

ANDERSON LOURENÇÃO

**Atividade algicida e estresse oxidativo de extratos e frações de *Pistia stratiotes*,
Salvinia auriculata e *Emilia sonchifolia* no metabolismo de *Microcystis aerugi-
nosa***

**ARARAQUARA
2021**

ANDERSON LOURENÇÃO

**ATIVIDADE ALGICIDA E ESTRESSE OXIDATIVO DE EXTRATOS E
FRAÇÕES DE *Pistia stratiotes*, *Salvinia auriculata* E *Emilia sonchifolia* NO
METABOLISMO DE *Microcystis aeruginosa***

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva

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

**ARARAQUARA
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

L892a Lourenção, Anderson
Atividade algicida e estresse oxidativo de extratos e frações de *Pistia stratiotes*, *Salvinia auriculata* e *Emília sonchifolia* no metabolismo de *Microcystis aeruginosa* / Anderson Lourenção. – Araraquara : [s.n.], 2021
94 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Regildo Márcio Gonçalves da Silva
Coorientador: Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira

1. Alelopatia. 2. Superóxido dismutase. 3. Fitoquímicos.
4. Cianobactéria. 5. Antioxidantes. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Atividade algicida e estresse oxidativo de extratos e frações de *Pistia stratiotes*, *Salvinia auriculata* e *Emilia sonchifolia* no metabolismo de *Microcystis aeruginosa*

AUTOR: ANDERSON LOURENÇÃO

ORIENTADOR: REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP - Assis



Prof.ª Dr.ª PATRICIA SOARES SANTIAGO (Participação Virtual)
Campus Experimental de Registro / Universidade Estadual Paulista - UNESP - Registro



Prof.ª Dr.ª ERIKA COSENDEY TOLEDO DE MELLO PEIXOTO (Participação Virtual)
Centro de Ciências Agrárias / Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP - Bandeirantes



Prof. Dr. VALTER HENRIQUE MARINHO DOS SANTOS (Participação Virtual)
Atina Ativos Naturais / Atina Ativos Naturais - Pouso Alegre



Prof. Dr. RONALDO PAVARINI (Participação Virtual)
Campus Experimental de Registro / Engenharia Agrônômica e Engenharia de Pesca - UNESP - Registro

Araraquara, 30 de agosto de 2021

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Anderson Lourenção

Nome em citações bibliográficas: Anderson Lourenção; LOURENÇÃO, A.; LOURENÇÃO, Anderson.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Rua Engenheiro Mario Stefani, 501, Centro. Pedrinhas Paulista - SP.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade estadual Paulista – UNESP (2013). Mestrado em Biociências pela Universidade Estadual Paulista – UNESP (2017). Doutorado em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista – UNESP (2021).

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Professor Educação Básica II.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Lourenção, A., Mecina, G.F., Cordeiro-Araújo, M.K. et al. Characterization of allelochemicals from *Pistia stratiotes* extracts and their effects on the growth and physiology of *Microcystis aeruginosa*. Environ Sci Pollut Res (2021). <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14658-z>

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

LOURENCAO, A.; CORDEIRO-ARAUJO, M. K.; OLIVEIRA, M. C. B.; MECINA, G. F.; SILVA, R. M. G. Physiological response of *Microcystis aeruginosa* exposed to extracts of *Pistia stratiotes*, *Salvinia auriculata* e *Emilia sonchifolia*. In: 7th Brazilian Biotech Congress and 2nd Biotech Ibero-American Congress, 2018, Brasília. 7th Brazilian Biotech Congress and 2nd Biotech Ibero-American Congress, 2018. p. 1.

SANTOS, P. C.; LOURENCAO, A.; MECINA, G. F.; ARAUJO, M. K. C.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; SILVA, R. M. G. Control of cell density in culture of *Microcystis aeruginosa* using extract of *Pistia stratiotes*. In: 6th BCNP Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017, Vitória-ES. 6th BCNP Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM. v. 1. p. x-x.

Dedico esse trabalho a toda minha família, sobretudo minha mãe, por sempre me apoiar, incentivar e acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Aos colegas, técnicos de laboratório e funcionários das universidades em que desenvolvi minha pesquisa, por toda ajuda, troca de experiências e ensinamentos.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES - Brasil, pela bolsa de estudos a mim concedida (Código de Financiamento 001).

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

Lourenção, Anderson. **Atividade algicida e estresse oxidativo de extratos e frações de *Pistia stratiotes*, *Salvinia auriculata* e *Emilia sonchifolia* no metabolismo de *Microcystis aeruginosa***. 2021. Tese (Doutorado em Biotecnologia). – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2021.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial dos extratos e frações de *Pistia stratiotes* L., *Salvinia auriculata* Aubl. e *Emilia sonchifolia* L. para controle de *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger (cianobactéria) em condições laboratoriais, investigar o potencial oxidativo dos extratos e frações no metabolismo de defesa antioxidante de *Microcystis aeruginosa*, elucidar fitoquimicamente os componentes dos diferentes extratos e frações, além de avaliar a atividade citotóxica e genotóxica da água resultante dos bioensaios por meio do teste de *Allium cepa*. A exposição da *M. aeruginosa* aos extratos e frações das plantas utilizadas resultou em redução significativa na densidade celular da cepa. O extrato etanólico das três plantas apresentou maior redução da densidade celular da cepa de cianobactéria após seis dias de bioensaio. O extrato etanólico de *S. auriculata* e *E. sonchifolia*, juntamente com a fração F6 de *S. auriculata* e F5 de *E. sonchifolia*, apresentaram a maior atividade algicida entre os tratamentos, também aumentaram a produção interna de peróxido de hidrogênio, malondialdeído e das enzimas do metabolismo de defesa antioxidante na cianobactéria. O extrato etanólico e fração F6 de *P. stratiotes* apresentaram perfil semelhante, diferindo apenas no declínio acentuado nos níveis da superóxido dismutase, sugerindo que este seja o fator mais importante relacionado à ação algicida de *P. stratiotes*. As análises de cromatografia gasosa/espectrometria de massa dos extratos etanólico e aquoso de *P. stratiotes* apresentaram o éster etílico do ácido palmítico como principal aleloquímico. O conteúdo polifenólico encontrado nos extratos pode ser o responsável pela atividade inibitória no crescimento de cianobactérias, devido ao potencial fitotóxico encontrado na literatura para a presença destes compostos vegetais. Em conclusão, extratos e frações das plantas estudadas apresentaram atividade algicida, sugerindo que os mesmos são fontes de compostos que promovem estresse oxidativo e peroxidação lipídica nas cianobactérias, resultando na redução de sua população.

Palavras-chave: alelopatia; superóxido dismutase; fitoquímicos; cianobactéria; antioxidantes.

Lourenção, Anderson. **Algicidal activity and oxidative stress of *Pistia stratiotes*, *Salvinia auriculata* and *Emilia sonchifolia* extracts and fractions in *Microcystis aeruginosa* metabolism.** 2021. Tese (Doutorado em Biotecnologia). – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2021.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the potential of extracts and fractions of *Pistia stratiotes* L., *Salvinia auriculata* Aubl. and *Emilia sonchifolia* L. to control *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger (cyanobacteria) under laboratory conditions, investigate the oxidative potential of extracts and fractions in the antioxidant defense metabolism of *Microcystis aeruginosa*, phytochemically elucidate the components of different extracts and fractions, in addition to evaluate the cytotoxic and genotoxic activity of the water resulting from the bioassays using the *Allium cepa* test. The exposure of *M. aeruginosa* to the extracts and fractions of the plants used resulted in a significant reduction in the cell density of the strain. The ethanol extract of the three plants showed a greater reduction in cell density of the cyanobacteria strain after 6 days of bioassay. The ethanolic extract of *S. auriculata* and *E. sonchifolia*, together with the F6 fraction of *S. auriculata* and F5 of *E. sonchifolia*, showed the highest algicidal activity among the treatments, also increasing the internal production of hydrogen peroxide, malondialdehyde and enzymes of antioxidant defense metabolism in cyanobacteria. The ethanol extract and F6 fraction of *P. stratiotes* presented a similar profile, differing only in the sharp decline in superoxide dismutase levels, suggesting that this is the most important factor related to the algicidal action of *P. stratiotes*. Gas chromatography/mass spectrometry analyzes of ethanolic and aqueous extracts of *P. stratiotes* showed palmitic acid ethyl ester as the main allelochemical. The polyphenolic content found in the extracts may be responsible for the inhibitory activity on the growth of cyanobacteria, due to the phytotoxic potential found in the literature for the presence of these plant compounds. In conclusion, the extracts and fractions of the studied plants showed algicidal activity, suggesting that they are sources of compounds that promote oxidative stress and lipid peroxidation in cyanobacteria, resulting in a reduction in their population.

Keywords: allelopathy; superoxide dismutase; phytochemicals; cyanobacteria; antioxidants.

SUMÁRIO

	REVISÃO DE LITERATURA	10
	REFERÊNCIAS	13
	CAPÍTULO 1	15
1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVO	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	MATERIAL VEGETAL E PREPARO DOS EXTRATOS	20
3.2	BIOENSAIOS COM <i>Microcystis aeruginosa</i> BCCUSP232	21
3.3	AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>P. stratiotes</i> EM <i>M. aeruginosa</i> BCCUSP 232	22
3.3.1	Extrações bioquímicas	22
3.3.2	Peroxidação lipídica	23
3.3.3	Espécies reativas de oxigênio: formação do peróxido de hidrogênio intracelular (H ₂ O ₂)	23
3.3.4	Determinação de proteínas totais e atividade das enzimas do metabolismo de defesa antioxidante	23
3.4	FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS EM SÍLICA C18	25
3.5	QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS	25
3.6	DETERMINAÇÃO DA CITOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAIZ DE <i>Allium cepa</i>	26
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	27
4	RESULTADOS	27
4.1	<i>Salvinia auriculata</i>	27
4.1.1	Efeito do extrato e fração de <i>S. auriculata</i> no crescimento de <i>Microcystis aeruginosa</i> BCCUSP232	27
4.1.2	Peroxidação lipídica	29
4.1.3	Espécies reativas de oxigênio (ROS): determinação de Peróxido Hidrogênio (H ₂ O ₂) intracelular	30
4.1.4	Proteínas totais e atividade das enzimas antioxidantes	31
4.1.5	Determinação de polifenóis e flavonoides totais	36
4.1.6	Determinação da citotoxicidade e genotoxicidade em células meristemáticas de raiz de <i>Allium cepa</i>	36

4.2	<i>E. sonchifolia</i>	37
4.2.1	Efeito do extrato e fração de <i>E. sonchifolia</i> no crescimento de <i>Microcystis aeruginosa</i> BCCUSP232	37
4.2.2	Peroxidação lipídica	39
4.2.3	Espécies reativas de oxigênio (ROS): determinação de Peróxido Hidrogênio (H₂O₂) intracelular	40
4.2.4	Proteínas totais e atividade das enzimas antioxidantes	41
4.2.5	Determinação de polifenóis e flavonoides totais	46
4.2.6	Determinação da citotoxicidade e genotoxicidade em células meristemáticas de raiz de <i>Allium cepa</i>	46
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	51
	CAPÍTULO 2	59
	CAPÍTULO 3	72
1	INTRODUÇÃO	74
2	OBJETIVO	74
3	MATERIAIS E MÉTODOS	74
3.1	MATERIAL VEGETAL E PREPARO DOS EXTRATOS	74
3.2	FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS EM SÍLICA C18	75
3.3	BIOENSAIOS COM <i>Microcystis aeruginosa</i> BCCUSP232	75
3.4	AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DAS FRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>P. stratiotes</i> EM <i>M. aeruginosa</i> BCCUSP 232	76
3.4.1	Extrações bioquímicas	76
3.4.2	Peroxidação lipídica	76
3.4.3	Espécies reativas de oxigênio: formação do peróxido de hidrogênio intracelular (H₂O₂)	77
3.4.4	Determinação de proteínas totais e atividade das enzimas do metabolismo de defesa antioxidante de <i>M. aeruginosa</i> BCCUSP 232	77
3.5	QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS DA FRAÇÃO MAIS ATIVA	77
3.6	DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAIZ DE <i>Allium cepa</i>	77
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	78

4	RESULTADOS	78
4.1	Efeito das frações de <i>P. stratiotes</i> no crescimento de <i>Microcystis aeruginosa</i> BCCUSP232	78
4.2	Peroxidação lipídica	79
4.3	Espécies reativas de oxigênio (ROS): determinação de Peróxido Hidrogênio (H₂O₂) intracelular	80
4.4	Proteínas totais e atividade das enzimas antioxidantes	81
4.5	Determinação de polifenóis e flavonoides totais	86
4.6	Determinação da citotoxicidade e genotoxicidade em <i>Allium cepa</i>	86
5	DISCUSSÃO	87
6	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	89
	CONCLUSÕES GERAIS	93

REVISÃO DE LITERATURA

O fenômeno alelopático foi descoberto há muito tempo. Registros sobre interações entre plantas podem remontar ao século 3 a.C., enquanto o termo “alelopatia” foi proposto pela primeira vez na década de 1930 (MOLISCH, 1937). Alelopatia, proposta inicialmente por Molish (1937), era definida como as interações bioquímicas entre várias plantas (incluindo microrganismos). Em seguida, os metabólitos secundários, secretados no meio ambiente pelas plantas e exibindo efeito alelopático em outras plantas, foram denominados aleloquímicos por Whittaker e Feeny (WHITTAKER e FEENY, 1971). A essência dos aleloquímicos (ou seja, uma planta afeta outras plantas vizinhas ao liberar produtos químicos fora de seus corpos) foi elucidada pela primeira vez no livro *Allelopathy* (CIPOLLINI e BOHRER, 2016). Em 1996, a Sociedade Internacional de Alelopatia ampliou a definição de alelopatia, ou seja, metabólitos secundários secretados por plantas e microrganismos afetam o crescimento e o desenvolvimento de qualquer processo de sistemas agrícolas e biológicos (CHENG e CHENG, 2015). Além disso, os doadores e os receptores alelopáticos também devem incluir animais (MORROW *et al.*, 2017; PECKOL e PUTNAM, 2017), uma vez que metabólitos secundários secretados por plantas aquáticas ou algas eram conhecidos por contribuir para os mecanismos de defesa contra competidores e predadores. O termo alelopatia foi sugerido para uso generalizado a fim de descrever a interação entre predador e presa (LEGRAND *et al.*, 2003).

A deterioração do ecossistema aquático pela proliferação de algas prejudiciais têm sido um problema crítico em todo o mundo (Laughinghouse IV *et al.*, 2012). A inibição alelopática de algas por plantas aquáticas foi descoberta observando o crescimento e o declínio do número de plantas e algas no ambiente aquático natural (WU, 2016). Pesquisadores observaram que a densidade de algas plâncticas era significativamente mais baixa em corpos d'água onde a *Elodea canadensis* cresceram em maior número, quando comparado às áreas ausentes de plantas aquáticas; após observações durante quatro anos consecutivos (WU, 2016). Hasler e Jones (1949) descobriu, pela primeira vez, que as plantas aquáticas tinham um efeito restritivo sobre as algas aquáticas. Em 1969, Fitzgerald descobriu que aleloquímicos de plantas submersas podiam inibir o crescimento de algas, o que despertou amplo interesse (FITZGERALD, 1969). Na década de 1970, Aubert descobriu que as interações químicas desempenhavam papel importante na formação de comunidades e estruturas fitoplanctônicas, além da competição nutricional (AUBERT e GAUTHIER, 1977). Mais tarde, descobriu-se que plantas terrestres também tinham efeitos inibitórios sobre as algas (LI *et al.*, 2020).

Para resolver problemas de proliferação de algas prejudiciais, pesquisadores começaram a investigar a interação entre plantas aquáticas e microalgas. Por muito tempo, os pesquisadores se concentraram principalmente na revelação dos efeitos alelopáticos das plantas aquáticas sobre as algas de água doce (ZHU *et al.*, 2021). O isolamento de aleloquímicos inibidores de algas foi iniciado na década de 1980 (STEVENS e MERRILL, 1980). A partir daí centenas de aleloquímicos inibidores de algas foram extraídos e identificados, como pirogalol, ácido hexanóico, berberina, entre outros (ZHANG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016; DONG *et al.*, 2019).

Na década de 1990, os estudos sobre o mecanismo alelopático em microalgas foi iniciando gradualmente, no entanto, a pesquisa e o desenvolvimento eram limitados na época devido à restrição na extração e identificação de aleloquímicos antes da ampla utilização de instrumentos de alto desempenho como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (ZHU *et al.*, 2021). Beneficiando-se do rápido progresso da purificação química e da tecnologia de detecção, uma grande quantidade de aleloquímicos de plantas aquáticas até então desconhecidos foram descobertos, relatórios relevantes sobre seus efeitos alelopáticos foram surgindo e os mecanismos de inibição de algas tornaram-se melhor elucidados (ZHU *et al.*, 2021).

Macrófitas são cruciais para estabilizar o estado de águas claras em lagos rasos, mesotróficos e eutróficos, pois podem reduzir o crescimento de microalgas (HILT *et al.*, 2006). Os mecanismos envolvidos incluem sombreamento de luz, ressuspensão de sedimentos, competição de nutrientes e alelopatia (MULDERIJ *et al.*, 2007). Quanto à alelopatia, as macrófitas excretam de forma sustentável aleloquímicos inibidores de algas para o meio ambiente, resultando em reduções da biomassa fitoplanctônica (PARK *et al.*, 2006). A utilização de alelopatia para inibir o crescimento de microalgas pode ser alcançada cultivando plantas aquáticas diretamente no ambiente. Entretanto, a maior parte das pesquisas existentes foram realizadas em laboratórios, usando extratos de plantas, exsudatos ou compostos purificados (LI *et al.*, 2020). Estudos anteriores demonstraram que pelo menos 40 espécies de grandes plantas aquáticas produzem aleloquímicos que podem inibir o crescimento de algas, e os tipos mais comuns de aleloquímicos são compostos fenólicos, terpenóides e ácidos graxos (MOHAMED, 2017). Alguns desses aleloquímicos inibitórios sobre algas foram extraídos de plantas aquáticas, como *Acorus gramineus* (NAKAI *et al.*, 2010), *Phragmites australis* (GAO *et al.*, 2011), *Potamogeton pusillus* (TAKEDA *et al.*, 2011).

Pistia stratiotes L., conhecida popularmente como alface d'água, é uma planta aquática flutuante, amplamente distribuída por todo o mundo (CARDOSO *et al.*, 2005). *P. stratiotes* apresenta porte herbáceo, caule, estolonífera, com propagação sexuada e assexuada por meio de seus estolões. Possui folhas sésseis, esponjosas, espatuladas, obtusas e densamente pubescentes, dispostas em rosetas, coloração verde, com inflorescência composta por espádice cercada por uma espata

pilosa (COELHO *et al.*, 2005). Esta espécie é responsável pela formação de densos tapetes de plantas sobre a superfície aquática, sendo considerada como uma espécie daninha, afetando o aproveitamento econômico dos sistemas aquáticos (COELHO *et al.*, 2005). Esta macrófita tem sido utilizada para a remoção de mercúrio de efluentes de mineração, pela capacidade de acumular o metal em suas raízes, melhorando consequentemente a qualidade dos sistemas aquáticos. No tratamento de esgoto urbano, é demonstrado seu potencial de utilização na fitorremediação (LIN e LI, 2016). Pesquisas também demonstraram que *P. stratiotes* apresenta efeitos alelopáticos, podendo controlar o crescimento de microrganismos como as cianobactérias (WU *et al.*, 2015).

Salvinia auriculata Aubl. é uma monilófita livre e flutuante, muito comum em água doce, com ampla distribuição geográfica, de rápida disseminação por propagação vegetativa, sendo considerada como planta daninha (HENRY-SILVA e CAMARGO, 2006). Apresenta nós e entre-nós nítidos, em cada nó se originam três folhas, sendo duas verdes e flutuantes em cuja superfície ocorrem inúmeros tricomas hidrofóbicos. Uma terceira folha apresenta-se submersa, modificada e adaptada à absorção de água e íons, desenvolvendo basicamente a função de raiz (FORNO e HARLEY, 1979). Estudos científicos demonstram seu potencial bioindicador, fitorremediador e bactericida, o que torna essa planta candidata para controle de cianobactérias e suas toxinas (LIMA *et al.*, 2013).

Além das plantas aquáticas, muitas plantas terrestres produzem compostos alelopáticos com a capacidade de inibir o crescimento de algas (MENG *et al.*, 2015; MECINA *et al.*, 2017, 2019). *Emilia sonchifolia* L. da família Asteraceae, conhecida por flor pincel, destaca-se por ser uma espécie daninha com capacidade de inibir a germinação de sementes e crescimento inicial de espécies adjacentes (USUAH *et al.*, 2013). Esta espécie caracteriza-se por ser uma erva anual, ereta, pouco ramificada, de 30 a 60 cm de altura, com folhas membranáceas dispostas de maneira rosulada e com flores vermelhas dispostas em capítulos. É uma planta originária da Ásia tropical que se adaptou plenamente às condições ambientais de todo o território brasileiro (LORENZI e MATOS, 2008).

Diante da premente necessidade de controle da proliferação de algas nocivas em corpos d'água, principalmente por meio de novas tecnologias e compostos mais eficientes, duradouros, sustentáveis e ecologicamente corretos, os estudos de plantas candidatas a fornecedoras de compostos algicidas e/ou algistáticos torna-se de suma importância, visto o impacto das cianotoxinas frente à saúde das populações, assim como a possível contaminação de alimentos e do meio ambiente.

Diante do contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial dos extratos e frações de *Pistia stratiotes* L., *Salvinia auriculata* Aubl. e *Emilia sonchifolia* L. para controle de

Microcystis aeruginosa (Kützinger) Kützinger (cianobactéria) em condições laboratoriais, investigar o potencial oxidativo dos extratos e frações no metabolismo de defesa antioxidante de *Microcystis aeruginosa*, elucidar fitoquimicamente os componentes dos diferentes extratos e frações, além de avaliar a atividade citotóxica e genotóxica da água resultante dos bioensaios por meio do teste de *Allium cepa*.

REFERÊNCIAS

AUBERT, M.; GAUTHIER, M. J. Biological interactions between microorganisms in sea. **Marine Chemistry**, v. 5, n. 4-5, p. 553–555, Nov. 1977.

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

CHENG, F.; CHENG, Z. H. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, Nov. 2015.

CIPOLLINI, K.; BOHRER, M. G. Comparison of allelopathic effects of five invasive species on two native species. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 143, n. 4, p. 427-436, Oct. 2016.

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

DONG, J.; CHANG, M.; LI, C.; DAI, D.; GAO, Y. Allelopathic effects and potential active substances of *Ceratophyllum demersum* L. on *Chlorella vulgaris* Beij. **Aquatic Ecology**, v. 53, n. 6, p. 651–663, Aug. 2019.

FITZGERALD, G. P. Some factors in the competition or antagonism among bacteria, algae and aquatic weeds. **Journal of Phycology**, v. 5, n. 4, p. 351-359, Dec. 1969.

FORNO, I. W.; HARLEY, K. L. S. The occurrence of *Salvinia molesta* in Brazil. **Aquatic Botany**, v. 6, n. 2, p. 185-187, 1979.

GAO, Y.; LIU, B.; XU, D.; ZHOU, Q.; HU, C.; GE, F.; ZHANG, L.; WU, Z. Phenolic compounds exuded from two submerged freshwater macrophytes and their allelopathic effects on *Microcystis aeruginosa*. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 20, n. 5, p. 1153–1159, 2011.

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

HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A. F. M. Composição química de macrófitas aquáticas flutuantes utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura. **Planta Daninha**, v. 24, n. 1, p. 21-28, Jan. 2006.

HILT, S.; GROSS, E.M.; HUPFER, M.; MORSCHEID, H.; MÄHLMANN, J.; MELZER, A.; POLTZ, J.; SANDROCK, S.; SCHARF, E.-M.; SCHNEIDER, S.; van de WEYER, K. Restoration of submerged vegetation in shallow eutrophic lakes—a guideline and state of the art in Germany. **Limnologia**, v. 36, n. 3, p. 155–171, Sep. 2006.

LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; PRÁ, D.; SILVA-STENICO, M. E.; RIEGER, A.; FRESCURA, V. D.-S.; FIORE, M. F.; TEDESCO, S. B. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **Science of The Total Environment**, v. 432, p. 180-188, Aug. 2012.

LEGRAND, C.; RENGEFORS, K.; FISTAROL, G. O.; GRANALI, E. Allelopathy in phytoplankton - biochemical, ecological and evolutionary aspects. **Phycologia**, v. 42, p. 406-419, Sep. 2003.

LI, B.; YIN, Y.; KANG, L.; FENG, L.; LIU, Y.; DU, Z.; TIAN, Y.; ZHANG, L. A review: application of allelochemicals in water ecological restoration-algal inhibition. **Chemosphere**, v. 267, n. 128869, Nov. 2020.

LIMA, S.; DIAZ G.; DIAZ, M. A. N. Antibacterial chemical constituent and antiseptic herbal soap from *Salvinia auriculata* Aubl. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, Dec. 2013.

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum, 2008. 161 p.

MECINA, G. F.; CHIA, M. A.; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; MOLINILLOD, J. M. G.; MACÍAS, F. A.; SILVA, R. M. G. Effect of flavonoids isolated from *Tridax procumbens* on the growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Toxicology**, v. 211, p. 81–91, Jun. 2019.

MECINA, G. F.; DOKKEDAL, A. L.; SALDANHA, L. L.; CHIA, M. A.; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K.; do CARMO BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.; da SILVA, R. M. G. Response of *Microcystis aeruginosa* BCCUSP 232 to barley (*Hordeum vulgare* L.) straw degradation extract and fractions. **Science of the Total Environment**, v. 599-600, p. 1837-1847, Dec. 2017.

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

MOHAMED, Z. A. Macrophytes-cyanobacteria allelopathic interactions and their implications for water resources management – a review. **Limnologia**, v. 63, p. 122–132, Mar. 2017.

MOLISH, H. B. **Der Einfluss einer Pflanze auf die andere, Allelopathie**. Jena: Gustav Fischer, 1937. 106 p.

MORROW, K. M.; BROMHALL, K.; MOTTI, C. A.; MUNN, C. B.; BOURNE, D. G. Allelochemicals produced by the brown macroalga, *Lobophora* sp., are active against coral larvae and

associated bacteria, supporting pathogenic shifts to *Vibrio* dominance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 1, Jan. 2017.

MULDERIJ, G.; VAN NES, E. H.; VAN DONK, E. Macrophyte-phytoplankton interactions: the relative importance of allelopathy versus other factors. **Ecological Modelling**, v. 204, n. 1-2, p. 85–92, May 2007.

NAKAI, S.; ZOU, G.; OKUDA, T.; TSAI, T. Y.; SONG, X.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Anti-cyanobacterial allelopathic effects of plants used for artificial floating islands. **Allelopathy Journal**, v. 26, p. 113-121, 2010.

PARK, M. H.; HAN, M. S.; AHN, C. Y.; KIM, H. S.; YOON, B. D.; OH, H. M. Growth inhibition of bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by rice straw extract. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 307–312, May 2006.

PECKOL, P.; PUTNAM, A. B. Differential toxic effects of *Ulva lactuca* (Chlorophyta) on the herbivorous gastropods, *Littorina littorea* and *L. obtusata* (Mollusca). **Journal of Phycology**, v. 53, n. 2, p. 361-367, Apr. 2017.

STEVENS, K. L.; MERRILL, G. B. Growth inhibitors from spikerush. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 644–646, May 1980.

TAKEDA, F.; NAKANO, K.; NISHIMURA, O.; SHIMADA, Y.; FUKURO, S.; TANAKA, H.; HAYASHI, N.; INAMORI, Y. Allelopathic potential of *Potamogeton pusillus* community against *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Water and Environment Technology**, v. 9, n. 1, p. 21–28, Mar. 2011.

USUAH, P. E.; UDOM, G. N.; EDEM, I. D. Allelopathic effect of some weeds on the germination of seeds of selected crops grown in Akwa Ibom State Nigeria. **Global Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 1, p. 23-33, Jun. 2013.

WANG, J.; LIU, Q.; FENG, J.; LV, J.; XIE, S. Effect of high-doses pyrogallol on oxidative damage, transcriptional responses and microcystins synthesis in *Microcystis aeruginosa* TY001 (Cyanobacteria). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 134, p. 273–279, Dec. 2016.

WHITTAKER, R. H.; FEENY, P. P. Allelochemicals: Chemical Interactions between Species. **Science**, v. 171, p. 757-770, 1971.

WU, X.; WU, H.; YE, J.; ZHONG, B. Study on the release routes of allelochemicals from *Pistia stratiotes* Linn., and its anticyanobacteria mechanisms on *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 18994–19001, Aug. 2015.

WU, Z. B. Allelopathy of Aquatic Macrophytes on Phytoplankton. **Science Press**, p. 120-140, 2016.

ZHANG, S.; ZHANG, M.; DAI, W.; BI, X.; YANG, P.; ZHANG, D. Evaluation of berberine's algicidal effects on toxic *Microcystis aeruginosa* growth using a double fluorescein staining method. **The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh**, v. 66, p. 940–945, 2014.

ZHU, X.; DAO, G.; TAO, Y.; ZHAN, X.; HU, H. A review on control of harmful algal blooms by plant-derived allelochemicals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 401, n. 123403, Jan. 2021.

CAPÍTULO I

ESTRESSE OXIDATIVO E INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM *Microcystis aeruginosa* INDUZIDO POR EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Salvinia auriculata* Aubl. E *Emilia sonchifolia* L.

RESUMO

Os problemas causados pela proliferação de cianobactérias nocivas têm atraído a atenção mundial devido aos graves danos à saúde do meio ambiente e dos seres humanos. Aleloquímicos como metabólitos secundários secretados pelas plantas, têm excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, efeito inibidor de cianobactérias e pouco dano ecológico, além de perspectivas de aplicação promissoras na restauração ecológica da água. O presente estudo avaliou o potencial dos extratos e frações de *S. auriculata* e *E. sonchifolia* para controle de *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger em condições laboratoriais, monitorando as mudanças no crescimento, estresse oxidativo e resposta antioxidante. Este estudo também avaliou fitoquimicamente os extratos e frações mais ativos nos bioensaios, além de avaliar a atividade citotóxica e genotóxica da água resultante dos bioensaios por meio do teste de *Allium cepa*. Os resultados obtidos demonstraram maiores reduções na densidade celular da cianobactéria exposta ao extrato etanólico e fração metanólica de *S. auriculata* e extrato etanólico e fração hidrometanólica (20:80) de *E. sonchifolia*. Além disso, o extrato e a fração mais ativos de *S. auriculata* e *E. sonchifolia* aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e a atividade das enzimas antioxidantes em *M. aeruginosa*. O extrato etanólico de *S. auriculata* reduziu o índice mitótico e a fração metanólica o índice de morte em *Allium cepa*. Mesmo perfil foi observado para o extrato e fração mais ativos de *E. sonchifolia*. O presente estudo verifica que *S. auriculata* e *E. sonchifolia* possuem metabólitos secundários capazes de prejudicar a fisiologia e crescimento de *M. aeruginosa*. Estes efeitos podem estar associados ao conteúdo polifenólico encontrado nos extratos e frações avaliados. Assim, estudos futuros serão realizados a fim de elucidar estes aleloquímicos.

Palavras-chaves: aleloquímicos; *Allium cepa*; cianobactérias; polifenóis; sustentabilidade ambiental.

