UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

PÂMELA FERREIRA MIRANDA

EFEITOS ALELOPATICOS DO EXSUDATO DE *Microcystis aeruginosa* (KÜTZING) KÜTZING SOBRE AS RESPOSTAS FISIOLOGICAS DE *Scenedesmus acuminatus* (LAGERHEIM) CHODAT

VITÓRIA - ES

2017

PÂMELA FERREIRA MIRANDA

EFEITOS ALELOPATICOS DO EXSUDATO DE *Microcystis aeruginosa* (KÜTZING) KÜTZING SOBRE AS RESPOSTAS FISIOLOGICAS DE *Scenedesmus acuminatus* (LAGERHEIM) CHODAT

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Metre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Profª. Drª. Valéria de Oliveira Fernandes

VITÓRIA - ES

2017

[Ficha catalográfica]

EFEITOS ALELOPATICOS DO EXSUDATO DE *Microcystis aeruginosa* (KÜTZING) KÜTZING SOBRE AS RESPOSTAS FISIOLOGICAS DE *Scenedesmus acuminatus* (LAGERHEIM) CHODAT

PÂMELA FERREIRA MIRANDA

Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre/Doutor em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em XX de XXXX de 2017.

Comissão Examinadora:

_____

Drª. Valéria de Oliveira Fernandes - UFES

Orientadora e Presidente da Comissão

_____

Dr. Camilo Dias Junior - UFES

Examinador Interno

_____

Drª. Silvia Tamie Matsumoto - UFES

Examinador Interno Suplente

_____

Drª. Fabíola Chrystian Oliveira Martins – IFES- campus Guarapari

Examinador Externo

_____

Dr. Stefano Zorzal de Almeida – UCV/ES

Examinador Externo Suplente

Dedico este trabalho ao meu pai, que tanto confiou em mim; a minha mãe, irmã e meu noivo Renato pela confiança e palavras de estímulo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sua infinita bondade em me guiar nesta rica jornada durante esses dois anos de felicidade e desespero durante a construção deste trabalho.

Á minha mãe e irmã amada, por todos os conselhos, orações e confiança depositada durante a construção desse sonho.

Ao meu noivo Renato, pela paciência, carinho e por ser um grande amigo e incentivador, sempre me animando, e me acalentando durante as dificuldades e surtos oriundos do mestrado.

Á minha orientadora Valéria de Oliveira Fernandes pela orientação, carinho, amizade e confiança durante todos esses anos.

Ao PPGBV, pela oportunidade de realização desse Mestrado, e ao todo corpo docente, o meu muito obrigado, por todo conhecimento passado durante esta jornada enriquecedora.

Á CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos membros constituintes da banca examinadora, Professora Dr$^{a.}$ Fabíola Chrystian Oliveira Martins e Professor Dr. Camilo Dias Junior, que aceitaram de bom grado contribuir para o melhoramento deste trabalho com suas críticas e sugestões.

Á minha turma de mestrado 2015/1, pela amizade e companhia e por tornar as horas de estudo mais leves e divertidas.

Á professora Dr$^{a.}$ Maria Do Carmo do Carmo Bittencourt de Oliveira, que gentilmente doou as cepas de *Microcystis*, sendo possível assim a realização deste trabalho.

Á Anny, por toda a dedicação, paciência e por dispor de seu tempo em me ajudar nas incansáveis analises enzimáticas.

Á Juju, pelas palavras de incentivo e por me ajudar com minhas dúvidas metodológicas em relação ao biovolume.

Aos amigos Fred, Brener, Fernanda o meu muito obrigado, por se mostrarem empáticos diante dos meus problemas e desesperos ao longo desta jornada.

Meus sinceros agradecimentos, aos meus colegas de trabalho do LATEAC, por promoverem um ambiente de trabalho divertidíssimo. Em especial aos amigos Fred, Brener, Fernanda, Sandra e a intrusa mais que especial Kathiani, que abdicaram de parte do seu tempo, para me auxiliar nas incansáveis analises ao longo de várias tardes e noites; a companhia de vocês durante esta etapa foi imprescindível.

