



BIOATIVIDADE ALELOPÁTICA DE EXTRATOS METANÓLICOS DE *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. SOBRE *Microcystis aeruginosa* Kutzing

Rafael Shinji Akiyama Kitamura²; Ana Roberta Soares da Silva³; Thomaz Aurelio Pagioro¹; Lúcia Regina Rocha Martins^{1*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Curitiba, Paraná, Brasil;

² Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil

³ Divisão de Monitoramento da Gerência e Fiscalização, Instituto Água e Terra (IAT), Curitiba, Paraná, Brasil

*Autor para correspondência: rafaelkitamura@hotmail.com

Recebido em: 15/08/2021 – Aprovado em: 15/09/2021 – Publicado em: 30/09/2021

DOI: 10.18677/EnciBio_2021C10

trabalho licenciado sob licença [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

RESUMO

Macrófitas aquáticas do gênero *Myriophyllum* apresentam estratégias alelopáticas para o controle do fitoplâncton e, neste contexto, a utilização de extratos produzidos a partir destas espécies na inibição de cianobactérias têm sido investigadas. Neste estudo foi avaliado o efeito inibitório do extrato metanólico de *M. aquaticum* sobre o crescimento celular de *Microcystis aeruginosa* e a produção de microcistina-LR. Exemplos de *M. aquaticum* foram coletadas no reservatório do rio Verde (Araucária-PR, Brasil) e após a secagem foram pulverizadas. A extração hidrometanólica (50%) foi realizada por cavitação em ultrassom, os extratos brutos foram secos e liofilizados. Foram preparadas diferentes concentrações de soluções do extrato: 0 (Controle), 1, 10, 50, 100 e 250 mg.L⁻¹). Posteriormente, foram realizados inóculos de *M. aeruginosa* (10⁶ células mL⁻¹). O crescimento celular foi analisado por contagem em câmaras de Neubauer. Após nove dias de exposição, alterações no potencial fotossintético foram avaliadas pela determinação de clorofila-a. Além disso, foi realizada a quantificação de microcistina-LR por cromatografia líquida de alta eficiência. O extrato metanólico de *M. aquaticum* apresentou potencial inibitório sobre o crescimento de *M. aeruginosa*, com valores inibitórios de até 71%. Houve redução do teor de clorofila-a nas concentrações de 10 a 250 mg.L⁻¹. Por fim, constatou-se redução de microcistina-LR de 90 a 99% para todas as concentrações de extratos testadas. Tais resultados indicam que o extrato metanólico de *M. aquaticum* foi eficiente para inibir *M. aeruginosa*, bem como reduziu a concentração de microcistina-LR, apresentando potencial para o uso como alternativa no controle de florações de cianobactérias.

PALAVRAS-CHAVE: Cianobactérias. Microcistina-LR. Soluções Baseadas na Natureza

ALLELOPATHIC BIOACTIVITY OF METHANOLIC EXTRACTS OF *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. ON *Microcystis aeruginosa* Kutzing.

ABSTRACT

Aquatic macrophytes of genus *Myriophyllum* present allelopathic strategies for the control of phytoplankton and, in this context, the use of extracts from these species in the inhibition of cyanobacteria has been investigated. In this study, the inhibitory effect of the methanolic extract of *M. aquaticum* on the cell growth of *Microcystis aeruginosa* and the production of microcystin-LR was evaluated. Specimens of *M. aquaticum* were collected in the Rio Verde reservoir (Araucaria-PR, Brazil) and after drying were triturated. The hydromethanolic extraction (50%) was performed by ultrasound cavitation, the crude extract was dried and lyophilized. Different extract solutions were prepared: 0 (Control), 1, 10, 50, 100 and 250 mg.L⁻¹. Subsequently, inoculum of *M. aeruginosa* (10⁶ cells mL⁻¹) were performed. Cells growth was analyzed by counting in Neubauer chamber. After nine days of exposure, changes in photosynthetic potential were evaluated by determining of chlorophyll-*a*. In addition, microcystin-LR quantification was performed by high performance liquid chromatography. The methanolic extract of *M. aquaticum* has inhibitory potential on the growth of *M. aeruginosa*, with inhibitory values up to 71%. There was a reduction in the content of chlorophyll-*a* in the concentrations ranging from 10 to 250 mg.L⁻¹. Finally, there was a reduction of microcystin-LR from 90 to 99% for all the concentrations of extract tested. These results indicate that the methanolic extract of *M. aquaticum* was efficient to inhibit *M. aeruginosa*, as well as reduced the concentration of microcystin-LR, presented potential for use as an alternative in the control of cyanobacterial blooms.

KEYWORDS: Cyanobacteria. Microcystin-LR. Nature-based solution.