1 INTRODUÇÃO

O aumento das atividades urbanas, industriais e agrícolas, assim como a descarga de seus efluentes nos corpos d'água, ocasionam e aceleram o processo de eutrofização. Este evento, quando aliado à elevação da temperatura, favorece a rápida proliferação de cianobactérias no ambiente aquático, processo conhecido como “floração” ou “bloom” (O’NEIL *et al.*, 2012; PAERL e OTTEN, 2013). Este fenômeno pode originar-se a partir de diferentes espécies de algas e cianobactérias, resultando em interferências na gestão dos mananciais, levando a alterações ambientais devido à biomassa excessiva e liberação de toxinas, prejudicando a utilização deste recurso (ZHOU *et al.*, 2016).

A produção de toxinas por cianobactérias pode produzir gostos e odores desagradáveis na água. Além disso, a medida que ocorre a acumulação dessas toxinas nos indivíduos de uma cadeia alimentar, pode alterar a qualidade de peixes, e tornar essa água inapropriada para a recreação, consumo humano e animal (EL-SHEHAWY *et al.*, 2012). As principais toxinas produzidas pelos gêneros de cianobactérias são microcistinas, nodularinas, anatoxinas, cilindrospermopsinas e saxitoxinas, sendo estas classificadas como hepatotóxicas, neurotóxicas, citotóxicas, dermatotóxicas e irritantes gastrointestinais (MEREL *et al.*, 2013). Estas toxinas podem causar doenças em humanos por ingestão de água ou alimentos contaminados, podendo até mesmo ocasionar a morte (SVIRČEV *et al.*, 2009). A exposição à cianotoxinas pode provocar dor abdominal, náuseas, irritação da pele, paralisia respiratória ou cardíaca, podendo resultar em óbito (SVIRČEV *et al.*, 2011). A hepatotoxicose e a neurotoxicose são os efeitos tóxicos mais comuns provocados pelas cianotoxinas (HAIDER *et al.*, 2003). Diante disso, a legislação brasileira baseada nas concentrações propostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), estabeleceu que o nível máximo aceitável de cianotoxina em água potável, como, para as microcistinas totais é de 1µg/L, saxitoxinas é 3µg/L, cilindrospermopsinas é 1µg/L, anatoxina-a(s) é 1µg/L (BRASIL, 2011a, 2011b).

Entre as mais frequentes e prejudiciais cianobactérias, destaca-se o gênero *Microcystis* que apresenta registros de floração em 108 países, 79 dos quais relatam a produção de microcistina (HARKE *et al.*, 2016). No que concerne à ocorrência de cianobactérias no Brasil, estas encontram-se amplamente distribuídas em todas as regiões apresentando florações contendo microcistina em vários reservatórios, sendo ainda mais recorrente na região semiárida brasileira (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2014; LORENZI *et al.*, 2018), o que certamente se deve às condições climáticas e de eutrofização dos corpos d'água dessa região, que favorecem as florações (MOURA *et al.*, 2018). O primeiro caso reconhecido no Brasil de intoxicação com cianotoxinas ocorreu em Caruaru

no estado de Pernambuco em uma clínica de hemodiálise onde 52 mortes foram registradas, devido à exposição direta a altas concentrações de microcistinas hepatotóxicas (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Diante disso, algumas medidas físicas e químicas são utilizadas para reduzir e/ou eliminar os efeitos do crescimento de cianobactérias e seus danos ao meio ambiente (YU *et al.*, 2007). As físicas são: filtração, centrifugação, ultrassom e radiação UV, já os tratamentos químicos utilizam sulfato de cobre e peróxido de hidrogênio (OU *et al.*, 2012). Outra alternativa efetiva é o controle biológico, que utiliza a introdução de organismos previamente selecionados como peixes e zooplânctons (LIANG e NAN, 2009). Entretanto, essas medidas apresentam sucesso limitado, pois são dispendiosas, sendo utilizadas apenas como soluções emergenciais (FERRIER *et al.*, 2005). Assim, há necessidade de novas pesquisas para a elaboração de novas técnicas menos onerosas, mais eficazes, que gerem menor impacto ambiental, e maior durabilidade; favorecendo consequentemente a sustentabilidade dos sistemas como um todo.

Desta forma, diversos estudos tem demonstrado que compostos químicos naturais, provenientes do metabolismo secundário dos vegetais, podem vir a ser utilizados no controle de cianobactérias e outros organismos (LI *et al.*, 2016; AMORIM *et al.*, 2019). Entre os vegetais promissores como fornecedores de substâncias ativas para o controle de cianobactérias estão as macrófitas aquáticas que assim como as cianobactérias, tem sua taxa de crescimento elevada em ambientes eutrofizados. Estudos têm demonstrado também que em condições de competição, as macrófitas aquáticas podem liberar substâncias provenientes de seu metabolismo secundário, tais como taninos e outros compostos fenólicos, originando o fenômeno denominado alelopatia, interferindo direta ou indiretamente no desenvolvimento de outros indivíduos, incluindo cianobactérias (ZHANG *et al.*, 2011; MOHAMED, 2017). Dentre as principais macrófitas estudadas para efeitos alelopáticos estão as espécies pertencentes ao gênero *Salvinia* (Salviniaceae) (ZHANG *et al.*, 2016a, 2016b).

Salvinia auriculata Aubl. é uma monilófita livre e flutuante, muito comum em água doce, com ampla distribuição geográfica, de rápida disseminação por propagação vegetativa, sendo considerada planta daninha (HENRY-SILVA e CAMARGO, 2006). Apresenta nós e entre-nós nítidos, sendo que em cada nó se originam três folhas, sendo duas verdes e flutuantes em cuja superfície ocorrem inúmeros tricomas hidrofóbicos. Uma terceira folha submersa, modificada e adaptada à absorção de água e íons, funcionando basicamente como uma raiz (FORNO e HARLEY, 1979). Estudos científicos demonstram seu potencial bioindicador, fitorremediador e bactericida, o que torna essa planta candidata para o controle de cianobactérias e suas toxinas (LIMA *et al.*, 2013).

Outro vegetal com potencial para controle de cianobactérias e suas toxinas é *Emilia sonchifolia* L. da família Asteraceae, conhecida por flor pincel. Esta planta terrestre destaca-se por ser

uma espécie daninha com capacidade de inibir a germinação de sementes e crescimento inicial de espécies adjacentes (USUAH *et al.*, 2013). Caracteriza-se como erva anual, ereta, pouco ramificada, de 30 a 60 cm de altura, com folhas membranáceas dispostas de maneira rosulada e com flores vermelhas dispostas em capítulos. É uma planta originária da Ásia tropical que se adaptou plenamente às condições ambientais de todo o território brasileiro (LORENZI e MATOS, 2008). Estudos realizados com esta planta revelaram propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidante e antinociceptivo (NWORU *et al.*, 2012). Mais recentemente, o efeito imunomodulador foi relatado, além da atividade apoptótica em células cancerosas (GILCY e KUTTAN, 2016).

Diante da premente necessidade de controle da proliferação de algas nocivas em corpos d'água, principalmente por meio de novas tecnologias e compostos mais eficientes, duradouros, sustentáveis e ecologicamente corretos, os estudos de plantas candidatas a fornecedoras de compostos algicidas e/ou algistáticos torna-se de suma importância, visto o impacto das cianotoxinas frente à saúde das populações, assim como a possível contaminação de alimentos e do meio ambiente.

2 OBJETIVO

Avaliar a presença de atividade inibitória dos extratos e frações de *S. auriculata* e *E. sonchifolia* L. sobre o crescimento *in vitro* de *Microcystis aeruginosa*; Investigar o potencial oxidativo dos extratos e frações no metabolismo de defesa antioxidante de *M. aeruginosa*; Caracterizar fitoquimicamente os compostos dos diferentes extratos e frações com ação inibitória; Avaliar a atividade citotóxica e genotóxica da água resultante dos bioensaios por meio do teste de *Allium cepa*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARO DOS EXTRATOS

Ambas espécies vegetais foram coletadas na cidade de Assis, localizada no sudeste brasileiro, entre os meses de maio e julho de 2017. A espécie aquática *S. auriculata* (voucher HASSI-1129) foi obtida em uma lagoa pública, sem causar impacto na população de plantas (22°44'59,40"S e 50°31'40,40"W). A espécie terrestre *E. Sonchifolia* (voucher HASSI-1128) foi coleta de espécimes cultivadas em casa de vegetação na UNESP - Câmpus Assis (22°38'57.3"S 50°26'15.1"W). As plantas inteiras foram limpas e secas a 40°C em estufa com circulação de ar (Cienlab, Brasil) e

posteriormente moídas em um moinho de facas (Cienlab, CE-430, Brasil). O pó resultante de cada planta foi primeiramente misturado com hexano em uma garrafa de vidro tampada, que foi submetida a ultrassom (Prolab, SSBUC10L, Brasil) por 30 minutos para remover a gordura do material. A mistura resultante foi então filtrada a vácuo e o processo repetido três vezes consecutivas. Em seguida, o material vegetal foi submetido a extração por percolação com acetato de etila, etanol e água destilada (temperatura ambiente e extração exaustiva), de acordo com Prista *et al.* (1995). Os extratos resultantes foram filtrados a vácuo e submetidos à rotaevaporação (Marconi, MA-120, Brasil), para retirada dos solventes. Para a extração aquosa, foram realizadas as etapas de congelamento e liofilização do extrato (Liotop, L101, Brasil). Os extratos secos foram mantidos em pequenos frascos âmbar à temperatura ambiente até sua utilização.

3.2 BIOENSAIOS COM *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232

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

Conforme mostra a figura 1, os bioensaios foram elaborados durante 10 dias e conduzidos utilizando-se Erlenmeyers de 1000 mL com 700 mL de meio ASM-1, em câmaras de cultura nas condições acima descritas. Todos os experimentos iniciaram com a densidade de $2,3 \times 10^5$ células/mL de *M. aeruginosa* obtida a partir da mesma cultura em fase de crescimento exponencial. Na fase de crescimento exponencial (4 dias após o inóculo) das culturas experimentais, foram coletadas amostras para a determinação da densidade celular antes da adição dos extratos, a fim de confirmar o estágio de crescimento da cepa. Logo após, a cianobactéria foi exposta separadamente aos extratos (aquoso, etanólico e acetato de etila) de *Emilia Sonchifolia* L. e *Salvinia auriculata* Aubl. nas concentrações de 100, 250 e 500 mg/L e incubada durante seis dias consecutivos. As culturas dos grupos controle não foram expostas aos extratos, porém foram mantidas nas mesmas condições às dos grupos experimentais. Devido a coloração dos extratos vegetais brutos, suas absorbâncias foram subtraídas das leituras da densidade celular do bioensaio. Para tanto, os mesmos foram adicionados em meio ASM-1 sem a adição da cianobactéria, nas mesmas concentrações utilizadas no

bioensaio e mantidas nas mesmas condições às dos grupos experimentais. Amostras foram coletadas no 2º, 4º e 6º dia de exposição aos extratos utilizando capela de fluxo laminar e técnicas estéreis para determinação da densidade celular, peroxidação lipídica, espécies reativas de oxigênio (H_2O_2), proteínas totais e atividade enzimática do metabolismo antioxidante. Todos os experimentos foram realizados em triplicada.

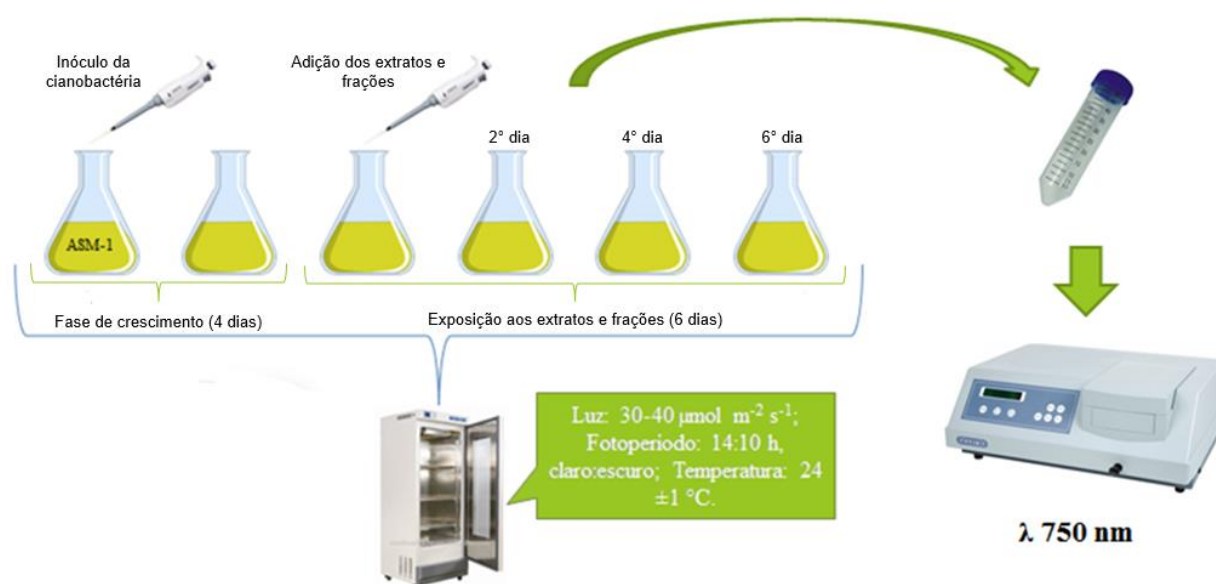


Figura 1 - Resumo das etapas adotadas no bioensaio com *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232.

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

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

3.3 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *S. auriculata* e *E. sonchifolia* EM *M. aeruginosa* BCCUSP 232

3.3.1 Extrações bioquímicas

A biomassa obtida a partir do *pellet* formado pela centrifugação de 40 mL a 10000 rpm e 0°C das coletas de cultura de *M. aeruginosa*, foi homogenizadas em tampão de fosfato 0,1 mol (pH 6,5) contendo 1% (w/v) de polivinilpirrolidona (PVP), e posteriormente centrifugadas a 15000 rpm e 0°C durante 10 min, sendo o sobrenadante obtido armazenado em criotubos a -20°C.

3.3.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada estimando-se o teor de malondialdeído (MDA). Seguindo o método de Madhava Rao e Sresty (2000) com modificações, uma alíquota de 1 mL do sobrenadante das amostras foram transferidas para tubos de vidro e adicionados 4 mL de ácido tiobarbitúrico 0,5 % (p/v) em ácido tricloroacético 20 % (p/v). A mistura foi aquecida a 95°C durante 30 min e posteriormente resfriada em banho com gelo. A mistura resultante foi centrifugada a 15000 rpm durante 15 min e a absorbância do sobrenadante foi medida a 532 nm. As medições foram corrigidas para turbidez inespecífica pela subtração da absorbância a 600 nm. A concentração de MDA foi calculada usando a absorvidade molar de 155 L mM⁻¹ cm⁻¹ e os resultados foram apresentados em mmol/L.

3.3.3 Espécies reativas de oxigênio: formação do peróxido de hidrogênio intracelular (H₂O₂)

O método de Jana e Choudhuri (1982) foi utilizado para medir a formação interna de H₂O₂ por *M. aeruginosa*, com algumas modificações. Para dosar a concentração de H₂O₂, 133 mL de cloreto de titânio 0,1% (em 20% H₂SO₄) foram adicionados a 400 mL do sobrenadante, e após 1 min de incubação, a absorbância da mistura de cor vermelho-laranja foi medida a 410 nm com um espectrofotômetro Biospectro SP-22. A absorvidade molar de 0.28 L μmol⁻¹ cm⁻¹ foi utilizada para calcular a concentração de H₂O₂ em μmol/g.

3.3.4 Determinação de proteínas totais e atividade das enzimas do metabolismo de defesa antioxidante

A extração obtida no item 3.3.1 foi usada para a medição de proteínas totais e os ensaios de atividade das enzimas antioxidantes. A concentração total de proteínas foi determinada de acordo com Bradford (1976) e expressa em μg/mL, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada com base na sua função peroxidativa de acordo com Johansson e Borg (1988). Este método utiliza metanol como um doador de hidrogênio para a catalase, o que resulta na formação de formaldeído que é medido colorimetricamente com Purpald. Para o preparo da solução mista, 250 mL de tampão fosfato de potássio (25 mmol, pH 7,0) foram incubados com 250 mL de metanol e 50 mL de peróxido de hidrogênio (0,27%, v/v). A reação foi iniciada pela adição de 50 μL de extrato da enzima à temperatura ambiente (28°C) em

tubos de 2 mL contendo 350 μ L de água deionizada e 500 μ L de solução mista, com agitação contínua. Após 20 min, a reação foi interrompida pela adição de 250 μ L de hidróxido de potássio 7,8 M. Em seguida, 500 μ L de Purpald 34,2 mmol (4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol) em HCl a 480 mmol foi adicionado, e a mistura reacional foi incubada novamente durante 10 min a temperatura ambiente com agitação contínua. A adição de 250 μ L de periodato de potássio 65,2 mmol produziu cor púrpura, cuja absorbância foi lida a 550 nm por um espectrofotômetro Biospectro SP-22. A atividade da enzima foi calculada a partir de curvas de calibração realizadas utilizando formaldeído (0-120 mmol). Uma unidade (U) de CAT foi definida como a quantidade de enzima que causou a formação de 200 mmol de formaldeído nas condições do ensaio acima definidas. A atividade de CAT foi expressa em unidade U/mL de amostra.

A atividade da peroxidase (POD) foi determinada de acordo com Reddy *et al.* (1996), assim três mL de solução de pirogalol (0,05 M em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5) e 0,5 mL de H₂O₂ 1% foram misturados em uma cubeta, e a reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL de extrato da enzima. A alteração na absorbância por minuto é proporcional à atividade da enzima. A atividade foi apresentada em U/mL de extração.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada espectrofotometricamente de acordo com os procedimentos descritos por Misra e Fridovich (1972). O meio de incubação continha num volume final de 400 mL, 240 mL de água deionizada, 40 mL de solução tampão de fosfato de potássio 67 mmol (pH 7,8), 40 mL de solução de metionina 45 mmol, 40 mL de solução de riboflavina 5,3 mmol e 40 mL de solução de cloreto de nitro azul de tetrazólio (NBT) 84 mmol. Os tubos de reação contendo 2 mL de meio de incubação e 0,1 mL de extrato da enzima foram colocados numa câmara forrada com folhas de alumínio e iluminados com duas lâmpadas fluorescentes de 15 W, a 25 °C durante 10 min. Após a exposição à luz, a absorbância do meio de incubação foi medida por espectrofotometria a 600 nm. A quantidade de homogeneizado adicionado ao meio de incubação foi mantida abaixo de uma unidade de enzima para assegurar precisão suficiente. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que inibiu 50% da redução de NBT, de acordo com a equação abaixo: $\%I = (AS-ANC)/ANC$, onde %I é a percentagem de inibição; AS é a absorbância das amostras, e ANC a absorbância do controle negativo (sem extrato da enzima).

O doseamento da atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi realizada utilizando o modelo de substrato padrão dinitrobenzeno 1-cloro-2,4- (CDNB) de acordo com Mauch e Dudler (1993). A reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL de extrato da enzima a 2 mL da mistura reacional contendo 3,6 mmol de glutathione reduzida e 1 mmol de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,5). A atividade enzimática foi determinada pelo do monitoramento

da variação da absorbância a 340 nm. A alteração na absorbância foi diretamente proporcional à atividade de GST.

3.4 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS EM SÍLICA C18

O extrato bruto etanólico de *E. sonchifolia* e *S. auriculata* foi submetido a fracionamento, pois este apresentava maior atividade inibitória sobre o crescimento da cepa de *M. aeruginosa* estudada ao final do bioensaio, por esse motivo uma coluna cromatográfica foi ajustada com cerca de 75% sílica LiChroprep® RP-18 (40-63 µm) (MERCK®) e 25% da mesma sílica incorporado com 2,0 g de extrato. Em seguida, os extratos foram eluídos com misturas de Água/Metanol em polaridade decrescente, realizando as separações em fase reversa na seguinte sequência: água destilada, água destilada: metanol (80:20), água destilada: metanol (60:40), água destilada: metanol (40:60), água destilada: metanol (20:80) e metanol. As trocas de solventes foram realizadas sempre que a fração permanecia sem evidência de separação, desta forma, o fracionamento de cada extrato resultou cada um em frações de F1 a F6. As frações filtradas foram concentradas em um evaporador rotativo a 40±2°C, armazenadas em frasco âmbar a temperatura ambiente, e então submetidas a novos bioensaios nas concentrações de 25 e 50 mg/L.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS

A quantificação de fenóis e flavonoides dos extratos e frações mais ativos nos bioensaios foi realizada pela diluição dos mesmos em etanol nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 250, 500, 1.000, 3.000, 5.000 e 10.000 µg/mL. Para a determinação do teor de fenóis totais foi utilizado o método de Singleton e Rossi (1965). Para cada 0,5 mL de extrato nas diferentes concentrações foi adicionada 5 mL de água destilada, além de 0,25 mL do reagente de *Folin-Ciocalteu*. Após 3 min, 1 mL de solução saturada de Na₂CO₃ foi adicionada a 10% e a mistura foi armazenada durante 1h. A absorbância foi medida a 725 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Modelo: SP220, BIOSPECTRO, BRASIL). Todos os testes foram realizados em triplicada e os resultados foram expressos em µg equivalente de ácido gálico (AGE) por miligrama de extrato.

A quantificação dos flavonoides totais dos extratos e frações foi determinada com base no espectrofotômetro UV-Vis e as amostras foram preparadas como descrito por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999), com base na complexação dos flavonoides com AlCl₃. Uma alíquota de 250 µL de extrato em diferentes concentrações foi misturada com 1,25 mL de água destilada e 75 µL solução de NaNO₂ em 5%. Após 6 min, foi adicionada uma solução de 150 µL AlCl₃/H₂O a 10%.

Após 5 min, foi adicionado 0,5 mL de uma solução de NaOH 1 M e, em seguida, o volume total foi ajustado por adição de 2,5 mL de água destilada. As amostras foram agitadas em misturador de vórtice e a absorbância foi medida a 510 nm. Todos os testes foram realizados em triplicada e os resultados foram expressos em µg equivalente de rutina (RE) por miligrama de extrato.

3.6 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAIZ DE *Allium cepa*

Após o último dia do bioensaio (6º dia) com os extratos brutos e frações mais ativas de *S. auriculata* e *E. sonchifolia* sobre *M. aeruginosa* BCCUSP232, 40 mL de cada bioensaio foram separados e utilizados para o teste em *Allium cepa*.

Seguindo procedimento descrito por Fiskesjö (1985), sementes de *A. cepa* variedade Baia periforme de mesmo lote foram submetidas à germinação, em placas de Petri, embebidas com as amostras dos bioensaios (tratamento contínuo). Quando as raízes das plântulas atingiram em média 1 cm de comprimento, as mesmas foram transferidas para placas de Petri com papel filtro embebidos com água destilada, permanecendo nestas placas até atingirem 5 cm médio de comprimento (período de recuperação) e, por fim, foi realizada a coleta das raízes. Todo o experimento foi realizado em condições de umidade relativa, temperatura e luminosidade controladas artificialmente em estufas de germinação tipo BOD. Após a coleta, as raízes foram fixadas em Carnoy (álcool etílico absoluto e ácido acético glacial, 3:1) e então armazenadas em geladeira ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) até o preparo e análise das lâminas.

As raízes foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N a 60°C , durante 8 minutos, e posteriormente coradas em Reativo de Schiff por 2 horas ao abrigo da luz. As raízes foram colocadas sobre lâminas e adicionado uma gota de Carmin acético 2% sobre o meristema e as mesmas cobertas por lamínulas. Em seguida foram esmagadas e fixadas em chama de lamparina. As análises foram realizadas em microscópio óptico (aumento de 40x e 100x com auxílio de óleo de imersão).

Foram utilizadas cinco raízes por parcela, contando 5000 células/tratamento. Os efeitos citotóxicos da água residual foram determinados pela análise do índice mitótico (n° total de células em divisão/ n° total de células analisadas x 100) e índice de morte celular (n° total de células em morte/ n° total de células analisadas x 100). As aberrações cromossômicas também foram determinadas (anáfase e telófase aberrantes), e suas frequências utilizadas para determinar o índice de alterações cromossômicas (n° total de células alteradas/ n° total de células analisadas x 100). Já a

determinação da frequência de células micronucleadas foi utilizada para determinar os efeitos mutagênicos, por meio da análise do índice de mutagenicidade (n° de células com micronúcleo e quebras/ n° total de células analisadas x 100).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos nos testes acima descritos foram submetidos a tratamento estatístico por meio de testes de normalidade (SHAPIRO-WILKS) e homogeneidade (LEVENE). Para identificar as diferenças entre os tratamentos e os grupos controle, os dados foram analisados por meio de testes paramétricos (ANOVA e TUKEY; $\alpha=0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 *Salvinia auriculata*

4.1.1 Efeito do extrato e fração de *S. auriculata* no crescimento de *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232

Com a aplicação dos extratos obtidos de *S. auriculata* (Figura 2) foi possível verificar efeito inibitório na concentração de 250 mg/L para o extrato etanólico e acetato de etila no 2º dia de exposição (diferença estatística significativa em relação ao controle $p<0,05$). A maior redução na densidade celular ocorreu quando foi utilizada a concentração 500 mg/L do extrato aquoso no 4º dia do bioensaio ($p<0,05$), contudo, após esse período houve retomada no crescimento da cianobactéria. No 6º dia de exposição aos extratos de *S. auriculata* a maior redução da concentração celular foi observada para 500 mg/L do extrato etanólico com $1,01(\pm 0,09).10^6$ células/mL.

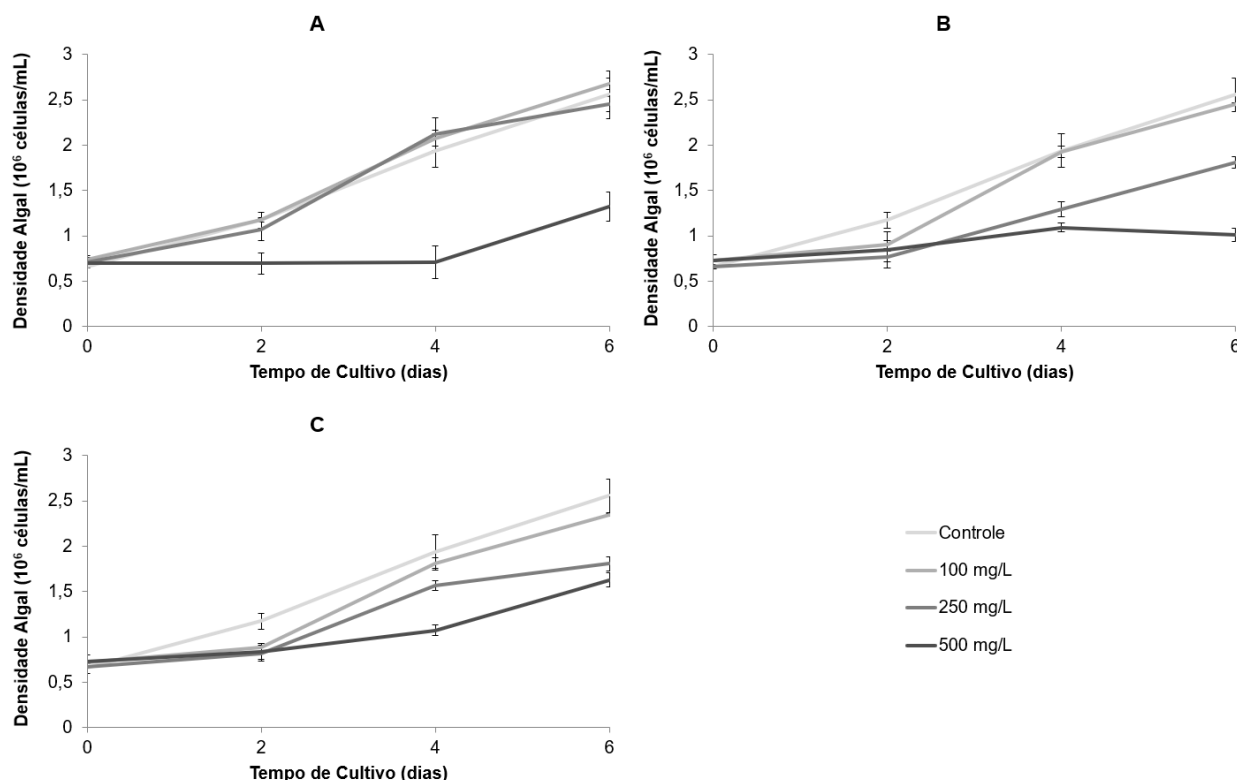


Figura 2 - Efeito inibitório do extrato aquoso (A) etanólico (B) e acetato de etila (C) de *S. auriculata* no crescimento de *M. aeruginosa* BCCUSP232. As barras correspondem ao desvio padrão (n=3).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Devido a maior redução na densidade celular ao final dos seis dias de experimento com a cepa de *M. aeruginosa* exposta ao extrato etanólico de *S. auriculata*, esse extrato foi selecionado e então fracionado, resultando em seis frações identificadas de F1 a F6. As frações obtidas foram então utilizadas em novos bioensaios nas concentrações de 25 e 50 mg/L.

De maneira a melhor comparar as inibições observadas e verificar as frações de maior efetividade na redução do número de células, as taxas de inibição (Tabela 1) foram calculadas a partir das diferentes concentrações utilizadas.

A partir dos dados obtidos, na Tabela 1, foi possível observar que com a exposição às frações do extrato etanólico de *S. auriculata*, as maiores inibições foram obtidas na fração 6 (25 e 50 mg/L) com valores de 32,1 ($\pm 4,3$)% e 46,3 ($\pm 6,3$)%, respectivamente.

Devido a estes resultados, a fração 6 (metanólica) de *S. auriculata*, juntamente com o extrato bruto mais ativo (etanólico), foram utilizados no restante das análises, a fim de elucidar os seus mecanismos de ação sobre a cepa de *M. aeruginosa*.

Tabela 1 - Taxas de inibição celular média para *M. aeruginosa* exposta às frações provenientes de extrato etanólico de *Salvinia auriculata* em diferentes concentrações.

Amostra teste	Concentração de extrato (mg/mL)	N ⁰ médio (10 ⁶ células/mL)	N ⁰ médio (10 ⁶ células/mL)	TI (%)
<i>Salvinia auriculata</i> F1	25	2,95	3,09	-4,51 (±8,8)
	50	2,95	3,30	-11,9 (±4,8)
<i>Salvinia auriculata</i> F2	25	2,95	3,07	-4,0 (±1,6)
	50	2,95	2,99	-1,1 (±5,6)
<i>Salvinia auriculata</i> F3	25	2,95	2,67	9,6 (±8,0)
	50	2,95	2,70	8,5 (±8,0)
<i>Salvinia auriculata</i> F4	25	2,95	2,89	2,3 (±0,8)
	50	2,95	2,90	1,7 (±1,6)
<i>Salvinia auriculata</i> F5	25	2,95	2,92	1,2 (±5,0)
	50	2,95	2,62	11,27 (±7,1)
<i>Salvinia auriculata</i> F6	25	2,95	2,00	32,1 (±4,3)
	50	2,95	1,58	46,3 (±2,2)

N₀ e N indicam a concentração celular no recipiente controle e no recipiente teste, respectivamente, após 6 dias de experimento, e TI a taxa média (n=3) de inibição calculada (±desvio padrão). Valores negativos representam atividade contrária a inibição.