Aos meus amigos do coração, Rayani, Leilane e Vinicius, pela confiança e por sempre emanar vibrações positivas, durante a conquista deste sonho.

Agradeço aos meus familiares por entender a minha ausência nas festinhas e encontros de família durante a realização deste trabalho; em especial ao meu Tio Dilson, por toda confiança depositada desde o início deste sonho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram com manifestações de carinho, conselhos, orações e toda ajuda possível na realização deste trabalho, muito obrigada!!!

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Estrutura molecular da microcistina-LR, a variante mais conhecida da microcistina 20

Figura 02 - *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, cultivada em meio ASM1 25

Figura 03 - *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat, cultivada no meio ASM1 26

Figura 04 - Deliamento experimental 29

Figura 05 - Densidade celular de *Scenedesmus acuminatus*. A: Tratamentos com o exsudato de *M. aeruginosa* – MCs^-. B: Tratamentos com o exsudato de *M. aeruginosa* – MCs^+. Início da fase *lag* para o tratamento MC^+ 5.0 (Seta preta). Diferença significativa de densidade celular entre os tratamentos 1.0, 5.0 MC^+ em relação ao controle (*) e entre os tratamentos MC^- 5.0 e MC^+ 0.5 após o 16° de cultivo $p < 0,05$. 35

Figura 06 - Diferença no biovolume de Scenedesmus acuminatus em diferentes tratamentos no 10° dia de cultivo. A – Controle, B – MCs^- 5,0, C – MCs^+ 5,0 38

Figura 07 - Conteúdo de clorofila ‘a’ ($\mu g.mL^{-1}$) correspondente as coletas do dia 5°, 10°, 15° e 20° em todas as unidades experimentais 38

Figura 08 - Atividade enzimática do cultivo de *Scenedesmus acuminatus* exposta ao exsudato de M. aeruginosa (MCs^+ e MCs^-). A - atividade da catalase. B - atividade da APX. C - atividade da SOD. As médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição e concentração das soluções-estoque do meio ASM1 27

Tabela 2 - Valores da taxa de crescimento (μ), tempo de duplicação (G) e rendimento máximo (R) para a cultura de *Scenedesmus acuminatus* submetido aos tratamentos com microcistina ($MCs^{+)}$, sem microcistina (MCs^{-}) e controle 36

Tabela 3 - Valores de biovolume ($mm^3.L^{-1}$) correspondente as coletas do dia 5°, 10°, 15° e 20° em todas as unidades experimentais 37