INTRODUÇÃO

A interferência antrópica tem contribuído sobremaneira na degradação dos corpos hídricos e a intensificação das florações de cianobactérias tem sido uma das principais alterações (PEKAR *et al.*, 2016; HUISMAN *et al.*, 2018). Tais eventos podem alterar a estrutura trófica e a funcionalidade local devido à desoxigenação da coluna d'água e à produção de cianotoxinas (PEKAR *et al.*, 2016; HUISMAN *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2021). As cianotoxinas podem causar a mortalidade de organismos aquáticos, alterações fisiológicas, assim como danos à saúde humana (CALADO *et al.*, 2019; METCALF; CODD, 2020; MUNOZ *et al.*, 2021).

Dentre as cianobactérias que estabelecem florações de ampla ocorrência global, a espécie *Microcystis aeruginosa* Kutzing tem recebido atenção especial uma vez que suas cepas podem produzir diferentes subtipos de cianotoxinas. As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos hepatotóxicas que, além de impactar a saúde de peixes e outros animais, causam efeitos para a saúde humana e ambiental (LI *et al.*, 2016; CALADO *et al.*, 2018; DIÉZ-QUIJADA *et al.*, 2019; CALADO *et al.*, 2019). Há diferentes variantes estruturais de microcistinas, a depender do tipo de aminoácido presentes, entretanto as detectadas em maior número de ocorrências de florações são a microcistina-LR (leucina-arginina) e RR (arginina-arginina) (DIÉZ-QUIJADA *et al.*, 2019).

Diferentes estratégias têm sido adotadas para o controle da proliferação de cianobactérias e consequente diminuição na concentração de cianotoxinas,

principalmente em reservatórios de abastecimento de água. A aplicação de algicidas e tratamentos físicos ou químicos convencionais corroboram para essa finalidade. Além disso, opções de maior eficácia têm sido desenvolvidas, tais como processos de micro e nanofiltração e métodos avançados de oxidação (PANTELIC *et al.*, 2013; MICHELETO *et al.*, 2020; TORRES *et al.*, 2020; MUNOZ *et al.*, 2021; QI *et al.*, 2021). Embora apresentem bons resultados, muitas dessas técnicas implicam em custos elevados e, no caso de processos químicos, podem levar à formação de subprodutos com efeitos nocivos para a biota (HUANG *et al.*, 2016).

Diante disso, o uso de tratamentos baseados em soluções sustentáveis torna-se de relevância por causarem menores impactos aos ambientes, além de apresentarem baixo custo, quando comparadas aos tratamentos físicos e químicos convencionais (LI *et al.*, 2021; TAZART *et al.*, 2021, ZHU *et al.*, 2021). Dentre as possíveis alternativas que podem ser empregadas, estudos envolvendo o potencial alelopático de macrófitas aquáticas submersas têm demonstrado eficiência, principalmente para a inibição de cianobactérias (CHENG *et al.*, 2008; MAREDOVÁ *et al.*, 2021; TAZART *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2021). Esta técnica é vantajosa, principalmente, visto que dependendo da concentração aplicada, não são observados efeitos de toxicidade a organismos não-alvo (LU *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2021; TAZART *et al.*, 2021).

As macrófitas aquáticas submersas corroboram para a regulação populacional do fitoplâncton, devido à liberação de aleloquímicos, como forma de reduzir a competição por luz, carbono e nutrientes (MOHAMED, 2017; TAZART *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2021; MAREDOVÁ *et al.*, 2021). Diante disso, pode-se vislumbrar a aplicação de espécies vegetais como uma alternativa ao uso algicidas, dentre as quais destacam-se as do gênero *Myriophyllum*, pois já existem estudos que demonstram sua capacidade alelopática sobre as cianobactérias (ZHU *et al.*, 2010; MOHAMED, 2017; WANG *et al.*, 2017). Sendo assim, estudos de bioprospecção de extratos das macrófitas aquáticas permitem a investigação da presença dos compostos com a propriedade alelopática e contribuem para a compreensão do mecanismo de inibição e potencial controle de florações de cianobactérias. Deste modo, o presente estudo objetivou avaliar o efeito de extratos de *M. aquaticum* sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* e a influência na concentração de microcistina-LR.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo de *Microcystis aeruginosa*

A cepa foi fornecida pelo Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (cepa BB005, obtida de floração da represa de Barra Bonita – SP). A cianobactéria foi cultivada em meio ASM-1 (pH = 7,4) sob condições controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), intensidade luminosa ($3,14 \pm 0,33$ watts) e fotoperíodo (12/12h claro/escuro) (ALMEIDA *et al.*, 2016).