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

4.1.2 Peroxidação lipídica

Uma vez que o MDA é um produto da decomposição da membrana celular de algas, as alterações no seu conteúdo foram usadas como indicador de peroxidação lipídica em *M. aeruginosa* exposta a diferentes concentrações do extrato e fração de *S. auriculata* mais ativos nos bioensaios. Como mostrado nas Figura 3, o conteúdo de MDA das células de *M. aeruginosa* aumentou significativamente ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle. Esse aumento pôde ser observado já no 2º dia de bioensaio para todas as concentrações do extrato e fração utilizada, com aumento nos seus níveis à medida que o tempo do bioensaio se estendia. A maior dosagem de MDA ($0,18 \pm 0,008$ mmol/L) foi obtida para a fração metanólica (50 mg/L) de *S. auriculata* no 6º dia de bioensaio.

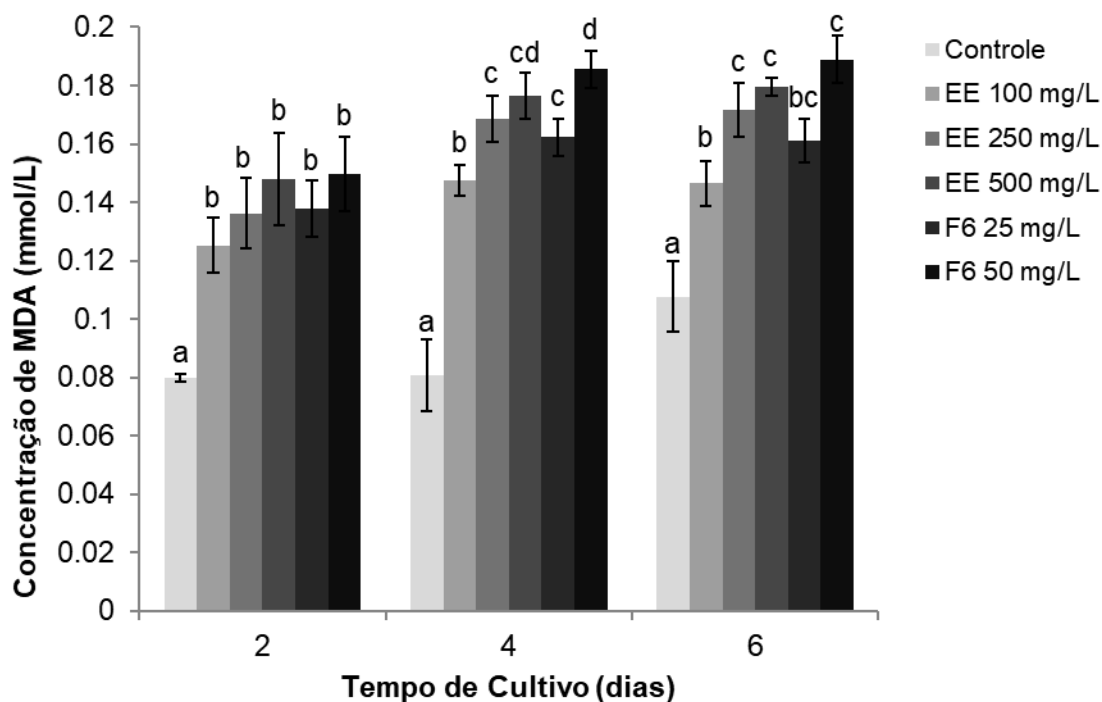


Figura 3 - Efeito do extrato etanólico (EE) e fração metanólica (F6) do extrato etanólico de *S. auriculata* no conteúdo de Malondialdeído em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', 'c' e 'd' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

4.1.3 Espécies reativas de oxigênio (ROS): determinação de Peróxido Hidrogênio (H_2O_2) intracelular

Como pode ser visualizado na figura 4, a concentração de H_2O_2 interno em *Microcystis aeruginosa* aumentou na presença do extrato e fração de *S. auriculata*. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na produção de H_2O_2 por *M. aeruginosa* foram registradas a partir do dia 2º dia de exposição quando comparado ao grupo controle.

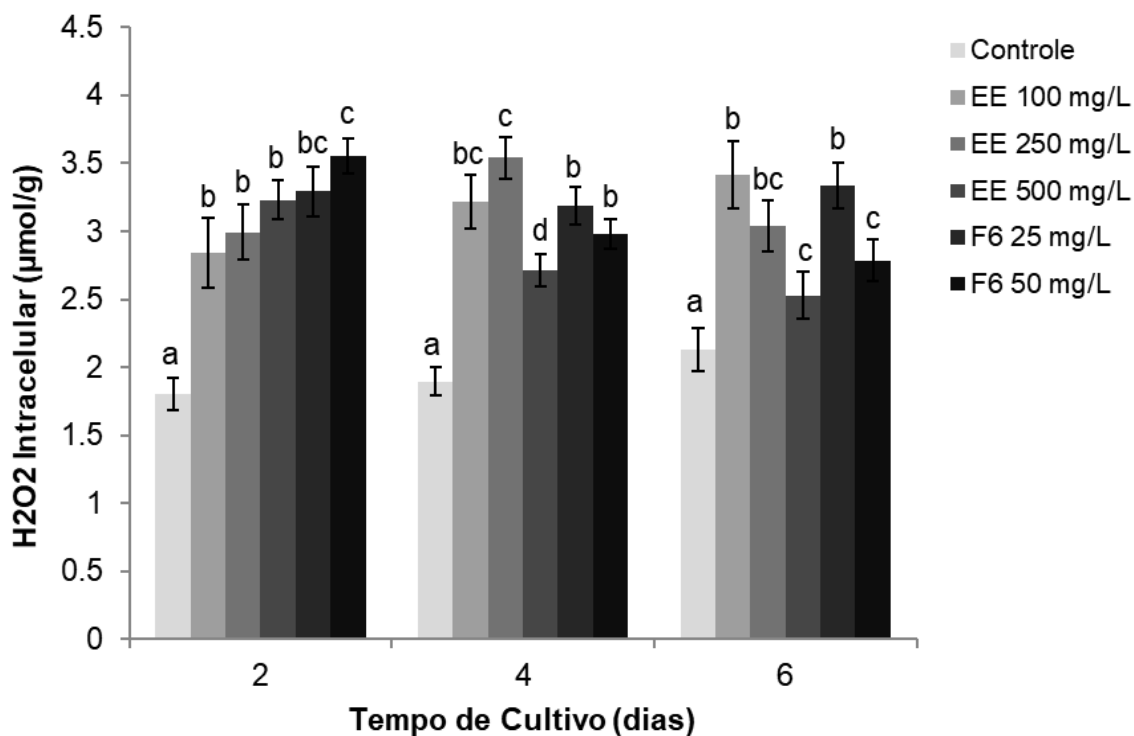


Figura 4 - Efeito do extrato etanólico (EE) e fração metanólica (F6) do extrato etanólico de *S. auriculata* no conteúdo de H_2O_2 intracelular em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', e 'c' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

4.1.4 Proteínas totais e atividade das enzimas antioxidantes

O extrato e a fração de *S. auriculata* causaram redução no conteúdo total de proteínas de *M. aeruginosa* (Figura 5). Todas as concentrações do extrato e fração reduziram significativamente ($p < 0,05$) as concentrações totais de proteínas de *M. aeruginosa* ao longo do estudo. A maior redução ao final do último dia do bioensaio foi observada para a maior concentração da fração metanólica (50 mg/L).

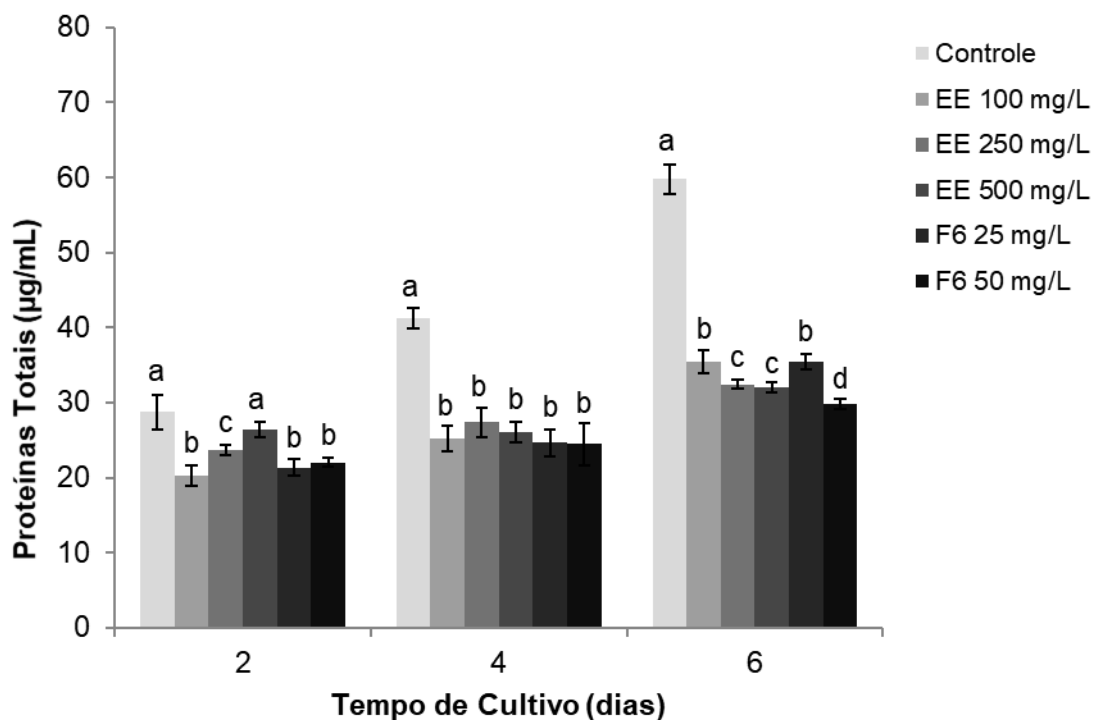


Figura 5 - Efeito do extrato etanólico (EE) e fração metanólica (F6) do extrato etanólico de *S. auriculata* no conteúdo de proteínas totais em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', 'c', e 'd' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Na quantificação da atividade da catalase intracelular em *M. aeruginosa*, foi possível verificar aumento significativo ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle, tanto na presença do extrato, quanto da fração de *S. auriculata* ao longo do experimento (Figura 6). Os maiores níveis na atividade da CAT foram verificados em 250 mg/L do extrato e 25 mg/L da fração utilizados.

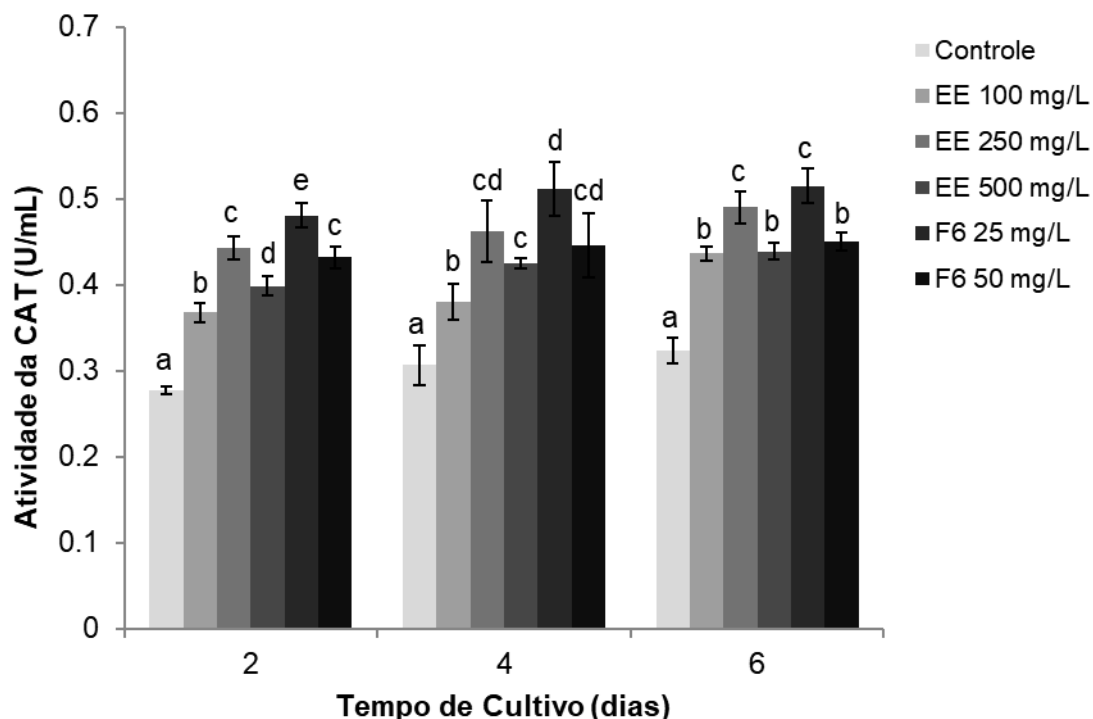


Figura 6 - Efeito do extrato etanólico (EE) e fração metanólica (F6) do extrato etanólico de *S. auriculata* na atividade da Catalase em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', 'c', 'd' e 'e' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Como pode ser verificado na Figura 7, a atividade da enzima POD de *M. aeruginosa* aumentou drasticamente após a exposição a diferentes concentrações do extrato e fração de *S. auriculata*. Esse aumento foi estatisticamente significativo a partir do 2º dia de bioensaio ($p < 0,05$). Para o extrato etanólico, os maiores níveis de atividade da enzima foram obtidos para a concentração de 500 mg/L, enquanto da fração em 50 mg/L, do 2º ao 6º dia de bioensaio.

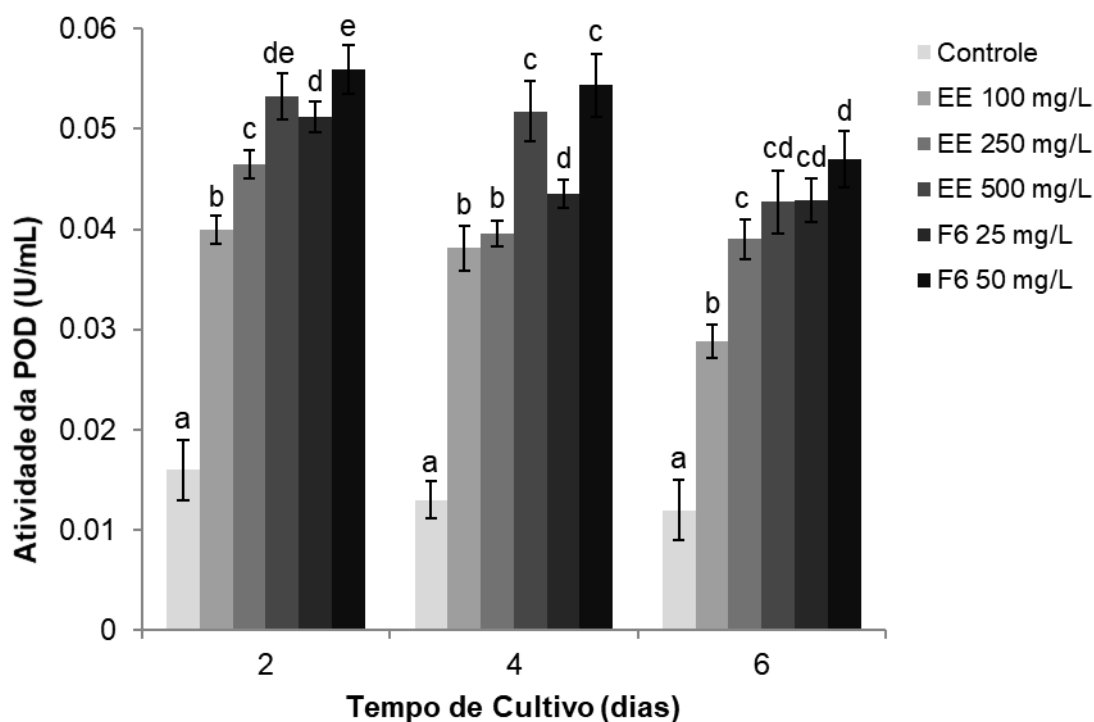


Figura 7 - Efeito do extrato etanólico (EE) e fração metanólica (F6) do extrato etanólico de *S. auriculata* na atividade da Peroxidase em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', 'c', 'd' e 'e' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Na Figura 8, estão apresentados os dados obtidos para a atividade da SOD intracelular de *M. aeruginosa* exposta a extrato e fração de *S. auriculata*. É possível verificar aumento significativo nos níveis da enzima, assim como perfil de aumento dose dependente, diferindo estatisticamente do grupo controle logo no 2º dia de exposição.

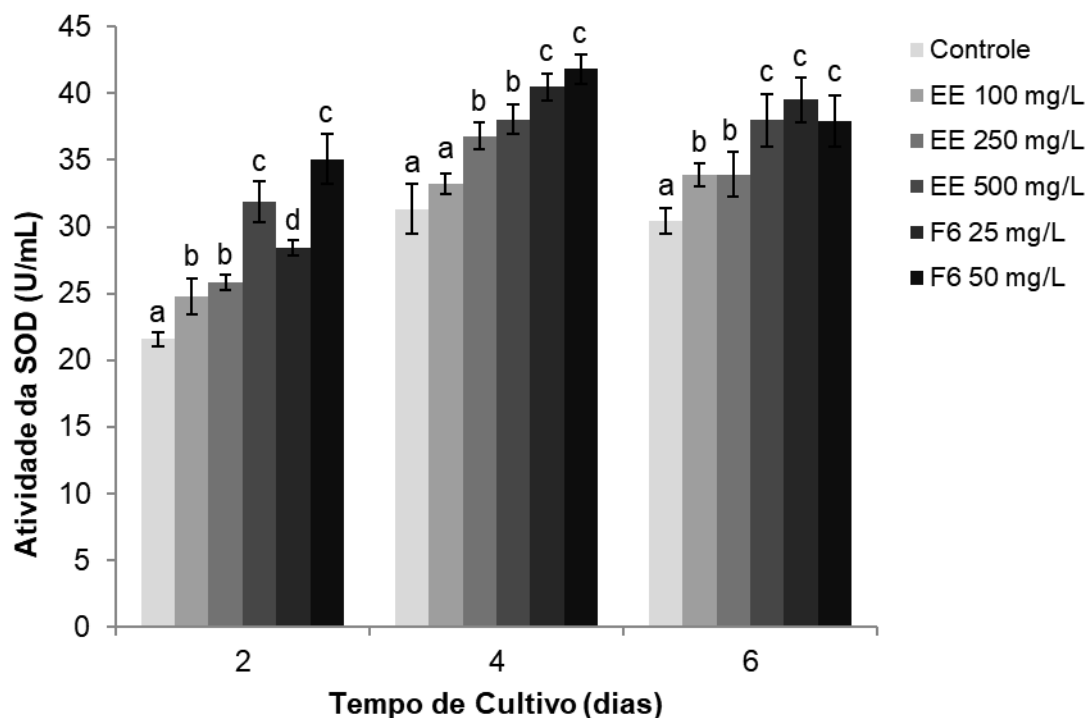


Figura 8 - Efeito do extrato etanólico (EE) e fração metanólica (F6) do extrato etanólico de *S. auriculata* na atividade da Superóxido dismutase em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', 'c', 'd' e 'e' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Na figura 9, é possível verificar aumento significativo na atividade da GST de *M. aeruginosa* para todas as concentrações do extrato e fração de *S. auriculata* utilizadas no bioensaio. Esse efeito foi mais acentuado no 2º dia de exposição da cianobactéria ao extrato e fração utilizados.

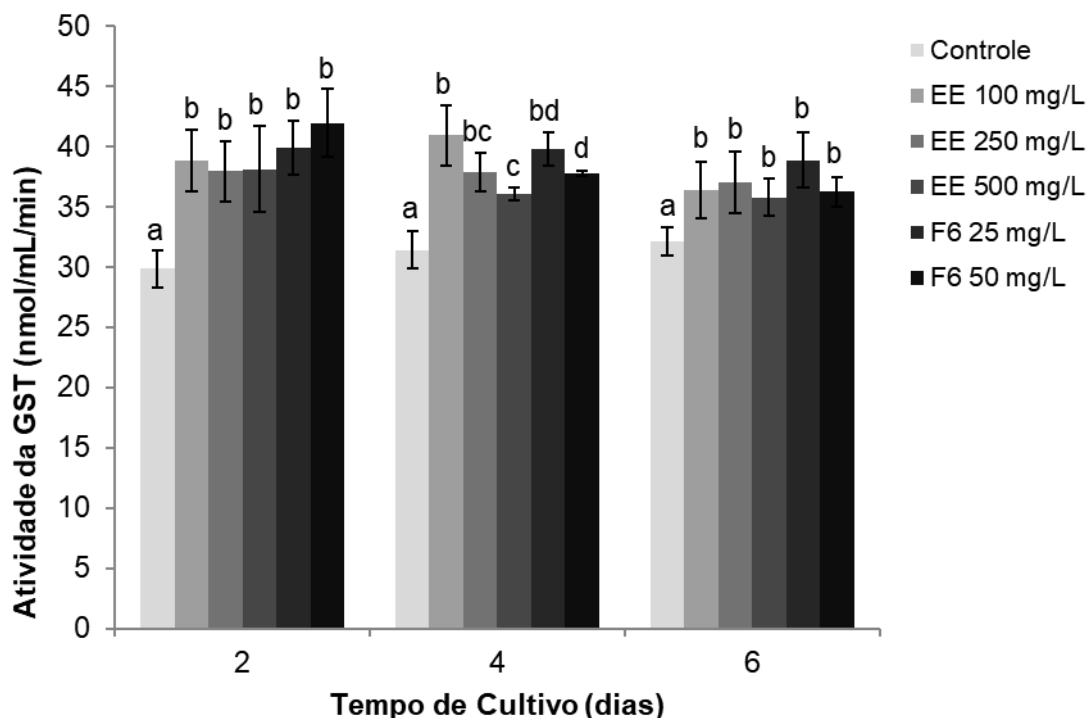


Figura 9 - Efeito do extrato etanólico (EE) e fração metanólica (F6) do extrato etanólico de *S. auriculata* na atividade da Glutathione S-transferase (GST) em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', 'c', e 'd' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

4.1.5 Determinação de polifenóis e flavonoides totais

Análises fitoquímicas revelaram que o extrato etanólico de *S. auriculata* apresentou 232.79 (± 8.7) mg de polifenóis totais GAE g⁻¹ DW e 143.2 (± 5.4) mg RE g⁻¹ DW de flavonoides totais. Por outro lado, a fração metanólica (F6) do extrato de *S. auriculata* possuía 217.3 (± 8.3) mg de polifenóis totais GAE g⁻¹ DW e 118.9 (± 5.7) mg RE g⁻¹ DW de flavonoides totais.

4.1.6 Determinação da citotoxicidade e genotoxicidade em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*

O índice mitótico de células meristemáticas radiculares de *A. cepa* expostas a água residual dos bioensaios de *M. aeruginosa* tratada com o extrato e fração mais ativos de *S. auriculata*, estão apresentados na Tabela 2. A fim de melhor comparar as águas residuais tratadas com diferentes concentrações do extrato e fração, com o grupo controle do bioensaio (Meio de cultivo + Cianobactéria), o controle negativo do teste de *Allium cepa* (água destilada) não foi adicionado na tabela. Porém, os dados obtidos permitiram observar que o controle do bioensaio, extrato e fração de *S. auriculata* apresentaram aumento em todos os índices em relação ao controle negativo (índice mitótico 10.09 ± 1.07 , índice de morte 0.25 ± 0.12 , aberrações cromossômicas 0.23 ± 0.15 e índice de

mutagenicidade 0.00 ± 0.00). Foi possível verificar que o aumento na concentração do extrato reduziu o índice mitótico e aumentou o índice de morte e alterações cromossômicas. Para as duas concentrações da fração utilizada, o índice mitótico apresentou valores inferiores quando comparados com o grupo controle do bioensaio, porém, não diferiram estatisticamente do mesmo. Todos os tratamentos apresentaram médias maiores em relação ao grupo controle, quanto ao índice de morte, índice de alterações cromossômicas e índice de mutagenicidade. Resultado inverso foi observado para as duas concentrações da fração utilizada.

Tabela 2 - Índice Mitótico, Índice de Morte, Índice de alterações cromossômicas e Índice de mutagenicidade de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* tratadas com água resultante do bioensaio com *M. aeruginosa* utilizando extrato e fração ativa de *S. auriculata* em diferentes concentrações. Controle foi tratado com água resultante do bioensaio com *M. aeruginosa* sem adição de extrato ou fração (Meio de cultivo + Cianobactéria).

Bioensaio	Índice mitótico	Índice de morte	Índice de alterações cromossômicas	Índice de mutagenicidade
Controle	11.62 $\pm$ 0.70a	2.74 $\pm$ 0.49ab	1.40 $\pm$ 0.68a	1.34 $\pm$ 0.31a
EE <i>S. auriculata</i> 100 mg/L	12.14 $\pm$ 0.40a	2.77 $\pm$ 0.48ab	1.46 $\pm$ 0.21a	1.44 $\pm$ 0.22a
EE <i>S. auriculata</i> 250 mg/L	9.87 $\pm$ 0.59bc	3.09 $\pm$ 0.61ab	1.73 $\pm$ 0.43a	1.36 $\pm$ 0.34a
EE <i>S. auriculata</i> 500 mg/L	8.64 $\pm$ 0.71c	3.28 $\pm$ 0.11a	1.90 $\pm$ 0.26a	1.37 $\pm$ 0.22a
F6 <i>S. auriculata</i> 25 mg/L	10.79 $\pm$ 1.14ab	2.35 $\pm$ 0.31b	1.29 $\pm$ 0.28a	1.06 $\pm$ 0.20a
F6 <i>S. auriculata</i> 50 mg/L	11.15 $\pm$ 0.87ab	2.38 $\pm$ 0.51ab	1.30 $\pm$ 0.34a	1.08 $\pm$ 0.22a

EE=Extrato etanólico e F6=Fração metanólica. 5000 células analisadas. Médias $\pm$ Desvio padrão. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b' e 'c' representam significância em $P < 0.05$.

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

4.2 *Emilia sonchifolia*

4.2.1 Efeito do extrato e fração de *E. sonchifolia* no crescimento de *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232

Na figura 10 estão apresentadas as densidades celulares médias obtidas para a exposição de *M. aeruginosa* aos extratos de *E. sonchifolia*. Foi possível observar que o crescimento celular foi inibido de forma mais efetiva nas concentrações de 250 e 500 mg/L dos 3 extratos utilizados. Após o 4º dia de exposição aos extratos aquoso e acetato de etila, o efeito inibitório sobre a cepa de cianobactéria foi reduzido, resultando na retomada de seu crescimento, sendo esta retomada mais acentuada para o extrato acetato de etila. Os valores de concentração celular nos testes com 250 e

500 mg/L do extrato etanólico apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle ao longo de todo o bioensaio ($p < 0,05$), sendo possível verificar no 6º dia densidades celulares de $1,37(\pm 0,08) \cdot 10^6$ células/mL para 250 mg/L e $1,52(\pm 0,19) \cdot 10^6$ células/mL para 500 mg/L.

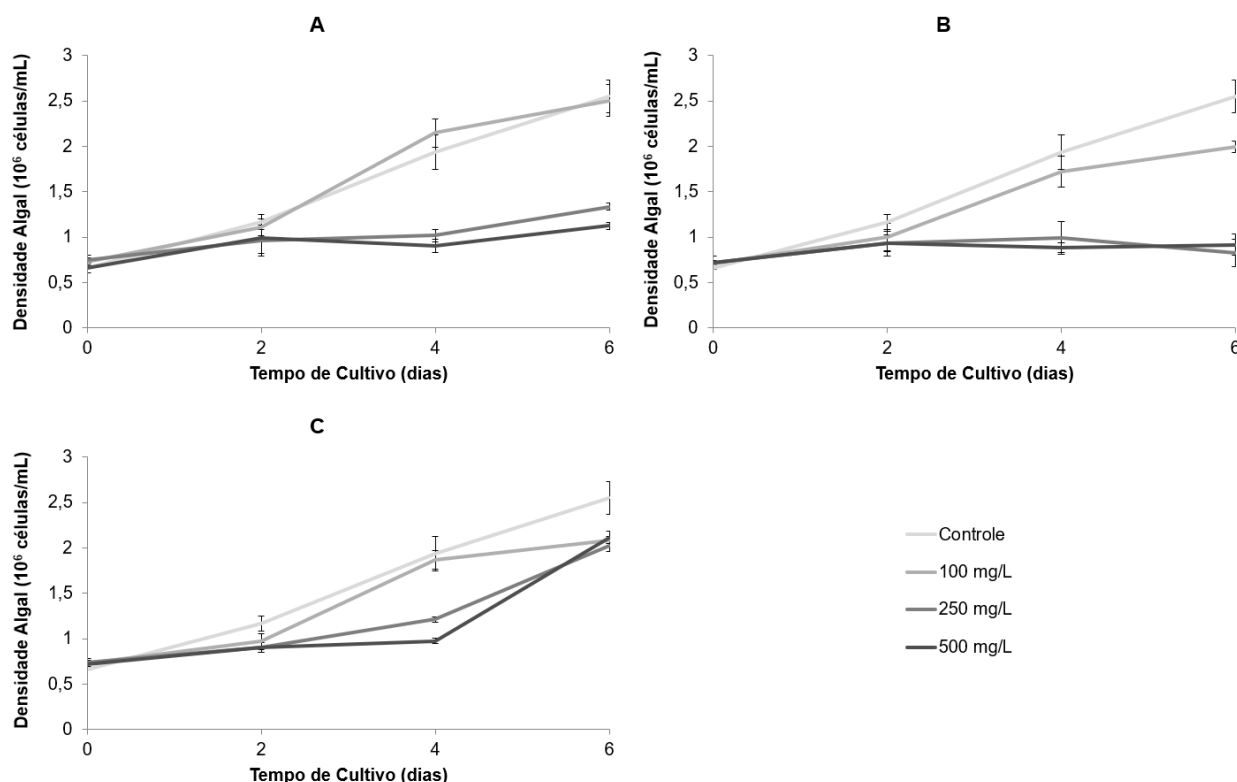


Figura 10 - Efeito inibitório do extrato aquoso (A) etanólico (B) e acetato de etila (C) de *E. sonchifolia* no crescimento de *M. aeruginosa* BCCUSP232. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Devido a maior redução na densidade celular ao final dos seis dias de experimento com a cepa de *M. aeruginosa* exposta ao extrato etanólico de *E. sonchifolia*, esse extrato foi selecionado e então fracionado, resultando em seis frações identificadas de F1 a F6. As frações obtidas foram então utilizadas em novos bioensaios nas concentrações de 25 e 50 mg/L.

De maneira a melhor comparar as inibições observadas e verificar as frações de maior efetividade na redução do número de células, as taxas de inibição (Tabela 3) foram calculadas a partir das diferentes concentrações utilizadas.

Tabela 3 - Taxas de inibição celular média para *M. aeruginosa* exposta às frações provenientes de extrato etanólico de *Emilia sonchifolia* em diferentes concentrações.

Amostra teste	Concentração de extrato (mg/L)	N ₀ médio (10 ⁶ célu- las/mL)	N médio (10 ⁶ célu- las/mL)	TI (%)
<i>Emilia sonchifolia</i> F1	25	2,95	2,67	9,6 (±8,0)
	50	2,95	2,49	15,8 (±5,6)
<i>Emilia sonchifolia</i> F2	25	2,95	2,92	1,1 (±4,0)
	50	2,95	2,45	16,9 (±5,6)
<i>Emilia sonchifolia</i> F3	25	2,95	2,70	8,5 (±6,3)
	50	2,95	2,95	0 (±5,5)
<i>Emilia sonchifolia</i> F4	25	2,95	2,87	2,9 (±8,0)
	50	2,95	2,62	11,3 (±2,4)
<i>Emilia sonchifolia</i> F5	25	2,95	2,16	27,1 (±7,2)
	50	2,95	1,77	40,0 (±3,2)
<i>Emilia sonchifolia</i> F6	25	2,95	2,50	15,2 (±3,2)
	50	2,95	2,65	10,2 (±7,1)

N₀ e N indicam a concentração celular no recipiente controle e no recipiente teste, respectivamente, após 6 dias de experimento, e TI a taxa média (n=3) de inibição calculada (±desvio padrão). Valores negativos representam atividade contrária a inibição.

