

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

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DO GUANANDI**  
**(*Calophyllum brasiliense* Cambess) NO CONTROLE DO**  
**CRESCIMENTO DE *Microcystis aeruginosa***

Tiago Henrique Rombola

Tese apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da Unesp -  
Câmpus de Botucatu, para obtenção do  
título de Doutor em Ciências Florestais.

BOTUCATU - SP  
Novembro de 2014

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

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DO GUANANDI**  
*(Calophyllum brasiliense Cambess)* **NO CONTROLE DO**  
**CRESCIMENTO DE *Microcystis aeruginosa***

TIAGO HENRIQUE ROMBOLA

Iraê Amaral Guerrini

Orientador

Tese apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da Unesp -  
Câmpus de Botucatu, para obtenção do  
título de Doutor em Ciências Florestais.

BOTUCATU - SP  
Novembro de 2014

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

R762e Rombola, Tiago Henrique, 1982-  
Efeito do extrato aquoso de folhas de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) no controle do crescimento de *Microcystis aeruginosa* / Tiago Henrique Rombola. - Botucatu : [s.n.], 2014  
vi, 73 f. : ils. color., grafs., tabs., fots. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014  
Orientador: Iraê Amaral Guerrini  
Inclui bibliografia

1. Água - Qualidade. 2. Eutroficação. 3. Microcistinas. 4. Cianobacteria. 5. Toxinas cianobacterianas. I. Guerrini, Iraê Amaral. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU  
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DO GUANANDI  
(*Calophyllum brasiliense* CAMBESS) NO CONTROLE DO CRESCIMENTO  
DE *Microcystis aeruginosa*"

ALUNO: TIAGO HENRIQUE ROMBOLA

ORIENTADOR: PROF. DR. IRAÊ AMARAL GUERRINI

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. IRAÊ AMARAL GUERRINI



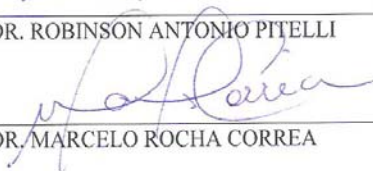
PROFA. DRA. MARIA DE LOURDES B. TRINDADE GALO



PROF. DR. LUIS RODRIGO MIYAMOTO BARBERIS



PROF. DR. ROBINSON ANTONIO PITELLI



PROF. DR. MARCELO ROCHA CORREA

Data da Realização: 21 de novembro de 2014.

### DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TIAGO HENRIQUE ROMBOLA – nascido em Jaboticabal – SP aos 12 de Novembro de 1982, filho de Luiz Carlos Rombola e Maria Aparecida Lopes Rombola. Graduado em Biomedicina pelo Centro Universitário de Araraquara –UNIARA- em Araraquara no ano de 2005, Mestre em Microbiologia Agropecuária pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV Campus de Jaboticabal - em Jaboticabal no ano de 2008.

"O Homem pretende ser imortal e para isso defende princípios efêmeros. Um dia, inexoravelmente, descobrirá que para ser imortal deverá defender princípios absolutos. Nesse dia, morrerá para a carne, efêmera, e viverá para o espírito, eterno. Será Imortal"

Dr.Celso Charuri

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e por me dar forças e coragem para atingir meus objetivos.

Aos meus pais, Luiz Carlos Rombola e Maria Aparecida Lopes Rombola pelo amor, carinho e apoio, já que sem eles eu não teria forças, pois são meu alicerce.

À minha noiva, Carolina Politi Penariols, pelo apoio nos momentos difíceis, pela amizade e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Iraê Amaral Guerrini, pela orientação, amizade e dedicação dispensada durante todo o período de pós-graduação.

Ao professor Dr. Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini, pela amizade e apoio dispensados durante todo o meu período de pós-graduação.

À Dr. Maria Lúcia Bueno Trindade, grande amiga, por toda a ajuda em momentos de dúvidas e apoio dispensados durante todo o meu período de pós-graduação.

Ao professor Dr. Armando Augusto Henriques Vieira da Universidade Federal de São Carlos-UFSCAR, por ceder gentilmente a colônia auxênica da cianobactéria, a qual o trabalho não poderia ser desenvolvido.

Aos amigos e funcionários do laboratório de Matologia, José Roberto M. Silva, José Guilherme Cordeiro e Marcelo Siono, pelas preciosas colaborações durante a realização dos experimentos.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

## Sumário

1. Resumo .....	1
2. Summary .....	3
3. Introdução .....	5
4. Revisão bibliográfica .....	8
4.1. Eutrofização .....	8
4.2. Cianobacterias .....	10
4.3. Microcistinas .....	13
4.4. Controle de ciano bactérias .....	15
4.5. Aspectos do Guanandi ( <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess ) .....	17
5. Material e métodos .....	19
5.1. Guanandi ( <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess) .....	19
5.2. Obtenção e Cultivo dos Microrganismos .....	21
5.3. Ensaio preliminar com extrato das folhas de 15 plantas de Guanandi decompostas em conjunto, sobre o crescimento de <i>Microcystis aeruginosa</i> .... em meio de cultivo.	21
5.4. Ensaio como os extratos das folhas de 15 plantas de guanandi, de forma individual, sobre o crescimento de <i>Microcystis aeruginosa</i> em meio de cultivo. ....	22
5.5. Extração da clorofila $\alpha$ das cianobactérias cultivadas nos ensaios. ....	22
5.6. Determinação da concentração de clorofila $\alpha$ , contidas nas cianobactérias, como indicador de crescimento dos cultivos. ....	23
5.7. Detecção e quantificação da microcistinas LR, RR, YR e LA presentes .... nas amostras de células e sobrenadante dos cultivos.	24
5.8. Análise dos dados .....	24
6. Resultados e Discussão .....	25
6.1. Ensaio Preliminar .....	25
6.2. Ensaios com extratos individualizados das 15 plantas .....	33
7. Conclusões .....	64
8. Referências .....	65
Apêndice .....	76

## 1. RESUMO

A água corresponde ao recurso da maior importância para a sobrevivência de toda a vida do planeta. O aumento das atividades agrícolas, urbanas e industriais, acarretam o acúmulo de efluentes ricos em fósforo e nitrogênio nos corpos d'água, causando a eutrofização. Em termos de qualidade de água, a eutrofização pode causar alteração na disponibilidade de oxigênio dissolvido, morte extensiva de peixes e aumento da incidência de florações de cianobactérias. A principal preocupação com as cianobactérias é a capacidade produzirem e liberarem as microcistinas, um grupo de hepatotoxinas, que é muito associada a incidentes de intoxicação em todo o mundo. O Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) é uma árvore de grande porte, que cresce em regiões de floresta da Mata atlântica, amazônica e em determinados locais do cerrado, desde a América Central até litoral norte de Santa Catarina, apresenta em extratos brutos de diferentes partes da planta (raízes, caules e folhas) atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e sobre algumas cepas Gram-negativas. O objetivo deste trabalho, foi avaliar o efeito de extratos

compostos com folhas de quinze plantas de Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess), no controle do crescimento em uma cepa de *Microcystis aeruginosa*, produtora de microcistina. Os extratos foram obtidos de folhas de guanandi submetidas à decomposição em água da represa de Barra Bonita-SP. Os experimentos foram conduzidos em meio de cultivo BG 11, onde 10% do volume do meio foi acrescido com os extratos das folhas de guanandi, submetidos à diferentes períodos de decomposição (7; 15; 30 e 60 dias), foram inoculados com a cepa de *Microcystis aeruginosa* (aproximadamente  $10^9$  células) e incubados em câmara climatizada, sob condições controladas (30°C e 12 horas de fotoperíodo). Após 10 dias de incubação, foram realizadas as análises quanto ao teor de clorofila, para determinar o crescimento das cianobactérias e o teor de microcistina produzida nas células e liberada no sobrenadante. Os resultados demonstraram que o extrato, pode ocasionar até 90% de inibição de crescimento da cianobactéria em meio de cultivo, a redução do crescimento, também reduz a quantidade de microcistina produzida. Portanto o uso das folhas do guanandi, decompostas em água, pode ser uma alternativa viável de controle preventivo das florações de cianobactérias .

Palavras chave: Qualidade de água; Eutrofização; Microcistina, cianobactéria; cianotoxina.

## 2. SUMMARY

### **EFFECT OF LIQUID EXTRACT OF GUANANDI LEAVES (*Calophyllum brasiliense* Cambess) ON GROWTH OF *Microcystis aeruginosa* .**

The expansion of the agricultural, urban and industrial activities leads to the accumulation of effluents like phosphorus and nitrogen in water bodies, causing eutrophication. In terms of water quality, eutrophication, can affect the oxygen dissolved availability, fish mortality and increased incidence of cyanobacteria blooms. The main concern with cyanobacterias is its ability to produce and release microcystins, a group of hepatotoxins, which is closely associated with poisoning incidents worldwide. Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) is a tree that grows in areas of Atlantic Forest, Amazon and certain sites of Cerrado, from Central America until the northern coast of Santa Catarina. Crude extracts from different parts of the tree (roots, stems and leaves) has demonstrated

antibacterial activity against Gram-positive bacteria and some of gram-negative strains. The objective of this work was to use an extract made with leaves of fifteen Guanandi plants (*Calophyllum brasiliense* Cambess) to control the growth of a strain of *Microcystis aeruginosa*, that can produces microcystin. The preparation of the extracts, was performed with the decomposition of leaves, in water from the reservatory of Barra Bonita, Brazil. The experiments were conducted in BG 11 culture medium, where 10% of the volume of the medium was supplemented with the extracts from the leaves, with different periods of decomposition (7, 15, 30 and 60 days), inoculated with approximately  $10^9$  cells of *Microcystis aeruginosa* and incubated in a climatic chamber under controlled conditions (30 ° C and 12 hour photoperiod), after 10 days analyzes were performed for: chlorophyll content to determine the growth and the content of microcystin produced and released in the supernatant. The results showed that the extracts can reach 90% of cyanobacteria growth inhibition in culture medium, with growth inhibition also reduces the amount of microcystin produced. Therefore the use of Guanandi leaves, left to decompose in water, can be a viable alternative, preventive control in cyanobacteria blooms.

**Key Words:** water quality; eutrophication; Microcystins, cyanobacteria; cyanotoxin.

### 3. INTRODUÇÃO

A água é um dos recursos de maior importância para a sobrevivência de toda a vida do planeta. Aproximadamente 70,9% de todo planeta Terra é coberto por água e apenas 29,1% é composto por solo. Essa proporção se divide, na maior parte, entre os cinco grandes oceanos que cercam a parte composta por terra dividida em continentes. Portanto, quase toda a água do planeta está concentrada nos oceanos e apenas uma pequena parte se encontra na forma de água potável. Desta a maior parte está sob a forma de gelo e neve ou abaixo da superfície (água subterrânea), e uma fração muito pequena de maneira disponível, na forma de lagos e rios ou como umidade do solo, da atmosfera e como componente dos mais diversos organismos.

O aumento de atividades urbanas e industriais, assim como a descarga de seus efluentes, acarreta o acúmulo de compostos ricos, especialmente em fósforo e nitrogênio nos corpos d'água. A este fenômeno, causado pelo excesso desses nutrientes (N e P), dá-se o nome eutrofização, que, aliado à elevação da temperatura, pelo aquecimento global, tem como uma das conseqüências, a rápida proliferação de cianobactérias no ambiente aquático, conhecida como “floração” (“*bloom*”). Paerl e Huisman (2008) relataram que o processo de aquecimento global poderá intensificar a formação de florações em razão do aumento da temperatura média da água em ecossistemas aquáticos, principalmente nos de

países de clima temperado, o que promoverá a estratificação térmica por períodos mais longos, condições propícias para a dominância de cianobactérias.

A característica mais marcante das cianobactérias é o fato de serem capazes de crescer nos mais diferentes ambientes, tendo sido identificadas em praticamente todos os ecossistemas aquáticos. A grande preocupação com o aumento das florações de cianobactérias em águas de abastecimento é a sua capacidade de produzir e liberar toxinas (cianotoxinas). Com isso fatalidades podem ocorrer em animais e seres humanos, quando estes consomem água com um grande número de células ( $>10^6$ /ml) de cianobactérias.

As microcistinas são uma família de hepatotoxinas, as heptapeptídicas, produzidas por vários gêneros de cianobactérias. São comumente encontradas em florações de água doce (CARMICHAEL, 1994; KONDO et al., 2002). São denominadas microcistinas por terem sido primeiramente detectadas no gênero *Microcystis*, com destaque especificamente para a espécie *Microcystis aeruginosa* (CARMICHAEL et al., 1988).

Segundo Carvalho (2006), as toxinas liberadas nas águas pelas cianobactérias, em decorrência de sua morte por senescência ou por ação de algicidas, podem afetar a saúde humana, pela ingestão, por contato em atividades de recreação, ou ainda pelo consumo de pescado contaminado. A principal via de intoxicação é pelo consumo oral da água sem tratamento para remoção dessas toxinas.

A necessidade de monitorar a presença de cianobactérias em águas de consumo humano tem se tornando um fator determinante para sua qualidade e a garantia de segurança para seu consumo. Os tratamentos convencionais nem sempre são eficazes no controle, na sua maioria atuam como algicidas, ocasionando a liberação das toxinas, pela lise das cianobactérias no meio aquoso, assim como a maioria dos tratamentos também são ineficazes na remoção da toxina da água.

Compostos naturais, com a habilidade de controlar o desenvolvimento das cianobactérias, podem ser uma importante alternativa para o manejo desses microrganismos em corpos hídricos. Como exemplo, tem-se o uso da palha da cevada no controle do crescimento e na prevenção das florações.

O *Calophyllum brasiliense* Cambess é uma espécie arbórea, conhecida vulgarmente como guanandi, que possui compostos com atividade antibacteriana, antifúngica, gastroprotetora, antiespasmódica, moluscicida, inibitória sobre o vírus HIV-1 e contra o parasita *Trypanosoma cruzi*. O extrato bruto de diferentes partes dessa planta

(raízes, caules, folhas, flores e frutos) apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e sobre algumas cepas Gram-negativas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de uso de extrato de folha de Guanandi (*Calophyllum brasiliense*), no controle do crescimento de *Microcystis aeruginosa* e na redução da produção e liberação da toxina microcistina e serem utilizadas como alternativas para os algicidas comuns, reduzindo os efeitos ambientais de suas utilizações; bem como, avaliar se os extratos produzidos com folhas de plantas distintas apresentam efeitos diferenciados sobre estes parâmetros.

## **4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1. Eutrofização**

A crescente eutrofização dos ambientes aquáticos tem sido produzida principalmente por atividades humanas, causando um enriquecimento artificial desses ecossistemas. O efeito mais óbvio da eutrofização é uma alteração da cadeia alimentar, que resulta em altos níveis de biomassa vegetal, incluindo algas microscópicas (ANDERSON et al, 2002; SMAYDA, 2004) que podem prejudicar o ambiente e os seres humanos. Isso ocorre por meio da produção de toxinas que se acumulam nos peixes e na água ou do acúmulo de biomassa, que por sua vez frequentemente afeta negativamente as cadeias alimentares, como vem ocorrendo em grande parte dos litorais do mundo e em águas continentais (HARRNESS, 2005) (Figura 1).



Figura 1. Trecho eutrofizado, com alta concentração de biomassa de algas (ecologiaverde.com/eutrofizacion/ acesso 2012).

As causas determinantes da eutrofização incluem fatores externos e internos aos próprios sistemas. Nos primeiros, deve ser incluída, sobretudo, a descarga excessiva de esgotos e de despejos agrícolas (adubos) que determinam um enriquecimento nutricional das águas dos lagos (TUNDISI, 2003; HENRY et al., 2004). Em longo prazo, a adição de nutrientes na água, mesmo em cargas reduzidas, pode causar eutrofização no sistema (BICUDO et al., 2002). Entre os fatores internos que podem acelerar a eutrofização das águas dos lagos e reservatórios, incluem-se os fluxos de nutrientes do sedimento/água (MOZETTO et al., 2001) e excreção e translocação de seus organismos residentes, como zooplâncton, peixes e invertebrados bentônicos (PERSON, 1997; SCHAUS et al., 1997; COVICH et al., 1999; PINTO-COELHO e GRECO, 1999; VANNI, 2002).