Coleta das macrófitas

Exemplares de *Myriophyllum aquaticum* foram coletadas no reservatório do Rio Verde ($25^\circ 90,81'S$ $49^\circ 28,03'O$), localizado no município de Araucária, Paraná, Brasil. Em laboratório, o material vegetal fresco foi lavado em água corrente e seco em estufa (30°C) por 15 dias. A biomassa seca foi triturada e a granulometria foi padronizada (0,5 mm).

Preparo e obtenção dos extratos

O extrato foi preparado com solução extratora hidrometanólica (50% v/v). O material vegetal foi pesado, utilizando a proporção de 20 g de pó para 100 mL de solução extratora, e submetido a três ciclos de extração em banho ultrassônico, com duração de 45 minutos cada, seguido de filtração e renovação do líquido extrator. O extrato líquido foi concentrado em evaporador rotativo, congelado a -80 °C e liofilizado (Liotop). O extrato liofilizado foi armazenado a -20 °C, até o preparo das soluções para os experimentos de avaliação da atividade alelopática.

Bioensaios

Para avaliar o efeito inibitório, o extrato foi solubilizado em meio ASM-1 obtendo as seguintes concentrações (soluções teste): 1, 10, 50, 100 e 250 mg L⁻¹. O bioensaio foi realizado em frascos do tipo Erlenmeyer (capacidade de 125 mL) contendo 100 mL de solução teste nas diferentes concentrações (n = 3), no frasco controle apenas o meio ASM-1. O inóculo de *M. aeruginosa* foi adicionado a partir de cultivo em fase exponencial de crescimento, obtendo concentração celular inicial de 10⁶ células mL⁻¹.

Os frascos foram homogeneizados e mantidos sob condições estáveis de temperatura (24 ± 2°C), luminosidade (3,14 ± 0,33 watts) e fotoperíodo (12/12h claro/escuro). Durante o período de incubação (9 dias) foi analisada a concentração celular por contagem em câmara de Neubauer, a cada 48 horas. Ao término do bioensaio foram verificados os seguintes parâmetros: teste de viabilidade celular, concentração de clorofila-a e concentração de microcistina-LR.

Análise do efeito inibitório

Ao longo do período de incubação e utilizando os valores de concentração celular, foi calculada a taxa de inibição utilizando a Equação 1 (Eq.1) (CHENG *et al.*, 2008)

$$TI = 1 - (N \times N^0)^{-1} \times 100 \text{ (Eq.1)}$$

Em que:

TI= Taxa de inibição

N= Concentração celular dos frascos contendo extratos

N⁰= Concentração celular dos frascos Controle.

Viabilidade celular

Ao término do período de exposição, foram retiradas alíquotas de 1 mL dos frascos experimentais e transferidas para tubos de ensaio contendo 9 mL de meio ASM-1 (n = 3). Após 10 dias de incubação foi determinada a concentração celular para verificar se houve efeito algicida ou algistático.

Análise de clorofila-a

Alíquotas (n = 3) de 6 mL foram retiradas de cada frasco teste e transferidas para tubos Falcon e centrifugadas (10500 rpm, por quatro minutos), sendo o sobrenadante descartado. Aos tubos contendo *pellet* celular foram adicionados 2 mL de acetona 80% (v/v), homogeneizados e mantidos sob refrigeração e ausência de luz por 24 horas. Posteriormente, a amostra foi homogeneizada, centrifugada e o sobrenadante foi

analisado em espectrofotômetro (646 e 663 nm). Para o cálculo de concentração de clorofila-a, foi utilizada a Equação 2 (Eq.2) (LICHTENTHALER; WELLBURN, 1983).

$$\text{Clorofila - a (mg. mL}^{-1}\text{)} = 12,21 \times (A_{663}) - 2,81 \times (A_{646}) \text{ (Eq. 2)}$$

Quantificação de microcistina-LR (MCLR)

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (Prominence, Shimadzu®) utilizando coluna C18 híbrida (XTerra®, Waters) de 150 x 3 mm de diâmetro interno (partículas de 3,4 µm), mantida a 35 °C. A fase móvel (vazão 0,3 mL min⁻¹) foi constituída por ácido trifluoracético 0,05% (solvente A) e metanol (solvente B), utilizando eluição isocrática (50:50 v/v) durante 30 minutos, seguido de gradiente de limpeza (50 a 90% de solvente B em 5 minutos). O método de quantificação previamente validado no grupo de pesquisa analisou as concentrações de MCLR a partir de valores de área em 238 nm utilizando a regressão linear (Eq. 3) com coeficiente de regressão 0,9998. (TORRES *et al.*, 2020)

$$y = 322,481x - 3,2831 \text{ (Eq.3)}$$

Em que:

y= área do pico;

x= concentração MCLR (mg.L⁻¹)