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Para *E. sonchifolia* a fração 5 (hidrometanólica 20:80) do extrato etanólico, apresentou o maior percentual de inibição, com valores de 27,1 (±7,2) e 40,0 (±3,2) nas concentrações de 25 e 50 mg/L, respetivamente.

Devido a estes resultados, a fração hidrometanólica (20:80) de *E. sonchifolia*, foi utilizada juntamente com o extrato bruto mais ativo (etanólico) no restante das análises, afim de elucidar os seus mecanismos de ação sobre a cepa de *M. aeruginosa*.

4.2.2 Peroxidação lipídica

As alterações no conteúdo de MDA foram usadas como um indicador de peroxidação lipídica em *M. aeruginosa* exposta a diferentes concentrações do extrato e frações de *E. sonchifolia*. Como mostrado na Figura 11, o conteúdo de MDA das células de *M. aeruginosa* aumentou significativamente ($p < 0,05$) em comparação ao controle. Esse aumento pôde ser observado já no 2º dia de bionsaio para todas as concentrações dos extrato e fração utilizada, com valores crescentes a

medida que o tempo se estendia. A maior dosagem de MDA foi obtida para a concentração de 250 mg/L do extrato de *E. sonchifolia* no 6º dia de bioensaio.

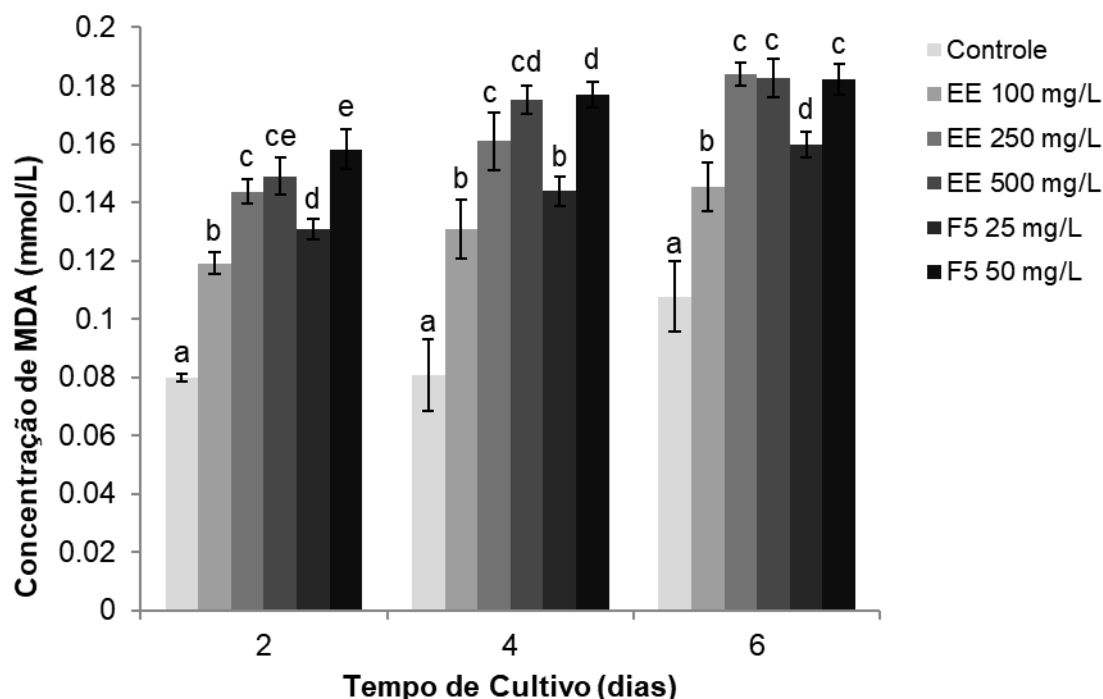


Figura 11 - Efeito do extrato etanólico (EE) e fração hidrometanólica 20:80 (F5) do extrato etanólico de *E. sonchifolia* no conteúdo de Malondialdeído em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', 'c', 'd' e 'e' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

4.2.3 Espécies reativas de oxigênio (ROS): determinação de Peróxido Hidrogênio (H_2O_2) intracelular

Apesar de oscilações nos níveis de H_2O_2 intracelular, como tendência geral, a concentração de H_2O_2 interno em *Microcystis aeruginosa* aumentou ao longo do tempo na presença do extrato e da fração mais ativa de *E. sonchifolia* (Figura 12). Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na produção de H_2O_2 por *M. aeruginosa* foram registradas a partir do dia 2º dia de exposição. A maior concentração média de H_2O_2 ($4,14 \pm 0,16 \mu\text{mol/g}$) em *M. aeruginosa* foi observada no 2º dia de exposição à fração hidrometanólica 20:80 (50 mg/L) de *E. sonchifolia*.

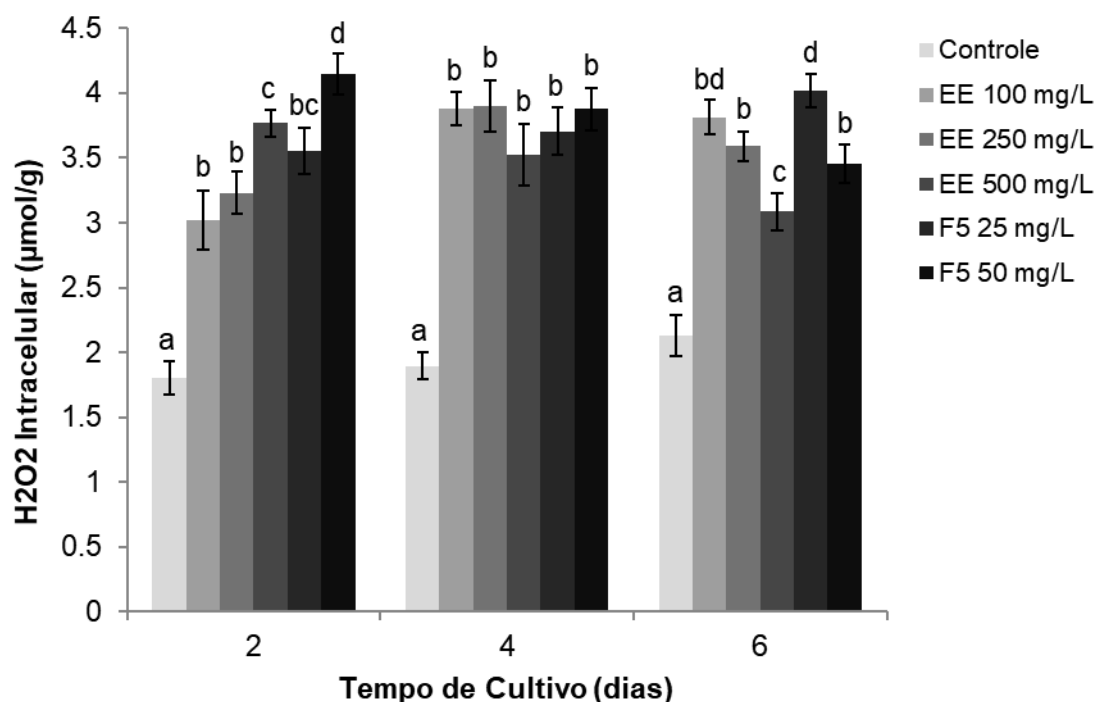


Figura 12 - Efeito do extrato etanólico (EE) e fração hidrometanólica 20:80 (F5) do extrato etanólico de *E. sonchifolia* no conteúdo de H_2O_2 intracelular em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', 'c', e 'd' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

4.2.4 Proteínas totais e atividade das enzimas antioxidantes

O extrato e a fração de *E. sonchifolia* causaram declínio no conteúdo total de proteínas de *M. aeruginosa* (Figura 13). Todas as concentrações do extrato e fração reduziram significativamente ($p < 0,05$) as concentrações totais de proteínas de *M. aeruginosa* no período avaliado, quando comparadas ao grupo controle.

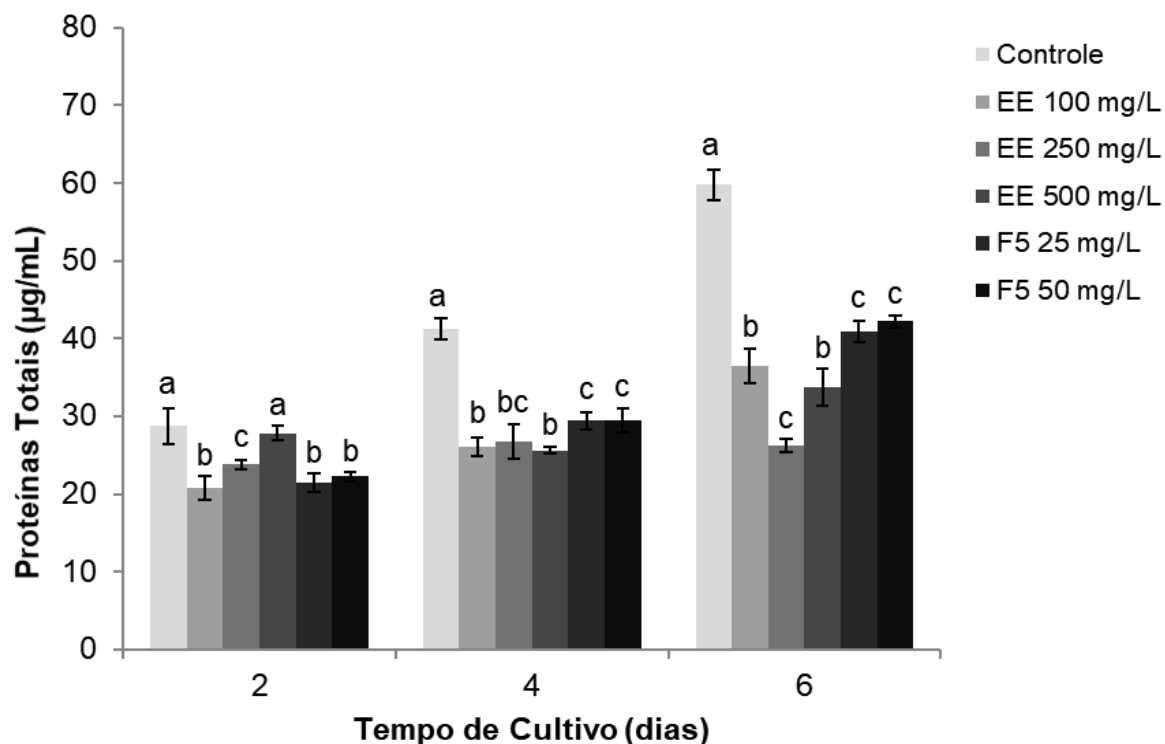


Figura 13 - Efeito do extrato etanólico (EE) e fração hidrometanólica 20:80 (F5) do extrato etanólico de *E. sonchifolia* no conteúdo de proteínas totais em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', e 'c' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Comparadas ao controle, as atividades da catalase de *M. aeruginosa* aumentaram significativamente ($p < 0,05$), tanto na presença do extrato, quanto da fração de *E. sonchifolia* ao longo do experimento (Figura 14). As maiores atividades da CAT foram obtidas para a maior concentração do extrato e para a menor concentração da fração.

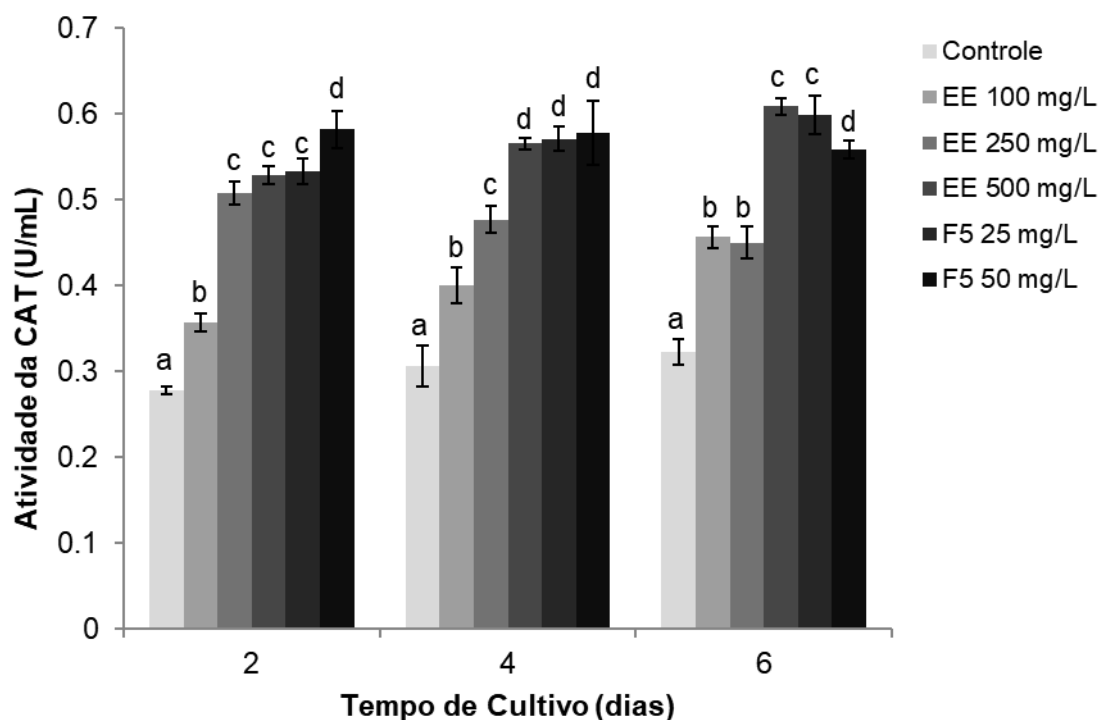


Figura 14 - Efeito do extrato etanólico (EE) e fração hidrometanólica 20:80 (F5) do extrato etanólico de *E. sonchifolia* na atividade da Catalase em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', 'c', e 'd' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Como pode ser observado na Figura 15, as atividades de POD de *M. aeruginosa* aumentaram após a exposição a diferentes concentrações do extrato e fração de *E. sonchifolia*. Em comparação ao grupo controle, a elevação nos níveis de atividade da enzima foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) a partir do 2º dia de bioensaio. Os maiores níveis de atividade da enzima foram obtidos para a concentração de 500 mg/L do extrato etanólico e 50 mg/L da fração hidrometanólica (20:80) de *E. sonchifolia* no 4º dia de exposição.

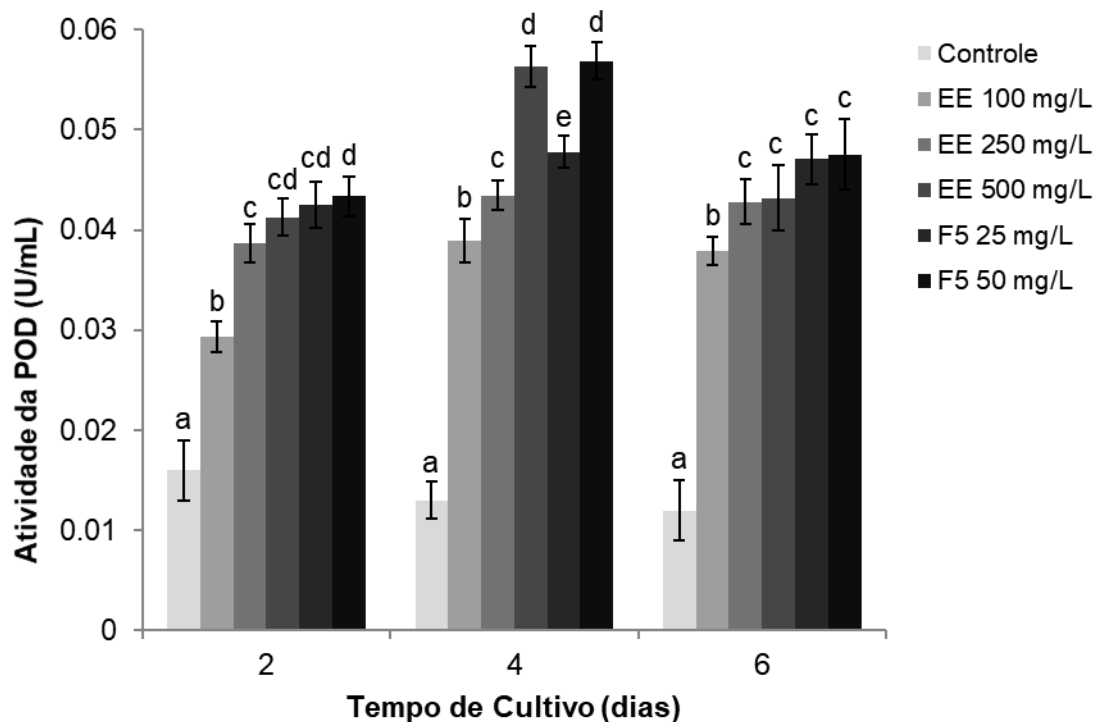


Figura 15 - Efeito do extrato etanólico (EE) e fração hidrometanólica 20:80 (F5) do extrato etanólico de *E. sonchifolia* na atividade da Peroxidase em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', 'c', e 'd' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Na Figura 16 é possível observar o aumento significativo nos níveis de atividade da SOD de *M. aeruginosa* exposta a extrato e fração de *E. sonchifolia*. Os dados apresentaram aumento dose dependente na atividade da enzima SOD, diferindo estatisticamente do grupo controle logo no 2º dia de exposição.

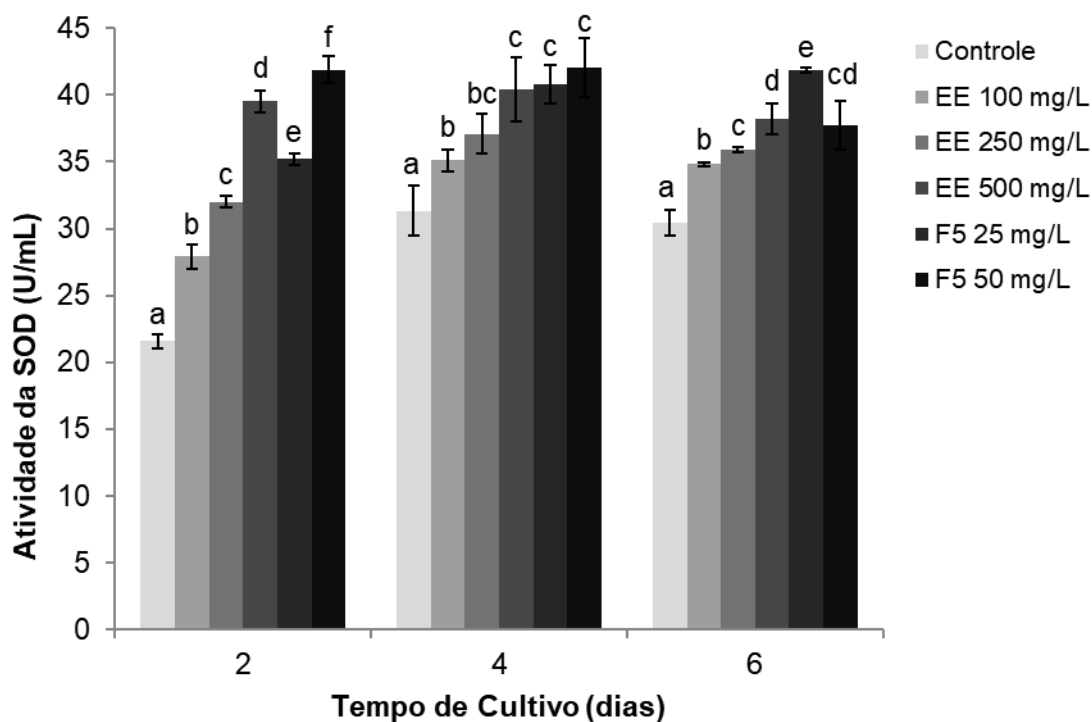


Figura 16 - Efeito do extrato etanólico (EE) e fração hidrometanólica 20:80 (F5) do extrato etanólico de *E. sonchifolia* na atividade da Superóxido dismutase em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', 'c', 'd', 'e' e 'f' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$). **Fonte:** elaborado pelo autor, 2020.

Na figura 17, estão apresentados os dados obtidos para a atividade da enzima GST. Durante todo o período do bioensaio, foi possível verificar aumento significativo na atividade da GST de *M. aeruginosa* em todas as concentrações do extrato e fração de *E. sonchifolia* utilizadas, quando comparadas com o grupo controle. Não ocorreram diferenças estatísticas entre os tratamentos utilizados durante os dias avaliados do bioensaio.

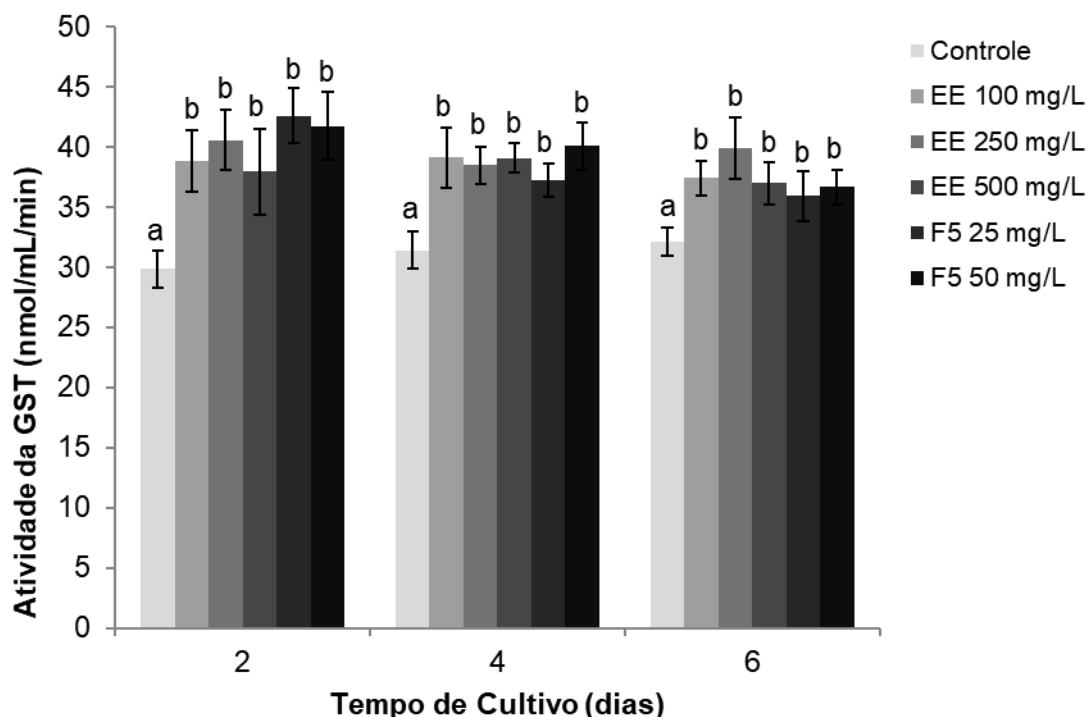


Figura 17 - Efeito do extrato etanólico (EE) e fração hidrometanólica 20:80 (F5) do extrato etanólico de *E. sonchifolia* na atividade da Glutathione S-transferase (GST) em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a' e 'b' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

4.2.5 Determinação de polifenóis e flavonoides totais

A espécie terrestre *E. sonchifolia* apresentou para o extrato etanólico 151.2 (± 7.1) mg de polifenóis totais GAE g⁻¹ DW e 107.9 (± 7.3) mg RE g⁻¹ DW de flavonoides totais. Por outro lado, a fração hidrometanólica (20:80) do extrato de *E. sonchifolia* possuía 361.94 (± 9.2) mg de polifenóis totais GAE g⁻¹ DW e 164.32 (± 6.7) mg RE g⁻¹ DW de flavonoides totais.

4.2.6 Determinação da citotoxicidade e genotoxicidade em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*

O índice mitótico de células meristemáticas radiculares de *A. cepa*, expostas a água residual dos bioensaios de *M. aeruginosa* tratada com o extrato e fração mais ativos de *E. sonchifolia*, estão apresentados na Tabela 4. A fim de melhor comparar as águas residuais tratadas com diferentes concentrações do extrato e fração, com o grupo controle do bioensaio (Meio de cultivo + Cianobactéria), o controle negativo do teste de *Allium cepa* (água destilada) não foi adicionado na tabela. Porém, os dados obtidos permitiram observar que o controle do bioensaio, extrato e fração de *E. sonchifolia* apresentaram aumento em todos os índices em relação ao controle negativo

(índice mitótico 10.09 ± 1.07 , índice de morte 0.25 ± 0.12 , aberrações cromossômicas 0.23 ± 0.15 e índice de mutagenicidade 0.00 ± 0.00).

Apesar de todos tratamentos com o extrato e fração apresentarem redução no índice mitótico, quando comparados com o grupo controle do bioensaio, apenas a concentração de 500 mg/L do extrato utilizado no bioensaio diferiu estatisticamente. Quando comparados controle do bioensaio e as diferentes concentrações do extrato, foi verificado que de forma geral, o aumento na concentração do extrato causou redução das médias do índice mitótico e aumento do restante dos índices. Quando essa comparação é feita entre controle do bioensaio e as concentrações da fração, foi verificada redução nas médias dos índices mitótico, de morte, aberrações cromossômicas e mutagenicidade.

Tabela 4 - Índice Mitótico, Índice de Morte, Índice de alterações cromossômicas e Índice de mutagenicidade de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* tratadas com água resultante do bioensaio com *M. aeruginosa* utilizando extrato e fração ativa de *E. sonchifolia* em diferentes concentrações. Controle foi tratado com água resultante do bioensaio com *M. aeruginosa* sem adição de extrato ou fração (Meio de Cultivo + Cianobactéria).

Bioensaio	Índice mitótico	Índice de morte	Índice de alterações cromossômicas	Índice de mutagenicidade
Controle	$11.62 \pm 0.70a$	$2.74 \pm 0.49ab$	$1.40 \pm 0.68a$	$1.34 \pm 0.31a$
EE <i>E. sonchifolia</i> 100 mg/L	$10.32 \pm 0.43ab$	$2.78 \pm 0.58ab$	$1.62 \pm 0.37a$	$1.28 \pm 0.15a$
EE <i>E. sonchifolia</i> 250 mg/L	$9.77 \pm 0.59ab$	$3.12 \pm 0.47ab$	$1.68 \pm 0.32a$	$1.44 \pm 0.34a$
EE <i>E. sonchifolia</i> 500 mg/L	$8.52 \pm 0.41b$	$3.45 \pm 0.30a$	$1.96 \pm 0.42a$	$1.49 \pm 0.14a$
F5 <i>E. sonchifolia</i> 25 mg/L	$9.44 \pm 0.97ab$	$2.42 \pm 0.36b$	$1.33 \pm 0.28a$	$1.08 \pm 0.19a$
F5 <i>E. sonchifolia</i> 50 mg/L	$11.21 \pm 1.14a$	$2.48 \pm 0.46b$	$1.36 \pm 0.37a$	$1.11 \pm 0.17a$

EE=Extrato etanólico e F5=Fração hidrometanólica (20:80). 5000 células analisadas. Médias $\pm$ Desvio padrão. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a' e 'b' representam significância em $P < 0.05$.

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

5 DISCUSSÃO

O bioensaio sobre cultura da cianobactéria *M. aeruginosa* BCCUSP232 exposta aos extratos e frações de *Salvinia auriculata* e *Emilia sonchifolia* inicialmente mostrou redução em seu crescimento, com retomada conforme o tempo de exposição se estendia, desta forma, refletindo na sua densidade celular. Resultados semelhantes foram observados em estudos realizados por Liu *et al.* (2011) e Meng *et al.* (2015) que utilizaram extratos de *Eichhornia crassipes* e *Ailanthus altissima* para controle de *M. aeruginosa*. De acordo com Kong *et al.* (2006) e Hong e Hu (2009)

dependendo do tempo de exposição dos aleloquímicos em meio de cultura é possível constatar degradação dos mesmos, interferindo diretamente na ação inibitória do extrato, tornando possível a retomada do crescimento de *M. aeruginosa*, assim como observado no presente estudo.

Para a determinação do H_2O_2 intracelular das cianobactérias, foi observada elevação da formação inicial de H_2O_2 após a exposição aos extratos e frações das espécies vegetais estudadas. De acordo com estudos realizados por Rhoads *et al.* (2006) e Qian *et al.* (2012) o aumento de H_2O_2 está correlacionado diretamente com o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS). As espécies reativas de oxigênio têm sua produção intensificada significativamente em organelas de organismos fotossintéticos que sofrem exposição ao estresse ambiental e/ou exógeno Qian *et al.* (2012). Além disso, e de acordo com Dummermuth *et al.* (2003), Torres *et al.* (2008) e Mikula *et al.* (2012), a elevada produção de H_2O_2 aumenta o risco de dano oxidativo para a célula, resultando em danos a diversas estruturas relacionadas aos cloroplastos, redução nos níveis de clorofila a e, consequentemente redução do potencial fotossintético. Sendo assim, estes danos poderiam também estar correlacionados com o declínio na densidade celular observada neste estudo.

Na determinação da peroxidação lipídica foi avaliada a formação de malondialdeído, pois de acordo com Zhou *et al.* (2016), este reativo comporta-se como um biomarcador para danos oxidativos causados na membrana lipídica das células de cianobactérias. No presente estudo, os resultados obtidos para os extratos e frações mais ativos, permitiram observar que o conteúdo de MDA aumentou de acordo com o tempo de exposição. Diante disso, tal resultado revelou a ocorrência de alterações na peroxidação lipídica em *M. aeruginosa* expostas a diferentes concentrações dos extratos e frações de *S. auriculata* e *E. sonchifolia*, resultando no efeito inibitório sobre o crescimento da cianobactéria. Li *et al.* (2016) e Li e Hu (2005) demonstraram em seus estudos que determinados aleloquímicos podem causar lesões nas membranas celulares, principalmente devido a desequilíbrio nos canais iônicos, resultando em alterações na permeabilidade da membrana e comprometendo a integridade da mesma. Este fato também poderia justificar os resultados observados no presente estudo, os quais são corroborados com estudos realizados por Meng *et al.* (2015) e Li *et al.* (2016) que utilizaram extratos de *Ailanthus altissima* e *Sagittaria trifolia* sobre populações de *M. aeruginosa* causando alterações em sua peroxidação lipídica.

O teor de proteínas é um fator importante na determinação das taxas de atividade do metabolismo celular (ZHANG *et al.* 2013). Neste estudo, a diminuição dos teores de proteínas totais intracelulares para os bioensaios utilizando extratos e frações vegetais, pode, desta forma, ser explicada pela inibição da síntese proteica, levando ao mal funcionamento do metabolismo fisiológico normal nas células da cianobactéria, refletindo na sua densidade celular. Essa suposição está

de acordo com estudo anterior de Ni *et al.* (2012), e pode ser um dos mecanismos de inibição de algas.