RESUMO

As cianobactérias têm uma ampla distribuição geográfica, sendo importantes membros das comunidades fitoplanctônica e perifíticas de ambientes marinhos e de água doce. Umas das preocupações, no que concerne esses organismos, está na capacidade destes produzirem metabolitos secundários denominados cianotoxinas, que são altamente alelopáticos que conferem uma vantagem competitiva às espécies produtoras. Muitos trabalhos sugerem que cianotoxinas provocam uma série de impactos a toda cadeia trófica, uma vez que afetam a fisiologia dos organismos fotoautotróficos. Sendo assim, o presente estudo visa avaliar os efeitos alelopáticos do exsudato de *Microcystis aeruginosa* (KÜTZING) KÜTZING sobre a fisiologia de *Scenedesmus acuminatus* (LAGERHEIM) CHODAT. A microalga *Scenedesmus acuminatus* foi submetida aos exsudatos das cepas de *Microcystis aeruginosa* produtora (MCs+) e não produtora (MCs-) de microcistina em três concentrações diferentes (0.5, 1.0 e 5.0 $\mu g.L^{-1}$) e ao meio controle (ASM1) totalizando seis tratamentos, todos em triplicata, os quais foram mantidos na sala de cultivo a uma temperatura de 22 ± º C, fotoperíodo de 12h de claro/escuro com uma intensidade luminosa de aproximadamente ($40\mu mol.m^2.s^{-1}$) e pH no início no experimento em torno de 7,0 sendo cultivadas durante 20 dias. Foram realizadas análises de densidade celular, biovolume, concentração de clorofila *a* e estresse oxidativo, por meio da quantificação das enzimas antioxidantes CAT, APX e SOD. Os dados obtidos foram submetidos a testes de normalidade com posterior análise de variância ANOVA seguido de teste de Tukey. Para os dados não paramétricos foi realizado o teste Kruskal – Wallis com ($p< 0.05$). Os resultados demostram que as maiores concentrações dos tratamentos tóxicos (MCs^+ 1.0 e 5.0) apresentam ter um efeito inibitório significativo com relação à densidade populacional e biovolume de *S. acuminatus.* Quanto ao teor de clorofila - *a* a maioria dos tratamentos demostraram queda em seus valores a partir do 15° dia de experimentação. *S. acuminatus* submetida a concentração de MCs^+ 5.0 registrou no 20° dia de cultivo o menor valor de clorofila *a* (3,43 $\mu g.mL^{-1}$) em relação aos demais tratamentos. Já para as enzimas CAT e APX não houve diferença significativas da atividade antioxidante entre os tratamentos em relação ao controle em todos os dias de coleta, no entanto, a enzima SOD apresentou um aumento mais evidente na sua atividade nos dias 5, 10 e 15 de cultivo, nos tratamentos na presença de toxicidade (MCs^+ 5.0; 1.0 e 0.5). Com base

nos resultados, conclui-se que a microalga *S. acuminatus* mostrou responder de forma heterogênea ao estresse provocado pelos exsudatos MCs^+ e MCs^-, visto que, os ensaios expostos as altas concentrações de MCs^+ (1.0, e 5.0) demonstraram ser mais sensíveis aos efeitos alelopáticos, provenientes do exsudato tóxico e para algumas análises fisiológicas o tratamento MCs^- (5.0) demostrou ocasionar efeitos inibitórios equivalentes aos ensaios expostos aos tratamentos (MCs^+ 5.0 e 1.0).

Palavras chaves: Alelopatia. Exsudato. Microcistina*. Scenedesmus acuminatus.*

ABSTRACT

Cyanobacteria have a wide geographical distribution, being important members of the phytoplankton and periphytic communities of marine and freshwater environments. One of the concerns with respect to these organisms lies in their ability to produce secondary metabolites called cyanotoxins, which are highly allelopathic, conferring a competitive advantage on producing species. Many studies suggest that cyanotoxins cause a number of impacts to the entire trophic chain, since they affect the physiology of photoautotrophic organisms. Thus, the present study aims to evaluate the allelopathic effects of the exudate of *Microcystis aeruginosa* (KÜTZING) KÜTZING on the physiology of *Scenedesmus acuminatus* (LAGERHEIM) CHODAT. The microalga *Scenedesmus acuminatus* was submitted to *Microcystis aeruginosa* producing exudates (MCs^+) and non-producing (MCs^-) of microcystin at three different concentrations (0.5, 1, 5 $\mu g.L^{-1}$) and to the control medium (ASM1) totaling six treatments, all in triplicate, which were kept in the culture room at a temperature of 22 ± ºC, 12 h photoperiod of light / dark with a light intensity of approximately (40 µmol.m2.s - 1) and pH at the beginning in the experiment around 7.0 being cultivated for 20 days.Cell density, biovolume, chlorophyll and oxidative stress were analyzed by quantification of the antioxidant enzymes CAT, APX and SOD. The obtained data were submitted to normality tests with posterior analysis of variance ANOVA followed by Tukey test. For non - parametric data the Kruskal - Wallis test was performed with ($p < 0.05$). The results show that the higher concentrations of the toxic treatments (MCs^+ 1.0, 5.0) have a significant inhibitory effect on *S. acuminatus* growth and biovolume. As regards chlorophyll content, the majority of treatments showed a decrease in their values from the 15th day of experimentation. *S. acuminatus* submitted to concentration of MCs + 5.0 recorded on the 20th day of cultivation the lowest value of chlorophyll a (3.43 µg.mL-1) in relation to the other treatments. However, for the CAT and APX enzymes, there was no significant difference in the antioxidant activity between the treatments in relation to the control on all days of collection; however, the SOD enzyme presented a more evident increase in its activity on days 5, 10 and 15 of treatment in the presence of toxicity (MCs^+ 5.0, 1.0, 0.5). Based on the results, it was concluded that the microalgae S. acuminatus showed a heterogeneous response to the stress