Análise de dados

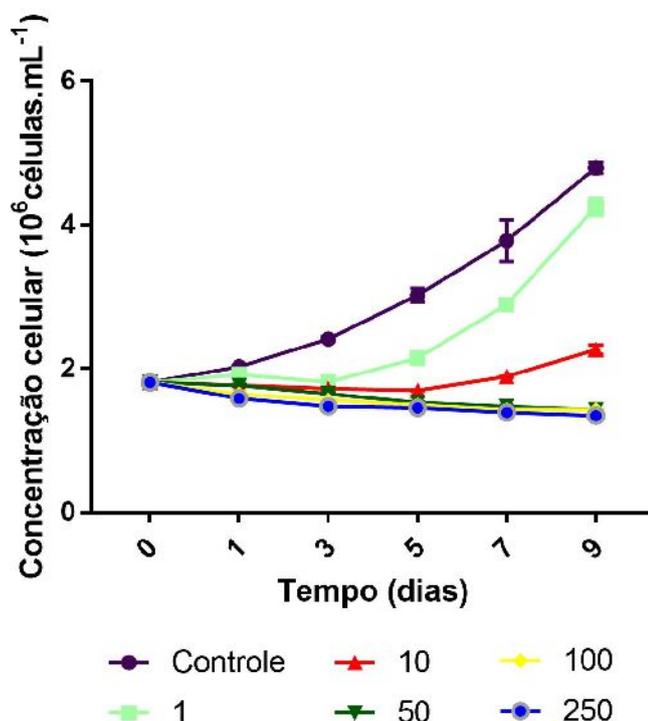
Os dados foram avaliados quanto à normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e homoscedasticidade (teste de Levene). Os dados paramétricos foram analisados pelo teste análise de variância de um fator, seguido pelo teste de Tukey para comparação dos pares de média. Foram considerados valores de significância de 0,05%. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 7.01.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato metanólico apresentou efeito inibitório sobre o crescimento celular de *M. aeruginosa*. Comparado ao controle, as maiores concentrações (100 e 250 mg.L⁻¹) afetaram o crescimento celular desde o primeiro dia experimental ($F_{(2,10)} = 61,50$; $P < 0,001$) e, a partir do 3º dia de exposição, houve a redução do crescimento celular para todas as concentrações de extratos ($F_{(2,10)} = 381,00$; $P < 0,01$) (Figura 1).

O percentual de inibição de crescimento no término do período de exposição variou entre 11 e 71% (Tabela 1). Considerando o tempo necessário para cada concentração de extrato alcançar a redução de 50% da contagem celular (CI₅₀), verifica-se que as concentrações entre 50 e 250 mg.L⁻¹ atingiram esse efeito a partir do 5º dia experimental. Em 10 mg.L⁻¹ foi obtido este valor no último dia de exposição e em 1 mg.L⁻¹ a CI₅₀ não foi alcançada, demonstrando o efeito concentração-dependente da propriedade inibitória avaliada.

FIGURA 1. Efeitos de diferentes concentrações de extrato metanólico de *Myriophyllum aquaticum* sob o crescimento celular de *Microcystis aeruginosa*.



Fonte: Os autores (2021).

TABELA 1. Taxa de inibição (%) de diferentes concentrações de extrato metanólico de *Myriophyllum aquaticum* sob o crescimento de *Microcystis aeruginosa*.

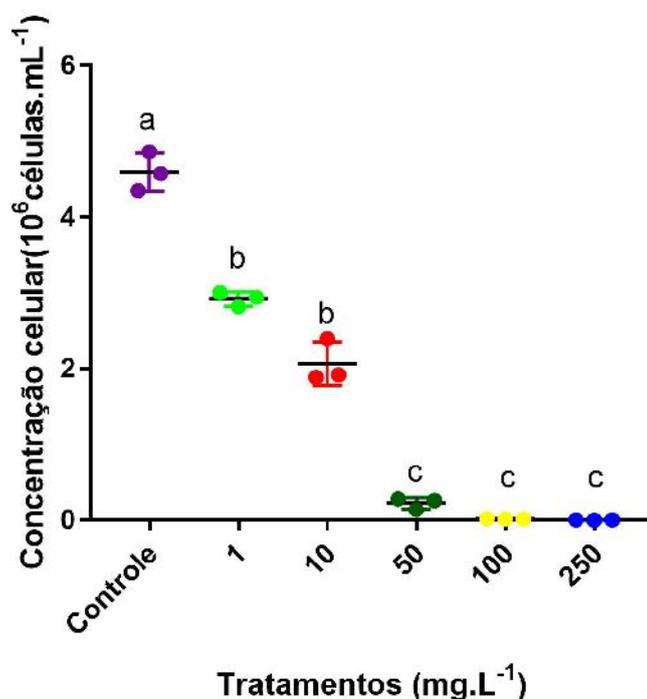
Concentração (mg.L ⁻¹)	Tempo de exposição (dias)				
	1	3	5	7	9
1	5,27±2,75 ^c	24,78±0,84 ^{cd}	28,81±5,74 ^c	22,77±8,14 ^c	11,26±6,23 ^c
10	12,54±1,01 ^b	28,54±2,13 ^c	43,77±2,93 ^b	49,44±6,05 ^b	52,74±3,02 ^{b*}
50	12,70±1,68 ^b	31,60±0,57 ^b	49,31±3,12 ^a	60,64±4,87 ^{a*}	70,24±0,67 ^{a*}
100	18,68±2,68 ^a	35,24±1,37 ^{ab}	50,52±3,49 ^{a*}	61,81±4,54 ^{a*}	70,19±0,71 ^{a*}
250	21,75±1,89 ^a	38,83±1,65 ^a	51,86±2,30 ^{a*}	62,83±4,66 ^{a*}	71,94±0,90 ^{a*}