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

De acordo com Mishra *et al.* (1993) e Qureshi *et al.* (2007), a SOD é uma enzima que converte o superóxido em oxigênio livre e peróxido de hidrogênio, e este último é convertido em água e oxigênio pela ação da POD e CAT. Portanto, a SOD tem sido apontada como a primeira linha de defesa contra os ROS (HASSAN e SCANDALIOS, 1990). Como mostrado no presente estudo, a atividade da SOD de *M. aeruginosa* foi visivelmente estimulada pelos extratos e frações de *S. auriculata* e *E. Sonchifolia*, para responder ao estresse oxidativo causado, o que também foi verificado por Li *et al.* (2016), utilizando extrato de *Sagittaria trifolia* em *M. aeruginosa*.

No presente estudo, pôde ser observado aumento na atividade de GST em resposta à presença dos extratos e frações, isso indica que a mesma esteja envolvida na biotransformação e/ou a desintoxicação do metabolismo da cianobactéria em resposta aos extratos e frações vegetais. Isto ocorre como uma medida de proteção contra os danos oxidativos. Esta biotransformação e/ou desintoxicação é conseguida pelo processo de conjugação que utiliza a forma reduzida de glutathione (GSH), catalisada pela GST (VESTENA *et al.*, 2011; CHIA *et al.*, 2015). Além disso, estudos anteriores realizados por Bártova *et al.* (2011) e Ha e Pflugmacher (2013a, 2013b) demonstraram que esta enzima é capaz de biotransformar e desintoxicar cianobactérias, espécies de fitoplâncton e as plantas vasculares contra ação de toxinas e compostos oxidativos.

Além do estudo dos mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse oxidativo ocasionado pelos extratos, e a fim de elucidar o possível mecanismo de ação algicida dos mesmos, foi também realizada a quantificação de polifenóis. A determinação de polifenóis demonstrou considerável quantidade destes compostos nos extratos e frações com maior atividade inibitória no crescimento de *M. aeruginosa*. Esse resultado é corroborado por estudos realizados por Bauer *et al.* (2009), Gross e Gene (2009), Wu *et al.* (2013) e Zhang *et al.* (2010, 2013), os quais demonstraram que

aleloquímicos extraídos de várias plantas vem sendo confirmados como inibidores do crescimento de algas e cianobactérias, sendo atribuído principalmente aos polifenóis esse efeito inibitório. Além disso, Czarnota *et al.* (2001), Yu *et al.* (2003) e Zhang *et al.* (2010), demonstraram em seus estudos que, o potencial fitotóxico de muitos compostos, entre eles os fenólicos e flavonoídicos é inibidor da fotossíntese e indutor do aumento da produção de ROS que, por sua vez, podem afetar a permeabilidade da membrana, promover danos ao DNA e às proteínas e provocar a peroxidação lipídica, conduzindo à morte celular. Essas atividades estão relacionadas à formação de radicais que doam elétrons ao oxigênio molecular, formando superóxido radical (O_2^-), que ainda pode sofrer uma série de reações que se tornam mais reativas, hidroxil (OH^-) ou até formar o radical hidroperóxil (HO_2^-) (TESTA, 1995; HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996).

Com a finalidade de avaliar os possíveis impactos ambientais decorrentes do tratamento de águas contaminadas com *M. aeruginosa* com extratos vegetais, o teste de *Allium cepa* foi utilizado. A espécie *A. cepa* constitui um dos materiais pioneiros nos estudos de aberrações cromossômicas causadas pela ação de agentes físicos e químicos. O primeiro autor a utilizar essa espécie como sistema-teste foi Levan (1938) e, desde então, *A. cepa* tem sido indicada como um eficiente organismo-teste de citotoxicidade e genotoxicidade. Esse fato se deve às características que possui na sua cinética de proliferação, pelo crescimento rápido de suas raízes, pelo grande número de células em divisão, pela sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, pela sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho (GRANT, 1982; FISKEJÖ, 1985; MATSUMOTO *et al.*, 2006).

O teste de *A. cepa*, além de todas as vantagens mencionadas acima, tem mostrado alta sensibilidade e boa correlação quando comparado com outros sistemas-teste, principalmente com os de mamíferos (GRANT, 1982; FISKEJÖ, 1985; RANK e NIELSON, 1994). Muitos estudos de comparação entre sistemas-teste vegetais vêm sendo realizados por diversos autores e a maioria tem mostrado maior sensibilidade de *A. cepa* em relação a outras plantas superiores utilizadas como organismos-teste, como, por exemplo, a espécie *Vicia faba* (MA *et al.*, 1995; MIGID *et al.*, 2007). O sistema-teste *A. cepa* tem sido aplicado para examinar a influência de agentes contaminantes presentes em recursos hídricos, assim como, na avaliação do potencial antimutagênico de substâncias naturais, da mesma forma que neste estudo (ROBERTO *et al.*, 2007; LEME e MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA e MARIN-MORALES, 2009).

Analizando os resultados do índice mitótico, foi observado que o controle do bioensaio apresentou tendência a aumentar o número de divisões celulares. De acordo com estudo realizado por Carmichael *et al.* (1991) e Laughinghouse IV *et al.* (2012), a toxicidade proveniente de abundância em microcistinas está relacionada à hiperplasia, citotoxicidade, alterações cromossômicas

e mutagenicidade, o que é claramente corroborado pelo presente estudo, uma vez que de acordo com Bittencourt-Oliveira *et al.* (2011) a cepa de *M. aeruginosa* BCCUSP232 é produtora de microcistina-LR. Por outro lado, ao utilizar extratos de diferentes vegetais, os índices mitóticos foram reduzidos mesmo na presença de microcistinas, indicando potencial efeito inibitório na mitose das células de raiz de *A. cepa*, com maior incidência de alterações cromossômicas, assim como demonstrou estudo de Kwankua *et al.* (2010) e Timothy *et al.* (2014). Knoll *et al.* (2006) evidenciaram potencial atividade genotóxica de *Pterocaulon polystachyum* por meio do teste de *A. cepa*, detectaram capacidade inibitória na divisão celular relacionada ao aumento das concentrações de extratos aquosos. Da mesma forma, como apresentado no estudo de De Pinho *et al.* (2010) para o tojo (*Baccharis trimera*), evidenciando efeitos mutagênicos da infusão em células vegetais de *A. cepa* e em células humanas cultivadas. Contudo, os índices avaliados para as frações utilizadas (morte, alterações cromossômicas e mutagenicidade), apesar de não diferir estatisticamente do controle do bioensaio (meio de cultivo + cianobactéria), apresentaram-se inferiores. Esta diminuição pode estar correlacionada com a redução no número de compostos presente nos extratos (selecionados pelo método de fracionamento) e com o tratamento realizado com as frações utilizadas sobre a cultura de *M. aeruginosa*, que deteeminou redução populacional e diminuição dos metabólitos produzidos pelas algas, o que refletiu diretamente no efeito genotóxico sobre as células de *A. cepa*.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para este estudo mostraram que *S. auriculata* e *E. sonchifolia* apresentam potencial para controle de populações de cianobactérias tendo constatada a ação algicida exercida em cultura de *M. aeruginosa*, sugerindo também que o mecanismo de ação pode estar correlacionado com o estresse oxidativo, pois houve alterações nas enzimas relacionadas ao equilíbrio oxidativo. Estes efeitos podem estar associados ao conteúdo polifenólico encontrado nos extratos e frações avaliados. Estudos adicionais serão realizados a fim de elucidar estes aleloquímicos.

REFERÊNCIAS

AMORIM, C. A.; MOURA-FAUCÃO, R. H.; VALENÇA, C. R.; SOUZA, V. R.; MOURA, A. N. Allelopathic effects of the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. on phytoplankton species: contrasting effects between cyanobacteria and chlorophytes. **Acta Limnologica Brasiliensia**, vol. 31, Aug. 2019.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru/Brazil. **Toxicology**, v. 181-182, p. 441-446, Dec. 2002.

BÁRTOVA, K.; HILSCHEROVA, K.; BABICA, P.; MARSÁLEK, B.; BLÁHA, L. Effects of microcystin and complex cyanobacterial samples on the growth and oxidative stress parameters in green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and comparison with the model oxidative stressor-herbicide paraquat. **Environmental Toxicology**, v. 26, n. 6, p. 641-648, Nov. 2011.

BAUER, N.; BLASCHKE, U.; BEUTLER, E.; GROSS, E.M.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; HILT, S. Seasonal and interannual dynamics of polyphenols in *Myriophyllum verticillatum* and their allelopathic activity on *Anabaena variabilis*. **Aquatic Botany**, v. 91, n. 2, p. 110-116, Aug. 2009.

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

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; PICCIN-SANTOS, V.; MOURA, A. N.; ARAGÃO-TAVARES, N. K.; CORDEIRO-ARAÚJO, M.K. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 1, p. 297-310, Mar. 2014.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, 248-252, May 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Brasília, DF: Diário Oficial da União República Federativa do Brasil. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011a.

BRASIL. FUNASA. **Normas de qualidade de água para consumo humano**. Brasília, DF: Diário Oficial da União República Federativa do Brasil. Portaria nº. 2914 de dezembro, 2011b.

CARMICHAEL, W. W. Blue-Green Algae: An Overlooked Health Threat. **Health & Environment Digest, Freshwater Foundation**, v. 5, n. 6, p. 1-4, Jul. 1991.

CHIA, M. A.; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Growth and antioxidant response of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) exposed to anatoxin-a. **Harmful Algae**, v. 49, p. 135-146, Nov. 2015.

CZARNOTA, M. A.; PAUL, R. N.; DAYAN, F. E.; NIMBAL, C. I.; WESTON, L. A. Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: a potent PS II inhibitor in *Sorghum* spp. root exudates. **Weed Technology**, v. 15, n. 4, p. 813-825, Oct. – Dec. 2001.

DE PINHO, D. S.; STURBELLE, R. T.; MARTINO-ROTH, M. D. G.; Garcias, G. L. Evaluation of mutagenic activity resulting from the infusion *Baccharis trimera* (Less.) DC. using the *Allium cepa* test and a chromosomal test for aberrations in human lymphocytes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 165-170, May 2010.

DUMMERMUTH, A. L.; KARSTEN, U.; FISCH, K. M.; KONIG, G. M.; WIENCKE, C. Responses of marine macroalgae to hydrogen-peroxide stress. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 289, n. 1, p. 103–121, Apr. 2003.

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

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

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99–112, Mar. 1985.

FORNO, I. W.; HARLEY, K. L. S. The occurrence of *Salvinia molesta* in Brazil. **Aquatic Botany**, v. 6, p. 185–187, 1979.

GILCY, G. K.; KUTTAN, G. Inhibition of pulmonary metastasis by *Emilia sonchifolia* (L.) DC: An in vivo experimental study. **Phytomedicine**, v. 23, n. 2, p. 123–130, Feb. 2016.

GORHAM, P. R.; MCLACHLON, J. R.; HAMMER, V. T.; KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.). Breb. **Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Verhandlungen**, v. 15, n. 2, p. 796–804, Feb. 1964.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in Allium. A report of the U.S. environmental protection agency. Gene-Tox program. **Mutation Research**, v. 99, n. 3, p. 273–291, Nov. 1982.

GROSS, E. M.; GENE, E. L. Allelochemical reactions. In: LIKENS, G. E. **Encyclopedia of inland waters**. 1st ed. Oxford: Academic Press, p. 715–726, 2009.

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

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

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

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1773–1791, Oct. 1996.

HARKE, M. J.; STEFFEN, M. M.; GLOBER, C. J.; OTTEN, T. J.; WILHELM, S. W.; WOOD, S. A.; PAERL, H. W. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. **Harmful Algae**, v. 54, p. 4–20, Apr. 2016.

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

HENRY-SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Composição química de macrófitas aquáticas flutuantes utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura. **Planta Daninha**, v. 24, n. 1, p. 21-28, Jan. 2006.

HONG, Y.; HU, H. Y.; XIE, X.; SAKODA, A.; SAGEHASHI, M.; LI, F. M. Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 262–269, Feb. 2009.

HONG, Y.; HU, H. Y. Research and application of aquatic plant allelopathy inhibition on algae. **Chinese Science Bulletin**, v. 54, n. 3, p. 287–293, Jan. 2009.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 8, p. 2090–2095, Nov. 2009.

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

JOHANSSON, L. H.; BORG, L. A. H. A Spectrophotometric Method for Determination of Catalase Activity in Small Tissue Samples. **Analytical Biochemistry**, v. 174, n. 1, p. 331-336, Oct. 1988.

KNOLL, F. M.; DA SILVA, A. C. F.; DO CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 539-542, 2006.

KONG, C. H.; WANG, P.; ZHANG, C. X. Herbicidal potential of allelochemicals from *Lantana camara* against *Eichhornia crassipes* and the alga *Microcystis aeruginosa*. **Weed Research**, v. 46, n. 4, p. 290–295, Jul. 2006.

KWANKUA, W.; SENGSAI, S.; KULEUNG, C.; Euawong, N. Sunlight decreased genotoxicity of azadirachtin on root tip cells of *Allium cepa* and *Eucrosia bicolor*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 5, p. 949-954, Jul. 2010.

LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; PRÁ, D.; SILVA-STENICO, M. E.; RIEGER, A.; FRESCURA, V. D.-S.; FIORE, M. F.; TEDESCO, S. B. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **Science of The Total Environment**, v. 432, p. 180-188, Aug. 2012.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutation Research**, v. 650, n. 1, p. 80–86, Jan. 2008.

LEVAN, A. The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, n. 4, p. 471–486, May 1938.

LI, F. M.; HU, H. Y. Isolation and characterization of novel antialgal allelochemical from *Phragmites communis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6545-6553, Nov. 2005.

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

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

LIMA, S.; DIAZ G.; DIAZ, M. A. N. Antibacterial Chemical Constituent and Antiseptic Herbal Soap from *Salvinia auriculata* Aubl. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-5, Dec. 2013.

LIU, G. T.; ZHOU, C. F.; SUN, L. F.; ZHU, W. W.; JIANG, H.; WANG, H. X. Effects of *Eichhornia crassipes* allelochemicals on the growth of two mono- and co-cultured algae *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus*. **Acta Scientiae Circumstantiae**, v. 31, n. 10, p. 2303-2311, Oct. 2011.

LORENZI, A. S.; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K.; CHIA, M. A.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Cyanotoxin contamination of semiarid drinking water supply reservoirs. **Environmental Earth Sciences**, v. 77, n. 595, p. 1-8, Aug. 2018.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum, 2008. 161 p.

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, H.; ZHANG, H. An improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, n. 2, p. 185-195, Apr. 1995.

MADHAVA RAO, K. V.; SRESTY, T. V. S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon-pea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. **Plant Science**, v. 157, n. 1, p. 113-128, Aug. 2000.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in of *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MAUCH, F.; DUDLER, R. Differential induction of distinct glutathione-S-transferase of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. **Plant Physiology**, v. 102, n. 4, p. 1193-1201, Aug. 1993.

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

MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURES, E.; THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment International**, v. 59, p. 303-327, Sep. 2013.

MIGID, H. M. A.; AZAB, Y. A.; IBRAHIM, W. M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 1, p. 57-64, Jan. 2007.

MIKULA, P.; ZEZULKA, S.; JANCULA, D.; MARSALEK, B. Metabolic activity and membrane integrity changes in *Microcystis aeruginosa* – new findings on hydrogen peroxide toxicity in cyanobacteria. **European Journal of Phycology**, v. 47, n. 3, p. 195–206, Jul. 2012.

MISHRA, N. P.; MISHRA, R. K.; SINGHAL, G. S. Changes in the activities of anti-oxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. **Plant Physiology**, v. 102, n. 3, p. 903–910, Jul. 1993.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical antioxidation of haemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 21, p. 6960–6962, Nov. 1972.

MOHAMED, Z. A. Macrophytes-cyanobacteria allelopathic interactions and their implications for water resources management—A review. **Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters**, v. 63, p. 122–132, Mar. 2017.

MOURA, A. N.; ARAGÃO-TAVARES, N. K. C.; AMORIM, C. A. Cyanobacterial blooms in freshwater bodies from a semiarid region, Northeast Brazil: a review. **Journal of Limnology**, v. 77, n. 2, p. 179-188, Jan. 2018.

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

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

NWORU, C. S.; AKAH, P. A.; OKOYE, F. B.; ESIMONE, C. O. Inhibition of proinflammatory cytokines and inducible nitric oxide by extract of *Emilia sonchifolia* L. aerial parts. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 34, n. 6, p. 925–931, Dec. 2012.

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

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

PAERL, H. W.; OTTEN, T.G. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 4, p. 995-1010, May 2013.

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

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

QURESHI, M. I.; QADIR, S.; ZOLLA, L. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 10, p. 1239–1260, Oct. 2007.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as tool in screening of the genotoxicity of complex mixture. **Hereditas**, v. 118, n. 1, p. 49–53, Feb. 1993.

REDDY, J. K.; SUGA, T.; MANNAERTS, G. P.; LAZAROW, P. B.; SUBRAMANI, S. Peroxisomes: biology and role in toxicology and disease, Ann. N. Y. Acad. Sci., New York, 1996.

RHOADS, D. M.; UMBACH, A. L.; SUBBAIAH, C. C.; SIEDOW, J. N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signalling. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 357–366, Jun. 2006.

ROBERTO, M. M.; PEDRO, J.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. **Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico da própolis marrom pelo ensaio de aberrações cromossômicas e micronúcleos em *Allium cepa***. In: SBMCTA 2007 - VIII Congresso Brasileiro de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2007, Mangaratiba - RJ. Revista Brasileira de toxicologia.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR., J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, Jan. 1965.

SVIRČEV, Z.; BALTIĆ, V.; MILADINOV-MIKOV, M.; SAJENKOVIĆ, D. **Cyanobacterial blooms in Serbia – epidemiological studies and health risk assessment**. In: 16th Academy of Studenica – International Scientific Conference “Cyanobacteria and human health”. Novi Sad. Abstract Book, p. 34, 2011.

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

TESTA, B. **The Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics**. 1995. New York: Academic Press, p. 475.

TIMOTHY, O.; M. IDU, D. I. Olorunfemi and O. Ovuakporie-Uvo. Cytotoxic and genotoxic properties of leaf extract of *Icacina trichantha* Oliv. **South African Journal of Botany**, v. 91, p. 71–74, Mar. 2014.

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

USUAH, P. E.; UDOM, G. N.; EDEM, I. D. Allelopathic effect of some weeds on the germination of seeds of selected crops grown in Akwa Ibom State Nigeria. **Global Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 1, p. 23–33, Jun. 2013.

VESTENA, S.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, J. A.; OLIVA, M. A. Cadmium-induced oxidative stress and antioxidant enzyme response in water hyacinth and *Salvinia*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 2, p. 131–139, Jan. 2011.

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

YU, J. Q.; YE, S. F.; ZHANG, M. F.; HU, W. H. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*), and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 2, p. 129–139, Feb. 2003.

YU, Y.; KONG, F.; WANG, M.; QIAN, L.; SHI, X. Determination of short-term copper toxicity in a multispecies microalgal population using flow cytometry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 1, p. 49–56, Jan. 2007.

ZHANG, C.; YI, Y. L.; HAO, K.; LIU, G. L.; WANG, G. X. Algicidal activity of *Salvia miltiorrhiza* Bung on *Microcystis aeruginosa*—towards identification of algicidal substance and determination of inhibition mechanism. **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 997–1004, Oct. 2013.

ZHANG, S.; XIA, W.; YANG, X.; ZHANG, T. Inhibition effect of aquaculture water of *Salvinia natans* (L.) All. on *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 45, n. 1, p. 81–86, Jan. 2016a.

ZHANG, S.; XIA, W.; YANG, X.; ZHANG, T. Inhibition effect on *Microcystis aeruginosa* PCC7806 as well as separation and identification of algicidal substances isolated from *Salvinia natans* (L.) All. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 45, n. 3, p. 442–447, May 2016b.

ZHANG, T. T.; ZHENG, C. Y.; HU, W.; XU, W. W.; WANG, H. F. The allelopathy and allelopathic mechanism of phenolic acids on toxic *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 1, p. 71–77, Feb. 2010.

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

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555–559, Mar. 1999.

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

CAPÍTULO 2



Characterization of allelochemicals from *Pistia stratiotes* extracts and their effects on the growth and physiology of *Microcystis aeruginosa*

Anderson Lourenção¹ · Gustavo F. Mecina¹ · Micheline K. Cordeiro-Araújo² · Maria C. Bittencourt-Oliveira² · Mathias A. Chia³ · João L. Bronzel-Júnior¹ · Filipe O. Granero¹ · Luciana P. Silva⁴ · Regildo M. G. da Silva^{1,5} 

Received: 26 November 2020 / Accepted: 27 May 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Due to the public and environmental health impact of cyanotoxins, investigations have been focused on finding environmental friendly algacides from aquatic plants. The present study had the objective to evaluate the population control and physiological response of *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger (strain BCCUSP232) exposed to *Pistia stratiotes* L. extracts. Aqueous and ethanolic extracts of *P. stratiotes* at different concentrations (10, 25, and 50 mg L⁻¹) were submitted to *M. aeruginosa* and reduced significantly ($p < 0.05$) the cyanobacterium cell density. The ethanolic extract presented the greatest growth inhibition of the strain at the highest concentration. During exposure to *P. stratiotes* extracts, intracellular hydrogen peroxide levels, malondialdehyde content, and antioxidant enzymes (peroxidase, catalase, and glutathione S-transferase) activities increased in *M. aeruginosa*, while total protein concentration decreased when compared to the control group. Superoxide dismutase (SOD) activities presented a sharp decline, suggesting superoxide radical and peroxide accumulation. This implied that SOD was a target for bioactive substance(s) from aqueous and ethanolic extracts of *P. stratiotes*. Phytochemical screening of the extracts revealed that the ethanolic extract presented 93.36 mg gallic acid equivalent (GAE) per gram dry weight (g⁻¹ DW) total polyphenols and 217.33 mg rutin equivalent (RE) per gram dry weight total flavonoids, and for the aqueous extract, 5.19 mg GAE g⁻¹ DW total polyphenols and 11.02 mg RE g⁻¹ DW total flavonoids were detected. Gas chromatography (GC)/mass spectrometry (MS) analyses of the ethanolic and aqueous extracts presented palmitic acid ethyl ester as major allelochemical. In view of these results, it can be concluded that *P. stratiotes* showed potential in controlling *M. aeruginosa* populations.

Keywords Aquatic macrophytes · Cyanobacterium · Allelochemicals · Oxidative stress · Phytocomponents · Palmitic acid

Responsible Editor: Vitor Vasconcelos

✉ Regildo M. G. da Silva
regildo.silva@unesp.br

¹ Institute of Chemistry, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil

² Department of Biological Sciences, Luiz de Queiroz College of Agriculture, University of São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo, Brazil

³ Department of Botany, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria

⁴ Fundação Educacional do Município de Assis (FEMA), Assis, São Paulo, Brazil

⁵ Laboratory of Herbal Medicine and Natural Products, Department of Biotechnology, School of Sciences, Humanities and Languages, São Paulo State University (UNESP), Dom Antonio Avenue 2100, 19806-900, Assis, São Paulo, Brazil

Introduction

Increasing urbanization, industrial, and agricultural activities have led to the discharge of effluents into aquatic ecosystems, and the acceleration of eutrophication. Massive release and accumulation of organic compounds combined with the rise in global temperatures have facilitated excessive cyanobacteria proliferation in aquatic environments (O'Neil et al. 2012; Monchamp et al. 2018). Some cyanobacteria species produce toxic secondary metabolites called cyanotoxins, which can promote unpleasant tastes and odors, resulting in interferences in the water sources management, thus impairing the use of this resource (Drobac et al. 2013; Brooks et al. 2016; Zhou et al. 2016). Their distribution in the food chain accumulates and affects all individuals, altering plant and fish quality, and making the water unsuitable for recreation or

human and animal consumption (El-Shehawey et al. 2012; Cordeiro-Araújo et al. 2017). The most common cyanobacteria toxins are classified considering their mechanism of action in mammals as hepatotoxic (e.g., microcystins, nodularins), neurotoxic (anatoxins, saxitoxins), cytotoxic (cylindrospermopsin), and endotoxic (lipopolysaccharides) (Kaebemick and Neilan 2001; Briand et al. 2003; Falconer 2008; Merel et al. 2013).

In view of the problems related to cyanobacteria and their toxins, different methods have been employed to reduce and/or eliminate these organisms in aquatic systems (Chen and Pan 2012; Noyma et al. 2016). Physical methods consist filtration, centrifugal separation, and ultrasound treatment, while chemical methods include hydrogen peroxide and copper sulfate to control cyanobacterial growth (Drábková et al. 2007; Wu et al. 2010; Yan et al. 2011; Ou et al. 2012). The biological method is more environmentally friendly and employs fish and zooplankton to selectively graze on cyanobacteria of interest (Kotopoulos et al. 2009; Heng et al. 2009). Unfortunately, these measures have had limited success due to secondary pollution (e.g., chemical treatments), high cost, and their application as only emergency solutions (Sun et al. 2017). Thus, there is a necessity for further researches concerning the development of new cost-efficient and effective techniques that are more durable and sustainable and leave less environmental footprints.

Since the 1970s, studies have shown the possibility to control populations of cyanobacteria and other organisms by plant origin compounds (Street 1978). More recently, studies have demonstrated that compounds produced by aquatic plants can control harmful algae growth (Hou et al. 2019; Mecina et al. 2019). A species with potential to produce promising secondary compounds for cyanobacterial population control is *Pistia stratiotes* L. of the Araceae family (Sinang et al. 2019). This macrophyte is a floating aquatic species with tropical cosmopolitan distribution popularly known as water lettuce (Pott and Pott 2000). It is a species considered to proliferate undesirably in some tropical aquatic ecosystems, for example, in fish breeding ponds in Africa, in irrigation canals in Gambia, and Itaipu reservoir in Brazil (Terry 1981; Thomaz et al. 1999; Petr 2000).

Studies on the genus *Pistia* have yielded interesting pharmacological findings such as antioxidant and healing properties (Jha et al. 2012). Extracts and compounds obtained from *P. stratiotes* controlled population growth of several microorganisms including microalgae in freshwater systems (Aliotta et al. 1991; Bich and Kato-Noguchi 2012; Wu et al. 2013). In the last decade, many studies have shown that extracts and solutions containing *P. stratiotes* interfere in the culture of *Microcystis aeruginosa*, which may result in changes in the growth of these microalgae, acting both as algaecide and as algaestatic (Mohamed 2017; Sinang et al. 2019). These results were obtained using extracts from different organic solvents,

exudates, and volatilization products of plant parts; however, these studies did not present the yields of the different extracts, the phytochemical characterization, and the possible mechanism of action that promote interference in the growth of *M. aeruginosa* (Wu et al. 2013; Wu et al. 2015; Nguyen et al. 2019).

Thus, *P. stratiotes* is an excellent target species for further researches on the control of toxin-producing cyanobacteria. The present study evaluated the algaecidal potential of *P. stratiotes* extracts on *Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Kützinger. Algaecidal potential and physiological biochemical responses of the cyanobacterium during exposure to different concentrations of *P. stratiotes* extracts were investigated as an attempt to understand their mechanism of action. In addition, phytochemical characterization of ethanolic and aqueous extracts was performed to determine the possible compound with allelopathic activity on *M. aeruginosa*.

Materials and methods

Preparation of *P. stratiotes* extracts

P. stratiotes was collected from greenhouse with controlled cultivation conditions, located in UNESP-Assis/SP, south-eastern Brazil (22° 44' 59.45" S and 50° 31' 40.45" W), in July 2018. The voucher specimen has been deposited (HASSI-1038) in the Assisense Herbarium. Whole plants were cleaned and dried in forced-air oven at 40 °C until constant weight. After drying process, the plant material was grounded by a Wiley-type mill (Cienlab, CE-430, Brazil), obtaining a powder. This plant material was exhaustively extracted with ethanol (1:10, w/v) by percolation at room temperature for 72h. The resulting extract was vacuum filtered and dried with a rotary evaporator (Marconi, MA-120, Brazil). For the aqueous extract, the extraction procedure was repeated with distilled water (1:10, w/v) in place of ethanol. Afterwards, the extracts were lyophilized with a Liotop L101 Lyophilizer (Liotop, Assis, Brazil). The extracts were kept in opaque bottles at room temperature, and the extraction yields of both extracts were determined.

Cyanobacterial bioassay

The axenic strain of *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232 was obtained from the Brazilian Cyanobacteria Collection of the University of São Paulo (BCCUSP) and maintained in ASM-1 medium at pH 7.4. The unicellular cyanobacterium was maintained under controlled conditions (temperature: 24 ± 1 °C; light intensity: 40 μmol m⁻² s⁻¹; and photoperiod: 14:10 h light/dark cycle).

Experiments were conducted using 0.7 L of ASM-1 growth medium under the same conditions as the stock cultures in 1 L

Erlenmeyer flasks. *M. aeruginosa* was exposed to ethanolic and aqueous extracts of *P. stratiotes* at different concentrations (10, 25, and 50 mg L⁻¹) for 6 days, while the control cultures only had the cyanobacterium. These were diluted in sterile ASM-1 culture medium and ultrasonic bath. All experimental treatments and controls had 2.3×10⁵ cells mL⁻¹ at exponential growth phase as initial cell density. Samples (40 mL) were collected on days 2, 4, and 6 of the experiment for cell density, lipid peroxidation, reactive oxygen species (ROS), antioxidant enzyme activities, and total proteins determination. All experiments were performed in triplicates.

The *M. aeruginosa* number of cells was monitored using a combination of optical density calibration curve ($y = 3E-08x + 0.0058$; $r^2 = 0.9992$) measured at 750 nm (Biospectro SP-22 spectrophotometer, Biospectro, Curitiba, Brazil) and microscopic counts with a Fuchs Rosenthal counting chamber.

Biochemical analyses

Sample preparation and extraction for biochemical analyses

M. aeruginosa biomass was obtained through centrifugation of 40 mL culture aliquots at 10,000 rpm for 5 min at 0 °C. The resultant pellet was re-suspended and homogenized (10 s vortexing) in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) containing 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP). Subsequently, the homogenate was centrifuged at 15,000 rpm for 10 min at 0 °C, and the supernatant was stored in cryogenic vials at -20 °C.

Lipid peroxidation assay

According the method of Madhava Rao and Sresty (2000) with some modifications, the determination of lipid peroxidation was performed by measuring the malondialdehyde (MDA) content of *M. aeruginosa*. For each 1 mL enzymatic extract, 4 mL 20% trichloroacetic acid (TCA) with 0.5% thiobarbituric acid was added, and the mixture was cooled in ice bath after 30 min in water bath at 95 °C. The resulting mixture was centrifuged at 10,000 rpm for 15 min, and the supernatant absorbance was measured at 532 nm and corrected at 600 nm. The concentration of MDA was calculated by the molar absorptivity of 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Demiral and Türkan 2005).

Internal hydrogen peroxide (H₂O₂) determination

Following the method described by Jana and Choudhuri (1982) with some modifications, the internal H₂O₂ content in *M. aeruginosa* was determined. To 133 µL 0.1% titanium chloride (in 20% H₂SO₄) 400 µL enzymatic extract was added, and the mixture absorbance was measured at 410 nm with a spectrophotometer 1 min after incubation. The H₂O₂ concentration was calculated by the molar absorptivity of 0.28 µM⁻¹ cm⁻¹.

Total protein and antioxidant enzyme activities assay

Total protein content determination was performed according to Bradford (1976). Periodic function was used to measure catalase (CAT) activity (Johansson and Borg 1988). This method employs methanol (working as a hydrogen donor for catalase) resulting in formaldehyde formation, which concentration was measured with Purpald at 550 nm. Enzyme activity was calculated by formaldehyde calibration curves (0–120 mM). One unit (U) of CAT was defined as the enzyme amount that generated the formation of 200 mM formaldehyde under the test conditions specified above.