caused by MCs^+ and MCs^- exudates, as the high concentrations of MCs^+ (1.0, 5.0) were shown to be more sensitive to effects allelopathic from toxic exudates and for some physiological analyzes the MCs^- (5.0) treatment was shown to cause equivalent inhibitory effects to the assays exposed to treatments (MCs^+ 5.0,1.0).

Keywords: Allelopathy. Exudate Microcystin. *Scenedesmus acuminatus.*

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
3 OBJETIVOS 24
3.1 OBJETIVO GERAL 24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 24
4 METODOLOGIA 25
4.1 LINHAGENS UTILIZADAS 25
4.2 CONDIÇÕES DO CULTIVO 25
4.3 MEIO DE CULTURA 26
4.4 OBTENÇÃO DO EXSUDATO 27
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MICROCISTINA NO EXSUDATO 27
4.6 PREPARAÇÃO DO EXSUDATO E ADIÇÃO AOS MEIOS DE CULTURA.....28
4.7 DELIAMENTO EXPERIMENTAL 28
4.8 COLETA DE DADOS 29
4.8.1 Densidade celular 30
4.8.2 Biovolume 30
4.8.3 Analise de clorofila 30
4.8.4 Analise de proteínas e estresse oxidativo 31
4.9 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS 31
4.10 ANALISE ESTATÍSTICA 32
5 RESULTADOS 33
5.2 DENSIDADE CELULAR 35
5.3 BIOVOLUME 37
5.4 ANALISE DE CLOROFILA 38
5.5 ANALISE DO ESTRESSE OXIDATIVO 39
6 DISCUSSÃO 41
7 CONCLUSÂO 47
6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 48

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias apresentam ampla distribuição geográfica, sendo importantes membros das comunidades fitoplanctônica e perifíticas de ambientes marinhos e de água doce (MOLICA; AZEVEDO, 2009; OLIVEIRA *et al.,* 2009). Esses organismos chamam atenção em particular, devido à sua capacidade de proliferação intensa nos ambientes aquáticos em processo de eutrofização (AZEVEDO *et al*., 2002; SYCHROVÁ *et al.,* 2012).

O processo de eutrofização é caracterizado pelo aumento nas concentrações de nitrogênio e fósforo, decorrente de ações antrópicas, resultando em alterações drásticas no metabolismo desses ecossistemas e na estrutura da comunidade fitoplanctônica (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

A intensificação da ocorrência de florações de cianobactérias, têm sérias implicações sociais e econômicas devido à degradação dos recursos hídricos, pois sua presença culmina em alterações nos aspectos organolépticos da água, além de reduzir o oxigênio dissolvido e promover sombreamento de outras microalgas (OLIVEIRA *et al.,* 2009; BITTENCOURT; OLIVEIRA; PINTO, 2011). Os metabólitos liberados, por esses organismos podem apresentar toxicidade, além de transmitirem sabor e odor à água (BITTENCOURT *et al*., 2015 a; XU *et al*., 2016).

As cianotoxinas são metabolitos secundários liberados pelas cianobactérias que dependendo da sua estrutura química podem ser inseridas em três grandes grupos: os peptídeos cíclicos, os alcalóides e os lipopolissacarídeos. A toxicidade das cianotoxinas apresenta efeitos diversos, variando entre efeitos hepatotóxicos, neurotóxicos e dermatotóxicos (SIVONEN; JONES, 1999).