Valores de média ± desvio padrão. N.D = não detectado. *Indica CI₅₀ (concentração Inibitória que reduziu a contagem celular a 50%). Letras diferentes indicam diferença significativa (P = 0,05) pelo teste ANOVA-one way, seguido pelo teste de Tukey.

Quanto à viabilidade celular de *M. aeruginosa*, nas concentrações de 1 (F_(2,10) = 522,6; P = 0,01) e 10 mg.L⁻¹ (F_(2,10) = 522,6; P = 0,0006) foi observado efeito algistático, enquanto nas concentrações de 50 (F_(2,10) = 522,6; P < 0,0001), 100 (F_(2,10) = 522,6; P < 0,0001) e 250 mg.L⁻¹ (F_(2,10) = 522,6; P < 0,0001), houve efeito algicida (Figura 2). Esses resultados demonstram que as propriedades alelopáticas apresentam efeito

algicida concentração-dependente e indicam que tanto podem promover a estabilização da concentração celular ou ocasionar a morte celular. Considerando uma hipotética situação de proliferação de *Microcystis aeruginosa* em ambiente natural, é necessário avaliar os riscos envolvidos com o efeito algicida, devido à possível liberação de cianotoxinas para a água. Nestes casos, as menores concentrações podem ser uma opção de manejo capaz de prevenir a floração de forma segura. Outros autores já evidenciaram que o uso de extratos de macrófitas aquáticas submersas apresenta eficácia para o controle de florações de cianobactérias (TAZART *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2021).

FIGURA 2. Viabilidade celular de *Microcystis aeruginosa* após exposição a diferentes concentrações de extratos metanólicos de *Myriophyllum aquaticum* (1, 10, 50, 100 e 250 mg.L⁻¹).



Fonte: Os autores (2021).

Com relação aos níveis de microcistina-LR (MCLR), a exposição ao extrato resultou na sua redução entre 90 e 99% para todas as concentrações-teste utilizadas (Tabela 2). Com esses resultados é possível constatar que, além da inibição do crescimento celular, os extratos contêm substâncias que interferem na síntese de microcistina-LR, uma vez que mesmo na menor concentração (1 mg.L⁻¹) onde houve efeito algistático e a inibição alcançou apenas 11,26%, houve redução de 90,31% na concentração da cianotoxina.

TABELA 2. Efeitos de diferentes concentrações de extrato metanólico de *Myriophyllum aquaticum* sob a produção de microcistina-LR (MCLR) por *Microcystis aeruginosa*.

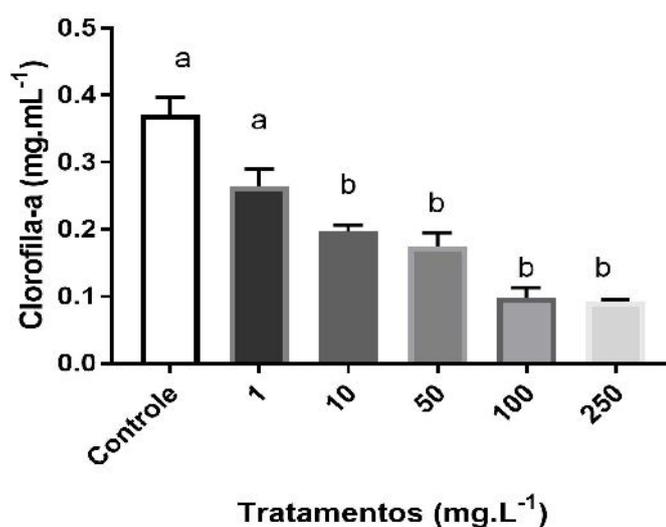
Concentração de extrato (mg.L ⁻¹)	MCLR (µg.L ⁻¹)	Redução (%)	G.L	Valor de F	Valor de P
Controle	0,00±0 ^a	N.D			
1	0,284±0,004 ^b	90,31±3,55 ^a	2	0,26	< 0,0001
10	0,027±0,009 ^b	98,34±0,34 ^a			
50	0,0016±0,001 ^b	99,41±0,39 ^a			
100	0,0010±0 ^b	99,64±0,01 ^a			
250	0,0010±0 ^b	99,64±0,01 ^a			

Valores de média±desvio padrão. N.D = não detectado. Letras diferentes indicam diferença significativa (P = 0,05) pelo teste de ANOVA-one way, seguido pelo teste de Tukey.