Em termos de qualidade de água, a eutrofização pode causar redução de oxigênio dissolvido, morte extensiva de peixes, perda de qualidade cênica e aumento da incidência de florações de algas e cianobactérias. O termo floração é utilizado para designar o crescimento intenso de algas e cianobactérias na superfície e sub-superfície dos corpos d'água. Esse crescimento de cianobactérias chega a formar uma densa camada de células, muitas vezes com vários centímetros de profundidade, que como consequência negativa diminui a eficiência e aumenta o custo do tratamento da água para abastecimento público (AZEVEDO, 2002; CARNEIRO, 2005).

Em algumas condições, especialmente em águas ricas em nutrientes, ou eutrofizadas, associadas às concentrações elevadas de fósforo e nitrogênio, com alta radiação solar as cianobactérias e outras algas eucarióticas se multiplicam rapidamente, formando os chamados “blooms” ou florações na superfície da água (CHORUS e BARTRAM, 1999). Segundo Carmichael (1992), esta situação tem sido a causa mais comum da dominância de cianobactérias em recursos naturais de água doce .

A principal preocupação com o aumento da ocorrência de florações de cianobactérias em mananciais de abastecimento de água é a capacidade desses microrganismos produzirem e liberarem toxinas (cianotoxinas) que podem provocar a mortalidade de peixes e outros animais, incluindo o homem, que consome a água ou organismos contaminados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; FERRÃO-FILHO, 2009; PANDOLPHO et al., 2013).

## **4.2. Cianobacterias**

Cianobactérias são microrganismos procariotos, autotróficos fotossintetizantes, de morfologia simples. Consistem em seres unicelulares de vida livre ou envoltos em um envelope mucilaginoso viscoso, com uma parede celular muito semelhante à das bactérias gram-negativas ou seja, uma camada de peptídeoglicano envolvendo a membrana celular. No protoplasma se encontram ribossomos 70s, material genético (DNA) difuso e membranas lamelares chamadas tilacóides, que servem como abrigo de pigmentos fotossintéticos, em sua maioria clorofila  $\alpha$ , para a captação de luz e realização dos processos de transferência de elétrons (LEE, 2008) .

O termo cianobactéria indica que esses seres procarióticos são mais próximos em relação às bactérias procarióticas do que das algas eucarióticas (Figura 2). Acredita-se que seus primeiros membros se originaram quando o teor de oxigênio atmosférico na terra era muito baixo, e que, provavelmente, esses microrganismos tenham sido responsáveis por seu aumento gradual na atmosfera. Acredita-se que a linha evolucionária das cianobactérias date de 2,7 bilhões de anos atrás (BUICK, 1992; BRASIER et al., 2002; DALTON, 2002).

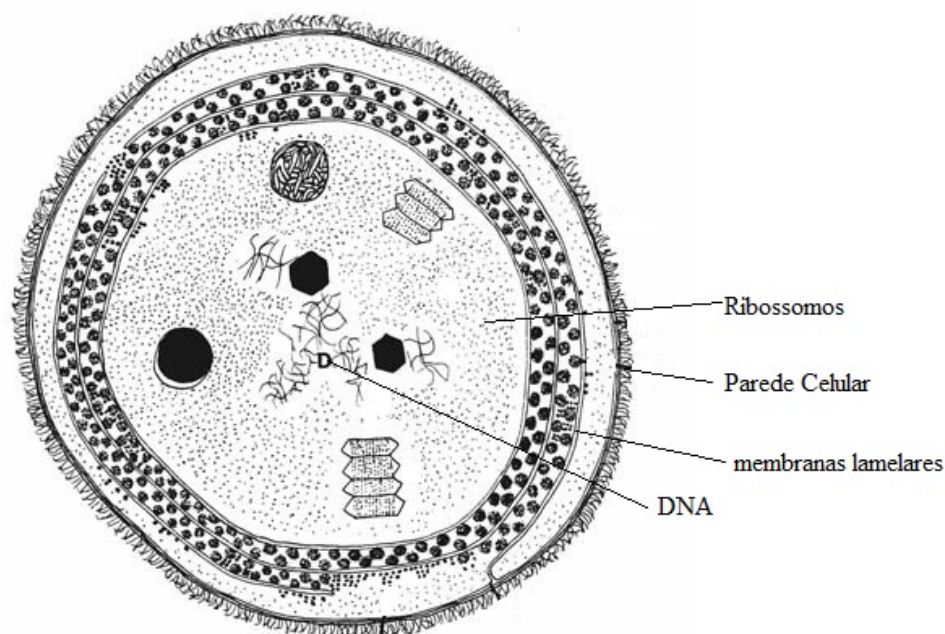


Figura 2. Estruturas da célula de Cianobactéria (Modificado de LEE, 2008).

Segundo Prescott et al (1975), a fotossíntese é seu principal modo de obtenção de energia para o metabolismo das cianobactérias, sua reprodução é assexuada e ocorre por simples divisão da célula. Sua organização celular demonstra que esses microrganismos são muito semelhantes bioquimicamente e estruturalmente das bactérias. São comumente encontradas no plâncton de ambientes marinhos e de água doce, possuindo mecanismos para tolerar a incidência de raios ultravioletas, concentrações elevadas de metais pesados, além de baixas concentrações de oxigênio, baixas e altas temperaturas (WHITTON e POTTS, 2000).

A característica mais marcante desses microrganismos é o fato de serem capazes de crescer nos mais diferentes ambientes, tendo sido identificados em praticamente todos os ecossistemas aquáticos (GIBSON e SMITH, 1982; TANDEAU de MARSAC e HOUMARD, 1993; CARNEIRO, 2005).

O seu desenvolvimento favorável ocorre em águas neutro-alcalinas onde o pH pode variar de 6 a 9, temperaturas entre 15 a 30°C, e que apresentem alta concentração de nutrientes como nitrogênio, fósforo e gás carbônico (REYNOLDS, 1984; CHORUS e BARTRAM, 1999).

As cianobactérias apresentam-se, geralmente, pouco numerosas em ambientes oligotróficos, mas sua importância (ecológica e humana) aumenta muito nos ecossistemas eutrofizados, nos quais o aumento de matéria orgânica favorece um aumento da quantidade de microrganismos decompositores livres na água e nos sedimentos, consumindo o oxigênio dissolvido na água. Além disto, em meios anaeróbicos, a disponibilidade das formas inorgânicas de nitrogênio e fósforo aumenta e o fornecimento desses nutrientes não é feito em relações equilibradas (N: P ~ 16, razão de Redfield). Essas condições, associadas a alta radiação solar, fazem com que as cianobactérias e outras microalgas eucarióticas se desenvolvam rapidamente, resultando em um crescimento ilimitado dos fitoplânctons, formando as florações na superfície da água (CHORUS e BARTRAM, 1999; CONLEY, 1999 )

Souza (2006) afirmou que a grande maioria das espécies de cianobactérias (cerca de 2400 espécies) são de água doce, fazendo parte da comunidade planctônica presente na coluna de água e também da comunidade perifítica aderida a substratos. A ocorrência das cianobactérias em lagos de zonas temperadas predomina no verão. A floração das cianobactérias é caracterizada quando a concentração de células é  $\geq 20000$  células mL<sup>-1</sup>, ou apresenta um biovolume  $\geq 2\text{mm}^3\text{L}^{-1}$ , ou ainda quando o teor de clorofila- $\alpha$  (pigmento fotossintético) é superior a 10mg m<sup>-3</sup>.

Atualmente, encontram-se identificados cerca de 150 gêneros de cianobactérias, englobando cerca de 200 espécies, dentre as quais, pelo menos 40 são consideradas como produtoras de toxinas (HITZFELD et al., 2000; JAYATISSA et al., 2006). Essas toxinas são metabolitos secundários naturais que apresentam uma potente atividade, capazes de induzir patologias graves mesmo em um curto período de exposição (CHORUS, 2001).

Segundo Carvalho (2006), as toxinas liberadas pelas cianobactérias, quando de sua senescência ou por ação de algicidas, pertencem a três classes químicas distintas. Por sua ação farmacológica, são caracterizadas como hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas, que podem afetar a saúde humana, tanto pela ingestão de água como por contato por imersão, ou ainda pelo consumo de pescado contaminado. Entretanto, a principal via de intoxicação é pelo consumo oral da água sem um tratamento adequado para remoção dessas toxinas.

### 4.3. Microcistinas

As microcistinas são uma família hepatotoxinas, heptapeptídicas (com sete aminoácidos), produzidas por vários gêneros de cianobactérias. São comumente encontradas em florações de água doce (CARMICHAEL, 1994; KONDO et al., 2002), denominadas microcistinas por terem sido primeiramente detectadas no gênero *Microcystis*, com destaque especificamente para a espécie *Microcystis aeruginosa* (CARMICHAEL et al., 1988).

Park et al. (2001) citam a existência de 64 tipos de microcistinas. E segundo Sigma e Aldrich (2006), já foram identificadas mais de 75 variantes desta toxina. As características do ambiente também podem afetar a produção e as proporções entre as concentrações dessas microcistinas em cianobactérias, conforme observado nos trabalhos de Sivonen (1990), Luukkainen et al. (1993), Rantala et al. (2004) e Kurmayer et al. (2005).

A variabilidade das microcistinas resulta da presença de diferentes aminoácidos em duas posições (X e Y), sendo que a forma predominante é a microcistina-LR com os aminoácidos leucina e arginina nas duas posições (Figura 3), respectivamente (MOFFIT et al., 2004).

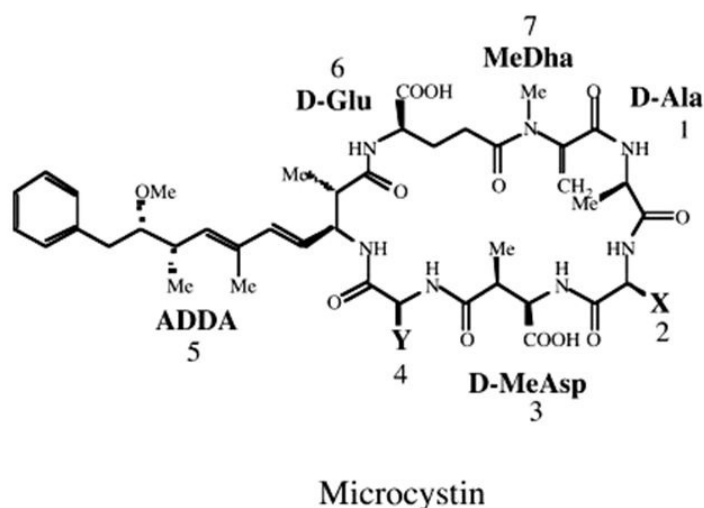


Figura 3. A Microcistina é um Heptapeptídeo cíclico com dois aminoácidos variáveis (X e Y). Fonte: Moffit et al. (2004).

A microcistina -LR foi a primeira microcistina quimicamente identificada. Em função disso, a maioria dos trabalhos científicos são conduzidos usando-a como base (CARMICHAEL, 1994). Ela vem sendo associada, em vários países, com a maioria dos incidentes envolvendo intoxicação por microcistina (FAWELL et al., 1994), pois de acordo com Wannemacher (1989), é um hepatopeptídeo cíclico com o peso molecular de 1000 daltons, muito estável em meio aquoso, resistente a variações extremas de pH e temperaturas até 300 °C. Harada, et al. (1996) relataram que em temperaturas acima de 40°C com pH alto ou baixo, sua hidrólise é muito lenta, atingindo 90% de degradação em pH 1 após aproximadamente 10 semanas e em mais de 12 semanas em pH 9.

A biodegradação e fotólise são as maneiras pelas quais as microcistinas podem ser naturalmente eliminadas das águas (KENEFFICK et al., 1993; TSUJI et al., 1994). Testes realizados por Cousins (1996) em laboratório, demonstraram que a microcistina, em baixas concentrações, em águas de reservatório, se degrada no período de 7 dias. Nas mesmas condições, mas com a água esterilizada, ela se mantém estável por 12 dias, enquanto que, com a água após destilação ela se mantém estável por 27 dias, indicando que a instabilidade da toxina em reservatórios naturais ocorre por biodegradação.

Quando purificada, a microcistina mostra-se estável a irradiação de luz solar. Entretanto amostras não purificadas e na presença dos pigmentos contidos nas cianobactérias, a radiação solar promove a degradação de maneira significativa, com um tempo de meia vida de aproximadamente 10 dias. Uma degradação mais rápida das toxinas, microcistina LR e RR (tempo de degradação da ordem de 10 minutos), ocorre quando expostas a luz UV com espectros de absorção muito próximos aos de sua absorção máxima (238 ~254 nm) (TSUJI et al., 1995).

A biodegradação das microcistinas vem sendo observada em vários ambientes aquáticos, como lagos e rios, mas apenas algumas bactérias com a capacidade de degradar a toxinas foram isoladas, com uma diversidade extremamente baixa dessas bactérias. As bactérias do gênero *Sphingomonas* apresentam o maior grupo de bactérias, com capacidade de degradar esses heptapeptídeos cíclicos (PARK et al., 2001; ISHII et al., 2004).

A maior parte da microcistina LR produzida pelas cianobactérias tende a permanecer no interior da célula e sua liberação ocorre quando as cianobactérias morrem e se tem lise celular, liberando assim as microcistinas no meio. Geralmente isso ocorre em presença de substâncias químicas muitas vezes utilizadas no próprio controle das florações (LAM et al., 1995).

Uma liberação repentina de microcistinas nos reservatórios de água para consumo, devido a morte das cianobactérias, pode apresentar um sério risco a vida dos animais e seres humanos que se beneficiam desse reservatório.

Em condições naturais, as microcistinas não ultrapassam prontamente as membranas celulares e não penetram na maioria dos tecidos. Porém após ingeridas, elas ultrapassam o íleo (parte final do intestino delgado) por meio de um sistema orgânico de transporte e se dirige para os hepatócitos (células do fígado), causando danos ao citoesqueleto, necrose e acúmulo de sangue no fígado. Como consequência, aumenta o peso do órgão (RUNNEGAR et al., 1991; ROMANOWSKA-DUDA et al., 2002), que pode levar a pessoa à morte por choque hemorrágico, e isto pode ocorrer em poucas horas após o consumo de uma alta dose de água contaminada com microcistinas (BELL e CODD, 1994).

Kotak et al. (1993) e Rinehart et al. (1994) relatam que são toxinas muito específicas, com uma dose letal (LD50) podendo chegar a apenas 15-20ug/kg, colocando-as entre as substâncias mais tóxicas já identificadas. Sua toxicidade pode ser comparada as substâncias químicas organofosforadas, e os sintomas da intoxicação por microcistina são diarreia, vômitos, arrepios, fraqueza e palidez (BELL e CODD, 1994).

No Brasil, o primeiro caso confirmado de intoxicação humana causada por cianotoxinas ocorreu no início de 1996, quando 60 pacientes renais crônicos morreram após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise, em Caruaru (PE). Análises confirmaram a presença de microcistinas no sistema de purificação de água da clínica e em amostras de sangue e fígado dos pacientes intoxicados (CARMICHAEL, 1996; JOCHIMSEN et al., 1998; POURIA et al., 1998; MAGALHÃES et al., 2006).