Entre as cianotoxinas mais comumente conhecidas, as microcistinas (MCs) estão entre as toxinas mais bem estudadas em virtude do número elevado de casos de intoxicações que as envolvem (LEFLAIVE *et al., 2007;* OLIVEIRA *et al.,* 2009; BITTENCOURT; OLIVEIRA; PINTO, 2011). Várias espécies produzem esse grupo de toxinas, principalmente as do gênero *Microcystis*, que tem sido responsável por mais de 65% dos casos de intoxicação em seres humanos, animais (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; FALCONER; HUMPAGE, 2005; PAPADIMITRIOU *et al.,* 2013); e sobre o

fitoplâncton e macrófitas aquáticas essas toxinas demostram diversos efeitos inibitórios no crescimento, redução da biomassa, teor de clorofila e resposta antioxidante (BÁRTOVÁ *et al*., 2011; CAMPOS *et al.,* 2013; ZHENG *et al.,* 2013; WANG *et al*., 2017).

As MCs pertencem a uma família de heptapeptídeos cíclicos que apresenta cerca de 80 variantes em sua constituição, elas são inibidoras das proteínas fosfatases 1 e 2A importantes catalisadores de serina e treonina, os quais estão envolvidos na dinâmica funcional dos citoesqueletos dos hepatócitos (SIVONEN; JONES, 1999; MACKINTOSH *et al.,* 1990). A ação dessas toxinas podem promover tumores no fígado e induzir danos ao DNA (DUY *et al*., 2000; ZHOU; ELLEDGE*,* 2000).

Microcystis aeruginosa é uma das espécies mais comumente associada a florações e consequentemente a casos de intoxicações ao redor do mundo (SANT'ANNA et al., 2012). Sua ocorrência, já foi registrada em países como Austrália, Inglaterra, China e África do Sul (FALCONER, 1994). No Brasil, florações de cianobactérias produtoras de MCs foram detectadas em diversos ambientes aquáticos, tais como; na lagoa dos Patos no Rio Grande do Sul (MATTHIENSEN; YUNES; CODD 1999); na Represa Billings, em São Paulo (CARVALHO *et al*., 2007); no rio Tapajós, no estado do Pará (SÁ *et al.,* 2010); em mananciais superficiais de águas destinadas ao abastecimento público, de municípios da Zona da Mata Sul em Pernambuco (RAMOS *et al*., 2014); No Espírito Santo, estudos recentes de Martins (2010) e Alves (2015) nas lagoas Jacuném e Juara, respectivamente, mostraram haver, além de, grande densidade de cianobactérias, de diversos gêneros, a presença de microcistina.

O favorecimento de florações algais em especial de cianobactérias está diretamente relacionado a capacidade desses organismos produzirem metabólicos secundários altamente alelopáticos que conferem uma vantagem competitiva às espécies produtoras (CARMICHAEL, 2008; JONSSON; PAVIA; TOTH, 2009; BITTENCOURT *et al.,* 2013; CORBEL *et al.,* 2014).

A alelopatia, segundo Rice (1984) é definida como interações bioquímicas, que podem ser estimulantes ou inibitórias entre o organismo produtor do composto aleloquímico e o organismo - alvo. Assim, ao atuar como compostos alelopáticos, as cianotoxinas poderiam tanto favorecer a reprodução das cianobactérias produtoras, como inibir o

crescimento de outros organismos fitoplanctônicos, o que auxiliaria no estabelecimento e na dominância das florações de cianobactérias.