O uso de algicidas costumam contribuir para a inibição de crescimento de cianobactérias, porém podem ocasionar a indução de lise celular, acarretando na liberação de maiores concentrações de microcistina-LR intracelular (WANG *et al.*, 2007). Wu *et al.* (2013), afirmam que, quando o extrato inibe o crescimento celular e promove redução de cianotoxinas, há eficiência para o combate dos efeitos danosos ocasionados por cianobactérias nos ambientes.

Nos experimentos realizados para verificar uma possível interferência em pigmentos fotossintetizantes, foi avaliado o teor de clorofila-a. Desta forma, pode-se observar que o extrato metanólico reduziu o teor desse pigmento fotossintetizante para as concentrações de 10 (F_(2,10) = 26,64; P = 0,01), 50 (F_(2,10) = 26,64; P = 0,04), 100 (F_(2,10) = 26,64; P = 0,01) e 250 mg.L⁻¹ (F_(2,10) = 26,64; P = 0,01).

FIGURA 3. Efeitos de diferentes concentrações de extrato metanólico (1, 10, 50, 100 e 250 mg.L⁻¹) de *Myriophyllum aquaticum* sob o teor de clorofila-a em *Microcystis aeruginosa*.



Fonte: Os autores (2021).

A clorofila-a é um dos pigmentos essenciais para a fotossíntese e a diminuição de sua concentração pode ser um indicativo de interferência do extrato metanólico sobre o aparato fotossintético de *M. aeruginosa* e, por consequência, seu efeito fisiológico, associado à inibição do crescimento da cianobactéria. Outros autores obtiveram resultados similares com o presente trabalho, tal como o estudo de Cheng *et al.* (2008), verificaram o potencial de *M. aquaticum* em liberar compostos com propriedades alelopáticas e reduzir a concentração de clorofila-a, acarretando no decréscimo populacional. Tais aleloquímicos podem causar a inibição fotossintética e a síntese de proteínas, gerando desregulação do metabolismo primário das cianobactérias (LI *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2021).

Sabe-se que os principais grupos de compostos presentes em espécies de macrófitas aquáticas que apresentam potencial para a inibição de cianobactérias, são: polifenóis, ácidos graxos/ésteres, terpenóides e seus derivados (TAZART *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2021). Dentre os aleloquímicos presentes em macrófitas do gênero *Myriophyllum*, estão compostos fenólicos, como o ácido pirogálico, o qual já demonstrou potencial para desencadear a maior produção de espécies reativas de oxigênio e ocasionar danos oxidativos em cianobactérias (LU *et al.*, 2017). Diante disso, a bioatividade do extrato metanólico de *M. aquaticum* pode estar relacionada à presença dessas substâncias.

A presença de compostos fenólicos liberados por macrófitas aquáticas pode apresentar correlação forte com as interferências sobre os pigmentos fotossintéticos, bem como com a inibição celular de cianobactérias (ZHU *et al.*, 2021). Dentre os aleloquímicos encontrados no gênero *Myriophyllum*, destacam-se os compostos fenólicos (LEU *et al.*, 2002; ZHU *et al.*, 2021). Substâncias obtidas de *Myriophyllum spicatum*, como o tellimagrandim II, podem afetar diretamente o fotossistema II das cianobactérias e degradar os pigmentos acessórios ou interferir na atividade dos mesmos (LEU *et al.*, 2002).

Outros compostos fenólicos, como as catequinas, ácidos gálico e ácido elágico isolados de *M. spicatum*, também já foram evidenciados como interferentes no aparato fotossintético de cianobactérias (ZHU *et al.*, 2010). Tais afirmações podem corroborar com os resultados do presente estudo, visto que os extratos metanólicos em geral apresentam compostos fenólicos em sua composição. Diante disso, pode ocorrer interferências no metabolismo primário, além da inibição de atividades fisiológicas das células de cianobactérias (LI *et al.*, 2021), afetando a viabilidade e sobrevivência desses organismos. Tais resultados podem corroborar para os efeitos inibitórios observados no presente trabalho, sendo um possível mecanismo de ação que pode ser afetado pelos extratos metanólicos de *M. aquaticum*.