Determination of peroxidase (POD) activity was performed following the method of Reddy et al. (1995). In a cuvette, 3 mL pyrogallol solution (0.05 M in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5) and 0.5 mL H₂O₂ (1%) were mixed, and 0.1 mL enzyme extract was added to initiate the reaction. The enzyme activity was proportional to absorbance alteration per minute.

According to method described by Misra and Fridovich (1972), superoxide (SOD) dismutase activity was determined with a spectrophotometer. The incubation medium contained potassium phosphate buffer (6.7 mM, pH 7.8), methionine (45 µM), riboflavin (0.53 mM), and nitro blue tetrazolium chloride (NBT) (84 µM) in a 3-mL final volume. The reaction vials with the incubation medium were placed in an aluminum foil-lined chamber at 25 °C for 10 min under fluorescent lamps. After light exposure, the incubation medium absorbance at 600 nm was measured with a spectrophotometer. The homogenate amount was kept below one unit of enzyme to ensure accuracy considering the addition to the incubation medium. One unit of enzyme activity was defined as the enzyme amount inhibiting 50% of the NBT reduction.

The procedure described by Mauch and Dudler (1993) was applied to determine glutathione S-transferase (GST) activity. The reaction started with the addition of 100 µL enzyme extract to 2 mL reaction mixture (3.6 mM reduced glutathione and 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5)). The GST activity measured at 340 nm was directly proportional to the absorbance alteration.

Phytochemical compounds

Total polyphenols and flavonoids quantification

The total phenols and flavonoids of the ethanolic and aqueous extract treatments were measured to determine the concentrations to which the cyanobacterium was exposed. For total polyphenols, the Folin and Ciocalteu (1927) procedure was employed. To 0.5 mL aliquot per extract concentrations, 5 mL distilled water, and 0.25 mL Folin-Ciocalteu Reagent were added. Three minutes after incubation, 1 mL Na₂CO₃ saturated solution was added at 10%, and the mixture was incubated for 1 h. The absorbance was measured at

725 nm by a spectrophotometer. The standard curve was plotted from gallic acid, and total polyphenol contents were expressed as mg gallic acid equivalents per g dry weight (mg GAE g⁻¹ DW).

Total flavonoid content of the extracts was quantified following method described by Zhishen et al. (1999), which used AlCl₃ to complexate flavonoids and to change absorbance to higher wavelengths. An aliquot of 250 µL was mixed with 1.25 mL distilled water and 75 µL 5% NaNO₂ solution. Then, 150 µL 10% AlCl₃ solution was added after 6 min. Subsequently, 0.5 mL 1 M NaOH solution was added, and the total volume was adjusted with 2.5 mL distilled water. The samples were mixed, and the resulting mixture was measured at 510 nm. Rutin was used as the flavonoid to develop the standard calibration curve, and the total flavonoid content was expressed in mg rutin equivalent per gram dry weight (mg RE g⁻¹ DW).

Gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) analysis

The extracts were weighted and 9.4 mg of ethanolic and 5.5 mg of aqueous were used for the evaluation. For each extract, the methoxylation and silylation procedure was performed prior to the injection in the equipment. Methoxylation was performed by dissolving each extract in 100 µL of pyridine. Subsequently, 80 µL of a 20 mg mL⁻¹ methoxyamine hydrochloride in pyridine solution was added to the extract solution. The resulting mixture was taken to a thermostatic bath and maintained at 30 °C for 90 min. After methoxylation procedure, 200 µL N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) was added to the solution, and the total volume was heated to 37 °C for 30 min. Then, the silylated extract was kept at 5 °C for 24 h and filtered through a Nylon membrane syringe filter with 0.22 µm pore diameter. The filtered extract was transferred to the sampling flasks and readily analyzed.

Ethanolic and aqueous extract analysis of *P. stratiotes* was made by Agilent GC 7890B, MSD 5977 A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; Library: NIST14.L SOFTWARE MASSHUNTER) with AB innowax column (60 × 0.25 mm id, film thickness 0.25 µm). A system of electron ionization (70.007 eV electron energy) was used for GC/MS detection. Helium gas was used as a carrier gas at a total flow rate of 7.4206 mL min⁻¹. Injector and mass transfer line temperature were set at 270 and 280 °C, respectively. The oven temperature was programmed from 50 to 180 °C at 3 °C min⁻¹ with hold time of 10 min and from 180 to 250 °C at 6 °C min⁻¹ with hold time of 20 min, respectively. 0.2 µL samples diluted with methanol were manually injected in the split less mode. Sample compound identification was based on GC retention time on AB innowax column; total GC running time was 40 min.

Statistical analysis

Cell density, biochemical analysis, total polyphenols, and total flavonoids data were evaluated using Levene's and Shapiro-Wilks tests. Significant differences between the mean response parameters of *M. aeruginosa* during exposure to the extracts were determined using one-way analysis of variance (ANOVA). Where significant differences were detected, the Tukey's hsd post hoc test was used for separation of means. All analyses were carried out at 5% significance level using BioEstat 5.0 software for Windows.

Results

Extraction yield

The yield of the aqueous and ethanolic extract of *P. stratiotes* was 8.58% and 14.67%, respectively.

Effects of *P. stratiotes* extracts on *M. aeruginosa* growth

Aqueous and ethanolic extracts of *P. stratiotes* presented concentration-dependent inhibitory effects ($p < 0.05$) on *M. aeruginosa* (Fig. 1). The highest cyanobacterium growth inhibition occurred at 50 mg L⁻¹ for both extracts, but the ethanolic extract was the most effective. The most significant effects of the extracts were generally observed from days 4–6 of the experiment. On day 6 of the bioassay, the lowest cell density reduction of the *M. aeruginosa* strain was observed using the aqueous and ethanolic *P. stratiotes* extracts (1×10^3 and 6×10^5 cells mL⁻¹, respectively).

Lipid peroxidation

MDA content changes were used as an indicator of lipid peroxidation in *M. aeruginosa* exposed to different extract concentrations (Fig. 2A and B). MDA content of *M. aeruginosa* cells increased significantly ($p < 0.05$) when compared to the control. This increase could be seen from the 2nd day of bioassay for all concentrations of *P. stratiotes* extracts. The highest MDA content was 2.36 ± 0.1 µmol/10⁶ cells using 50 mg L⁻¹ of the ethanolic extract on the 4th bioassay day. In aqueous extract, the highest MDA content (1.69 ± 0.2 µmol/10⁶ cells) was observed using 50 mg L⁻¹ on the 2nd bioassay day.

Reactive oxygen species (ROS): internal hydrogen peroxide (H₂O₂) formation

As a general trend, the concentration of internal H₂O₂ in *M. aeruginosa* increased over time in the presence of aqueous

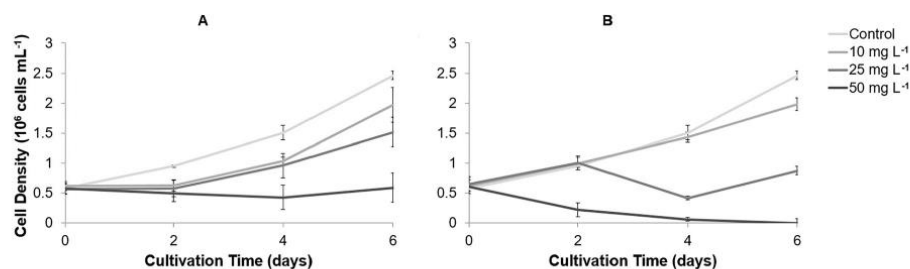


Fig. 1 Effect of aqueous (A) and ethanolic (B) extracts of *P. stratiotes* on the growth of *M. aeruginosa*. All error bars correspond to the standard deviation ($n=3$)

and ethanolic extracts of *P. stratiotes* (Fig. 2C and D). The highest H_2O_2 concentration ($3.77 \mu\text{mol}/10^6$ cells) in *M. aeruginosa* was observed after 6 days of exposure to the ethanolic extract (25 mg L^{-1}) of *P. stratiotes*. Alterations in cyanobacterium H_2O_2 levels during exposure to the ethanolic extract on 2nd, 4th, and 6th days were statistically significant ($p<0.05$) (Fig. 2D). On the other hand, significant differences in H_2O_2 production by *M. aeruginosa* were only recorded on days 4 and 6 of exposure to the aqueous extract.

Total protein and antioxidant enzyme activities

P. stratiotes extracts promoted a decline in total protein content of *M. aeruginosa* (Fig. 3A and B). All concentrations of the ethanolic extract significantly ($p<0.05$) reduced total protein concentrations of *M. aeruginosa* throughout the study. A

similar profile was observed in the aqueous extract, but the lowest concentration (10 mg L^{-1}) only differed statistically from the control on the 6th day of the experiment.

Compared to the control, CAT activities of *M. aeruginosa* significantly increased in presence of both extracts throughout the experiment (Fig. 4A and B). The highest CAT activity during exposure to aqueous extract occurred at the highest concentrations on day 6. The cultures exposed to 10 mg L^{-1} ethanolic extract presented higher CAT activity than the other concentrations of the extract at the end of the study.

POD activities of *M. aeruginosa* increased after exposure to aqueous and ethanolic extracts of *P. stratiotes* (Fig. 4C and D). Its activity increased over time during exposure to different concentrations of the extracts. The ethanolic extract of *P. stratiotes* demonstrated a dose-dependent increase in POD activity (Fig. 4D). The highest levels of activity of this

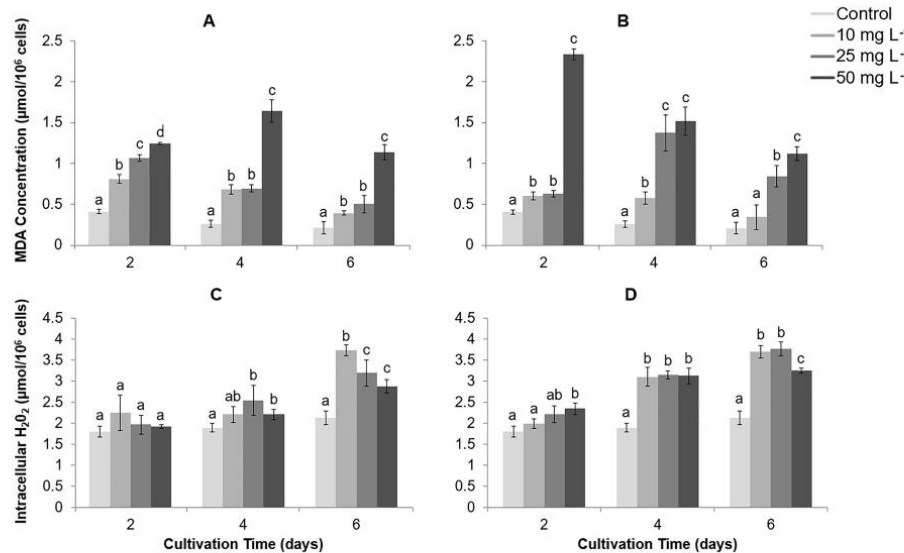


Fig. 2 Effect of aqueous (A and C) and ethanolic (B and D) extracts of *P. stratiotes* on lipid peroxidation and intracellular H_2O_2 content of *M. aeruginosa*. Means with the same letters are not significantly different ($p>0.05$). Error bars are plus or minus standard deviation ($n=3$)

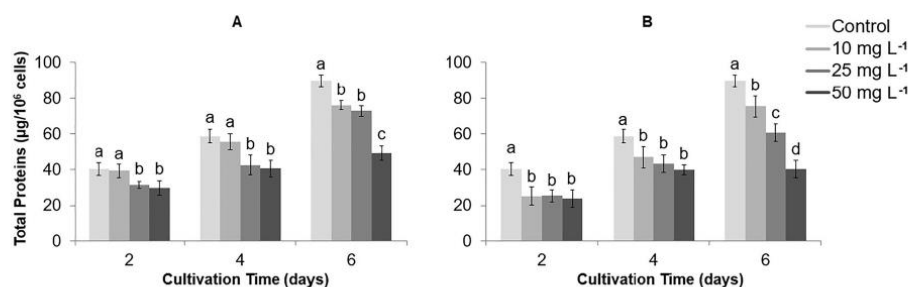


Fig. 3 Changes in total proteins of *M. aeruginosa* after exposure to aqueous (A) and ethanolic (B) extracts of *P. stratiotes*. Means with the same letters are not significantly different ($p > 0.05$). Error bars are standard deviation for $n=3$

enzyme were also observed for the ethanolic extract. Variations in POD activities during exposure to the extracts were statistically significant ($p < 0.05$).

SOD activities of the cyanobacterium significantly ($p < 0.05$) inhibited after exposure to aqueous and ethanolic extracts of *P. stratiotes* (Fig. 5A and B). GST activities of *M. aeruginosa* increased significantly ($p < 0.05$) when compared to the control (Fig. 5C and D). This increase is visible from the 2nd bioassay day for all concentrations of both *P. stratiotes* extracts, and the highest GST activities were observed using 50 mg L⁻¹.

Total polyphenols and flavonoids content of *P. stratiotes* extracts

Phytochemical analyses revealed that ethanolic extract had 93.36 mg GAE g⁻¹ DW total polyphenols and 217.33 mg RE g⁻¹ DW total flavonoids. On the other hand, the aqueous extract had 5.19 mg GAE g⁻¹ DW total polyphenols and 11.02 mg RE g⁻¹ DW total flavonoids.

Gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) analysis

GC/MS is one of the best assays to identify plant extract active compounds. GC/MS of *P. stratiotes* extracts showed peaks that indicate the presence of ten phytochemical constituents

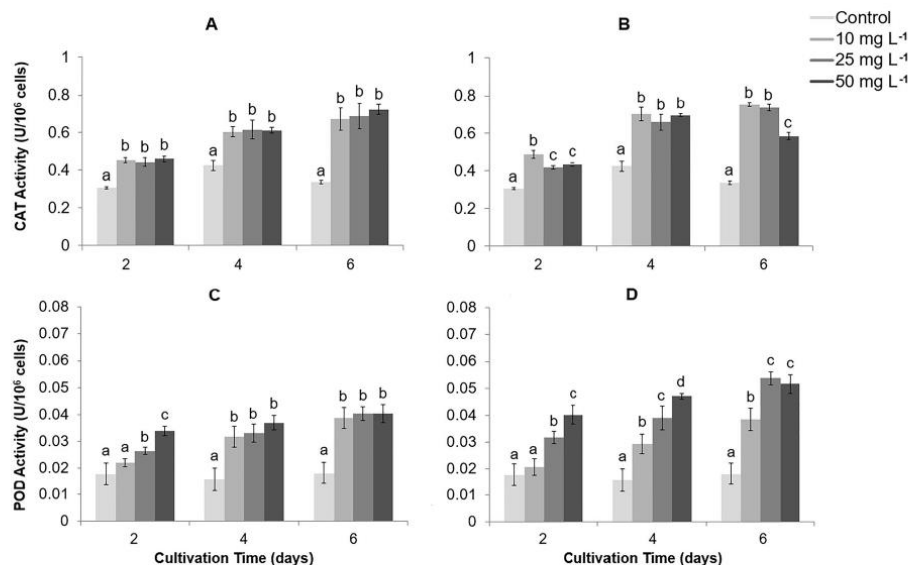


Fig. 4 Effect of different concentrations of aqueous (A and C) and ethanolic (B and D) extracts of *P. stratiotes* on CAT and POD activities of *M. aeruginosa* BCCUSP232. Means with the same alphabets are not significantly different ($p > 0.05$). Error bars are standard deviation for $n=3$

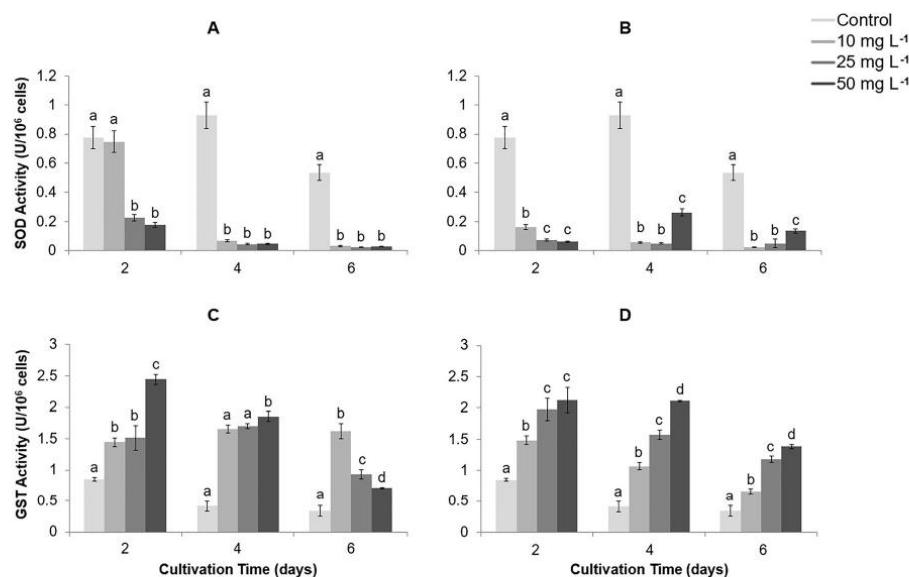


Fig. 5 Changes in SOD and GST activities of *M. aeruginosa* exposed to different concentrations of aqueous (A and C) and ethanolic (B and D) extracts of *P. stratiotes*. Means with the same alphabets are not significantly different ($p > 0.05$). Error bars are standard deviation for $n=3$

in the ethanolic and aqueous extracts. Phytochemicals of *P. stratiotes* extracts were detected by their retention time (RT), molecular formula (MF), molecular weight (MW), and peak area (PA%), and these data are expressed in Tables 1 and 2. In ethanolic extract, the major phytochemical observed was palmitic acid ethyl ester which presented the highest intensity and peak area (27.31%). In aqueous extract, the major phytochemical was palmitic acid ethyl ester with the highest intensity and peak area (12.11%).

Table 1 Retention time (Rt), name of compounds (NCs), molecular formula (MF), molecular weight (MW), and peak area (PA%) of *P. stratiotes* ethanolic extract

Rt	NCs	MF	MW	PA%
8.52	Ethene, (methylsulfonyl)	C ₂ H ₆ O ₂ S	95	0.33
12.01	L-Glutamine	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146	0.41
12.91	Propane, 2-chloro	C ₃ H ₇ Cl	79	0.14
15.47	Heptyl propyl carbonate	C ₄ H ₈ O ₃	104	0.11
17.89	n-Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	255	7.56
18.65	Phytol, acetate	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	338	4.20
19.23	Palmitic acid, ethyl ester	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	283	27.31
21.14	1,6-Heptadiene	C ₇ H ₁₂	96	0.11
28.43	Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	412	2.63
34.02	1-Hexacosanol	C ₂₆ H ₅₄ O	383	10.98

Discussion

The aqueous and ethanolic extracts of *P. stratiotes* presented algaecidal effects on *M. aeruginosa* BCCUSP232, which is in concordance with the results obtained by Aliotta et al. (1991) using *P. stratiotes* isolated substances and Wu et al. (2015) using different *P. stratiotes* allelochemicals release routes (root exudation, leaf leachates, and residue decomposition), both against *M. aeruginosa*. Similarly, Wu et al. (2013) demonstrated that four concentrations of ethyl acetate extract of *P. stratiotes* inhibited *M. aeruginosa* growth. The authors also observed that the cyanobacterium cells began to recover approximately 4 days after exposure to the extract, which is similar to results observed in the present study. According to Kong et al. (2006) and Hong and Hu (2009), depending on the exposure time to allelochemicals, cyanobacteria can degrade or transform the bioactive substances and resume normal growth. The results in this study demonstrated that the highest concentration of the extracts had greater efficiency, and ethanolic extract showed allelochemicals with the most significant impact on the algaecidal effect compared to aqueous extract. This might be explained by the fact that the different extraction solvent types and polarities can cause significantly different impacts, resulting in different algaecidal effects (Hong et al. 2008; Wu et al. 2013).

The increase in H₂O₂ content in *M. aeruginosa* during exposure to *P. stratiotes* extracts is indicative of high levels of reactive oxygen species (ROS) (Zhao et al. 2020). Reactive

Table 2 Retention time (Rt), name of compounds (NCs), molecular formula (MF), molecular weight (MW), and peak area (PA%) of *P. stratiotes* aqueous extract

Rt	NCs	MF	MW	PA%
12.05	Cyclohexene-1,1-dimethanol	C ₈ H ₁₄ O ₂	143	0.01
15.32	Carbonic acid, isohexyl propyl ester	C ₉ H ₁₈ O ₃	176	0.11
17.81	1,6-Octadiene, 5,7-dimethyl-, (R)-	C ₁₀ H ₁₈	139	0.123
18.20	E-11-Hexadecanoic acid, ethyl ester	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	1.04
18.30	Palmitic acid, ethyl ester	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	12.11
20.85	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	296	2.17
21.99	Stearic acid, ethyl ester	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312	0.98
25.64	α-Glyceryl linolenate	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	352	1.35
26.43	1-Monolinoleoylglycerol trimethylsilyl ether	C ₂₇ H ₅₄ O ₄ Si ₂	498	1.52
29.03	Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	412	1.45

oxygen species (ROS) are unstable and extremely reactive molecules capable of transforming other molecules with which they collide (Silva and Gonçalves 2010). The ROS are part of the natural metabolism of phytoplankton and are generated in large scale under oxidative stress conditions, in which molecules such as proteins, carbohydrates, lipids, and nucleic acids are affected (Lozano et al. 2014; Chia et al. 2015b; Meng et al. 2015). Increased ROS production usually occurs in different organelles of photosynthetic organisms during environmental stress and/or exposure to toxic substances (Zhao et al. 2020). Therefore, increased production of H₂O₂ damages subcellular structures associated with the chloroplasts, leading to pigment level, photosynthetic potential, and cell density reductions (Dummermuth et al. 2003; Torres et al. 2008; Mikula et al. 2012).

Malondialdehyde is a biomarker of oxidative damage to membrane lipids of cyanobacteria and other photosynthesizing organisms (Hong et al. 2008; Wang et al. 2011; Zhou et al. 2016). Yu and Matsui (1997) and Li and Hu (2004) demonstrated that certain bioactive substances (including allelochemicals) compromise membrane integrity by causing damages in cell membranes, imbalance in ion channels, and alterations in membrane permeability. In the present study, extract concentration and exposure time increased MDA amount. This implies that cell wall of *M. aeruginosa* suffered oxidative damage by ethanolic and aqueous extracts of *P. stratiotes*. These results are similar to those published by Meng et al. (2015) and Li et al. (2016) on *M. aeruginosa* exposed to extracts of *Ailanthus altissima* and *Sagittaria trifolia*.

The antioxidant metabolism enzymes are the first line of defense against ROS (Silva and Gonçalves 2010). In this way, the activity of antioxidant enzymes and *P. stratiotes* extract compounds related to oxidative stress were evaluated.

The decline in total protein content is related to changes in photosynthetic rates, which was probably caused by a decline in chlorophyll content of the cyanobacterium. A decline in photosynthesis causes a drop in the levels of organic carbon available for the biosynthesis of important biomolecules such

as proteins (Larkum et al. 2003). Cyanobacteria are equipped with an efficient antioxidant system to combat the effect of increasing ROS concentration. Antioxidant enzymes such as CAT and POD are involved in the scavenging and conversion of excess H₂O₂ to water and oxygen, which explains these enzymes activities increase as a function of extract type, concentration, and exposure time. The results of this study are in accordance with those of Hong et al. (2009) and Li et al. (2016) who showed that CAT and POD activities of *M. aeruginosa* exposed to plant extracts are increased. In addition, these enzymes have a vast array of substrate specificity, including phenolic compounds, formic acid, formaldehyde, indole, catechol, and pyrogallol (Murphy et al. 2000). Hence, these enzymes may have been involved in transformation and detoxification of the bioactive substances present in the aqueous and ethanolic extracts of *P. stratiotes*.

SOD is an enzyme that converts the superoxide molecule to free oxygen and H₂O₂, and the latter is converted to water and oxygen by POD and CAT (Mishra et al. 1993; Qureshi et al. 2007). The enzyme has been identified as the first line of defense against ROS (Hassan and Scandalios 1990). Hong et al. (2009) and Meng et al. (2015) demonstrated that high concentration and exposure time to compounds of plant origin might partially weaken or damage antioxidant enzymes such as SOD. In addition, Wang et al. (2019) demonstrated in their work that H₂O₂ in high concentrations inhibited the activity of the SOD enzyme in *M. aeruginosa*, as found in this work. Consequently, the excess of hydrogen peroxide formed inside the cyanobacterium, with the probable action of bioactive compounds in the extracts, caused the inhibition of SOD activity. Zhang et al. (2007) report that a sharp decline in SOD activity damages enzymatic proteins, due to the accumulation of peroxides and free radicals.

Increased GST activity in response to the presence of the extracts on the 6th day shows involvement in detoxification and biotransformation of bioactive substances. These processes are achieved by a conjugation reaction that uses the reduced form of glutathione (GSH) and is catalyzed by GST (Vestena

et al. 2011; Chia et al. 2015a). Previous studies by Bártova et al. (2011) and Ha and Pflugmacher (2013a, 2013b) have demonstrated that this enzyme is able to detoxify and biotransform bioactive substances and ROS in phytoplankton species and vascular plants, respectively. Therefore, increased GST activity in *M. aeruginosa* was a potent mean of protection against oxidative damage.

The extracts with the highest polyphenols content presented the highest algacidal activity. This result can be explained by studies performed by Bauer et al. (2009), Gross (2009), Wu et al. (2013), and Zhang et al. (2010, 2013), which showed that allelochemicals extracted from various aquatic plants inhibit growth of algae and cyanobacteria. Many compounds, including phenolic acids and flavonoids inhibit photosynthesis, increase ROS production, alter membrane permeability, promote damage to DNA and proteins, and cause lipid peroxidation and cell death (Czarnota et al. 2001; Yu et al. 2003; Zhang et al. 2010).

The GC/MS analyses showed several compounds in the ethanolic and aqueous extracts as observed by Tyagi and Agarwal (2017a, 2017b) who demonstrated the presence of the same compounds in the ethanolic extract of *P. stratiotes* in their studies. The ethanolic extract presented palmitic acid ethyl ester as the major component, in the same way the aqueous extract presented a greater presence of this compound in the analysis. The presence of palmitic acid ethyl ester may be related to the algacidal and/or allelostatic activities observed in the present study, since different studies attribute the allelopathic, antimicrobial, and toxic potentials to this compound (Alamsjah et al. 2007; Li et al. 2014; Ivanova et al. 2017; Li et al. 2020; Zhu et al. 2021).

Conclusion

The present work showed that *P. stratiotes* has the potential to control *M. aeruginosa* populations, and the ethanolic extract showed expressive results. The *P. stratiotes* extracts caused oxidative stress by increasing intracellular H₂O₂ content and lipid peroxidation in the cyanobacterium. Consequently, the antioxidant enzymes such as CAT, POD, and GST had significantly increased their activities in the presence of the extracts. On the other hand, SOD activity was inhibited, demonstrating that it was a target for bioactive substances such as palmitic acid ethyl ester observed as major allelochemical from the extracts. In view of these results, insights into the mechanism of action of different *P. stratiotes* extracts on *M. aeruginosa* were provided by the present study.

Availability of data and materials All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its supplementary information files).

Author contribution LA conceived the study, designed the study, and helped to draft the manuscript. B-OMC, BJL, C-AMK, and CMA carried out the growth studies and drafted the manuscript. SRMG and SLP participated in the design of the study. GFO and MGF performed the statistical analysis and translate the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP process No. 2016/01287-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq process No. 310079/2015-2).