Diversos autores relatam sobre os efeitos alelopáticos (fisiológicos e bioquímicos) dessas cianotoxinas em especial as MCs em diferentes organismos fotoautotróficos (HA; PFLUGMACHER, 2013; ZHENG *et al.,* 2013; CORBEL *et al.*, 2014 ŻAK; KOSAKOWSKA, 2014; WANG *et al*., 2017). A fitotoxicidade das MCs, induz diferentes respostas fisiológicas tanto para o fitoplâncton, quanto para as macrófitas aquáticas. No caso das microalgas, os estudos demostram efeitos inibitórios no crescimento, volume celular, teor de clorofila e estresse oxidativo, uma vez que as MCs têm demostrado afetar a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD, CAT, APx, GPx (EL-SHEEKH; KHAIRY; EL-SHENODY, 2010; BITTENCOURT *et al.,* 2015 a; WANG *et al*., 2017). Enquanto que em macrófitas aquáticas a toxicidade de cianobactérias induz um declínio na quantidade de biomassa, no teor de clorofila, além de promover o aumento do estresse oxidativo (HA; PFLUGMACHER, 2013; ZHENG *et al.,* 2013; XU *et al.,* 2016).

Entretanto, a maioria dos estudos que avaliam o efeito da atividade desses aleloquímicos geralmente são realizados com quantidade excedentes as que são comumente encontrados nos ecossistemas. Grande parte dos trabalhos que estudam a atividade aleloquímica da microcistina nesses organismos utilizam extratos celulares ou toxina purificadas, poucos são os estudos no que tange aos compostos provenientes do exsudato e seus possíveis efeitos (WANG *et al*., 2017).

Os resultados dos estudos demostram que os metabólitos secundários produzidos por essas algas trazem uma série de impactos a toda cadeia trófica, uma vez que afetam a fisiologia dos organismos fotoautotróficos aquáticos e podem bioacumular ao longo da cadeia, acarretando graves consequências a saúde humana, dessa forma, frente ao aumento expressivo de corpos hídricos eutrofizados, o estudo dos possíveis efeitos alelopáticos ocasionados por cianobactérias se torna cada vez mais significativo (KOSCHEK, 2008; BITTENCOURT et al., 2015 a).

Com base nas informações supracitadas, este estudo visa contribuir para a investigação de possíveis respostas fisiológicas de uma cepa de clorofícea submetida a diferentes concentrações de exsudato de *M. aeruginosa* (MC^+ e MC^-), visto que florações desta alga tem sido frequentemente registrada nos ecossistemas aquáticos

e o potencial alelopático desses metabólicos em concentrações normalmente encontradas na natureza são poucos estudados.

Com base no levantamento bibliográfico o presente estudo tem como hipótese:

H1: Somente a maior concentração provenientes do exudato de *M. aeruginosa*$^{+}$ tóxica (MCs^{+} 5.0) exercerão efeitos negativos sobre alguns indicadores do estado fisiológico (densidade celular, biovolume, clorofila e estresse oxidativo) de *Scenedesmus acuminatus.*

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As cianobactérias são organismos procariontes, fotossintetizantes e por esta razão possuem grande importância na produção primária dos ecossistemas onde habitam (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005). Além disso, algumas espécies de cianobactérias são de extrema importância no que se refere a incorporação do nitrogênio nos demais níveis das cadeias tróficas, já que, estas algas desenvolveram a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico através de células especializadas chamadas heterocistos (WEHR; SHEATH, 2005).

O sucesso das cianobactérias a diferentes condições ambientais deve-se a uma plasticidade adaptativa e a uma série de estratégias que lhes permitem dominar esses ambientes, como: a capacidade de produção de pigmentos acessórios, de acumular gás em vesículas (aerótopos) que lhes permitem migração na coluna d'água, de estocar nutrientes essenciais e produzir metabólitos tóxicos, como as cianotoxinas (PAERL, 1988; CODD, 1995).

Sob determinadas condições ambientais, as cianobactérias podem formar florações, um fenômeno no qual esses organismos se multiplicam rapidamente e dominam a comunidade fitoplanctônica (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006; MOLICA; AZEVEDO, 2009). As florações de cianobactérias podem ser danosas para o ambiente, e para a saúde humana, pois muitas espécies de cianobactérias possuem a potencialidade de produzir cianotoxinas.