CONCLUSÃO

Os extratos metanólicos de *M. aquaticum* foram eficientes para a inibição de *M. aeruginosa*, bem como para a redução de microcistina-LR. Os efeitos observados sob a concentração de clorofila-a podem ser indicativos de alterações no potencial fotossintético e, um dos principais fatores para a inibição de crescimento celular. Além disso, os extratos apresentaram potencial algicida, principalmente para as concentrações de 50 a 250 mg.L⁻¹, demonstrando a eficiência dessas concentrações para a utilização no combate de crescimento celular de *M. aeruginosa*. Apesar de todas as concentrações de extrato reduzirem a concentração de microcistina-LR, sugere-se

que as concentrações acima de 10 mg.L⁻¹ sejam melhor estudadas para possíveis aplicações para o combate de florações de cianobactérias, visto que, tais concentrações apresentaram CL₅₀ ao longo do período experimental. Diante disso, demonstra-se a importância da melhor elucidação do uso desses extratos, bem como, o potencial alelopático de *M. aquaticum* sobre *M. aeruginosa*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal e ao Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA – UTFPR). O presente trabalho foi realizado com apoio de bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. R.; PASSIG, F. H.; PAGIORO, T. A.; NASCIMENTO, P. T. H.; CARVALHO, K. Q. Remoção de microcistina-LR da *Microcystis aeruginosa* utilizando bagaço de cana de açúcar *in natura* e carvão utilizado. **Revista Ambiente & Água**, v. 11, p. 188-197, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1785>. DOI: 10.4136/ambi-agua.1785

CALADO, S.L.M.; SANTOS, G.S; LEITE, T.P.G.; WOJCIECHOWSKI, J.; NADALINE, M; *et al.*; Depuration time and sublethal effects of microcystins in a freshwater fish from water supply reservoir. **Chemosphere**, v. 210, p. 805-815, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.075>. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.075

CALADO, S.L.M.; VICENTINI, M.; SANTOS, G.S; PELANDA, A.; SANTOS, H.; *et al.*, Sublethal effects of microcystin-LR in the exposure and depuration time in a neotropical fish: Multibiomarker approach. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 183, p. 109527, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109527>. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109527

CHENG, W.; XUOXIU, C.; HONGJUAN, D.; DIFU, L.; JUNYAN, L. ;Allelopathic inhibitory effect of *Myriophyllum aquaticum* (Vell.)Verdc. On *Microcystis aeruginosa* and its physiological mechanism. **Acta Ecologica Sinica**, v. 28, p. 2595-2603, 2008. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1872-2032\(08\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2032(08)60061-X). DOI: 10.1016/S1872-2032(08)60061-X

DÍEZ-QUIJADA, L.; PRIETO, A.I; GUZMÁN-GUILLÉN, R.; JOS, A.; CAMÉAN, A.M.; Occurrence and toxicity of microcystin congeners other than MC-LR and MC-RR: A review. **Food and chemical toxicology**, v. 125, p. 106-132, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.042>. DOI: 10.1016/j.fct.2018.12.042

GRAPHPAD PRISM version 7.01 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com

HUANG, H.; XIAO, X.; LIN, F.; GROSSART, H.; NIE, Z.; *et al.*, Continuous-release beads of natural allelochemicals for the long-term control of cyanobacterial growth: Preparation, release dynamics and inhibitory effects. **Water research**, v. 95, p. 113-123, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.058>. DOI: 10.1016/j.watres.2016.02.058

HUISMAN, J.; CODD, G.A.; PAERL H.W.; IBELINGS, B.W.; VERSPAGEN, J.M.H.; VISSER, P.M.; Cyanobacterial blooms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 471-483, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>. DOI: 10.1038/s41579-018-0040-1

LEU, E.; KRIEGER-LISKAY, A.; GOUSSIAS, C.; GROSS, E.M.; Polyphenolic allelochemicals from the aquatic angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit photosystem II. **Plant physiology**, v. 130, n. 4, p. 2011-2018, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.011593>. DOI: 10.1104/pp.011593

LI, B.; YIN, Y.; KANG, L.; FENG, L.; LIU, Y.; *et al.* A review: Application of allelochemicals in water ecological restoration—algal inhibition. **Chemosphere**, p. 128869, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128869>. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.128869

LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R.; Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 11, p. 591-592, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bst0110591>. DOI: 10.1042/bst0110591

LU, Z.; SHA, J.; TIAN, Y.; ZHANG, X.; LIU, B.; WU, Z.; Polyphenolic allelochemical pyrogalllic acid induces caspase-3 (like)-dependent programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, **Algal research**, v. 21, p.148-155, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.007>. DOI: 10.1016/j.algal.2016.11.007