#### **4.4. Controle de cianobactérias**

De forma geral, as florações ocorrem quando as cianobactérias encontram no meio ambiente as características adequadas ao seu desenvolvimento, como águas eutrofizadas. Mas a floração também é limitada pelas condições ambientais, as cianobactérias não se desenvolvem bem em temperaturas abaixo de 15°C e tem como temperatura ótima em torno de 25°C; portanto as florações costumam ocorrer mais no verão e diminuem no inverno, sendo assim, a preocupação com o controle deve ocorrer no verão.

Verhoeven e Eloff (1975) reportaram o composto químico sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) como um algicida efetivo para o controle de cianobactérias em águas naturais, sendo que a toxicidade do composto está relacionada à concentração de células de cianobactérias. Para uma concentração de células em torno de  $1,8 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , a dose de 0,3 a 0,4 ppm de  $\text{Cu}^{2+}$  diminuiu a taxa de crescimento, mas doses acima de 0,5 ppm  $\text{Cu}^{2+}$  causam a morte das cianobactérias. Como a maioria das toxinas das cianobactérias são endotoxinas, sendo liberadas ao meio quando ocorre a morte e lise das células, o composto sulfato de cobre pode ser responsável pela liberação das toxinas (CETESB, 1973). Estudos mostram que o sulfato de cobre utilizado em altas concentrações pode eliminar quase todas as algas em mananciais (BURNETT et al., 2001).

Hoeger et al. (2002), testaram a eficácia do ozônio acoplado a várias filtrações para remover as cianobactérias tóxicas das águas em reservatórios. No entanto, águas com alta densidade de células reduzem a eficácia do processo e pode resultar em morte e lise das células ocorrendo também a liberação das toxinas.

O controle do desenvolvimento das cianobactérias com compostos naturais vem sendo observado na literatura, como é o caso do controle feito pela palha da cevada. Newman e Barret (1993) demonstraram que a palha de cevada em decomposição inibiu o crescimento da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*. Esse efeito inibitório pode ser atribuído à liberação de compostos químicos durante a decomposição; entretanto esses compostos ainda são desconhecidos. Algumas hipóteses foram levantadas tais como: os compostos possam ser antibióticos liberados por microrganismos durante a decomposição; ou que a decomposição possa liberar compostos que foram modificados durante o processo e que possuam efeito inibitório no crescimento das cianobactérias; ou que sejam componentes fenólicos provenientes da degradação da parede celular. Aparentemente o controle realizado pela palha da cevada é um controle algistático não algicida, sendo assim a palha da cevada pode auxiliar no controle das florações sem causar morte das células e liberação de toxinas.

O tratamento com cloro também pode causar a morte e a liberação de toxinas nas águas. Concentrações muito altas de cloro podem neutralizar as toxinas, mas o tratamento convencional não remove por completo as toxinas, até mesmo quando utilizado de adição de carbono ativo no tratamento (LAMBERT et al., 1996).

Segundo a Portaria nº 518/março/2004, revisada, do Ministério da Saúde, no segundo parágrafo é vetado o uso de algicidas para o controle de crescimento de

cianobactérias ou qualquer intervenção no manancial que promova a lise das células desses microorganismos, quando a densidade das cianobactérias exceder 20.000 células mL<sup>-1</sup>, sob pena de comprometimento da avaliação de riscos à saúde associados às toxinas.

A necessidade de se monitorar a presença de cianobactérias em águas de consumo humano tem se tornado um fator determinante para sua qualidade e a garantia de segurança para consumo. Aparentemente, o uso de compostos naturais que auxiliem no controle do crescimento das cianobactérias apresenta-se como uma das alternativas importantes para o controle desses organismos em corpos hídricos.

#### **4.5. Aspectos do Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess )**

As plantas são utilizadas desde os primórdios da humanidade para tratamento e cura de enfermidades e têm contribuído significativamente para o fortalecimento da indústria farmacêutica, através do isolamento de substâncias bioativas, cuja complexidade de muitas estruturas químicas inviabilizaria técnica e economicamente a síntese orgânica de tais substâncias (NOLDIN et al., 2006).

*O Calophyllum brasiliense* Cambess, pertence à família Clusiaceae e é conhecido vulgarmente como guanandi, guarandi ou jacareúba. É uma árvore de grande porte, podendo chegar a 40 m de altura e 1 a 3 m de diâmetro, que se desenvolve preferencialmente em florestas semidecídua ou ombrófila densa, crescendo principalmente em regiões de floresta da Mata atlântica, amazônica e em determinados locais do cerrado, desde a América Central até litoral norte de Santa Catarina (PEREIRA et al., 1967; JOLY, 1975; GASPAROTTO-JÚNIOR et al., 2005; NOLDIN et al., 2006; MUNDO e DUARTE, 2008).

Sua madeira pode ser utilizada para construções, pisos e mobílias, sendo que, outras partes da árvore, como as folhas e cascas do caule sob forma de chás, tem sido muito empregadas na medicina popular para tratar injúrias como dor, processos infecciosos, inflamatórios e úlceras (OLIVEIRA, 1994; DHARMARATNE et al., 1999; NOLDIN et al., 2006).

Estudos fitoquímicos do caule e da resina do *Calophyllum brasiliense* revelaram a presença de diversas substâncias químicas, tais como xantonas, sitosterol e triterpenos. Algumas cumarinas isoladas desta espécie apresentaram atividade anticancerígena e antimicrobiana (CHILPA et al., 2004; GASPAROTTO-JÚNIOR et al., 2005). O extrato

bruto de diferentes partes da planta (raízes, caules, folhas, flores e frutos) também apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas e sobre algumas cepas Gram-negativas (NOLDIN et al., 2006)

São, ainda, comprovadas as atividades antibacterianas (COTTIGLIA et al., 2004; PRETTO et al., 2004; YASUNAKA et al., 2005), antifúngica (REYES-CHILPA et al., 1997), gastroprotetora (SARTORI et al., 1999), antiespasmódica (EMENDORFER ET al., 2005), moluscicida (GASPAROTTO-JÚNIOR et al., 2005), inibitória sobre o vírus HIV-1 (HUERTA-REYES et al., 2004) e contra o parasita *Trypanosoma cruzi* (ABE et al., 2004; MUNDO e DUARTE, 2008).

Por apresentar atividade antibacteriana, foi proposto neste trabalho o uso das folhas do guanandi *Calophyllum brasiliense* Cambess, para tentativa do controle do crescimento de *Microcystys aeruginosa*, produtora da toxina microcistina LR, podendo ser considerada uma alternativa natural no controle dessa cianobactéria em reservatórios e lagos ornamentais ou de criação de peixes ou mesmo para facilitar o tratamento dessas águas.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess)

As plantas de Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess), utilizadas nos experimentos, foram cultivadas em vasos (Figura 4) e apresentavam aproximadamente dois anos de idade e em média 70 cm de altura.



Figura 4. Plantas de Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess), utilizadas na avaliação de seus efeitos no controle de cianobactérias.

Suas folhas foram utilizadas para obtenção dos extratos utilizados no trabalho, onde para o processo de decomposição utilizou-se 250 gramas de folha para 1L de água, da represa de Barra Bonita-SP, filtrada em filtro de fibra de vidro de 47 mm, a vácuo, e esterilizada por autoclavação, para então adicionar as folhas que permaneceram em decomposição, por períodos determinados nos ensaios, sob condições controladas de temperatura e iluminação (30°C e 12 horas de Luz).

Os extratos foram filtrados a vácuo, em filtro de fibra de vidro de 47 mm, para remoção de macro impurezas, e realizadas as medidas de pH e condutividade elétrica.

A análise nutricional dos extratos para os elementos K, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, Mn, e Na foi realizada através de leitura em espectrofotômetro de absorbância atômica; para P através de colorimetria com o método do vanadato; para o S através de turbidimetria e para o N por destilação no método semi-micro Kjeldahl. As análises nutricionais foram realizadas no Departamento de Solos e Recursos Ambientais.

Essas análises foram realizadas para que se pudesse caracterizar possíveis propriedades que poderiam apresentar efeitos inibitórios sobre o crescimento da cepa de *Microcystis aeruginosa*.



Figura 5. Decomposição das folhas de guanandi para produção dos extratos utilizados nos ensaios.

## 5.2. Obtenção e Cultivo dos Microrganismos

A cepa axênica de *Microcystis aeruginosa*, produtora de microcistina LR, cedida pela Universidade Federal de São Carlos-UFSCAR, foi mantida em meio de cultivo BG11 (Figura 5), composto por  $\text{NaNO}_3$   $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $0,04 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,075 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $0,036 \text{ g L}^{-1}$ , ácido Cítrico  $0,006 \text{ g L}^{-1}$ , citrato de amônio férrico  $0,006 \text{ g L}^{-1}$ , EDTA  $0,001 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{NaCO}_3$   $0,02 \text{ g L}^{-1}$  e traços de metais ( $\text{H}_3\text{BO}_3$   $2,86 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $1,81 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,222 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $0,39 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $0,079 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $49,4 \text{ mg L}^{-1}$ ), sob condições controladas ( $30^\circ\text{C}$  e 12 horas de fotoperíodo) em câmara climatizada.



Figura 6. Cultivo de *Microcystis aeruginosa*, produtora de microcistina LR cedida pela Universidade Federal de São Carlos-UFSCAR.

## 5.3. Ensaio preliminar com extrato das folhas de 15 plantas de Guanandi decompostas em conjunto, sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* em meio de cultivo.

No ensaio preliminar, o extrato, foi obtido utilizando-se folhas de 15 plantas de guanandi, coletadas aleatoriamente nas plantas e acondicionadas em conjunto, obtendo-se o extrato como descrito no item 6.1, por um período de 30 dias de decomposição.

Em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultivo BG 11, suplementado com as concentrações de extrato de 10%, 5% e 1% e filtrados, em filtro Millex HV (Millipore)

0,45 µm, com membrana durapore 13 mm para remoção de contaminantes, inoculou-se aproximadamente  $10^9$  células de cianobactéria a partir de inóculo fresco (com aproximadamente 4 dias de cultivo). Os tubos foram mantidos sob condições controladas a 30°C e 12 horas de fotoperíodo por 10 dias, sendo agitados manualmente diariamente para estimular o crescimento.

#### **5.4. Ensaio como os extratos das folhas de 15 plantas de guanandi, de forma individual, sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* em meio de cultivo.**

Para o ensaio realizado com os extratos de cada planta, individualmente, as folhas de cada uma das plantas, foram coletadas de forma aleatória e cortadas em tamanhos uniformes de aproximadamente 2 cm e mantidas nas condições de decomposição especificadas no item 6.1. Após os períodos de 07; 15; 30 e 60 dias de decomposição das folhas, foram retirados 20 ml de cada solução para se realizar o estudo do efeito dos diferentes extratos sobre a inibição da cianobactéria.

Em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultivo BG 11, suplementado com a concentração de 10% ,de extrato e filtrados, em filtro Millex HV (Millipore) 0,45 µm, com membrana durapore 13 mm para remoção de contaminantes, inoculou-se aproximadamente  $10^9$  células de cianobactéria a partir de inóculo fresco (com aproximadamente 4 dias de cultivo). Os tubos foram mantidos sob condições controladas a 30°C e 12 horas de fotoperíodo por 10 dias, sendo agitados manualmente diariamente para estimular o crescimento.

#### **5.5. Extração da clorofila $\alpha$ das cianobactérias cultivadas nos ensaios.**

Após o período de crescimento da cianobactéria, as amostras foram submetidas a centrifugação em tubos falcon de 15 ml, por 30 minutos, 1118 g a 4°C , na centrífuga Rotanta 460 R, para se separar as células do sobrenadante. Ao precipitado de células, foi adicionado metanol em fase 80:20 de água purificada e submetidos a 30 minutos de tratamento de ultrassom, com frequência ultra-sônica de 42 KHz, durante 30 minutos, para o rompimento das células e melhor extração da clorofila  $\alpha$ . Após esse processo, as amostras foram então filtradas, em filtro Millex HV (Millipore) 0,45 µm, com membrana

durapore 13 mm, 1ml desse extrato foi utilizado para a determinação da clorofila alfa (Figura 9).

O sobrenadante (meio de cultivo) também foi filtrado e armazenado para posterior análise da presença de toxinas

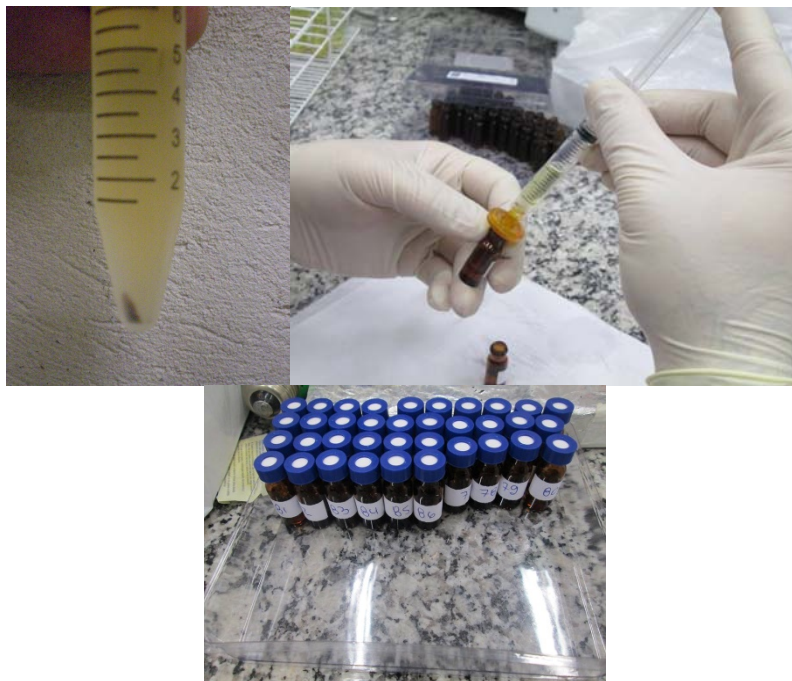


Figura 7. Processo de extração da clorofila  $\alpha$  da cianobactérias cultivadas com os extratos das folhas de guanandi nos ensaios.

### **5.6. Determinação da concentração de clorofila $\alpha$ , contidas nas cianobactérias, como indicador de crescimento dos cultivos.**

Após a extração da clorofila das amostras em metanol (fase 80:20), determinou-se o teor de clorofila  $\alpha$ , por meio de cromatografia de fase líquida (HPLC). Utilizou-se volume de injeção de amostra de 25 $\mu$ l, fase móvel de metanol e fluxo de injeção de 0,6ml/min, coluna Synergi 2.5 $\mu$  Hydro-RP 100A 50 x 4.60mm 2.5 micron, detector de fluorescência, em comprimentos de onda de excitação a 440 nm e emissão a 680 nm, com tempo de retenção de 4,9 min. Nas condições utilizadas, o método cromatográfico empregado permitiu a quantificação de concentrações de clorofila iguais ou superiores a

$1\mu\text{g L}^{-1}$  (menor concentração utilizada na elaboração da curva de calibração e que produziu cromatograma com relação sinal / ruído superior a 5).

### **5.7. Detecção e quantificação da microcistinas LR, RR, YR e LA presentes nas amostras de células e sobrenadante dos cultivos.**

A determinação das concentrações das toxinas foi feita através de cromatografia em fase líquida em detector de massa atômica no cromatógrafo LC/MS/MS QTrap 3200, com volume de injeção de amostra de  $25\mu\text{l}$ , fase móvel de metanol e fluxo de injeção de  $0,4\text{ ml/min}$ , coluna Synergi  $2.5\mu\text{ Hydro-RP 100A } 50 \times 4.60\text{mm } 2.5\text{ micron}$ , nas amostras de extração de clorofila em fase 80:20 de metanol: água e nos sobrenadantes filtrados. As substâncias foram detectadas e quantificadas utilizando procedimentos específicos de MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), em concentrações iguais ou superiores a  $0,5\mu\text{g L}^{-1}$  (menores concentrações dos compostos utilizadas para elaborar as curvas de calibração e que produziu cromatograma com relação sinal / ruído superior a 5). A alta sensibilidade da metodologia analítica utilizada permitiu a leitura direta das amostras sem a necessidade de concentrá-las.