Cianotoxinas são metabólitos secundários de natureza química de efeitos tóxicos. Esses metabólitos podem ser classificados como hepatotóxicos, neurotóxicos, citotóxicos e dermatotóxicos, dependendo da sua forma de ação (SIVONEN; JONES, 1999; SAKER; GRIFFITHS, 2000; ARAÓZ, 2010). De acordo com sua estrutura química, as cianotoxinas podem ser incluídas em três grandes grupos: os peptídeos cíclicos, os alcalóides e os lipopolissacarídeos (LPS) (MOLICA; AZEVEDO, 2009).

As microcistinas (MCs) estão entre as cianotoxinas mais estudadas, essas são heptapeptídeos cíclicos, caracterizados pela presença de 5 aminoácidos fixos (D-aminoácidos) e 2 variáveis (L-aminoácidos), contendo os aminoácidos leucina (L) e arginina (R) nas posições dois e quatro da estrutura, possuindo cerca de 80 variantes (SIVONEN; JONES, 1999).

Desta forma, as microcistinas são nomeadas de acordo com dois aminoácidos variáveis e outras variações estruturais menores. As variantes mais comumente encontradas são as MC-LR, MC-YR e MC-RR. Dentre estas, MC-LR (figura 01) pode ser considerada a mais perigosa para a saúde humana em relação à sua toxicidade (GUPTA *et al*., 2003; FALCONER; HUMPAGE, 2005). Dentre as espécies já identificadas como produtoras dessas toxinas, temos as pertencentes aos gêneros *Microcystis*, *Anabaena, Nodularia, Oscillatoria, Nostoc, Cylindrospermopsis, Planktotrix, Oscillatoria, Radiocystis, Arthrospira* (MERILUOTO; CODD, 2005).

Quanto ao seu efeito toxicológico, as microcistinas são classificadas como hepatotoxinas, uma vez que causam sérios danos ao tecido hepático. Essas cianotoxinas acumulam no fígado através de transportadores iônicos multiespecíficos presentes nos canais biliares e no intestino delgado, onde promove alterações citoesqueléticas das células, causando morte por hemorragia intra-hepática ou insuficiência hepática (HUMPAGE; FALCONER, 1999). Em nível molecular, as microcistinas são, potentes inibidoras de proteínas fosfatases 1 e 2 A, importantes enzimas que agem como catalisadores na desfosforilação de resíduos de serina/treonina em fosfoproteínas (MACKINTOSH et al., 1990; FALCONER; HUMPAGE,2005).

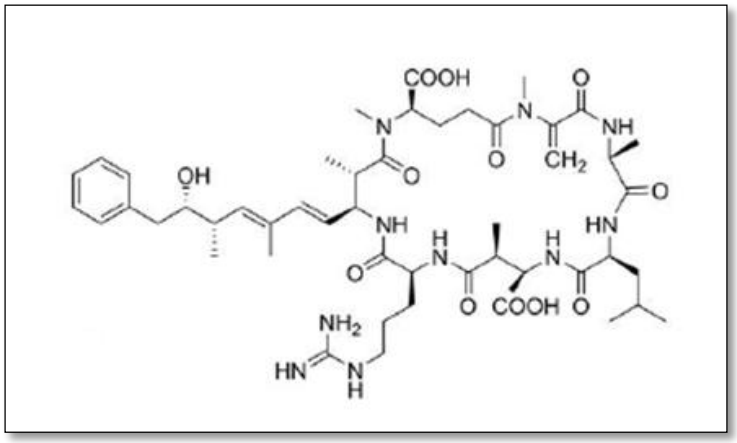

Figura 01: Estrutura molecular da microcistina-LR, a variante mais conhecida da microcistina.

Existem vários estudos que relatam o efeito das microcistinas nos processos fisiológicos e bioquímicos ao longo da cadeia tróficas (WU *et al*., 2012; CORBEL *et al*., 2014; BITTENCOURT *et al*., 2015 b); e de como a exposição ou até mesmo a ingestão desses metabólitos pode resultar em bioacumulação (KOSCHEK, 2008).