MAREDOVÁ, N.; ALTMAN, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; The effects of macrophytes on the growth of bloom-forming cyanobacteria: Systematic review and experiment. **Science of The Total Environment**, p. 148413, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148413>. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.148413

METCALF, J.S.; CODD, G.A.; Co-occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins with other environmental health hazards: impacts and implications. **Toxins**, v. 12, n. 10, p. 629, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins12100629>. DOI: 10.3390/toxins12100629

MICHELETTO, J.; TORRES, M.A.; PAULA, V.C.S.; CERUTTI, V.E.; PAGIORO, T.A.; *et al.*; The solar photo-Fenton process at neutral pH applied to microcystin-LR degradation: Fe²⁺, H₂O₂ and reaction matrix effects. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 19, n. 8, p. 1078-1087, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D0PP00050G>. DOI: 10.1039/D0PP00050G

MUNOZ, M.; CIRÉS, S.; PEDRO, Z.M.; COLINA, J.A.; VELÁSQUEZ-FIGUEROA, Y.; *et al.* Overview of toxic cyanobacteria and cyanotoxins in Ibero-American freshwaters: challenges for risk management and opportunities for removal by advanced. **Science of The Total Environment**, p. 143197, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143197>. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.143197

PANTELIC, D.; SVIRCEV, Z.; SIMEUNOVIC, J.; VIDOCVIC, M.; TRAJKOVIC, I.; Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. **Chemosphere**, v. 91, p. 421-441, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.003>. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.003

PEKAR, H.; WESTERBERG, E.; BRUNO, O.; LAANE, A.; PERSON, K. M.; *et al.*; Fast, rugged and sensitive ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method for analysis of cyanotoxins in raw water and drinking water – First findings of anatoxins, cylindrospermopsins and microcystin variants in Swedish source waters and infiltration ponds. **Journal of Chromatography A**, v. 1429, p. 265-276, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.049>. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.12.049

QI, J.; MA, B.; MIAO, S.; LIU, R.; HU, C.; QU, J.; Pre-oxidation enhanced cyanobacteria removal in drinking water treatment: A review. **Journal of Environmental Sciences**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.03.040>. DOI: 10.1016/j.jes.2021.03.040

TAZART, Z.; DOUMA, M.; TEBAA, L.; LOUDIKI, M. Use of macrophytes allelopathy in the biocontrol of harmful *Microcystis aeruginosa* blooms. **Water Supply**, v. 19, n. 1, p. 245-253, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2166/ws.2018.072>. DOI: 10.2166/ws.2018.072

TAZART, Z.; CALDEIRA, A.T.; DOUMA, M.; SALVADOR, C.; LOUDIKI, M.; Inhibitory effect and mechanism of three macrophytes extract on *Microcystis aeruginosa* growth and physiology. **Water and Environment Journal**, v. 35, n. 2, p. 580-592, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/wej.12653>. DOI: 10.1111/wej.12653

TORRES, M. A.; MICHELLETO, J.; LIZ, M.V.; PAGIORO, T.A.; MARTINS, L.R.R.; FREITAS, A.M.; *Microcystis aeruginosa* inactivation and microcystin-LR degradation by the photo-Fenton process at the initial near-neutral pH. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 19, n. 10, p. 1470-1477, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D0PP00177E>. DOI: 10.1039/D0PP00177E

WANG, J.; XIE, P.; GUO, N.; Effects of nonylphenol on the growth and microcystin production of *Microcystis* strains. **Environmental Research**, v. 103, n. 1, p. 70-78, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.05.013>. DOI: 10.1016/j.envres.2006.05.013

WANG, H.; LIU, F.; LUO, P.; LI, Z.; ZHENG, L.; WANG, H.; ZOU, D.; WU, J. Allelopathic effects of *Myriophyllum aquaticum* on two cyanobacterial of *Anabaena flos-aquae* and *Microcystis aeruginosa*. **Bullet Environment Contaminants & Toxicology**, v. 98, p. 556-561, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2034-5>. DOI: 10.1007/s00128-017-2034-5.

WU, X.; WU, H.; CHEN, J.; YE, J. Effects of allelochemical extracted from water lettuce (*Pistia stratiotes* Linn.) on the growth, microcystin production and release of *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 11, p. 8192-8201, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1783-x>. DOI: 10.1007/s11356-013-1783-x

ZHU, J.; LIU, B.; WANG, J.; GAO, W.; WU, Z. Study on the mechanism of allelopathic influence on cyanobacteria and chlorophytes by submerged macrophyte (*Myriophyllum spicatum*) and its secretion. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 2, p. 196-203, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.011>. DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.02.011

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, p. 123403, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123403>. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123403.