### **5.8. Análise dos dados**

Os resultados foram submetidos à análise de variância, pelo teste “F” a 10% de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste t a 10% de probabilidade.

$IC = (t \times \text{desvpad}) / \text{raiz nr}$ , onde:

IC = intervalo de confiança;

t = valor de t tabelado, ao nível de 10% de probabilidade;

desvpad = desvio padrão;

raiz nr = raiz quadrada do número de repetições.

Foi realizada também uma análise de correlação entre o crescimento (clorofila) e os diferentes compostos avaliados como as toxinas, dados nutricionais, pH e condutividade.

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1. Ensaio Preliminar**

O ensaio preliminar com o extrato misto das folhas de 15 plantas, em concentrações de 10, 5 e 1% do volume do meio de cultivo do microrganismo, demonstrou que a melhor taxa de inibição da clorofila  $\alpha$ , foi com 10% de extrato no meio de cultivo (Tabela 1). Pela análise da Tabela 1 pode-se observar que todas as concentrações do extrato reduziram significativamente o teor de clorofila das amostras, indicando uma importante redução no crescimento da cianobactéria, o que pode ser claramente observado pela porcentagem de inibição do crescimento que foi de 69,2%; 54,3% e 19,1% respectivamente para os extratos utilizados nas concentrações de 10, 5 e 1% no meio de cultura.

Na Tabela 2 podem-se observar os efeitos dos extratos mistos sobre a produção da toxina microcistina LR, contida nas células das cianobactérias, na Tabela 3 os teores de

microcistina LR que permaneceram no sobrenadante do meio de cultivo. Todas as concentrações estudadas reduziram significativamente o teor de microcistina nas células e no sobrenadante, com destaque para o extrato na maior concentração (10%) a qual apresentou as maiores reduções nos teores de toxina nas células e no sobrenadante.

Tabela 1. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Tratamentos	Teor de clorofila mg L <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Inibição %
Controle	1,833	*	69,2
10%	0,565		
Controle	1,833	*	54,3
5%	0,837		
Controle	1,833	*	19,1
1%	1,483		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>121,72</b>	
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,040</b>	
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>2,9</b>	

Tabela 2. Valores da produção de microcistina LR nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
Controle	732,667	*	68,4
10%	231,667		
Controle	732,667	*	20,7
5%	581,333		
Controle	732,667	*	14,9
1%	623,333		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>341,16</b>	
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>30,723</b>	
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>5,0</b>	

Tabela 3. Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição..

Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
Controle	315,667	*	83,6
10%	51,767		
Controle	315,667	*	13,8
5%	272,000		
Controle	315,667	*	33,5
1%	210,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>471,81</b>	
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>11,593</b>	
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>4,7</b>	

Neste trabalho, foram quantificadas as microcistinas LR, LA, RR e YR, mas nos resultados foram relatados apenas os dados relativos à toxina LR. Como pode ser observado nas Figuras subsequentes, que ilustram as correlações da microcistina LR com o total de todas as microcistinas quantificadas nas células (Figura 10), no sobrenadante (Figura 11) e total (células + sobrenadante, Figura 12), a toxina LR apresenta o mesmo padrão de ocorrência que as demais toxinas. Além disso, a quantidade de microcistina LR produzida nos ensaios é bem mais expressiva, cerca de 90% maior que as demais microcistinas (LA, RR e YR), o que se deve ao fato da cepa de *Microcystis aeruginosa* ser produtora de microcistina LR.

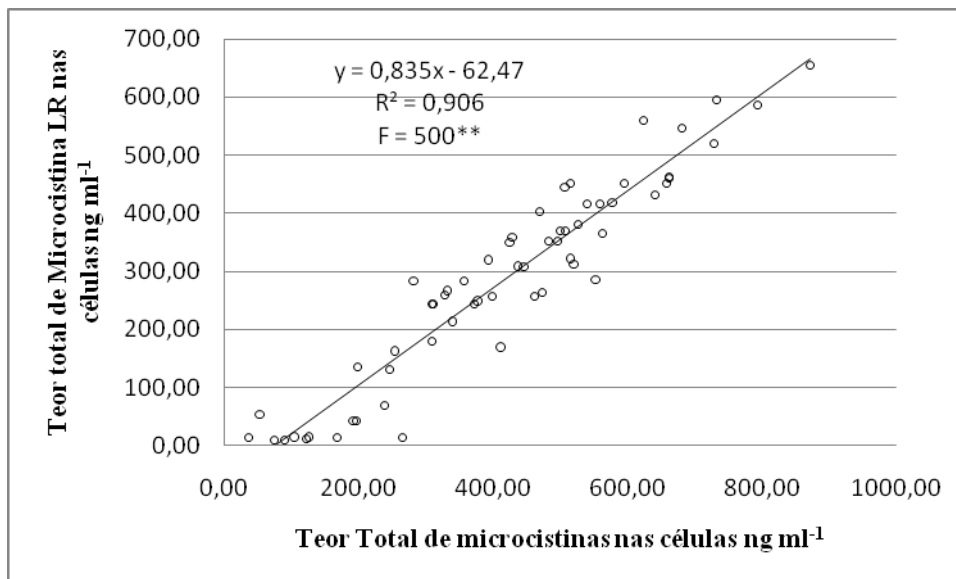


Figura 8. Correlação do total de microcistinas (LA, LR, RR e YR) nas células de cianobactéria, com o total de microcistina LR nas células de cianobactéria.

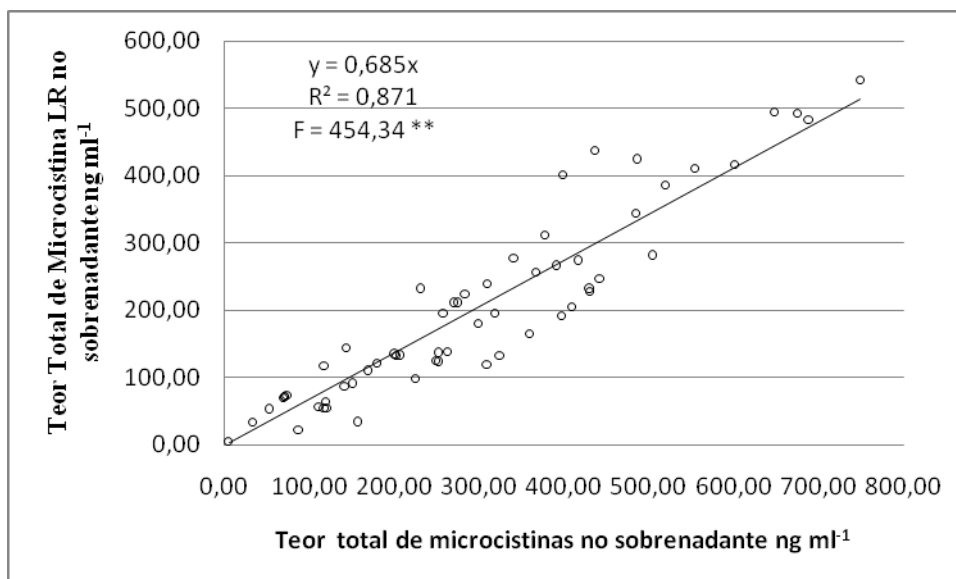


Figura 9. Correlação do total de microcistinas (LA, LR, RR e YR) no sobrenadante do meio de cultivo, com o total de microcistina LR no sobrenadante do meio de cultivo.

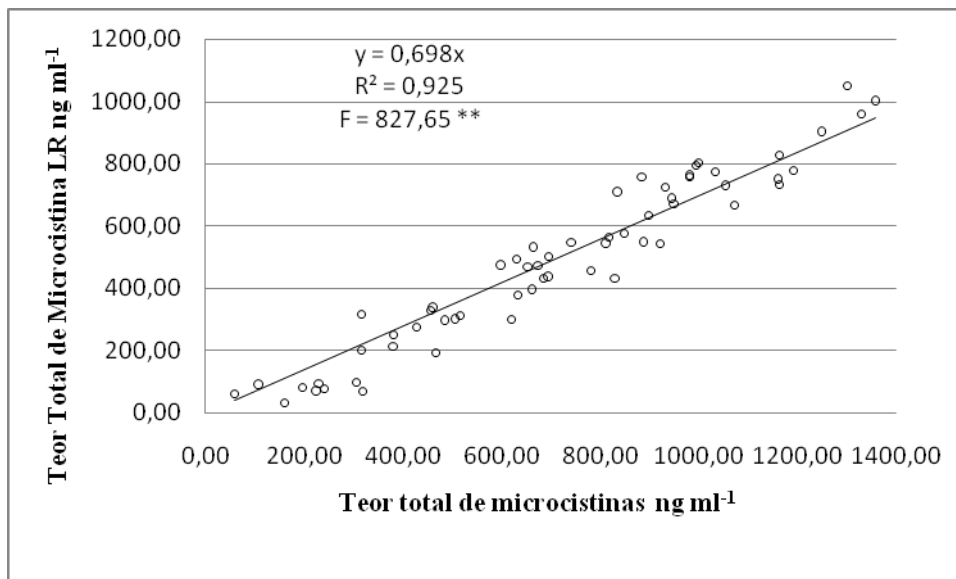


Figura 10. Correlação do total de microcistinas (LA, LR, RR e YR) com o total de microcistina LR.

A Figura 13 ilustra a correlação entre teor total de microcistinas e teor de clorofila, indicando uma tendência de aumento das microcistinas com o aumento do teor de clorofila. Na Figura 14 pode ser observada a correlação entre total de microcistina LR contida nas células e o teor de clorofila (usado como indicador do crescimento da cianobactéria). Tal correlação também evidencia uma tendência de aumento da microcistina LR com o aumento do teor de clorofila.

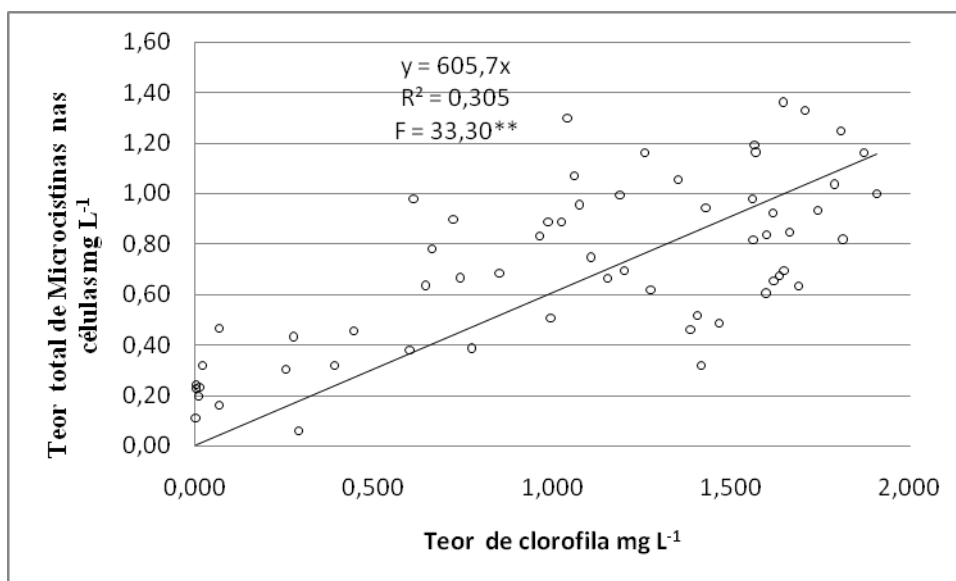


Figura 11. Correlação entre o teor de clorofila nos ensaios com o teor total de Microcistina produzido nos ensaios .

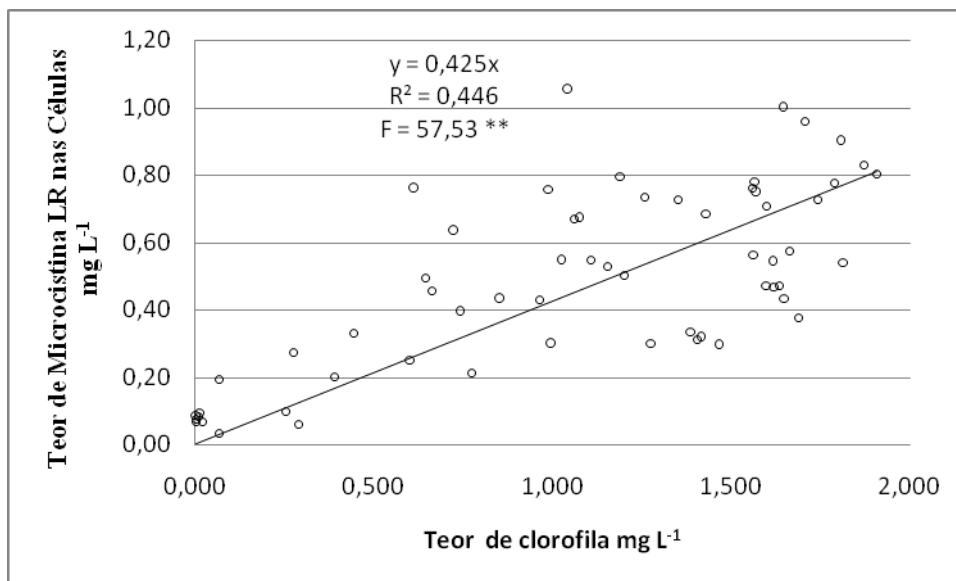


Figura 12. Correlação do total de microcistina LR contida nas células de cianobactéria, com o crescimento da cianobactéria (teor de clorofila).

O pH e a condutividade elétrica dos extratos foram medidos para avaliar se durante a decomposição das folhas as variações desses parâmetros poderiam interferir no crescimento das cianobactérias. Como pode se observar nas Figuras 15 e 16, eles não apresentaram efeitos sobre o crescimento da cianobactéria em meio de cultivo.

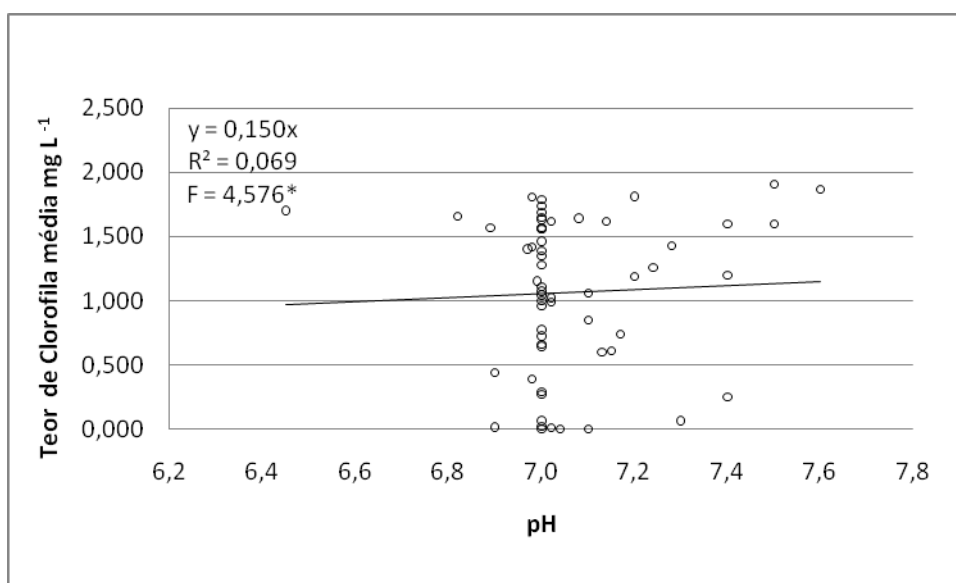


Figura 13. Correlação do pH com o crescimento da cianobactéria (teor de clorofila).