Declarations

Ethics approval and consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Alamsjah MA, Hirao S, Ishibashi F, Oda T, Fujita Y (2007) Algicidal activity of polyunsaturated fatty acids derived from *Ulva fasciata* and *U. pertusa* (Ulvaceae, Chlorophyta) on phytoplankton. *J Appl Phycol* 20:713–720. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9257-5>
- Aliotta G, Monaco P, Pinto G, Pollio A, Previtera L (1991) Potential allelochemicals from *Pistia stratiotes* L. *J Chem Ecol* 17:2223–2234. <https://doi.org/10.1007/BF00988003>
- Bártova K, Hilscherova K, Babica P, Marsálek B, Bláha L (2011) Effects of microcystin and complex cyanobacterial samples on the growth and oxidative stress parameters in green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and comparison with the model oxidative stressor - herbicide paraquat. *Environ Toxicol* 26:641–648. <https://doi.org/10.1002/tox.20601>
- Bauer N, Blaschke U, Beutler E, Gross EM, Jenett-Siems K, Siems K, Hilt S (2009) Seasonal and interannual dynamics of polyphenols in *Myriophyllum verticillatum* and their allelopathic activity on *Anabaena variabilis*. *Aquat Bot* 91:110–116. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2009.03.005>
- Bich TTN, Kato-Noguchi H (2012) Allelopathic potential of two aquatic plants, duckweed (*Lemna minor* L.) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.), on terrestrial plant species. *Aquat Bot* 103:30–36. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2012.05.007>
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Briand J-F, Jacquet S, Bernard C, Humbert J-F (2003) Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet Res* 34:361–377. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003019>
- Brooks BW, Lazorchak JM, Howard MDA, Johnson MV, Morton SL, Perkins DAK, Reavie ED, Scott GI, Smith SA, Steevens JA (2016) Are harmful algal blooms becoming the greatest inland water quality threat to public health and aquatic ecosystems? *Environ Toxicol Chem* 35:6–13. <https://doi.org/10.1002/etc.3220>
- Chen J, Pan G (2012) Harmful algal blooms mitigation using clay/soil/sand modified with xanthan and calcium hydroxide. *J Appl Phycol* 24:1183–1189. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9751-7>
- Chia MA, Chindirim PK, Japhet WS (2015a) Lead induced antioxidant response and phenotypic plasticity of *Scenedesmus quadricauda*

- (Turp.) de Brebisson under different nitrogen conditions. J Appl Phycol 27:293–302. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0312-8>
- Chia MA, Cordeiro-Araújo MK, Bittencourt-Oliveira MC (2015b) Growth and antioxidant response of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) exposed to anatoxin-a. Harmful Algae 49:135–146. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.09.006>
- Cordeiro-Araújo MK, Chia MA, Bittencourt-Oliveira MC (2017) Potential human health risk assessment of cylindrospermopsin accumulation and depuration in lettuce and arugula. Harmful Algae 68:217–223. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.08.010>
- Czarnota MA, Paul RN, Dayan FE, Nimbal CI, Weston LA (2001) Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: a potent PS II inhibitor in *Sorghum* spp. root exudates. Weed Technol 15:813–825. [https://doi.org/10.1614/0890-037X\(2001\)015\[0813:MOALOP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0890-037X(2001)015[0813:MOALOP]2.0.CO;2)
- Demiral T, Türkan I (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Environ Exp Bot 53:247–257. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.03.017>
- Drábková M, Matthijs HCP, Admiraal W, Maršálek B (2007) Selective effects of H₂O₂ on cyanobacterial photosynthesis. Photosynthetica 45:363–369. <https://doi.org/10.1007/s11099-007-0062-9>
- Drobac D, Tokodi N, Simeunović J, Baltić V, Stanić D, Svirčev Z (2013) Human exposure to cyanotoxins and their effects on health. Arh Hig Rada Toksikol 64:305–316. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2320>
- Dummernuth AL, Karsten U, Fisch KM, König GM, Wiencke C (2003) Responses of marine macroalgae to hydrogen-peroxide stress. J Exp Mar Biol Ecol 289:103–121. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00042-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00042-X)
- El-Shehawry R, Gorokhova E, Fernández-Piñás F, Del Campo FF (2012) Global warming and hepatotoxin production by cyanobacteria: what can we learn from experiments? Water Res 46:1420–1429. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.021>
- Falconer IR (2008) Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins. In: Hudnell KH (ed) Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer, New York, pp 607–612. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_27
- Folin O, Ciocalteu V (1927) Tyrosine and tryptophan determination in protein. J Biol Chem 73:627–650
- Gross EM (2009) Allelochemical reactions. In: Likens GE (ed) Encyclopedia of inland waters. Academic Press, Cambridge, pp 715–726. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12370626-3.00106-X>
- Ha M-H, Pflugmacher S (2013a) Phytotoxic effects of the cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a: morphological, physiological and biochemical responses in aquatic macrophyte, *Ceratophyllum demersum*. Toxicon 70:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.021>
- Ha M-H, Pflugmacher S (2013b) Time-dependent alterations in growth, photosynthetic pigments and enzymatic defense systems of submerged *Ceratophyllum demersum* during exposure to the cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a. Aquat Toxicol 138:139:26–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.04.007>
- Hassan HM, Scandalios JG (1990) Superoxide dismutases in aerobic organisms. In: Alscher RG, Cumming JR Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms. Wiley-Liss, New York 175–199
- Heng L, Jun N, Wen-jie H, Guibai L (2009) Algae removal by ultrasonic irradiation-coagulation. Desalination 239:191–197. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.12.035>
- Hong Y, Hu H-Y (2009) Research and application of aquatic plant allelopathy inhibition on algae. Chin Sci Bull 54:287–293
- Hong Y, Hu H-Y, Li F-M (2008) Physiological and biochemical effects of allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) on cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Ecotox Environ Safe 71:527–534. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.10.010>
- Hong Y, Hu H-Y, Xie X, Sakoda A, Sagehashi M, Li F-M (2009) Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Aquat Toxicol 91:262–269. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.11.014>
- Hou X, Huang J, Tang J, Wang N, Zhang L, Gu L, Sun Y, Yang Z, Huang Y (2019) Allelopathic inhibition of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) on the growth and physiological performance in *Microcystis aeruginosa*. J Environ Manag 232:382–386. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.105>
- Ivanova EP, Nguyen SH, Guo Y, Baulin VA, Webb HK, Truong VK, Wandiyanto JV, Garvey CJ, Mahon PJ, Mainwaring DE, Crawford RJ (2017) Bactericidal activity of self-assembled palmitic and stearic fatty acid crystals on highly ordered pyrolytic graphite. Acta Biomater 59:148–157. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.07.004>
- Jana S, Choudhuri MA (1982) Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. Aquat Bot 12:345–354. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(82\)90026-2](https://doi.org/10.1016/0304-3770(82)90026-2)
- Jha M, Sharma V, Ganesh N (2012) Antioxidant and wound healing potential of *Pistia stratiotes* L. Asian Pac J Trop Dis 2:S579–S584. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60225-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60225-4)
- Johansson LH, Borg LAH (1988) A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. Anal Biochem 174:331–336. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90554-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90554-4)
- Kaebnick M, Neilan BA (2001) Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. FEMS Microbiol Ecol 35:1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00782.x>
- Kong CH, Wang P, Zhang CX, Zhang MX, Hu F (2006) Herbicidal potential of allelochemicals from *Lantana camara* against *Eichhornia crassipes* and the alga *Microcystis aeruginosa*. Weed Res 46:290–295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2006.00509.x>
- Kotopoulos S, Schommartz A, Postema M (2009) Sonic cracking of blue-green algae. Appl Acoust 70:1306–1312. <https://doi.org/10.1016/j.apacoust.2009.02.003>
- Larkum AWD, Douglas S, Raven JA (2003) Photosynthesis in algae. In: Sharkey TD, Eaton-Rye JJ (eds) Advances in photosynthesis and respiration. Springer, vol 14. Dordrecht, Netherlands, pp 1–480. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1038-2>
- Li F-M, Hu H-Y (2004) Isolation and effects on green alga *Chlorella pyrenoidosa* of algal-inhibiting allelochemicals in the macrophyte, *Phragmites communis* Tris. J Environ Sci (China) 25:89–92
- Li D, Zhang H, Fu L, An X, Zhang B, Li Y, Chen Z, Zheng W, Yi L, Zheng T (2014) A novel algicide: evidence of the effect of a fatty acid compound from the marine bacterium, *Vibrio* sp. BS02 on the Harmful Dinoflagellate, *Alexandrium tamarense*. PLoS One 9: e91201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091201>
- Li J, Liu Y, Zhang P, Zeng G, Cai X, Liu S, Yin Y, Hu X, Hu X, Tan X (2016) Growth inhibition and oxidative damage of *Microcystis aeruginosa* induced by crude extract of *Sagittaria trifolia* tubers. J Environ Sci (China) 43:40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.08.020>
- Li B, Yin Y, Kang L, Feng L, Liu Y, Du Z, Tian Y, Zhang L (2020) A review: application of allelochemicals in water ecological restoration-algal inhibition. Chemosphere 128869:128869. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128869>
- Lozano P, Trombini C, Crespo E, Blasco J, Moreno-Garrido I (2014) ROI-scavenging enzyme activities as toxicity biomarkers in three species of marine microalgae exposed to model contaminants (copper, Irgarol and atrazine). Ecotox Environ Saf 104:294–301. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.021>
- Madhava Rao KV, Sresty TVS (2000) Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. Plant Sci 157:113–128. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00273-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00273-9)

- Mauch F, Dudler R (1993) Differential induction of distinct glutathione-S-transferase of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol* 102:1193–1201. <https://doi.org/10.1104/pp.102.4.1193>
- Mecina GF, Chia MA, Cordeiro-Araújo MK, Bittencourt-Oliveira MC, Varela RM, Torres A, Molinillo JMG, Macías FA, Silva RMG (2019) Effect of flavonoids isolated from *Tridax procumbens* on the growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Aquat Toxicol* 211:81–91. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.011>
- Meng P, Pei H, Hu W, Liu Z, Li X, Xu H (2015) Allelopathic effects of *Ailanthus altissima* extracts on *Microcystis aeruginosa* growth, physiological changes and microcystins release. *Chemosphere* 141:219–226. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.057>
- Merel S, Walker D, Chicana R, Snyder S, Baures E, Thomas O (2013) State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ Int* 59:303–327. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>
- Mikula P, Zezulka S, Jancula D, Marsalek B (2012) Metabolic activity and membrane integrity changes in *Microcystis aeruginosa* – new findings on hydrogen peroxide toxicity in cyanobacteria. *Eur J Phycol* 47:195–206. <https://doi.org/10.1080/09670262.2012.687144>
- Mishra NP, Mishra RK, Singhal GS (1993) Changes in the activities of anti-oxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiol* 102:903–910. <https://doi.org/10.1104/pp.102.3.903>
- Misra HP, Fridovich I (1972) The generation of superoxide radical autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 247:6960–6962
- Mohamed ZA (2017) Macrophytes-cyanobacteria allelopathic interactions and their implications for water resources management - a review. *Limnologia* 63:122–132. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.02.006>
- Monchamp ME, Spaak P, Domaizon I, Dubois N, Bouffard D, Pomati F (2018) Homogenization of lake cyanobacterial communities over a century of climate change and eutrophication. *Nature Ecol Evol* 2:317–324. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.105>
- Murphy CD, Moore RM, White RL (2000) Peroxidases from marine microalgae. *J Appl Phycol* 12:507–513. <https://doi.org/10.1023/A:1008154231462>
- Nguyen QV, Tran TH, Pham TN, Thuoc DV, Cao VD, Boo K-H (2019) Inhibitory effects of *Bidens pilosa* plant extracts on the growth of the bloom-forming alga *Microcystis aeruginosa*. *Water Air Soil Pollut* 230:24. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4077-1>
- Noyma NP, de Magalhães L, Furtado LL, Mucci M, van Oosterhout F, Huszar VLM, Marinho MM, Lüring M (2016) Controlling cyanobacterial blooms through effective flocculation and sedimentation with combined use of flocculants and phosphorus adsorbing natural soil and modified clay. *Water Res* 97:26–38. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.057>
- O’Neil JM, Davis TW, Burford MA, Gobler CJ (2012) The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14:313–334. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027>
- Ou H, Gao N, Deng Y, Qiao J, Wang H (2012) Immediate and long-term impacts of UV-C irradiation on photosynthetic capacity, survival and microcystin-LR release risk of *Microcystis aeruginosa*. *Water Res* 46:1241–1250. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.025>
- Petr T (2000) Interactions between fish and aquatic macrophytes in inland waters. A review, FAO Fishers Technical Paper, Rome, Italy
- Pott VJ, Pott A (2000) Plantas Aquáticas do Pantanal, Embrapa: Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Corumbá, Brazil
- Qureshi MI, Qadir S, Zolla L (2007) Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *J Plant Physiol* 164:1239–1260. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.01.013>
- Reddy JK, Suga T, Mannaerts GP, Lazarow PB, Subramani S (1995) Peroxisomes: biology and role in toxicology and disease. *Ann N Y Acad Sci*, New York, USA
- Silva AA, Gonçalves RC (2010) Reactive oxygen species and the respiratory tract diseases of large animals. *Ciênc Rural* 40:994–1002. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000037>
- Sinang SC, Daud N, Kamaruddin N, Poh KB (2019) Potential growth inhibition of freshwater algae by herbaceous plant extracts. *Acta Ecol Sin* 39:229–233. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.12.005>
- Street M (1978) Research on the improvement of gravel pits for water-fowl by adding straw. *Game Conserv Annu Rev* 10:56–61
- Sun R, Sun PF, Zhang JH, Esquivel-Elizondo S, Wu Y (2017) Microorganisms-based methods for harmful algal blooms control: a review. *Bioresour Technol* 248(Part B):12–20. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.175>
- Terry PJ (1981) Weeds and their control in the Gambia. *Trop Pest Manag* 27:44–52. <https://doi.org/10.1080/09670878109414171>
- Thomaz SM, Bini LM, Souza MC, Kita KK, Camargo AFM (1999) Aquatic macrophytes of Itaipu Reservoir, Brazil: survey of species and ecological considerations. *Braz Arch Biol Technol* 42:15–22. <https://doi.org/10.1590/S1516-89131999000100003>
- Torres MA, Barros MP, Campos SCG, Pinto E, Rajamani S, Sayre RT, Colepicolo P (2008) Biochemical markers in algae and marine pollution: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 71:1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.009>
- Tyagi T, Agarwal M (2017a) GC-MS analysis of invasive aquatic weed, *Pistia stratiotes* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *Int J Curr Pharm Res* 9:111–117. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2017.v9i3.19970>
- Tyagi T, Agarwal M (2017b) Phytochemical screening and GC-MS analysis of bioactive constituents in the ethanolic extract of *Pistia stratiotes* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms. *J Pharmacogn Phytochem* 6:195–206
- Vestena S, Cambraia J, Ribeiro C, Oliveira JA, Oliva MA (2011) Cadmium-induced oxidative stress and antioxidant enzyme response in water Hyacinth and Salvinia. *Braz J Plant Physiol* 23:131–139. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202011000200005>
- Wang J, Zhu J, Liu S, Liu B, Gao Y (2011) Generation of reactive oxygen species in cyanobacteria and green algae induced by allelochemicals of submerged macrophytes. *Chemosphere* 85:977–982. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.076>
- Wang B, Song Q, Long J, Song G, Mi W, Bi Y (2019) Optimization method for *Microcystis* bloom mitigation by hydrogen peroxide and its stimulative effects on growth of chlorophytes. *Chemosphere* 228:503–512. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.138>
- Wu Y, Kerr PG, Hu Z, Yang L (2010) Removal of cyanobacterial bloom from a biopond-wetland system and the associated response of zoobenthic diversity. *Bioresour Technol* 101:3903–3908. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.144>
- Wu X, Wu H, Chen J, Ye J (2013) Effects of allelochemical extracted from water lettuce (*Pistia stratiotes* Linn.) on the growth, microcystin production and release of *Microcystis aeruginosa*. *Environ Sci Pollut Res Int* 20:8192–8201. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1783-x>
- Wu X, Wu H, Ye J, Zhong B (2015) Study on the release routes of allelochemicals from *Pistia stratiotes* Linn., and its anti-cyanobacteria mechanisms on *Microcystis aeruginosa*. *Environ Sci Pollut Res* 22:18994–19001. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5104-4>
- Yan R, Wu Y, Ji H, Fang Y, Kerr PG, Yang L (2011) The decoction of *Radix Astragal* inhibits the growth of *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:1006–1010. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.01.014>
- Yu JQ, Matsui Y (1997) Effects of root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals on ion uptake by cucumber seedlings. *J*

- Chem Ecol 23:817–827. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006413.98507.55>
- Yu JQ, Ye SF, Zhang MF, Hu WH (2003) Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. Biochem Syst Ecol 31:129–139. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00150-3](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00150-3)
- Zhang FQ, Wang YS, Lou ZP, Dong JD (2007) Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*). Chemosphere 67:44–50. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.007>
- Zhang T-T, Zheng C-Y, Hu W, Xu W-W, Wang H-F (2010) The allelopathy and allelopathic mechanism of phenolic acids on toxic *Microcystis aeruginosa*. J Appl Phycol 22:71–77. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9429-6>
- Zhang C, Yi Y-L, Hao K, Liu G-L, Wang G-X (2013) Algicidal activity of *Salvia miltiorrhiza* Bung on *Microcystis aeruginosa*—towards identification of algicidal substance and determination of inhibition mechanism. Chemosphere 93:997–1004. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.068>
- Zhao P, Liu S, Huang W, He L, Li J, Zhou J, Zhou J (2020) Influence of eugenol on algal growth, cell physiology of cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and its interaction with signalling molecules. Chemosphere 255:126935. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126935>
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 64:555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zhou S, Yin H, Tang S, Peng H, Yin D, Yang Y, Liu Z, Dang Z (2016) Physiological responses of *Microcystis aeruginosa* against the algicidal bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. Ecotoxicol Environ Saf 127:214–221. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.001>
- Zhu X, Dao G, Tao Y, Zhan X, Hu H (2021) A review on control of harmful algal blooms by plant-derived allelochemicals. J Hazard Mater 401:123403. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123403>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

CAPÍTULO 3
(short communication)

CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E ATIVIDADE ALGICIDA DE FRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Pistia stratiotes*

RESUMO

Aleloquímicos em extratos brutos de *Pistia stratiotes* Linn. apresentam efeito inibitório sobre a cianobactéria nociva *Microcystis aeruginosa*. Para determinar os aleloquímicos inibitórios, o extrato etanólico bruto foi fracionado e as frações testadas quanto à inibição do crescimento e respostas fisiológicas de *M. aeruginosa* (Kützinger) Kützinger em condições laboratoriais. Este estudo ainda avaliou fitoquimicamente a fração mais ativa nos bioensaios com a cianobactéria, além de avaliar a atividade citotóxica e genotóxica da água resultante dos bioensaios por meio do teste de *Allium cepa*. A fração metanólica apresentou 83% de inibição da densidade celular na concentração de 50 mg/L. Foi possível observar aumento de espécies reativas de oxigênio e de peroxidação lipídica, além do aumento na atividade das enzimas do metabolismo de defesa antioxidante da cianobactéria. Ocorreram reduções nos níveis de proteínas totais e da enzima superóxido dismutase na cianobactéria, sendo esta última um possível mecanismo de ação para substância(s) bioativa(s) de *P. stratiotes*. Todos estes efeitos podem estar associados ao conteúdo polifenólico encontrado na fração avaliada. Assim, novos estudos serão realizados a fim de melhor elucidar estes aleloquímicos.

Palavras-chaves: Aleloquímicos; Alfaca d'água; *Allium cepa*; Cianobactérias; Densidade celular Estresse oxidativo.

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Pistia stratiotes* L., conhecida popularmente como alface d'água, é uma planta aquática flutuante, amplamente distribuída por todo o mundo (CARDOSO *et al.*, 2005). *P. stratiotes* apresenta porte herbáceo, caule, estolonífera, com propagação sexuada e assexuada por meio de seus estolões. Possui folhas sésseis, esponjosas, espatuladas, obtusas e densamente pubescentes, dispostas em rosetas, coloração verde, com inflorescência composta por espádice cercada por uma espata pilosa (COELHO *et al.*, 2005). Esta espécie é responsável pela formação de densos tapetes de plantas sobre a superfície aquática, sendo considerada como uma espécie daninha, afetando o aproveitamento econômico dos sistemas aquáticos (COELHO *et al.*, 2005). Esta macrófita tem sido utilizada para a remoção de mercúrio de efluentes de mineração, por acumular o metal em suas raízes, melhorando a qualidade dos sistemas aquáticos. Adicionalmente, tem sido empregada no tratamento de esgoto urbano, demonstrando seu potencial de utilização na fitorremediação (LIN e LI, 2016). Pesquisas também demonstraram que *P. stratiotes* apresenta efeitos alelopáticos, podendo interferir e controlar o crescimento de microrganismos como as cianobactérias, sendo o extrato etanólico da planta a forma mais eficiente para esse efeito (LOURENÇÃO *et al.*, 2021). Diante disso, a utilização de aleloquímicos de plantas aquáticas para inibir o crescimento excessivo de cianobactérias nocivas torna-se uma abordagem sustentável e ecológica, devido a sua baixa toxicidade, alta seletividade e excelente degradabilidade (WANG *et al.*, 2018).

2 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo, fracionar o extrato etanólico de *P. stratiotes*, identificando e caracterizando a fração com maior atividade algicida sobre a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*. Complementarmente, avaliou-se a citotoxicidade e genotoxicidade em *Allium cepa* da água resultante dos bioensaios com a fração com atividade algicida.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARO DOS EXTRATOS

A macrófita aquática *P. stratiotes* foi coletada na cidade de Assis - SP, em uma lagoa pública, sem causar impacto na população de plantas (22°44'59,40 "S e 50°31'40,40"W) entre os me-

ses de maio e julho de 2017. O exemplar da espécie foi depositado no Herbário Assisense, identificado através do voucher HASSI-1038. As plantas inteiras foram lavadas e secas em estufa com circulação de ar a 40°C. As folhas secas foram então trituradas para produzir um pó fino. A gordura do pó resultante foi removida com hexano em uma garrafa de vidro tampada, que foi submetida a ultrassom por 30 minutos, em seguida, filtrado 3 vezes. A extração com etanol por percolação foi realizada de acordo com Prista *et al.* (1995). Para a retirada do solvente extrator, o extrato resultante foi filtrado sob vácuo e concentrado em evaporador rotativo. O extrato seco foi então mantido em frasco âmbar à temperatura ambiente até sua utilização.

3.2 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS EM SÍLICA C18

O extrato bruto etanólico de *P. stratiotes* foi submetido a fracionamento, pois de acordo com Lourenção *et al.* (2021), este apresentava a maior atividade inibitória sobre o crescimento da cepa de *M. aeruginosa* (cepa BCCUSP232). Desta forma, uma coluna cromatográfica foi ajustada com cerca de 75% sílica (40-63 µm) e 25% da mesma sílica incorporado com 2,0 g de extrato. Em seguida, o extrato foi eluído com misturas de Água/Metanol em polaridade decrescente, realizando as separações em fase reversa na seguinte sequência: Água destilada, Água destilada: Metanol (80:20), Água destilada: Metanol (60:40), Água destilada: Metanol (40:60), Água destilada: Metanol (20:80) e Metanol. As trocas de solventes eram realizadas sempre que a fração permanecia sem evidência de separação, desta forma, o fracionamento do extrato resultou em 6 frações identificadas de F1 a F6. As frações filtradas foram concentradas em um evaporador rotativo a 40±2°C, armazenadas em frasco âmbar a temperatura ambiente e então submetidas aos bioensaios nas concentrações de 25 e 50 mg/L.

3.3 BIOENSAIOS COM *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232

A atividade de inibição de algas de cada fração do extrato etanólico foi examinada pela adição de 25 e 50 mg/L da fração diluída a um Erlenmeyers de 1000 mL contendo a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (cepa BCCUSP232) em 700 mL de meio ASM-1 (GORHAM *et al.* 1964). Nenhuma fração foi adicionado ao frasco do grupo controle. Os tratamentos foram avaliados em triplicada, ou seja, para cada fração do extrato etanólico e controle negativo. Todos os frascos foram mantidos em meio de cultivo ASM-1, pH 7,4, em condições ambientais controladas (intensidade de luz: 40 mmol m/s, mensurada com um Quantômetro LI-COR, modelo LI-250, equipado com um sensor esférico sub-aquático; fotoperíodo: 14:10 h, claro:escuro, e temperatura: 24 ± 1°C).

Os frascos foram agitados manualmente duas vezes ao dia. Para cada frasco, amostras de 40 mL foram retiradas a cada 2 dias do 2º ao 6º dia de exposição da cianobactéria às frações, para determinação da densidade celular, peroxidação lipídica, espécies reativas de oxigênio (H_2O_2), proteínas totais e atividade enzimática do metabolismo antioxidante.

Todos os experimentos iniciaram com a densidade de $2,3 \times 10^5$ células/mL de *M. aeruginosa* obtida a partir da mesma cultura em fase de crescimento exponencial, e os bioensaios foram realizados durante 10 dias, sendo 4 dias para o crescimento da cianobactéria após o inóculo, e 6 dias de exposição às frações. Na fase de crescimento exponencial (4 dias após o inóculo) das culturas experimentais, foram coletadas amostras para a determinação da densidade celular antes da adição dos extratos, a fim de confirmar o estágio de crescimento da cepa.

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

3.4 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DAS FRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DE *P. stratiotes* EM *M. aeruginosa* BCCUSP 232

3.4.1 Extrações bioquímicas

A biomassa obtida a partir do *pellet* formado pela centrifugação de 40 mL a 10000 rpm e 0°C das coletas de cultura de *M. aeruginosa*, foi homogenizadas em tampão de fosfato 0,1 mol (pH 6,5) contendo 1% (w/v) de polivinilpirrolidona (PVP), e posteriormente centrifugadas a 15000 rpm e 0°C durante 10 min, sendo o sobrenadante obtido armazenado em criotubos a -20°C.

3.4.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada estimando-se o teor de malondialdeído (MDA), seguindo o método de Madhava Rao e Sresty (2000).

3.4.3 Espécies reativas de oxigênio: formação do peróxido de hidrogênio intracelular (H₂O₂)

O método de Jana e Choudhuri (1982) foi utilizado para medir a formação interna de H₂O₂ pela *M. aeruginosa*, por meio da formação de peróxido de titânio lido em espectrofotômetro a 410 nm.

3.4.4 Determinação de proteínas totais e atividade das enzimas do metabolismo de defesa antioxidante de *M. aeruginosa* BCCUSP 232

A extração obtida no item 3.4.1 foi utilizada para a medição de proteínas totais e os ensaios de atividade das enzimas antioxidantes.

A concentração total de proteínas foi determinada de acordo com Bradford (1976) e expressa em µg/mL, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A atividade da catalase (CAT) foi determinada a 550 nm com base na sua função peroxidativa de acordo com Johansson e Borg (1988). A Atividade da peroxidase (POD) foi determinada a 430 nm por meio das mudanças na absorbância durante um minuto (REDDY *et al.*, 1996). O ensaio da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi conduzido a 600 nm de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972). O doseamento da atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi realizada utilizando o modelo de substrato padrão dinitrobenzeno 1-cloro-2,4- (CDNB) de acordo com Mauch e Dudler (1993).

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS DA FRAÇÃO MAIS ATIVA

A quantificação de fenóis e flavonoides da fração mais ativa nos bioensaios foi realizada pela diluição da mesma em etanol nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 250, 500, 1.000, 3.000, 5.000 e 10.000 µg/mL. Para a determinação do teor de fenóis totais foi utilizado o método de Singleton e Rossi (1965), enquanto a quantificação dos flavonoides totais da fração mais ativa foi determinada com base no método descrito por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999).

3.6 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAIZ DE *Allium cepa*

Após o último dia do bioensaio (6º dia) com a fração mais ativa do extrato etanólico de *P. stratiotes* sobre *M. aeruginosa* BCCUSP232, 40 mL dos bioensaios foram separados e utilizada para o teste em *Allium cepa*, de acordo com procedimento descrito por Fiskesjö (1985).

Foram utilizadas cinco raízes por parcela, contando 5000 células/tratamento em microscópio óptico. Os efeitos citotóxicos da água residual foram determinados pela análise do índice mitótico (n° total de células em divisão/ n° total de células analisadas x 100) e índice de morte celular (n° total de células em morte/ n° total de células analisadas x 100). As aberrações cromossômicas também foram determinadas (anáfase e telófase aberrantes), e suas frequências utilizadas para determinar o índice de alterações cromossômicas (n° total de células alteradas/ n° total de células analisadas x 100). Já a determinação da frequência de células micronucleadas foi utilizada para determinar os efeitos mutagênicos, por meio da análise do índice de mutagenicidade (n° de células com micronúcleo e quebras/ n° total de células analisadas x 100).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos nos testes acima descritos foram submetidos a análise estatística por meio de testes de normalidade (Shapiro-Wilks) e homogeneidade (Levene). Para identificar as diferenças entre os tratamentos e os grupos controles, os dados foram analisados por meio de testes paramétricos (ANOVA e Tukey; $\alpha=0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito das frações de *P. stratiotes* no crescimento de *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232

O fracionamento do extrato etanólico de *P. stratiotes* resultou em 6 frações identificadas de F1 a F6. As frações obtidas foram então utilizadas em novos bioensaios nas concentrações de 25 e 50 mg/L.

De maneira a melhor comparar as inibições observadas, e verificar as frações de maior efetividade na redução do número de células, as taxas de inibição (Tabela 1) foram calculadas a partir das diferentes concentrações utilizadas.

Por meio dos dados obtidos na Tabela 1, foi possível observar que a exposição às frações do extrato etanólico de *P. stratiotes*, determinou maiores inibições nas concentrações da fração 6 (25 e 50 mg/L) com valores de 61,4 ($\pm 3,2$)% e 82,9 ($\pm 6,4$)%, respectivamente.

Devido a estes resultados, a fração metanólica (F6) foi selecionada e utilizada no restante das análises, a fim de elucidar os seus mecanismos de ação sobre a cepa de *M. aeruginosa*.

Tabela 1 - Taxas de inibição celular média para *M. aeruginosa* exposta às frações de extrato etanólico de *Pistia stratiotes* nas concentrações de 25 e 50 mg/mL.

Amostra teste	Concentração de extrato (mg/L)	N ₀ médio (10 ⁶ células/mL)	N médio (10 ⁶ células/mL)	TI (%)
<i>Pistia stratiotes</i> F1	25	2,95	2,95	0 (±8,8)
	50	2,95	2,85	3,4 (±5,6)
<i>Pistia stratiotes</i> F2	25	2,95	3,15	-6,8 (±7,1)
	50	2,95	2,87	2,8 (±9,6)
<i>Pistia stratiotes</i> F3	25	2,95	2,89	2,3 (±8,8)
	50	2,95	3,12	-5,6 (±8,7)
<i>Pistia stratiotes</i> F4	25	2,95	2,99	-1,1 (±0,8)
	50	2,95	3,00	-1,7 (±4,8)
<i>Pistia stratiotes</i> F5	25	2,95	2,94	0,56 (±4,8)
	50	2,95	2,65	10,1 (±8,7)
<i>Pistia stratiotes</i> F6	25	2,95	1,14	61,4 (±3,2)
	50	2,95	0,51	82,9 (±6,4)

N₀ e N indicam a concentração celular no recipiente controle e no recipiente teste, respectivamente, após 6 dias de experimento, e TI a taxa média (n=3) de inibição calculada (±desvio padrão). Valores negativos representam atividade contrária a inibição.

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

4.2 Peroxidação Lipídica

As alterações no conteúdo de MDA foram usadas como indicador de peroxidação lipídica em *M. aeruginosa* exposta a diferentes concentrações da fração mais ativa no bioensaio. Como apresentado na figura 1, o conteúdo de MDA das células de *M. aeruginosa* expostas à fração de *P. stratiotes* aumentou significativamente ($p < 0,05$) em comparação ao tratamento controle negativo. Esse aumento pôde ser observado já no 2º dia de bioensaio para as duas concentrações da fração metanólica do extrato de *P. stratiotes*. A maior dosagem de MDA ($0,16 \pm 0,01$ mmol/L) foi obtida para a menor concentração utilizada da fração (25 mg/L) no 4º dia de bioensaio.

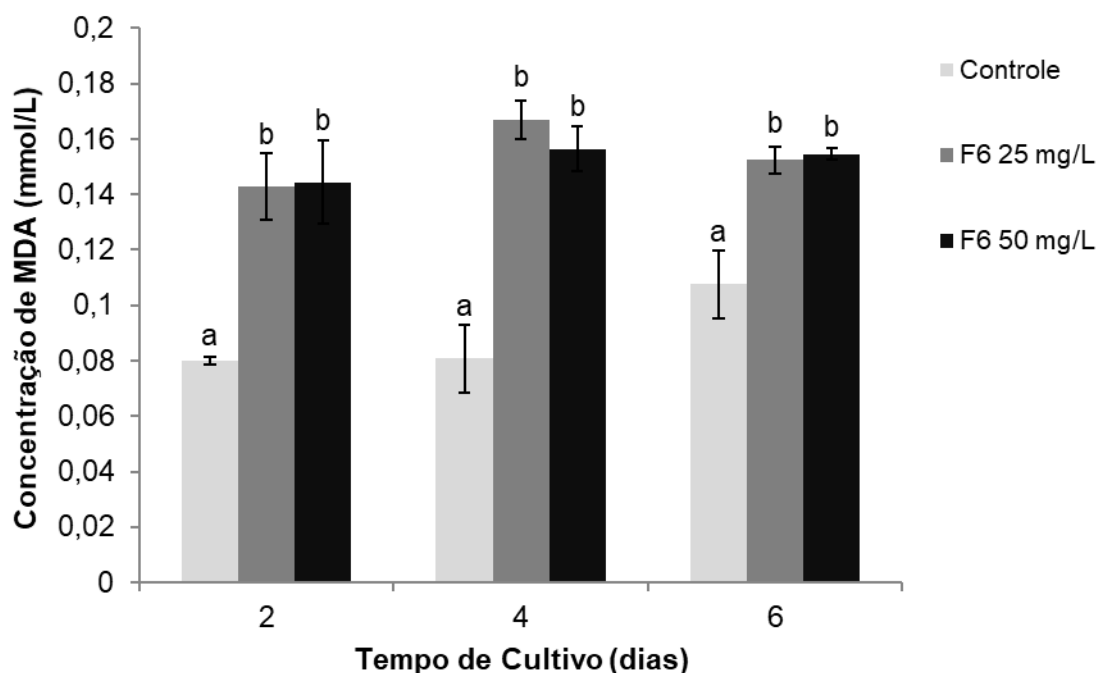


Figura 1 - Efeito da fração metanólica (F6) do extrato etanólico de *P. stratiotes* no conteúdo de Malondialdeído em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a' e 'b' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

4.3 Espécies reativas de oxigênio (ROS): determinação de Peróxido Hidrogênio (H_2O_2) intracelular

Como tendência geral, a concentração de H_2O_2 interno em *Microcystis aeruginosa* aumentou ao longo do tempo na presença da fração mais ativa de *P. stratiotes* (Figura 2). Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na produção de H_2O_2 por *M. aeruginosa* foram registradas a partir do dia 4º dia de exposição, quando a maior concentração de H_2O_2 ($3,51 \pm 0,22 \mu\text{mol/g}$) em *M. aeruginosa* foi observada no 6º dia de exposição à menor concentração utilizada da fração (25 mg/L).