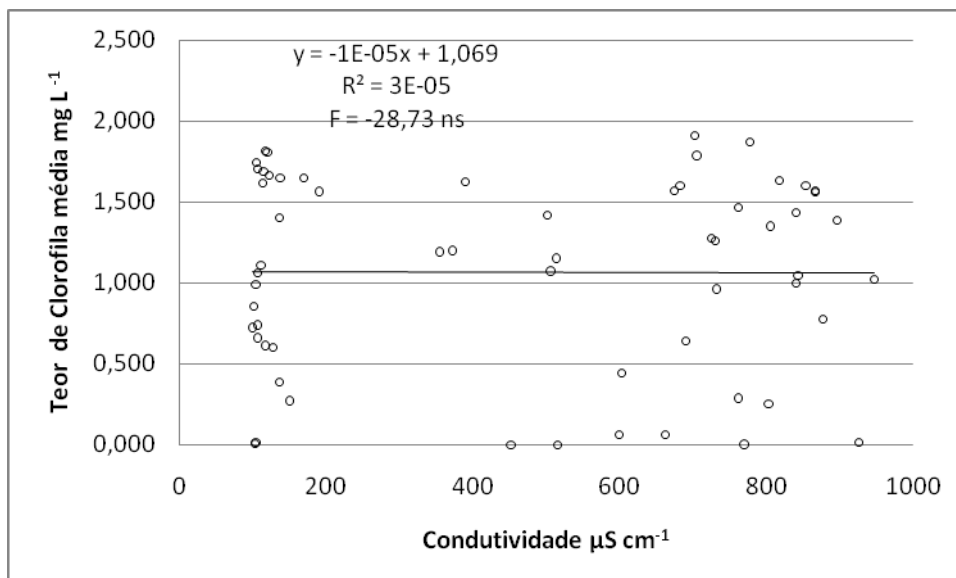


Figura 14. Correlação da condutividade elétrica com o crescimento da cianobactéria (teor de clorofila).

O fato de os extratos terem permanecido com o pH na faixa em torno de 7 (Apêndice A, B, C e D) devido ao efeito tamponante do meio de cultura BG 11, o pH e a condutividade elétrica não influenciaram o crescimento da cianobactéria.

Dos fatores nutricionais analisados (Apêndice A, B, C e D), os que poderiam interferir sobre o crescimento da cianobactéria, no meio de cultivo, seriam o nitrogênio e o fósforo, que são os elementos fundamentais para o crescimento das cianobactérias (REYNOLDS, 1984; CHORUS e BARTRAM, 1999). Como se pode observar nas Figuras 17 e 18, a concentração desses nutrientes nos extratos não afetou o crescimento da cianobactéria nos ensaios.

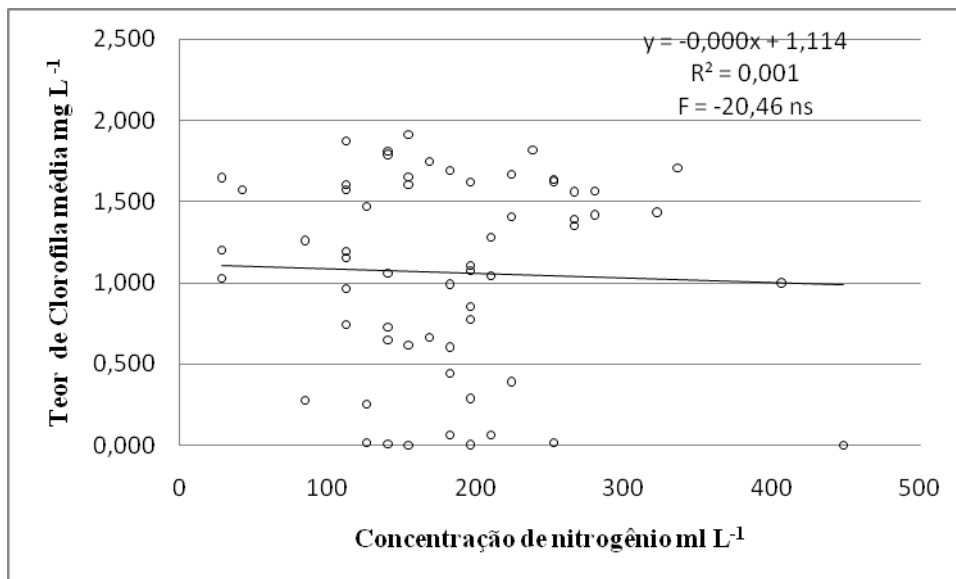


Figura 15. Correlação da concentração de nitrogênio com o crescimento da cianobactéria (teor de clorofila).

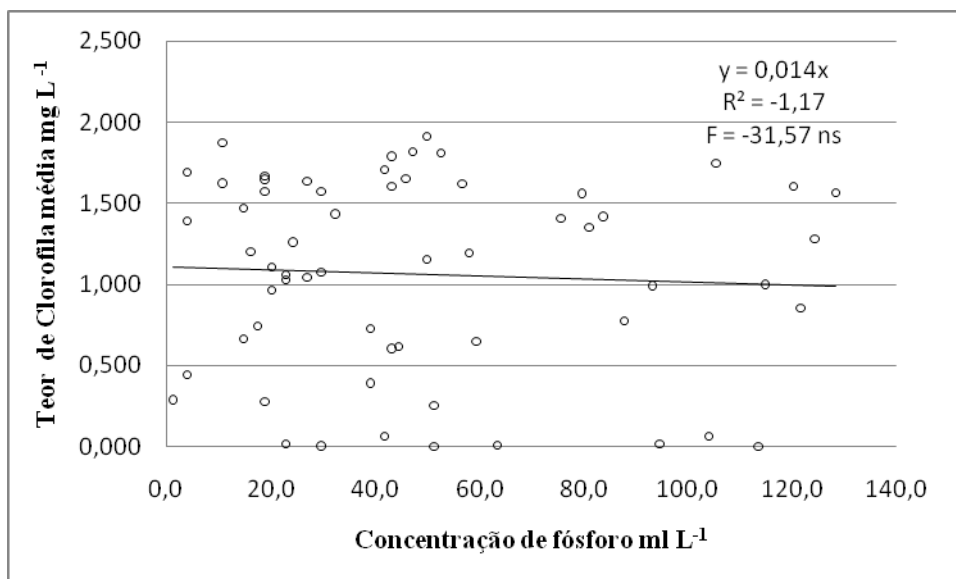


Figura 16. Correlação da concentração de fósforo, com o crescimento da cianobactéria (teor de clorofila).

## 6.2. Ensaios com extratos individualizados das 15 plantas

Os resultados dos extratos, obtidos em separado das quinze plantas, sobre o crescimento da *Microcystis aeruginosa* são apresentados planta a planta em relação aos

seus controles e ao tempo de decomposição dos extratos. Todos os extratos foram utilizados na concentração de 10%.

Na Tabela 4 pode-se observar os efeitos dos extratos da planta 1, obtidos com diferentes períodos de decomposição, sobre o crescimento da cianobactéria (medido pelo teor de clorofila) e a porcentagem de inibição destes extratos no crescimento da cianobactéria. A maior porcentagem de inibição foi obtida quando foi utilizado o extrato obtido com 15 dias de decomposição. Os extratos obtidos com 7, 30 e 60 dias de decomposição não inibiram significativamente o teor de clorofila  $\alpha$ .

Os efeitos dos extratos sobre a produção da toxina LR nas células da cianobactéria (Tabela 5) foram significativos para todos os extratos avaliados, sendo o maior decréscimo obtido no extrato com 15 dias de decomposição. Para a toxina LR extraída do sobrenadante (Tabela 6), decréscimos significativos na produção da toxina foram obtidos somente com extratos de 15 e 30 dias de decomposição. O período de decomposição do extrato da planta 1 de maior eficácia, em relação à inibição do crescimento da cianobactéria e decréscimo na produção da toxina LR, foi o de 15 dias.

Tabela 4. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila mg L <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	ns	10,2
7	Planta 1	1,645		
15	Controle	1,687	*	83,8
15	Planta 1	0,274		
30	Controle	1,829	ns	7,7
30	Planta 1	1,687		
60	Controle	1,822	ns	6,4
60	Planta 1	1,705		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>21,49</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,198</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>12,6</b>		

Tabela 5. Valores da produção de microcistina LR, nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	10,5
7	Planta 1	656,000		
15	Controle	321,000	*	86,9
15	Planta 1	42,033		
30	Controle	417,667	*	41,4
30	Planta 1	244,667		
60	Controle	591,000	*	29,2
60	Planta 1	418,667		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>129,70</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>35,035</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>8,1</b>		

Tabela 6. Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	315,667	ns	0
7	Planta 1	343,000		
15	Controle	511,000	*	54,5
15	Planta 1	232,333		
30	Controle	272,333	*	51,2
30	Planta 1	133,000		
60	Controle	476,333	ns	0
60	Planta 1	541,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>28,96</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>46,934</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>13,2</b>		

Os efeitos dos extratos da planta 2 podem ser observados nas Tabelas de 7 a 9. Na Tabela 7 pode-se observar que os extratos da planta 2 obtidos em todos os períodos de decomposição não afetaram significativamente o teor de clorofila  $\alpha$ . Entretanto, a quantidade de microcistina LR nas células da cianobactéria foi significativamente afetada pelos extratos obtidos com todos os períodos de decomposição (Tabela 8). Para a toxina

avaliada no sobrenadante (Tabela 9), os extratos obtidos com 7 e 15 dias de decomposição ocasionaram decréscimos significativos na produção da toxina, sendo de 60% e 49,8%, respectivamente.

Tabela 7. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila mg L <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	ns	9,3
7	Planta 2	1,662		
15	Controle	1,687	ns	4,2
15	Planta 2	1,617		
30	Controle	1,829	ns	0,7
30	Planta 2	1,816		
60	Controle	1,822	ns	0,8
60	Planta 2	1,807		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>0,77</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,176</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>9,9</b>		

Tabela 8. Valores da produção de microcistina LR, nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	38,4
7	Planta 2	451,333		
15	Controle	321,000	*	11,0
15	Planta 2	285,667		
30	Controle	417,667	*	36,7
30	Planta 2	264,333		
60	Controle	591,000	*	29,4
60	Planta 2	417,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>83,25</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>30,536</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>7,0</b>		

Tabela 9. . Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	315,667	*	60,6
7	Planta 2	124,333		
15	Controle	511,000	*	49,8
15	Planta 2	256,333		
30	Controle	272,333	ns	0
30	Planta 2	276,667		
60	Controle	476,333	ns	0
60	Planta 2	483,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>35,87</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>39,876</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>11,654</b>		

Na Tabela 10 observa-se os efeitos dos extratos da planta 3, obtidos com diferentes períodos de decomposição, sobre o crescimento da cianobactéria e a porcentagem de inibição destes extratos no crescimento da cianobactéria. Assim, a maior porcentagem de inibição foi obtida quando foi utilizado o extrato obtido com 15 dias de decomposição, e uma pequena inibição no extrato obtido com 7 dias.

O efeito dos extratos sobre a produção da toxina LR nas células da cianobactéria (Tabela 11) foi mais significativo para o extrato com 15 dias de decomposição. Considerando a toxina LR extraída do sobrenadante (Tabela 12), decréscimo significativo na produção da toxina foi obtido também, com o extrato de 15 dias de decomposição.

Tabela 10. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila mg L <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	*	44,1
7	Planta 3	1,024		
15	Controle	1,687	*	99,1
15	Planta 3	0,015		
30	Controle	1,829	ns	24,1
30	Planta 3	1,388		
60	Controle	1,822	ns	14,5
60	Planta 3	1,558		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>3,42</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,588</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>41,8</b>		

Tabela 11. Valores da produção de microcistina LR, nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	48,0
7	Planta 3	381,000		
15	Controle	321,000	*	97,1
15	Planta 3	9,167		
30	Controle	417,667	*	41,7
30	Planta 3	243,333		
60	Controle	591,000	*	40,8
60	Planta 3	350,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>127,76</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>33,582</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>8,7</b>		

Tabela 12. . Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	315,667	*	47,7
7	Planta 3	165,000		
15	Controle	511,000	*	83,1
15	Planta 3	86,400		
30	Controle	272,333	*	66,3
30	Planta 3	91,833		
60	Controle	476,333	*	13,9
60	Planta 3	410,333		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>198,37</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>20,708</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>7,0</b>		

Na Tabela 13 estão demonstrados os efeitos dos extratos da planta 4, obtidos com diferentes períodos de decomposição, sobre o crescimento da cianobactéria e a % de inibição destes extratos no crescimento da cianobactéria. Assim a maior porcentagem de inibição foi obtida quando foi utilizado o extrato obtido com 15 dias de decomposição.

O efeito dos extratos da planta 4 sobre a produção da toxina LR nas células da cianobactéria (Tabela 14) foi mais significativo também para o extrato com 15 dias de decomposição, e manteve um decréscimo aproximadamente semelhante nos outros períodos.

No sobrenadante, a quantidade da toxina LR extraída (Tabela 15) apresentou decréscimo significativo quando foi adicionado ao meio de cultura o extrato de 15 dias de decomposição (89,3%). No entanto, o extrato com período de decomposição de 7 dias também ocasionou um decréscimo considerável (68,8%).

Tabela 13. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila mg L <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	*	34,5
7	Planta 4	1,201		
15	Controle	1,687	*	99,9
15	Planta 4	0,002		
30	Controle	1,829	*	11,3
30	Planta 4	1,621		
60	Controle	1,822	*	34,6
60	Planta 4	1,191		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>140,36</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,092</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>6,5</b>		

Tabela 14. Valores da produção de microcistina LR, nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	45,1
7	Planta 4	402,333		
15	Controle	321,000	*	96,0
15	Planta 4	12,933		
30	Controle	417,667	*	41,7
30	Planta 4	243,667		
60	Controle	591,000	*	37,3
60	Planta 4	370,333		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>145,07</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>31,348</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>8,0</b>		

Tabela 15. . Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	315,667	*	68,8
7	Planta 4	98,600		
15	Controle	511,000	*	89,3
15	Planta 4	54,533		
30	Controle	272,333	*	17,6
30	Planta 4	224,333		
60	Controle	476,333	*	10,9
60	Planta 4	424,333		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>105,10</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>28,682</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>9,576</b>		

Os efeitos dos extratos da planta 5, obtidos com diferentes períodos de decomposição, sobre o crescimento da cianobactéria e a porcentagem de inibição destes extratos no crescimento da cianobactéria estão relatados na Tabela 16. Desta forma, pode se observar que, as maiores porcentagens de inibição foram obtidas quando foram utilizados os extratos dos períodos de 7 e 60 dias de decomposição.

Tabela 16. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila mg L <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	*	59,6
7	Planta 5	0,741		
15	Controle	1,687	*	34,4
15	Planta 5	1,108		
30	Controle	1,829	*	14,4
30	Planta 5	1,565		
60	Controle	1,822	*	60,2
60	Planta 5	0,725		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>68,17</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,102</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>7,1</b>		

Considerando os efeitos dos extratos sobre a produção da toxina LR nas células da cianobactéria (Tabela 17), estes também foram mais significativos para os extratos com 7 e 60 dias de decomposição. Para a toxina LR extraída do sobrenadante (Tabela 18), o maior decréscimo na produção da toxina foi obtido com o extrato de 15 dias de decomposição (74%), sendo que o extrato do período de 7 dias de decomposição também ocasionou um decréscimo considerável, de 57%.

Tabela 17. Valores da produção de microcistina LR, nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	64,8
7	Planta 5	257,667		
15	Controle	321,000	ns	0
15	Planta 5	416,000		
30	Controle	417,667	*	11,6
30	Planta 5	369,333		
60	Controle	591,000	*	58,2
60	Planta 5	247,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>65,47</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>36,074</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>8,5</b>		

Tabela 18. . Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	315,667	*	57,0
7	Planta 5	135,667		
15	Controle	511,000	*	74,0
15	Planta 5	133,067		
30	Controle	272,333	*	28,4
30	Planta 5	195,000		
60	Controle	476,333	*	19,0
60	Planta 5	386,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>36,81</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>42,099</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>13,8</b>		

A Tabela 19 apresenta os efeitos dos extratos da planta 6, obtidos com diferentes períodos de decomposição, sobre o crescimento da cianobactéria e a porcentagem de inibição destes extratos no crescimento da cianobactéria. Os melhores resultados de inibição foram obtidos quando utilizados os extratos obtidos com a partir de 15 dias de decomposição.

Os efeitos dos extratos sobre a produção da toxina LR nas células da cianobactéria (Tabela 20) foram mais significativos para os extratos com 15, 30 e 60 dias de decomposição. Para a toxina LR extraída do sobrenadante (Tabela 21), o maior decréscimo na produção da toxina foi obtido com o extrato de 30 dias de decomposição (91,5%), sendo que os extratos com 15 e 60 dias também ocasionaram decréscimos bastante significativos de 64,7% e 59%, respectivamente.

Tabela 19. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila $\text{mg L}^{-1}$	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	*	14,3
7	Planta 6	1,571		
15	Controle	1,687	*	96,1
15	Planta 6	0,065		
30	Controle	1,829	*	96,4
30	Planta 6	0,066		
60	Controle	1,822	*	75,7
60	Planta 6	0,442		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>485,91</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,065</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>5,5</b>		

Tabela 20. Valores da produção de microcistina LR nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	29,1
7	Planta 6	519,667		
15	Controle	321,000	*	95,9
15	Planta 6	13,133		
30	Controle	417,667	*	97,6
30	Planta 6	10,097		
60	Controle	591,000	*	77,2
60	Planta 6	135,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>284,37</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>28,041</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>8,1</b>		

Tabela 21. Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	decréscimo %
7	Controle	315,667	*	27,9
7	Planta 6	227,667		
15	Controle	511,000	*	64,7
15	Planta 6	180,167		
30	Controle	272,333	*	91,5
30	Planta 6	23,133		
60	Controle	476,333	*	59,0
60	Planta 6	195,333		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>52,71</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>38,445</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>13,8</b>		

Para os extratos obtidos da planta 7 (Tabela 22), a maior porcentagem de inibição ocorreu quando utilizado o extrato obtido com 15 dias de decomposição. Os extratos obtidos nos demais períodos de decomposição não afetaram significativamente o crescimento da cianobactéria.

Da mesma forma, as quantidades de microcistina LR nas células da cianobactéria e no sobrenadante foram significativamente afetadas pelo extrato obtido com 15 dias de período de decomposição (Tabelas 23 e 24).

Tabela 22. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila mg L <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	ns	0
7	Planta 7	1,871		
15	Controle	1,687	*	85,0
15	Planta 7	0,254		
30	Controle	1,829	ns	0
30	Planta 7	1,908		
60	Controle	1,822	ns	1,9
60	Planta 7	1,787		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>21,13</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,212</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>13,0</b>		

Tabela 23. Valores da produção de microcistina LR, nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	18,7
7	Planta 7	595,667		
15	Controle	321,000	*	86,6
15	Planta 7	43,000		
30	Controle	417,667	*	12,4
30	Planta 7	366,000		
60	Controle	591,000	*	39,2
60	Planta 7	359,333		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>113,07</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>34,876</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>8,0</b>		

Tabela 24. Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	decréscimo %
7	Controle	315,667	*	26,3
7	Planta 7	232,667		
15	Controle	511,000	*	89,0
15	Planta 7	56,233		
30	Controle	272,333	ns	0
30	Planta 7	437,000		
60	Controle	476,333	*	12,7
60	Planta 7	415,667		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>99,30</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>26,502</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>7,7</b>		

A Tabela 25, estão apresentados os efeitos dos extratos da planta 8, obtidos com diferentes períodos de decomposição, sobre o crescimento da cianobactéria e a porcentagem de inibição destes extratos no crescimento da cianobactéria. Neste caso, melhores resultados inibição foram observados quando utilizados os extratos obtidos com 15 e 30 dias de decomposição.

Das mesma forma, os efeitos dos extratos sobre a produção da toxina LR nas células da cianobactéria (Tabela 26) e no sobrenadante (Tabela 27) foram mais significativos para os extratos com 15 e 30 dias de decomposição.

Tabela 25. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila $\text{mg L}^{-1}$	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	*	31,3
7	Planta 8	1,258		
15	Controle	1,687	*	99,8
15	Planta 8	0,004		
30	Controle	1,829	*	84,2
30	Planta 8	0,289		
60	Controle	1,822	*	64,6
60	Planta 8	0,645		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>438,64</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,063</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>5,3</b>		

Tabela 26. Valores da produção de microcistina LR nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células $\text{ng ml}^{-1}$	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	38,3
7	Planta 8	452,000		
15	Controle	321,000	*	95,9
15	Planta 8	13,267		
30	Controle	417,667	*	87,0
30	Planta 8	54,200		
60	Controle	591,000	*	52,1
60	Planta 8	283,333		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>249,09</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>27,261</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>7,5</b>		

Tabela 27. . Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	decrécimo %
7	Controle	315,667	*	10,7
7	Planta 8	282,000		
15	Controle	511,000	*	85,5
15	Planta 8	74,167		
30	Controle	272,333	*	97,9
30	Planta 8	5,593		
60	Controle	476,333	*	55,6
60	Planta 8	211,667		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>193,86</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>21,952</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>8,1</b>		

O efeito dos extratos obtidos da planta 9 sobre o crescimento da cianobactéria pode ser observado na Tabela 28. Todos os períodos de decomposição apresentaram um efeito inibitório significativo sobre o crescimento da cianobactéria, porém a maior porcentagem de inibição ocorreu quando utilizado o extrato obtido com 15 dias de decomposição.

Os efeitos dos extratos sobre a produção da toxina LR nas células da cianobactéria (Tabela 29) foram significativos para todos os extratos avaliados, sendo o maior decréscimo obtido nos extratos com 7 e 15 dias de decomposição.

Quanto a toxina LR extraída do sobrenadante (Tabela 30), o melhor resultado de decréscimo na produção da toxina foi obtido com o extrato de 15 dias de decomposição.

Tabela 28. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila mg L <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	*	63,9
7	Planta 9	0,661		
15	Controle	1,687	*	99,5
15	Planta 9	0,009		
30	Controle	1,829	*	53,3
30	Planta 9	0,854		
60	Controle	1,822	*	45,7
60	Planta 9	0,990		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>394,65</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,060</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>5,0</b>		

Tabela 29. Valores da produção de microcistina LR nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	71,1
7	Planta 9	211,667		
15	Controle	321,000	*	96,1
15	Planta 9	12,500		
30	Controle	417,667	*	23,3
30	Planta 9	320,333		
60	Controle	591,000	*	24,7
60	Planta 9	445,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>166,23</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>30,060</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>7,8</b>		

Tabela 30. Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	decrécimo %
7	Controle	315,667	*	22,1
7	Planta 9	246,000		
15	Controle	511,000	*	86,2
15	Planta 9	70,400		
30	Controle	272,333	*	59,4
30	Planta 9	110,700		
60	Controle	476,333	*	34,5
60	Planta 9	312,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>121,52</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>24,486</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>8,3</b>		

Na Tabela 31 estão demonstrados os efeitos dos extratos da planta 10, obtidos com diferentes períodos de decomposição, sobre o crescimento da cianobactéria e a porcentagem de inibição destes extratos no crescimento da cianobactéria. O melhor resultado de inibição foi obtido ao se utilizar o extrato com 15 dias de decomposição.

Da mesma forma, para os efeitos dos extratos sobre a produção da toxina LR nas células da cianobactéria (Tabela 32) foram mais significativos para o extrato com 15 dias de decomposição. Considerando os resultados observados para a toxina LR extraída do sobrenadante (Tabela 33), decréscimos significativos na produção da toxina foram obtidos com os extratos de 15 e 30 dias de decomposição.

Tabela 31. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila mg L <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	*	41,4
7	Planta 10	1,074		
15	Controle	1,687	*	99,9
15	Planta 10	0,002		
30	Controle	1,829	*	22,6
30	Planta 10	1,416		
60	Controle	1,822	*	36,7
60	Planta 10	1,154		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>171,67</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,083</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>6,1</b>		

Tabela 32. Valores da produção de microcistina LR nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	41,1
7	Planta 10	431,667		
15	Controle	321,000	*	96,2
15	Planta 10	12,333		
30	Controle	417,667	*	32,2
30	Planta 10	283,000		
60	Controle	591,000	*	46,2
60	Planta 10	318,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>182,32</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>27,832</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>7,1</b>		

Tabela 33. Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	decréscimo %
7	Controle	315,667	*	24,1
7	Planta 10	239,667		
15	Controle	511,000	*	87,5
15	Planta 10	63,967		
30	Controle	272,333	*	87,5
30	Planta 10	34,000		
60	Controle	476,333	*	55,6
60	Planta 10	211,333		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>221,97</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>20,058</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>7,4</b>		

Na Tabela 34, observa-se o efeito dos extratos obtidos da planta 11 sobre o crescimento da cianobactéria e a porcentagem de inibição destes extratos no crescimento da cianobactéria. Nesta planta 11 observou-se o melhor resultado de inibição ao se utilizar o extrato com 15 dias de decomposição.

O efeito do extrato com 15 dias de decomposição também foi o mais efetivo no decréscimo da produção da toxina LR nas células da cianobactéria (Tabela 35) e no sobrenadante (Tabela 36).

Tabela 34. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila mg L <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	ns	14,5
7	Planta 11	1,568		
15	Controle	1,687	*	54,1
15	Planta 11	0,774		
30	Controle	1,829	ns	10,6
30	Planta 11	1,634		
60	Controle	1,822	*	25,9
60	Planta 11	1,351		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>5,05</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,278</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>17,6</b>		

Tabela 35. Valores da produção de microcistina LR, nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	19,9
7	Planta 11	586,667		
15	Controle	321,000	*	78,5
15	Planta 11	69,133		
30	Controle	417,667	*	15,7
30	Planta 11	351,900		
60	Controle	591,000	*	22,1
60	Planta 11	460,667		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>99,92</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>35,571</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>8,0</b>		

Tabela 36. Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	decréscimo %
7	Controle	315,667	*	39,2
7	Planta 11	192,000		
15	Controle	511,000	*	71,7
15	Planta 11	144,667		
30	Controle	272,333	*	55,7
30	Planta 11	120,733		
60	Controle	476,333	*	44,0
60	Planta 11	266,667		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>127,95</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>22,168</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>7,6</b>		

As Tabelas 37, 38 e 39 resumizam os resultados referentes aos extratos obtidos de folhas da planta 12. Pela análise destas Tabelas observa-se que o extrato obtido com 15 dias de decomposição das folhas foi o mais efetivo na inibição do crescimento da cianobactéria (Tabela 37), na quantidade de microcistina produzida avaliada nas células (Tabela 38) e no sobrenadante do meio de cultura (Tabela 39).

Tabela 37. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila mg L <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	*	42,2
7	Planta 12	1,060		
15	Controle	1,687	*	98,9
15	Planta 12	0,019		
30	Controle	1,829	*	23,2
30	Planta 12	1,405		
60	Controle	1,822	*	4,4
60	Planta 12	1,742		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>195,04</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,079</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>5,4</b>		

Tabela 38. Valores da produção de microcistina LR nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	36,8
7	Planta 12	463,333		
15	Controle	321,000	*	95,5
15	Planta 12	14,333		
30	Controle	417,667	*	38,5
30	Planta 12	257,000		
60	Controle	591,000	*	23,5
60	Planta 12	452,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>181,44</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>28,113</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>6,8</b>		

Tabela 39. Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	decréscimo %
7	Controle	315,667	*	35,0
7	Planta 12	205,333		
15	Controle	511,000	*	89,5
15	Planta 12	53,600		
30	Controle	272,333	*	79,9
30	Planta 12	54,767		
60	Controle	476,333	*	42,5
60	Planta 12	274,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>163,34</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>23,096</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>8,4</b>		

A Tabela 40 se observa os efeitos dos extratos da planta 13, obtidos com diferentes períodos de decomposição, sobre o crescimento da cianobactéria e a porcentagem de inibição destes extratos no crescimento da cianobactéria. Neste caso, o melhor resultado de inibição foi obtido com o extrato com 7 dias de decomposição.

Os efeitos dos extratos sobre a produção da toxina LR nas células da cianobactéria (Tabela 41) foram semelhantes para todos os extratos, com destaque também para o extrato de 7 dias de decomposição. em contrapartida, para a toxina LR extraída do sobrenadante (Tabela 42), decréscimos significativos na produção da toxina foram obtidos com os extratos de 7, 15 e 30 dias de decomposição, com destaque para o extrato de 30 dias com o maior decréscimo.

Tabela 40. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila mg L <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	*	47,5
7	Planta 13	0,962		
15	Controle	1,687	*	24,3
15	Planta 13	1,277		
30	Controle	1,829	*	19,9
30	Planta 13	1,465		
60	Controle	1,822	*	12,2
60	Planta 13	1,599		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>18,21</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,127</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>8,1</b>		

Tabela 41. Valores da produção de microcistina LR, nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	57,4
7	Planta 13	312,000		
15	Controle	321,000	*	47,8
15	Planta 13	167,667		
30	Controle	417,667	*	37,9
30	Planta 13	259,333		
60	Controle	591,000	*	48,1
60	Planta 13	306,667		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>103,74</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>31,928</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>8,1</b>		

Tabela 42. Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	decrécimo %
7	Controle	315,667	*	62,3
7	Planta 13	119,000		
15	Controle	511,000	*	73,8
15	Planta 13	133,667		
30	Controle	272,333	*	87,3
30	Planta 13	34,633		
60	Controle	476,333	*	16,0
60	Planta 13	400,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>182,17</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>22,676</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>8,0</b>		

Na Tabela 43 pode-se observar os efeitos dos extratos da planta 14, obtidos com diferentes períodos de decomposição, sobre o crescimento da cianobactéria bem como a porcentagem de inibição destes extratos no crescimento da cianobactéria. Assim os melhores resultados de inibição foram obtidos ao se utilizar os extratos com 7, 15 e 60 dias de decomposição.

Os efeitos dos extratos sobre a produção da toxina LR nas células da cianobactéria (Tabela 44) foram significativos para os extratos com 7, 15 e 60, sendo o maior decréscimo obtido no extrato com 7 dias de decomposição. Para a toxina LR extraída do sobrenadante (Tabela 45), decréscimos significativos na produção da toxina foram obtidos com os extratos de 7, 15 e 30 dias de decomposição, com destaque para o extrato de 15 dias que ocasionou o maior decréscimo.

Tabela 43. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila mg L <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	*	67,1
7	Planta 14	0,603		
15	Controle	1,687	*	76,9
15	Planta 14	0,391		
30	Controle	1,829	ns	9,8
30	Planta 14	1,650		
60	Controle	1,822	*	66,3
60	Planta 14	0,613		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>32,74</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,196</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>15,0</b>		

Tabela 44. Valores da produção de microcistina LR nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	75,5
7	Planta 14	179,333		
15	Controle	321,000	*	59,3
15	Planta 14	130,600		
30	Controle	417,667	*	26,1
30	Planta 14	308,667		
60	Controle	591,000	*	55,2
60	Planta 14	265,000		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>40,15</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>56,415</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>15,1</b>		

Tabela 45. Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	decrécimo %
7	Controle	315,667	*	77,1
7	Planta 14	72,300		
15	Controle	511,000	*	86,0
15	Planta 14	71,367		
30	Controle	272,333	*	54,0
30	Planta 14	125,333		
60	Controle	476,333	ns	0
60	Planta 14	493,667		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>168,76</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>25,310</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>8,6</b>		

Para a planta 15 (Tabelas 46, 47 e 48) os melhores resultados sobre a porcentagem de inibição da cianobactéria foram obtidos quando foram utilizados os extratos obtidos com 15 e 60 dias de decomposição, com porcentagens de inibição semelhantes (Tabela 46).