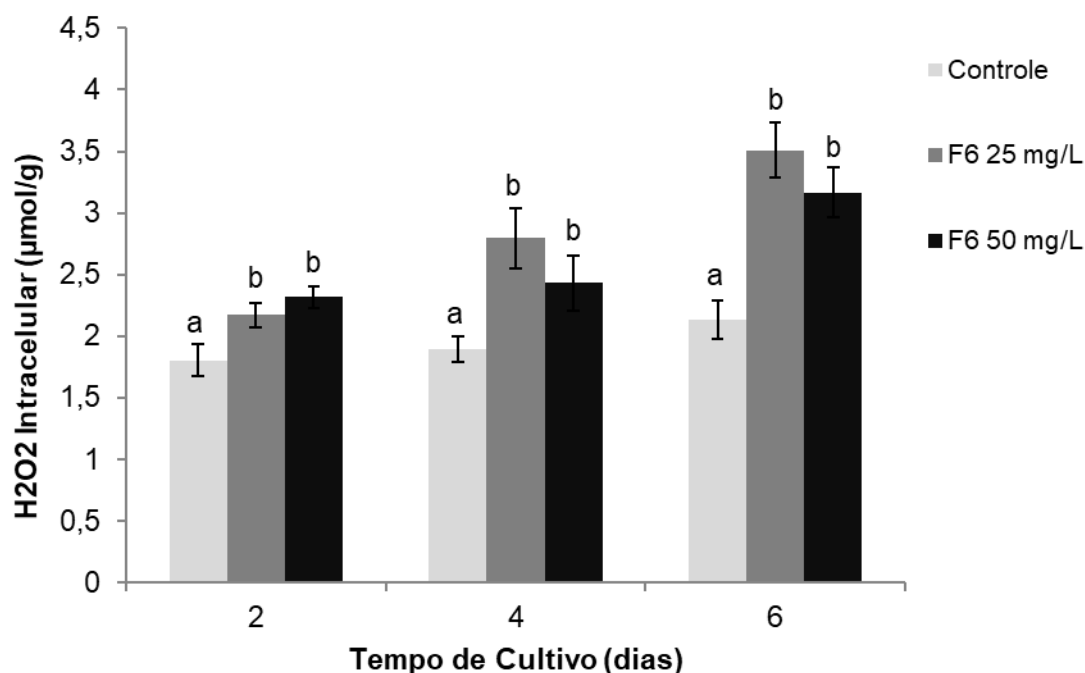


Figura 2 - Efeito da fração metanólica (F6) do extrato etanólico de *P. stratiotes* no conteúdo de H₂O₂ intracelular em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a' e 'b' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

4.4 Proteínas totais e atividade das enzimas antioxidantes

A fração mais ativa (F6) do extrato etanólico de *P. stratiotes* causou declínio no conteúdo total de proteínas de *M. aeruginosa* (Figura 3). Ambas as concentrações da fração metanólica reduziram significativamente ($p < 0,05$) as concentrações totais de proteínas de *M. aeruginosa* ao longo do estudo, quando comparadas com o grupo controle. A maior redução foi observada no 6º dia de exposição à maior concentração utilizada da fração F6 (50 mg/L).

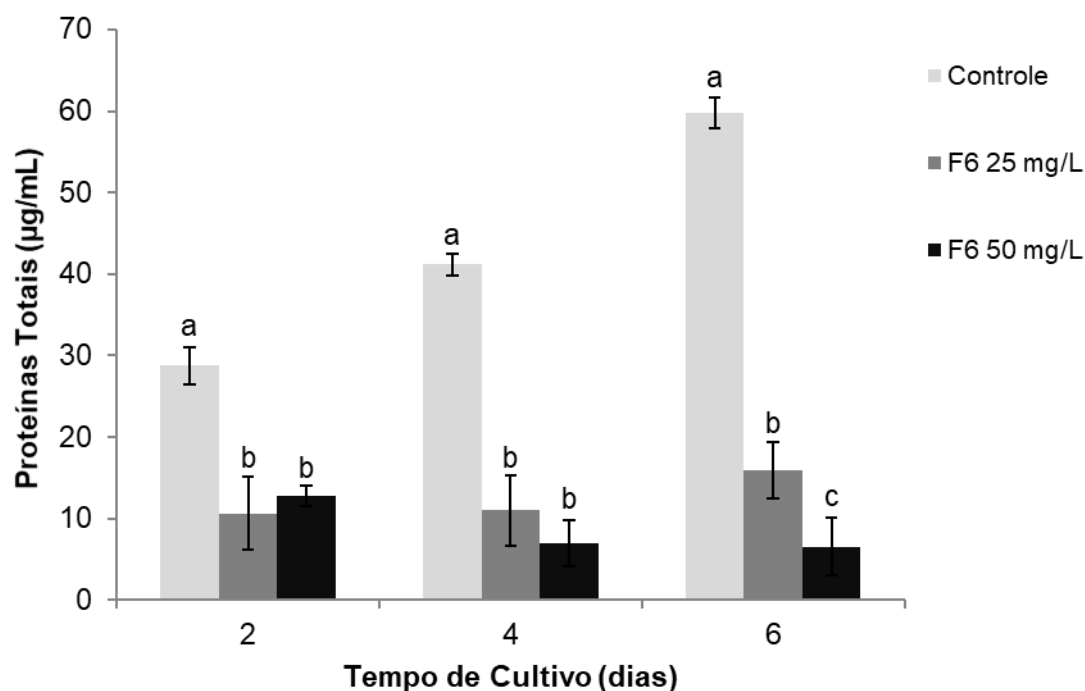


Figura 3 - Efeito da fração metanólica (F6) do extrato etanólico de *P. striatipes* no conteúdo de proteínas totais em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b', 'c', e 'd' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Comparada ao controle, a atividade da catalase de *M. aeruginosa* aumentou significativamente ($p < 0,05$) na presença da fração metanólica ao longo do experimento, para ambas as concentrações utilizadas, desde a primeira dosagem (Figura 4). As maiores atividades da CAT foram verificadas para a menor concentração da fração utilizada (25 mg/L).

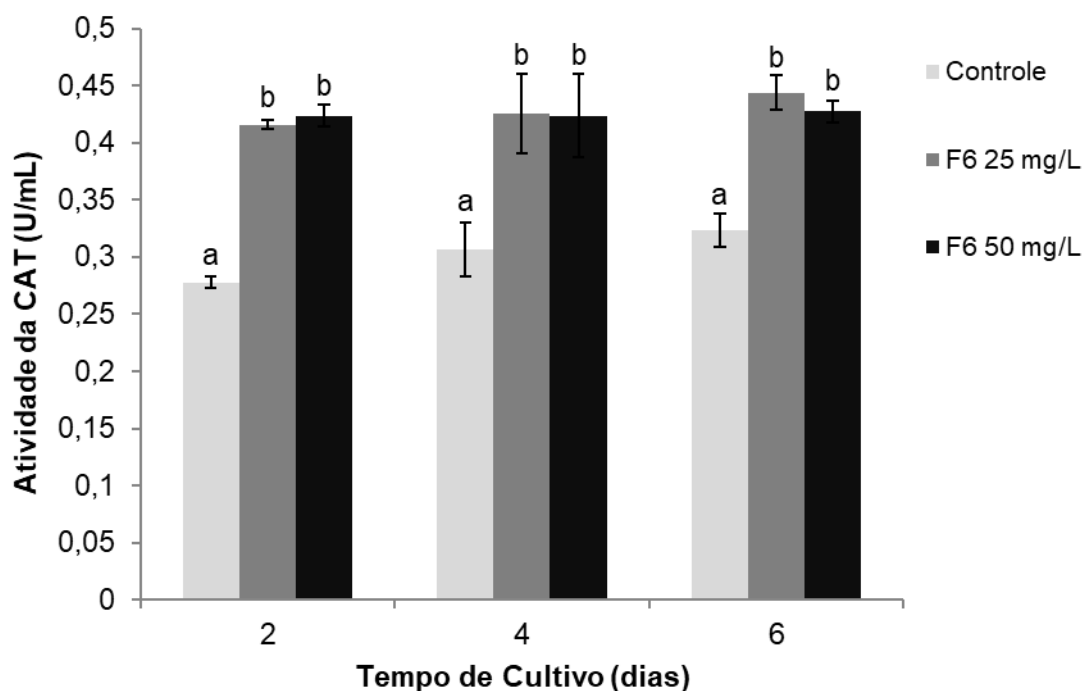


Figura 4 - Efeito da fração metanólica (F6) do extrato etanólico de *P. stratiotes* na atividade da Catalase em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a' e 'b' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Como pode ser observado na Figura 5, a atividade da enzima POD de *M. aeruginosa* aumentou após a exposição a ambas concentrações da fração do extrato etanólico de *P. stratiotes*. O acréscimo na atividade da POD durante todo o bioensaio foi estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). O maior nível de atividade da enzima ($0.03 \pm 0,001$ U/mL) foi obtido para a concentração de 50 mg/L da fração no 2º dia de exposição.

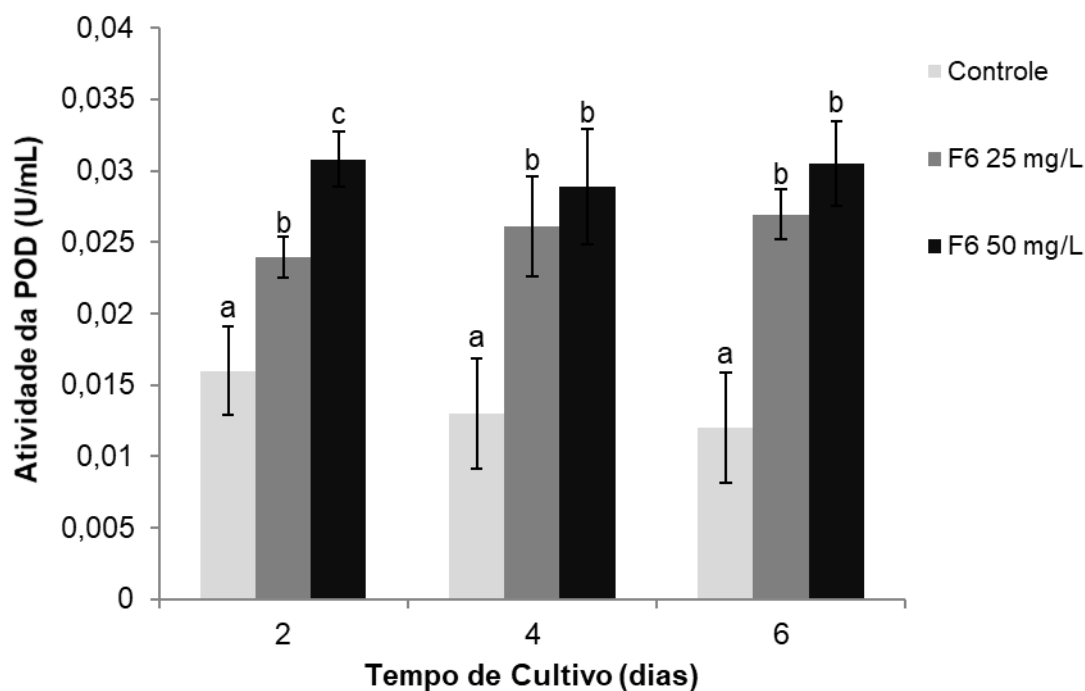


Figura 5 - Efeito da fração metanólica (F6) do extrato etanólico de *P. stratiotes* na atividade da Peroxidase em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a', 'b' e 'c' representam significância em $P < 0,05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Foi significativamente inibida ($p < 0,05$) a atividade da enzima SOD da cianobactéria após exposição a fração metanólica (Figura 6). Essa redução pôde ser observada em todo o período de exposição de *M. aeruginosa* às diferentes concentrações da fração F6 (25 e 50 mg/L).

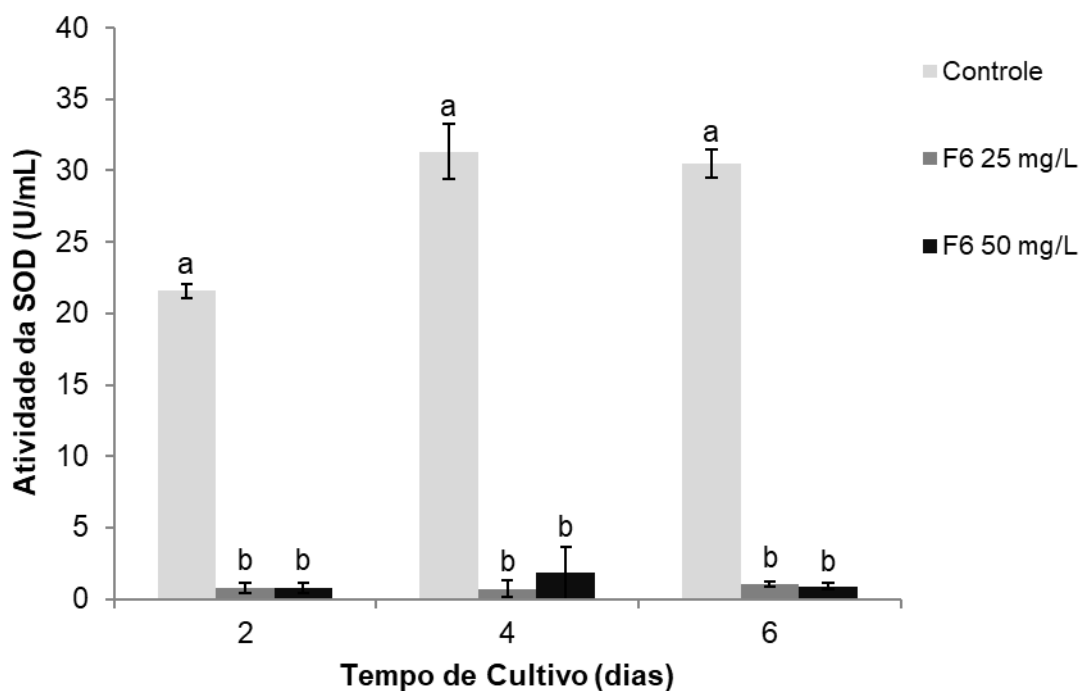


Figura 6 - Efeito da fração metnólica (F6) do extrato etanólico de *P. stratiotes* na atividade da Superóxido dismutase em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a' e 'b' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Na Figura 7, estão apresentados os dados obtidos para a atividade da enzima GST. Durante todo o período do bioensaio, foi possível verificar aumento significativo na atividade da GST de *M. aeruginosa* nas duas concentrações utilizadas da fração, quando comparadas ao grupo controle. Os maiores níveis de atividade da enzima foram obtidos para a concentração de 50 mg/L da fração do extrato etanólico de *P. stratiotes* durante todo o período de bioensaio, mesmo não ocorrendo diferenças estatísticas entre as duas concentrações da fração utilizada.

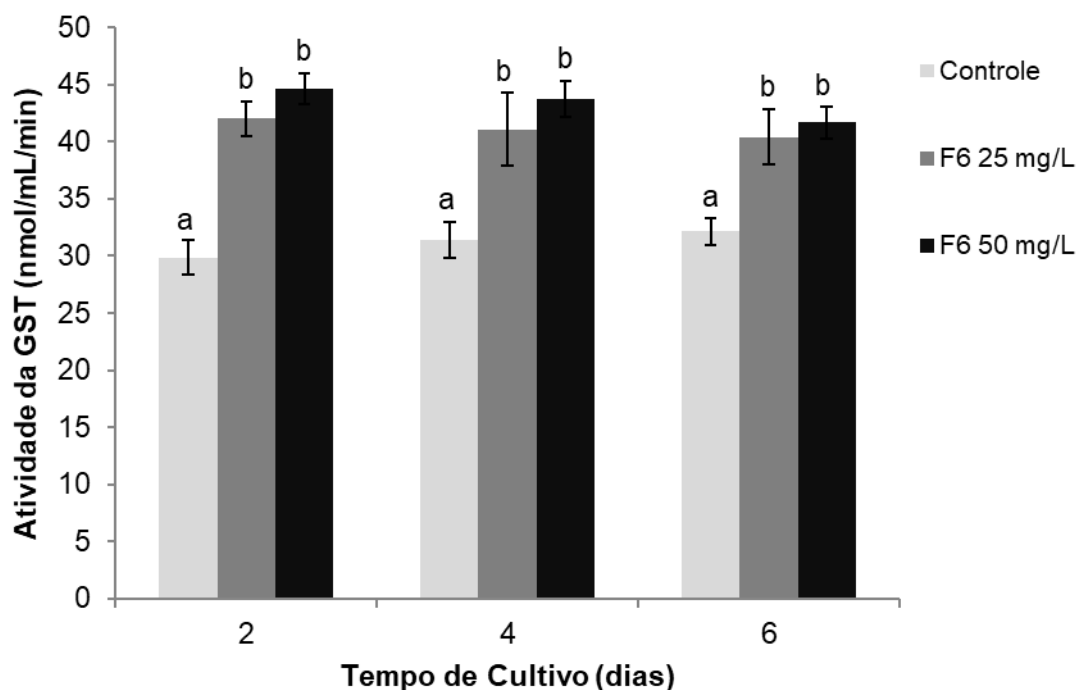


Figura 7 - Efeito da fração metanólica (F6) do extrato etanólico de *P. stratiotes* na atividade da Glutathione S-transferase (GST) em *M. aeruginosa* BCCUSP232. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a' e 'b' representam significância em $P < 0.05$. As barras correspondem ao desvio padrão ($n=3$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

4.5 Determinação de polifenóis e flavonoides totais

Análises fitoquímicas revelaram que a fração mais ativa do extrato etanólico de *P. stratiotes* possuía 170.5 (± 7.1) mg de polifenóis totais GAE g⁻¹ DW e 93.4 (± 4.3) mg RE g⁻¹ DW de flavonoides totais.

4.6 Determinação da citotoxicidade e genotoxicidade em *Allium cepa*

A citotoxicidade e genotoxicidade em células meristemáticas radiculares de *A. cepa*, expostas a água residual dos bioensaios de *M. aeruginosa* tratada com a fração mais ativa de *P. stratiotes*, está apresentada na Tabela 2. Os dados obtidos permitiram observar que o controle do bioensaio e fração de *P. stratiotes* apresentaram aumento significativo nos índices de morte, alterações cromossômicas e mutagenicidade em relação ao controle negativo (água destilada). Em comparação com o controle do bioensaio, a fração utilizada de *P. stratiotes* apresentou redução nos valores médios do índice mitótico, de morte, aberrações cromossômicas e mutagenicidade, porém não diferindo estatisticamente do mesmo.

Tabela 2 - Índice Mitótico, Índice de Morte, Índice de alterações cromossômicas e Índice de mutagenicidade de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* tratadas com água resultante do bioensaio com *M. aeruginosa* utilizando fração ativa do extrato etanólico de *P. stratiotes* em duas concentrações. Controle negativo foi tratado com água destilada e controle do bioensaio tratado com a água resultante do bioensaio sem adição de extrato ou fração (Meio de cultivo + Cianobactéria).

Bioensaio	Índice mitótico	Índice de morte	Índice de alterações cromossômicas	Índice de mutagenicidade
Controle negativo	10.09±1.07a	0.25±0.12a	0.23±0.15a	0.00±0.00a
Controle do bioensaio	11.62±0.70a	2.74±0.49b	1.40±0.68b	1.34±0.31b
F6 <i>P. stratiotes</i> 25 mg/L	10.94±0.76a	2.38±0.39b	1.31±0.28b	1.07±0.23b
F6 <i>P. stratiotes</i> 50 mg/L	10.89±0.75a	2.41±0.55b	1.30±0.39b	1.11±0.22b

F6=Fração metanólica. 5000 células analisadas. Médias±Desvio padrão. Diferenças entre o controle e as diferentes concentrações dos extratos foram determinadas por ANOVA um fator seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os símbolos 'a' e 'b' representam significância em $P<0.05$.

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou as frações do extrato bruto de *P. stratiotes* para determinar uma fração ativa, com atividade alelopática significativa sobre a cultura e crescimento de *M. aeruginosa*. Estudos anteriores realizados por Wu *et al.* (2013), Wu *et al.* (2015) e Lourenção *et al.* (2021), demonstraram que extratos brutos de *P. stratiotes* apresentaram atividade inibitória sobre cianobactérias. Já Mohamed (2017), Zhu *et al.* (2021) e Lourenção *et al.* (2021) demonstraram a presença de diferentes compostos ativos em extratos de *P. stratiotes*, com ação alelopática sobre *M. aeruginosa*, entre eles polifenóis, ácido linoleico, luteolina, ácidos graxos, cetonas esteróides e ácido palmítico, sendo este último o composto majoritário em extrato etanólico da planta.

No presente estudo, foi realizado pela primeira vez o fracionamento do extrato etanólico de *P. stratiotes*, com a finalidade de determinar a fração com maior atividade algicida sobre cultura de *M. aeruginosa*. Após fracionamento, foi determinada uma fração com atividade de 83% de inibição da densidade celular na concentração de 50 mg/L, sendo esta considerada a fração mais ativa. Em seguida, foram avaliados o potencial oxidativo, citotoxicidade e genotoxicidade.

Nas análises do potencial oxidativo foi identificado aumento nos níveis de malonaldeído (MDA) nos grupos tratados com a fração. As membranas celulares das algas são constituídas de fosfolipídios não saturados, que são vulneráveis a espécies reativas de oxigênio (ROS), e o MDA é um produto de decomposição destas membranas, principalmente devido ao dano oxidativo (PAN-CHA *et al.*, 2015). Assim, o aumento do potencial oxidativo causado pelos conteúdos intracelulares de H_2O_2 e MDA, pode ser relacionado aos compostos presentes na fração estudada. Além disso,

Aguiar *et al.* (2007) demonstraram que os compostos polifenólicos são potentes agentes pró-oxidativos e sua atividade pode induzir maior produção de ROS em diferentes células, justificando assim os teores encontrados no presente estudo para esses compostos.

Para células de cianobactérias em condições normais, a produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS) estão em um estado de equilíbrio dinâmico. No entanto, com a exposição aos aleloquímicos, as ROS intracelulares aumentam excessivamente por meio da oxidação direta dos aleloquímicos (LU *et al.*, 2016) ou da geração de $^1\text{O}_2$ e outras ROS (RAMEL *et al.*, 2012).

As respostas antioxidantes à superprodução de ROS intracelulares incluiu a ativação de antioxidantes enzimáticos, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) entre outros, e variação do conteúdo e das taxas de regeneração de antioxidantes não enzimáticos, como a glutathione reduzida (GSH) (HONG *et al.*, 2008, 2009). Uma vez que o nível de ROS excede o limite da capacidade antioxidante, as atividades biofísicas das células das cianobactérias seriam severamente influenciadas e, eventualmente, efeitos de inibição apareceriam. Neste estudo, as moléculas de defesa antioxidante CAT, POD e GST tiveram suas atividades aumentadas diante da exposição à fração estudada, confirmando sua atividade pró-oxidativa.

Os teores de SOD observados no presente estudo, nos tratamentos com a fração mais ativa do extrato etanólico de *P. stratiotes*, apresentaram-se inferiores aos observado no controle, independentemente do tempo de exposição e da concentração de extrato utilizado. Hong *et al.* (2009) e Meng *et al.* (2015) demonstraram que compostos de origem vegetal em alta concentração e, dependendo do tempo de exposição, poderiam enfraquecer ou danificar o sistema de defesa antioxidante inativando a SOD, portanto, colaboram para ação algicida. Desta forma, os resultados sugerem que este pode ser um importante mecanismo de ação dos aleloquímicos de *P. stratiotes* em *M. aeruginosa*, pois de acordo com Zhang *et al.* (2007), o acentuado declínio da atividade SOD pode causar danos às proteínas enzimáticas, devido ao acúmulo de radicais livres e peróxidos livres, resultando na redução no teor de proteínas totais e na inibição do crescimento da cianobactéria, assim com observado neste estudo.

Na avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade, os tratamentos utilizados não apresentaram diferença estatística entre si, porém foi observada tendência de aumento de todos os índices analisados quando comparados ao controle negativo. Carmichael *et al.* (1991) e Laughinghouse IV *et al.* (2012) em seus estudos concluíram que a toxicidade gerada pela exposição a microcistinas está relacionada à hiperplasia, citotoxicidade, alterações cromossômicas e mutagenicidade, que claramente é corroborado pelo presente estudo, uma vez que de acordo com Bittencourt-Oliveira *et al.* (2011) a cepa de *M. aeruginosa* BCCUSP232 é produtora de microcistina-LR. Contudo, os

índices avaliados (morte, alterações cromossômicas e mutagenicidade), apesar de não diferir estatisticamente do controle do bioensaio (meio de cultivo + cianobactéria), apresentaram índices inferiores. Esta diminuição pode estar correlacionada com o tratamento realizado com a fração metanólica sobre a cultura de *M. aeruginosa*, que determinou a redução populacional e diminuição dos metabólitos produzidos pelas algas, o que refletiu diretamente no efeito genotóxico sobre as células de *A. cepa*.

De acordo com Appel (1993) e Yu *et al.* (2003), compostos polifenólicos como os encontrados neste estudo apresentam potencial fitotóxico, pois é sabido que muitas quinonas e fenóis podem afetar a permeabilidade da membrana, causando danos ao DNA, às proteínas, e causando peroxidação lipídica, propiciando até a morte celular, o que poderia culminar no efeito inibitório do crescimento de *M. aeruginosa*.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para este estudo sugerem que compostos fenólicos (flavonoides e/ou ácidos orgânicos) presentes na fração metanólica do extrato bruto de *P. stratiotes*, são potenciais fornecedores de compostos algicidas sobre a cultura de *M. aeruginosa*, interferindo em seu crescimento.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J. Mecanismo e aplicações da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 623-628, Jun. 2007.

APPEL, H. M. Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, p. 1521-1552, Jul. 1993.

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

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, 248-252, May 1976.

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

CARMICHAEL, W. W. Blue-Green Algae: An Overlooked Health Threat. **Health & Environment Digest, Freshwater Foundation**, v. 5, n. 6, p. 1-4, Jul. 1991.

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

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, Mar. 1985.

GORHAM, P. R.; MCLACHLON, J. R.; HAMMER, V. T.; KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.). Breb. **Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Verhandlungen**, v. 15, n. 2, p. 796-804, Feb. 1964.

HONG, Y.; HU, H.; XIE, X.; LI, F. Responses of enzymatic antioxidants and nonenzymatic antioxidants in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to the allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) isolated from reed (*Phragmites communis*). **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 12, p. 1264-1273, Aug. 2008.

HONG, Y.; HU, H. Y.; XIE, X.; SAKODA, A.; SAGEHASHI, M.; LI, F. M. Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 262-269, Feb. 2009.

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

JOHANSSON, L. H.; BORG, L. A. H. A Spectrophotometric Method for Determination of Catalase Activity in Small Tissue Samples. **Analytical Biochemistry**, v. 174, n. 1, p. 331-336, Oct. 1988.

LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; PRÁ, D.; SILVA-STENICO, M. E.; RIEGER, A.; FRESCURA, V. D.-S.; FIORE, M. F.; TEDESCO, S. B. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **Science of The Total Environment**, v. 432, p. 180-188, Aug. 2012.

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

LOURENÇÃO, A.; MECINA, G. F.; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; CHIA, M. A.; BRONZEL-JÚNIOR, J. L.; GRANERO, F. O.; SILVA, L. P.; DA SILVA, R. M. G. Characterization of allelochemicals from *Pistia stratiotes* extracts and their effects on the growth and physiology of *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Science and Pollution Research**, Jun. 2021.

LU, Z.; ZHANG, Y.; GAO, Y.; LIU, B.; SUN, X.; HE, F.; ZHOU, Q.; WU, Z. Effects of pyrogalllic acid on *Microcystis aeruginosa*: oxidative stress related toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 132, p. 413-419, Oct. 2016.

MADHAVA RAO, K. V.; SRESTY, T. V. S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. **Plant Science**, v. 157, n. 1, p. 113-128, Aug. 2000.

MAUCH, F.; DUDLER, R. Differential induction of distinct glutathione-S-transferase of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. **Plant Physiology**, v. 102, n. 4, p. 1193–1201, Aug. 1993.

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

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical antioxidation of haemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 21, p. 6960–6962, Nov. 1972.

MOHAMED, Z. A. Macrophytes-cyanobacteria allelopathic interactions and their implications for water resources management—A review. **Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters**, v. 63, p. 122–132, Mar. 2017.

PANCHA I.; KAUMEEL CHOKSHI, RAHULKUMAR MAURYA, KHANJAN TRIVEDI, SHAIKESH KUMAR PATIDAR, ARUP GHOSH, SANDHYA MISHRA. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 341–348, Aug. 2015.

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

RAMEL, F.; BIRTIC, S.; GINIES, C.; SOUBIGOU, T. L.; TRIANTAPHYLIDES, C.; HAVAUX, M. Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 14, p. 5535–5540, Apr. 2012.

REDDY, J. K.; SUGA, T.; MANNAERTS, G. P.; LAZAROW, P. B.; SUBRAMANI, S. Peroxisomes: biology and role in toxicology and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 804, n. 1, p. 1–795, Dec. 1996.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR., J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, Jan. 1965.

WANG, Y.; LIU, Q.; WEI, Z.; LIU, N.; LI, Y.; LI, D.; JIN, Z.; XU, X. Thiazole amides, a novel class of algicides against freshwater harmful algae. **Scientific Reports**, v. 8, n. 8555, Jun. 2018.

WU, X.; WU, H.; YE, J.; ZHONG, B. Study on the release routes of allelochemicals from *Pistia stratiotes* Linn., and its anti-cyanobacteria mechanisms on *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Science Pollution Research**, v. 22, p. 18994–19001, Aug. 2015.

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

YU, J. Q.; YE, S. F.; ZHANG, M. F.; HU, W. H. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*), and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 2, p. 129–139, Feb. 2003.

ZHANG, F. Q.; WANG, Y. S.; LOU, Z. P.; DONG, J. D. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruquiera gymnorhiza*). **Chemosphere**, v. 67, n. 1, p. 44–50, Feb. 2007.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555–559, Mar. 1999.

ZHU, X.; DAO, G.; TAO, Y.; ZHAN, X.; HU, H. A review on control of harmful algal blooms by plant-derived allelochemicals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 401, n. 123403, Jan. 2021.

CONCLUSÕES GERAIS

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

Extratos e frações de *Pistia stratiotes*, *Salvinia auriculata* e *Emilia sonchifolia* interferem no crescimento da cepa de *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232 produtora de cianotoxina, principalmente nas maiores concentrações utilizadas.

As alterações observadas para os compostos e enzimas relacionadas ao metabolismo de respostas ao estresse oxidativo da cianobactéria, demonstraram que os extratos de *Pistia stratiotes*, *Salvinia auriculata* e *Emilia sonchifolia* agiram como estressores no metabolismo da mesma.

Pistia stratiotes inibiu a atividade da enzima superóxido dismutase durante o período de testes, demonstrando ser esse um importante mecanismo de ação dos compostos desta planta sobre o metabolismo da cianobactéria.

As análises de cromatografia gasosa (CG)/espectrometria de massa (MS) dos extratos etanólico e aquoso de *Pistia stratiotes* apresentaram o éster etílico do ácido palmítico como principal aleloquímico.

O conteúdo polifenólico encontrado nos extratos pode ser o responsável pela atividade inibitória no crescimento de cianobactérias, devido ao potencial fitotóxico encontrado na literatura para a presença destes compostos vegetais.

Os extratos e as frações mais ativas nos bioensaios apresentaram atividade algistática, dentro das concentrações avaliadas, sugerindo que os mesmos são fontes de compostos que proporcionam estresse oxidativo e a peroxidação lipídica as cianobactérias, processos estes de interesse ao controle populacional destes microrganismos.