O extrato com 15 dias de decomposição, também ocasionou o melhor efeito sobre o decréscimo da produção da toxina LR nas células da cianobactéria conforme demonstrado na Tabela 47. Para a toxina LR extraída do sobrenadante (Tabela 45), decréscimos significativos na produção da toxina foram obtidos com os extratos de 7, 15 e 30 dias de decomposição, destacando-se o extrato de 15 dias, com o maior decréscimo.

Tabela 46. Valores do teor de clorofila  $\alpha$  de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de clorofila mg L <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Inibição %
7	Controle	1,833	*	21,9
7	Planta 15	1,431		
15	Controle	1,687	*	40,9
15	Planta 15	0,997		
30	Controle	1,829	*	12,5
30	Planta 15	1,600		
60	Controle	1,822	*	42,7
60	Planta 15	1,044		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>14,55</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>0,157</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>10,1</b>		

Tabela 47. Valores da produção de microcistina LR nas células de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de Microcistina LR nas células ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	Decréscimo %
7	Controle	732,667	*	25,3
7	Planta 15	547,667		
15	Controle	321,000	*	50
15	Planta 15	160,667		
30	Controle	417,667	*	15,5
30	Planta 15	353,000		
60	Controle	591,000	*	5,2
60	Planta 15	560,333		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>118,54</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>29,157</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>6,2</b>		

Tabela 48. Valores da produção de microcistina LR no sobrenadante do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em meio contendo extrato das folhas de guanandi em diferentes tempos de decomposição.

Períodos dias	Tratamentos	Teor de microcistina LR no sobrenadante ng ml <sup>-1</sup>	Significância do contraste	decrécimo %
7	Controle	315,667	*	56,3
7	Planta 15	138,000		
15	Controle	511,000	*	73,1
15	Planta 15	137,667		
30	Controle	272,333	*	56,7
30	Planta 15	118,000		
60	Controle	476,333	ns	0
60	Planta 15	491,667		
<b>Valor de F para tratamentos</b>		<b>199,26</b>		
<b>DMS - teste t a 10%</b>		<b>20,834</b>		
<b>Coefficiente de variação (%)</b>		<b>6,7</b>		

Na Tabela 49 estão sumarizados os resultados referentes aos extratos de todas as plantas avaliadas, evidenciando os períodos de decomposição que proporcionaram extratos mais eficazes na inibição do crescimento da cianobactéria, na redução no teor de toxinas nas células e no sobrenadante.

Tabela 49. Períodos de decomposição que proporcionaram extratos mais eficientes no controle do crescimento de *Microcystis* e na produção da microcistina LR

Planta	Período de Maior Inibição	Período de Maior redução de toxina nas células	Período de Maior redução de toxina nos Sobrenadantes
1	15 dias	15 dias	15/30 dias
2	7 dias	7 dias	7 dias
3	15 dias	15 dias	15 dias
4	15 dias	15 dias	15 dias
5	7 / 60 dias	7/60 dias	15 dias
6	15/ 30 dias	15/30 dias	30 dias
7	15 dias	15 dias	15 dias
8	15/30 dias	15/30 dias	15/30 dias
9	15 dias	15 dias	15 dias
10	15 dias	15 dias	15/30 dias
11	15 dias	15 dias	15 dias
12	15 dias	15 dias	15 dias
13	7 dias	7/15/60 dias	30 dias
14	15 dias	7/15/60 dias	15 dias
15	60 dias	15 dias	15 dias

Assim como nos resultados obtidos com a palha de cevada por Ball et al. (2000), em que os melhores efeitos foram obtidos quando foram utilizados os extratos produzidos com 15 dias de decomposição, proporcionando resultados significativos quanto a redução do crescimento da cianobactéria para a maioria das plantas estudadas.

Lembi (2002), em seu manual de uso da palha da cevada no controle do crescimento de cianobactérias, indicou que a maior eficiência da palha decomposta ocorre após 2 semanas do início da decomposição se a temperatura da água estiver entre 20 a 30°C. Esse dado corrobora com o tempo de decomposição apresentado como ideal na decomposição das folhas do guanandi nas condições utilizadas neste experimento.

Apesar de as plantas serem da mesma espécie e cultivadas nas mesmas condições ambientais, nota-se importantes diferenças entre os extratos produzidos, quanto à eficiência destes no controle da cianobactéria (Tabela 50). Essa diferença é devido à grande variabilidade genética existente nas espécies.

Tabela 50. Maiores porcentagens de inibição do crescimento e maiores reduções nos teores de toxinas nas células das cianobactérias.

Planta	maior % de inibição	Maior % de redução de toxinas nas células	Maior % de redução de toxinas nos sobrenadantes
1	84%	86%	54%
2	9%	38%	60%
3	99%	97%	83%
4	99%	96%	89%
5	60%	64%	74%
6	96%	97%	91%
7	85%	86%	89%
8	99%	95%	97%
9	99%	96%	86%
10	99%	96%	87%
11	54%	78%	71%
12	99%	95%	89%
13	47%	57%	87%
14	77%	75%	86%
15	43%	49%	73%

Os extratos das plantas 3, 4, 6, 8, 9, 10 e 12, com período de decomposição de 15 dias, reduziram em mais de 90% o crescimento da cianobactéria e a produção de toxinas. Para as plantas 6 e 8, os extratos obtidos com período de decomposição de 30 dias também apresentaram reduções no crescimento e produção de toxinas acima de 90%. Já os extratos obtidos da planta 2 não causaram efeitos significativos na redução do crescimento da cianobactéria e na produção de toxina LR.

O guanandi demonstrou um excelente potencial no controle do crescimento da cepa de *Microcystis aeruginosa*, revelando ser uma boa alternativa no controle da proliferação dessa cianobactéria.

As folhas do guanandi devem ser aplicadas de forma preventiva as florações, ou de forma contínua com o plantio do guanandi em áreas próximas a lagoas ou reservatórios, que geralmente apresentam problemas com floração de cianobactérias, nos períodos mais quentes.

O uso das folhas do guanandi para o controle da cianobactéria, se traduz em uma nova opção de uso para as plantações comerciais de desta espécie arbórea. Além do uso da madeira, para fins comerciais, pode se usar as folhas após o corte e até mesmo as que caem naturalmente na serrapilheira dos talhões.

As folhas podem ser acondicionadas em fardos, os quais podem ser posicionados com bóias nos locais a se combater as florações, de 15 a 20 dias antes dos dias previstos como mais quentes, diminuindo assim a quantidade de cianobactérias e conseqüentemente a de toxinas nas águas, fator muito importante quando se trata de águas para o consumo humano.

O uso das folhas de guanandi, no combate ao crescimento da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, principal produtora da toxina hepatotóxica microcistina, demonstrou ser uma alternativa natural e viável a ser aplicada de forma correta.

## 7. CONCLUSÕES

Os extratos das plantas de Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess), na concentração de 10%, apresentaram um grande potencial no controle do crescimento da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*.

Os maiores efeitos de inibição ocorreram com os extratos obtidos com 15 dias de decomposição das folhas (30°C). O potencial de inibição varia com a planta avaliada.

## 8. REFERÊNCIAS

ABE, F. et al. Trypanocidal constituents in plants. 3. leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. **Biol. Pharm**, v. 27, p. 141-143, 2004.

ANDERSON, D.M.; GLIBERT, P.M.; BURKHOLDER, J.M. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition and consequences. **Estuaries**, v.25, p. 704–726, 2002.

AZEVEDO, S. M. F. O. *Cianobactérias tóxicas: causas ecológicas e conseqüências para a saúde pública*. **Apostila: Curso de especialização em Limnologia, gerenciamento de recursos hídricos e aquicultura** – IBCCF<sup>o</sup>.- UFRJ . 2002

BALL, A. S. et al. Algal growth control by a barley straw extract. **Bioresource Technology**. v.77, p. 177-181, 2001.

BEASLEY, V.R. Algae intoxication in livestock and waterfowl. **Veterinary clinics of North America, food animal practice**, vol. 5, p. 345-361, 1989.

BELL, S.G.; CODD, G.A. Cyanobacterial toxins and human health. **Rev. Med. Microbiol.** v. 5, p. 256-264, 1994.

BICUDO, D.C.; FORTI, M.C.; BICUDO, C.E.M. (orgs.). **Parque Estadual das fontes do Ipiranga (PEFI): Unidade de Conservação que resiste à urbanização de São Paulo.** São Paulo, Editora Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo. 2002.

BRASIER, M.D. et al. Questioning the evidence of Earth's oldest fossils. **Nature.** v. 416, p.76-81, 2002.

BUICK, R. The antiquity of oxygenic photosynthesis; Evidence from stromatolites in sulphate-deficient Archaean lakes. **Science**, 1992. v.255, p. 74-77,

BURNETT, J.A.B.; MATTOS, S.P.; AZZOLIN, N.M.P. Intervenções da Companhia de Saneamento **In: Olhares sbre o Lago Paranoá.** 1a edição. Brasília, 2001. p. 199-211.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacteria. **Sci. Amer.** v. 270, p. 78–86, 1994.

CARMICHAEL, W.W . A review: cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. **Journal of applied bacteriology.** v. 72, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W.W. Toxic *Microcystis* and the environment. In: Toxic *Microcystis*. M.F. Watanabe *et al.*, (Eds.) **New York: CRC Press.** p.1-11, 1996.

CARMICHAEL, W.W. et al. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v. 26, p. 971-973, 1988.

CARNEIRO, R. L. **Otimização de cultivo de *Microcystis aeruginosa* Kütz Emend. Elekin (Cianobacteria) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju (Cianobacteria) para produção de padrões de microcistina-LR e cilindrospermopsina.** 2005. 113 f .Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Biotecnologia Vegetal, Rio de Janeiro, 2005.

CARNEIRO, T.G.; LEITE, F. Cianobactérias e suas Toxinas. **Revista Analytica.**

2008.v.32,

CARVALHO, L.R. de. Cianotoxinas. In: SANT'ANA, C.L., AZEVEDO, M.T. de P., AGUJARO, L.F., CARVALHO, M. do C., CARVALHO, L.R. da e SOUZA, C.R. de (Eds.). **Manual ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias**

**Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras.** Interciência, Rio de Janeiro. pp. 9-19, 2006.

CETESB. Operação e Manutenção de ETA. **CETESB:** São Paulo – SP, 1973.

CHILPA, R. R. et al. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. **Life Sciences** . 75, 1635, 2004.

CHORUS, I. **Cyanotoxins: Occurrence, causes and consequences.** Berlin/New York: **Springer**, 2001. 357 pp.

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.

CLOERN, J.E.. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. Mar. **Ecol. Prog.** v. 210, p. 223–253, 2001.

CONLEY, D.J. Biogeochemical nutrient cycles and nutrient management strategies. **Hydrobiologia.** v.410, p.87–96, 1999.

COTTIGLIA, F.; DHANAPAL, B.; STICHER, O.; HEILMANN, J. New chromanone acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*. **J. Nat. Prod.**, v.67 (4), p. 537-541. 2004.

COUSINS IT, BEALING DJ, JAMES HA, SUTTON A. Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. **Water Res.** v.30, p. 481-485, 1996.

COVICH, A.P., PALMER, M.A. e CROWL, T.A. The role of benthic invertebrate species freshwater ecosystems. **BioScience**. v. 49 n.2, p.119-127, 1999.

DALTON, R. Microfossils: squaring up over ancient life. **Nature**. v.417, p.782-84, 2002.

DHARMARATNE, H. R.; PERERA, D. S. C.; MARASINGHE, G. P. K.; JAMIE, J.; **Phytochemistry**. v. 51, p.111, 1999.

EMENDORFER, F. et al. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. **J. Pharm. Sci.**, v.8 n.1, p. 63-68, 2005.

ESTEVES F.A. **Fundamentos de limnologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Interciencia, 1998. 602p.

EUTROFIZACIÓN. **Ecología verde :desarrollo sostenible para un mundo mejor**. 2008  
Disponível em: <http://www.ecologiaverde.com/eutrofizacion/>. Acesso em: 21 Ago. 2008.

FAWELL, J. K., JAMES, C. P. & JAMES, H. A. (EDS.) *Toxins from blue-green algae: Toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water*. **Water Research Centre**, v.1, p.46, 1994.

FERRÃO-FILHO, A.S. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos - **Oecologia Brasiliensis**. v.13 n.2, p. 272-312, 2009.

GASPAROTTO, JR. A. et al. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* CAMB(CLUSIACEAE). **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 575-578, 2005.

GASPAROTTO, JR. A. et al. Estudo morfo-anatômico das folhas e caule de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo farmacognóstico da droga vegetal. **Acta Farm.** v.24 n.3, p.371-376, 2005.

GIBSON, C. E.; SMITH, R. V. Freshwater plankton. IN: Carr, N. G., Whitton, B. A. (Eds), *The biology of cyanobacterium*. Botanical Monographs., **Blackwell Scientific Publicaations**, London, v. 19, p.463-490 , 1982.

HARADA, K.-I.et al. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. **Toxicon** . v.34, p.701–710, 1996.

HENRY, R., CARMO, C.F.; BICUDO, D.C. Trophic status of a Brazilian urban reservoir and prognosis about the recovery of water quality. **Acta Limnol. Bras.**, v.16 n.3, p. 251-262, 2004.

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.

HOEGER, S.J.; DIETRICH, D.R.; HITZFELD, B.C. Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment. **Environ. Health Perspect.** v.110, p. 1127-1132, 2002.

HUERTA-REYES, M. et al. HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27 n.9, p.1471-1475. 2004.

ISHII, H.; NISHIJIMA M.; ABE, T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. **Water Res.** v.38, p. 2667–2676, 2004 .

JAYATISSA, L.P.; SILVA, E.I.L.; McELHINEY, J.; LAWTON, L.A. Occurrence of toxigenic cyanobacterial blooms in freshwaters of Sri Lanka. **Systematic and Applied microbiology**,v.29, p. 156-164, 2006.

JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; NA, J; CARDO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARWIS, W.R. Liver failure and death following

exposure to microcrystal toxins at a hemodiálisis center in Brasil. **The New England Journal of Medicine**, v.36, p.373-378, 1998.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 1975. 428p.

KENEFICK SL et al. Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. **Water science and technology**, v. 27, p. 433-440, 1993.

KONDO, F. et al. Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column. **Toxicon**, v. 40, p. 893-899, 2002.

KOTAK, B.G. et al. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. **Water Research**, v. 27, p.495-506, 1993.

KUMAYER, R. et al. Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. **Microbiology**, v.151, p.1525-33, 2005.

LAM, A.K.-Y. et al. Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: Implications for human health. **Water Research**. v.29, p.1845-1854, 1995.

LAMBERT, T.W.; HOLMES, C.F.B.; HRUDEY, S.E. Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. **Water Research**. v.30 p. 1411-1422, 1996.

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

LEMBI, C. A. **Barley straw for algae control. Aquatic Plant Management APM-1-W**. Purdue University Cooperative Extension Service, West Lafayette, Indiana. 2002.

LUUKKAINEN, R.; et al. Isolation and identification of eight microcystins from thirteen *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. **Appl Environ Microbiol**. v.59 n.7, p. 2204-9, 1993.

MAGALHÃES, A. B. S.; AGUIAR, R. M.; MAGALHÃES, M. A. Isolamento de cianobactérias potencialmente tóxicas dos pontos de captação de água para o consumo humano do município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. In: AIDIS; **ASOCIACIÓN INTERAMERICANA DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL. SECCIÓN URUGUAY. RESCATANDO ANTIGUOS PRINCIPIOS PARA LOS NUEVOS DESAFÍOS DEL MILENIO**. Montevideo, Punta del Este: ilus, 2006. p. 26-30.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano. Impactos na Saúde Pública e processos de remoção em água para consumo humano*. Ascom. Brasília, DF. p.56, 2003.

MOFFITT, M.C.e NEILAN, B.A. Characterization of the nodularium synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n.11, p.6353-62, 2004.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecol. Bras.** v.13 n.2, p.229-246, 2009.

MOZETTO, A.A.; SILVÉRIO, P.F.; SOARES, A. Estimates of benthic fluxes of nutrients across sediment and water interface (Guarapiranga Reservoir, São Paulo, Brazil). **Sci. Tot. Environ.**, v. 266 n.1-3, p.135-142, 2001.

MUNDO, S.R.; DUARTE, M.R. Farmacobotânica foliar e Caulinar de guanandi - *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Clusiaceae). **Rev. Bras. Farm.**, v.89 n.2, p. 87-91, 2008.

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

NOLDIN, V.F.; ISAIAS, D.B.; CECHINEL-FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. **Quim. Nova**, v. 29 n.3, p.549-554, 2006.

OLIVEIRA, J. C.; *Resumos do 17º Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, Fortaleza, Brasil, 1994.

PAERL, H.W.; HUISMAN, J. Blooms like it hot. **Science**, v.320, p.57-58, 2008.

PANDOLPHO, L.R.A.B. et al. Identificação e teste de toxicidade "in vivo" do extrato bruto de cianobactérias em pesque-pagues da região dos Inconfidentes - MG. **Revinter revista intertox de toxicologia**, v. 6, n. 1, p. 29-44, 2013.

PARK, H. D. et al. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a heterotrophic lake. **Environ. Toxicol.**, v. 16, p. 337–343, 2001.

PARK, H. et al. [D-Leu[1]] microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake. **Toxicon**, v.39, n.6, p.1-4, 2001.

PEREIRA, M.O.S.; GOTTLIEB. O.R.; MAGALHÃES, M.T. Novas xantonas do *Calophyllum brasiliense*. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v.39, n.2, p. 255-256, 1967.

PERSSON, A. Phosphorus release by fish in relation to external and internal load in a eutrophic lake. **Limnol. Oceanogr.**, v.42, n.3, p. 577-583, 1997.

PINTO-COELHO, R.M.; GRECO, M.K.B. The contribution of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and zooplankton to the internal cycling of phosphorus in the eutrophic Pampulha reservoir, Brazil. **Hydrobiologia**. v.411, p.115-127, 1999.

POURIA, S. et al. Fatal microcystin intoxication in hemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet**. v352, p.21-26. 1998.

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

PRETTO, J.B. et al. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). **Naturforsch.**, v.59, n.9, p.657-662, 2004.

RAMSDELL, J.S., ANDERSON, D.M.; GLIBERT, P.M. *Harmful Algal Research and Response: A National Environmental Science Strategy*: HARRNESS. **Washington, DC: Ecological Society of America**, 2005. p.2005-2015.

RANTALA , A. et al. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.101, n.2, p.568-73, 2004.

REYES-CHILPA, R.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; ESTRADA-MUÑIZ, E. Antifungal xanthenes from *Calophyllum brasiliensis* heartwood. **J. Chem. Ecol.**, v. 23, n.7, p.1901-1911, 1997.

REYNOLDS, C.S. 1984. **The ecology of freshwater phytoplankton.** Cambridge Univ. Press, p. 367, 1984.

RINEHART, K.L.; NAMIKOSHI, M.; CHOIE, B.W. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). **Journal of applied phycology.** v. 6, p.159-176,1994.

ROMANOWSKA-DUDA, Z. et al. The effect of toxic cyanobacteria (blue-green algae) on water plants and animal cells. **Polish J. Environ Studies.** v.11, p.561- 566, 2002.

RUNNEGAR, M.T.; GERDES, R.G.; FALCONER, I.R. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. **Toxicon.** v.29, p.43-51, 1991.

SARTORI, N.T.et al. Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. bark on experimental gastric lesions in rats and mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.67, n.2, p.149-156, 1999.

SCHAUS, M.H.et al. Nitrogen and phosphorus excretion by detritivorous gizzard shad in a reservoir ecosystem. **Limnol. Oceanogr.** v.42, n.6, p.1386-1397, 1997.

**Sigma / Aldrich, 2006.** Disponível em: [http:// www. igmaaldrich.com/Area\\_of\\_interest/Biochemicals/Enzyme\\_Explorer/Cell\\_Signaling\\_Enzymes/Cyanobacterial\\_Toxins.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Cell_Signaling_Enzymes/Cyanobacterial_Toxins.html).

SIVONEN, K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. **Appl Environ Microbiol.** v.56, n.9, p.2658-2666, 1990.

SMAFYDA, T.J. Eutrophication and phytoplankton. In: Wassmann, P. and Olli, K. Integrated approaches to drainage basin nutrient inputs and coastal eutrophication. **Disponível em:** pdf file on web page: [http://www.ut.ee/\\_olli/eutr/](http://www.ut.ee/_olli/eutr/). p. 89–98, 2004.

SOUZA, R.C.R. de. Introdução. In: SANT'ANA, C.L., AZEVEDO, M.T. de P., AGUIJARO, L.F., CARVALHO, M. do C., CARVALHO, L.R. da e SOUZA, C.R. de (Eds.). **Manual ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Interciência, Rio de Janeiro. 2006. p. 1-4.

TANDEAU DE MARSAC, N.; HOUMARD, J. Adaptation of cyanobacterium to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. **FEMS Microbiol.** v. 104, p.119-190, 1993.

TSUJI, K.; et al. Stability of microcystins from cyanobacteria. II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. **Toxicon.** v.33, p. 1619-1631, 1995.

TSUJI, K. et al. Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. **Environmental science and technology**, v.28, p.173-177, 1994.

TUNDISI, J.G. **Água no século XXI. Enfrentando a escassez**. São Carlos: Rima, 2003. p.247.

VANNI, M.J. Nutrient cycling by animals in freshwater ecosystems. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.33, p.341-370, 2002.

VERHOEVEN, R.L.; ELOFF, J.N. Effect of lethal concentrations of copper on the ultrastructure and growth of *Microcystis*. **Proc. Electron Microsc. Soc. S. Afr.** v.9, p.161-162, 1979.

WANNEMACHER, R.W. Chemical stability and laboratory safety of naturally occurring toxins. **Fort Detrick, Frederick, MD, US Army Medical Research Institute of Infectious Disease**. 1989.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. **Dordrecht Kluwer**, p.669, 2000.

YASUNAKA, K. et al. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. **J. Ethnopharmacol.** v. 28, p.293-9. 2005.

## **APÊNDICE**

Apêndice A: Análise nutritiva, pH e condutividade, dos extratos das folhas de 15 plantas de gunandi, com 7 dias de decomposição.

Plantas	Tratamentos Dias	N	P	K	Ca	Mg	S	Na	Cu	Fe	Mn	Zn	pH	Condutividade
		----- mg/L -----											μS/cm	
1	7	28	18,9	122,0	47,00	27,00	34,2	45,00	0,10	0,20	0,10	0,90	7,08	168,9
2	7	224	18,9	64,0	47,50	17,40	76,6	35,00	0,20	0,30	0,10	0,60	6,82	120,9
3	7	28	23,0	66,0	30,00	10,30	20,7	45,00	0,10	0,20	0,10	0,80	7,02	947,3
4	7	28	16,2	70,0	35,70	14,90	20,7	40,00	0,10	0,20	0,10	1,00	7,4	371,1
5	7	112	17,6	88,0	56,00	19,40	72,5	40,00	0,20	0,30	0,20	1,10	7,17	105,9
6	7	42	18,9	60,0	39,70	17,30	12,4	25,00	0,20	0,30	0,10	1,10	7	674,3
7	7	112	10,8	76,0	42,00	9,30	12,4	40,00	0,10	0,20	0,10	1,00	7,6	777,3
8	7	84	24,3	106,0	32,80	14,60	5,2	40,00	0,10	0,30	0,20	1,10	7,24	730
9	7	168	14,9	90,0	36,30	13,30	22,8	40,00	0,20	0,40	0,10	0,90	7	105,7
10	7	196	29,7	72,0	27,40	11,20	11,4	35,00	0,20	0,20	0,10	0,90	7	505,5
11	7	112	29,7	86,0	53,20	14,20	22,8	35,00	0,20	0,40	0,10	0,80	6,89	867
12	7	140	23,0	94,0	41,90	20,50	15,5	35,00	0,10	0,20	0,10	0,90	7,1	105,8
13	7	112	20,3	76,0	58,00	23,90	13,5	35,00	0,10	0,20	0,20	0,70	7	731,8
14	7	182	43,2	130,0	52,00	26,30	35,2	40,00	0,10	0,20	0,20	0,70	7,13	126,5
15	7	322	32,4	74,0	62,50	18,50	22,8	35,00	0,10	0,40	0,20	0,70	7,28	841

Apêndice B: Análise nutritiva, pH e condutividade, dos extratos das folhas de 15 plantas de gunandi, com 15 dias de decomposição.

Plantas	Tratamentos Dias	N	P	K	Ca	Mg	S	Na	Cu	Fe	Mn	Zn	pH	Condutividade μS/cm
		----- mg/L -----												
1	15	84	18,9	280,0	75,00	52,30	84,9	50,00	0,20	0,30	0,10	1,00	7	149,7
2	15	196	56,7	144,0	67,00	49,60	58,0	50,00	0,20	0,40	0,40	1,20	7,02	112
3	15	252	23,0	148,0	35,70	38,50	13,5	35,00	0,10	0,40	0,10	0,70	6,9	927
4	15	448	113,4	136,0	36,00	28,80	18,6	50,00	0,20	0,40	0,20	1,20	7	451,1
5	15	196	20,3	132,0	65,90	37,60	15,5	45,00	0,10	0,20	0,10	0,70	7	110
6	15	182	41,9	108,0	42,00	29,40	38,3	50,00	0,10	0,20	0,20	1,50	7	662,2
7	15	126	51,3	138,0	27,40	28,50	18,6	35,00	0,10	0,40	0,20	0,60	7,4	803
8	15	196	29,7	100,0	42,20	31,00	38,3	55,00	0,10	0,20	0,10	1,50	7,1	770
9	15	140	63,5	164,0	52,40	31,50	25,9	50,00	0,10	0,30	0,10	1,40	7,02	102,4
10	15	154	51,3	106,0	32,70	17,50	77,7	50,00	0,10	0,20	0,20	1,80	7,04	515
11	15	196	87,8	140,0	54,50	26,00	34,2	50,00	0,10	0,20	0,20	1,30	7	877
12	15	126	94,5	168,0	37,70	29,20	28,0	65,00	0,10	0,20	0,10	1,50	7	102,7
13	15	210	124,2	112,0	52,90	32,80	23,8	45,00	0,10	0,20	0,20	0,90	7	725,5
14	15	224	39,2	216,0	51,50	42,00	44,5	45,00	0,10	0,20	0,10	0,60	6,98	135,8
15	15	406	114,8	98,0	67,80	32,00	14,5	40,00	0,10	0,30	0,10	0,60	7	841

Apêndice C: Análise nutritiva, pH e condutividade, dos extratos das folhas de 15 plantas de gunandi, com 30 dias de decomposição.

Plantas	Tratamentos Dias	N	P	K	Ca	Mg	S	Na	Cu	Fe	Mn	Zn	pH	Condutividade μS/cm
		----- mg/L -----												
1	30	182	4,1	164,0	33,00	30,00	43,5	45,00	0,20	0,20	0,10	1,00	7	113,3
2	30	238	47,3	82,0	17,40	19,40	25,9	40,00	0,20	0,20	0,10	0,80	7,2	115,6
3	30	266	4,1	130,0	38,20	27,30	15,5	40,00	0,10	0,20	0,10	1,00	7	897,3
4	30	252	10,8	120,0	65,00	28,50	25,9	40,00	0,10	0,20	0,10	0,90	7,14	389,2
5	30	280	128,3	178,0	63,60	41,50	23,8	55,00	0,10	0,20	0,20	0,60	7	189,4
6	30	210	104,0	118,0	41,70	28,10	45,6	20,00	0,20	0,20	0,20	1,10	7,3	598,8
7	30	154	50,0	70,0	14,80	11,10	52,8	30,00	0,10	0,30	0,10	0,60	7,5	702
8	30	196	1,4	118,0	50,50	34,80	57,0	45,00	0,10	0,30	0,10	1,50	7	762
9	30	196	121,5	184,0	33,50	31,50	16,6	55,00	0,10	0,20	0,20	1,10	7,1	100,8
10	30	280	83,7	82,0	19,40	9,60	33,1	35,00	0,10	0,20	0,10	0,80	6,98	501,2
11	30	252	27,0	128,0	43,50	18,60	30,0	40,00	0,10	0,20	0,10	1,00	7	818
12	30	224	75,6	170,0	34,00	23,70	31,1	45,00	0,10	0,20	0,10	0,90	6,97	135,2
13	30	126	14,9	128,0	50,00	31,50	35,2	40,00	0,10	0,20	0,20	0,90	7	762
14	30	154	45,9	218,0	40,00	35,60	82,9	40,00	0,10	0,20	0,20	0,90	7	136
15	30	112	43,2	110,0	53,00	36,60	39,4	40,00	0,10	0,30	0,10	1,30	7,4	854

Apêndice D: Análise nutritiva, pH e condutividade, dos extratos das folhas de 15 plantas de gunandi, com 60 dias de decomposição.

Plantas	Tratamentos Dias	N	P	K	Ca	Mg	S	Na	Cu	Fe	Mn	Zn	pH	Condutividade μS/cm
		----- mg/L -----												
1	60	336	41,9	240,0	9,00	17,80	13,5	25,00	0,10	0,20	0,10	0,70	6,45	105,2
2	60	140	52,7	178,0	11,50	25,90	18,6	35,00	0,10	0,20	0,10	0,60	6,98	118,5
3	60	266	79,7	250,0	19,00	30,70	28,0	35,00	0,10	0,20	0,10	0,70	7	867,1
4	60	112	58,1	228,0	28,00	26,60	32,1	40,00	0,10	0,20	0,20	0,80	7,2	354
5	60	140	39,2	280,0	40,00	33,00	21,8	45,00	0,10	0,20	0,20	1,10	7	98,7
6	60	182	4,1	138,0	36,00	19,00	46,6	35,00	0,10	0,20	0,20	1,10	6,9	603
7	60	140	43,2	112,0	17,10	9,90	62,1	40,00	0,10	0,20	0,10	1,00	7	705,2
8	60	140	59,4	190,0	45,50	30,20	20,7	35,00	0,10	0,30	0,10	1,00	7	689,8
9	60	182	93,2	206,0	25,20	14,00	78,7	45,00	0,10	0,20	0,20	1,30	7,02	103
10	60	112	50,0	144,0	37,00	14,50	30,0	45,00	0,10	0,20	0,20	1,50	6,99	514
11	60	266	81,0	174,0	35,00	13,60	26,9	35,00	0,10	0,20	0,10	0,80	7	805,3
12	60	168	105,3	200,0	24,00	13,30	18,6	40,00	0,10	0,20	0,20	1,00	7	104
13	60	154	120,2	184,0	30,00	19,40	65,3	40,00	0,10	0,30	0,10	0,80	7,5	682,5
14	60	154	44,6	324,0	25,50	29,20	71,5	40,00	0,10	0,20	0,10	1,00	7,15	116,2
15	60	210	27,0	70,0	5,00	3,60	14,5	35,00	0,10	0,20	0,10	0,80	7	843,2