Crush e colaboradores (2008) irrigaram raízes e partes aéreas de alface (*Lactuva sativa*), durante seis dias com extrato bruto provenientes de florações de dez variantes de MCs. Os autores observaram que esta hortaliça absorveu em seus tecidos foliares a concentração de até 84 $\mu g.Kg^{-1}$ de microcistina de massa fresca. Smith e Haney (2006) examinaram as concentrações de MCs em três níveis tróficos (fitoplâncton, zooplâncton e peixe-espinho (*Lepomis gibbosus*) de uma teia alimentar aquática e encontraram evidências para a transferência direta de MCs do zooplâncton para o peixe-espinho e o subsequente acúmulo da toxina no tecido do fígado do peixe. A Organização Mundial da Saúde (OMS) limita o consumo humano de microcistina nos alimentos em 0,04 $\mu g.kg^{-1}$ de massa corpórea.dia^{-1} (WHO, 1998). A ingestão continua, mesmo que em níveis baixos desta toxina pode acarretar riscos à saúde humana devido a sua ação bioacumulativa (BITTENCOURT *et al.,* 2015 b).

Uns dos casos mais graves já registrados em decorrência do uso de água contaminada com MCs, aconteceu em 1996, na cidade de Caruaru (PE), onde 76 pacientes de uma clínica de hemodiálise morreram, após o tratamento de diálise (JOCHIMSEN *et al.,* 1998; AZEVEDO *et al.,* 2002). Esse incidente obrigou o Ministério da Saúde a criar a Portaria 518 que estabeleceu o valor máximo de 1,0 $\mu g.L^{-1}$ de microcistina na água tratada para consumo humano (BRASIL, 2004).

A eutrofização dos ambientes aquáticos é uma das maiores causas de florações de cianobactérias, decorrente principalmente do lançamento de efluentes ricos em nitrogênio e fosforo, provenientes de atividades urbanas, agropecuárias e de piscicultura intensiva (OLIVEIRA *et al.,* 2009).

De acordo com Tundisi (2003), o aumento da concentração de nitrogênio e fosforo somados a pH neutro a alcalino e temperaturas acima de 20° C são fatores que favorecem a dominância desses organismos nos ecossistemas aquáticos. Dessa forma, o sucesso das florações de cianobactérias esta intrinsicamente associada as condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento e a produção de toxinas, que dão a esses organismos, vantagens competitivas em detrimento das demais espécies do fitoplâncton (GRANELI; WEBERG; SALOMON, 2008).

Diversos estudos tem discutindo a atuação das cianotoxinas como compostos alelopáticos (PFLUGMACHER, 2002; BITTENCOURT *et al.,* 2013; HARKE *et al*., 2016; XU *et al.,* 2016). Segundo Rice (1984), a alelopatia é um fenômeno, pelo qual

plantas, fungos, algas e bactérias, interagem com os demais seres vivos através da liberação de compostos no meio circundante, que podem ter ação estimulante ou inibitória em um determinado organismo alvo.

A alelopatia em algas já é conhecida desde antes dos anos 20 por Harder (1917 apud Oliveira, 2017, p. 14) que percebeu auto inibição em culturas antigas de *Nostoc punctiforme*. Segundo Dakshini (1994), os químicos alelopáticos liberados por algas podem operar de quatro formas: (1) afetando o crescimento de outra alga, (2) inibindo o crescimento dela mesma, (3) influenciando o crescimento de outros microrganismos e (4) afetando o crescimento de macrófitas aquáticas.

Esse metabólitos secundários produzidos por cianobactérias e outras algas, que apresentam atividade alelopática podem desempenhar diferentes papéis ecológicos, no que se refere a sucessão de espécies, competição por recursos e comunicação intraespecífica (LEÃO; VASCONCELOS; VASCONCELOS, 2009; BITTENCOURT; OLIVEIRA; PINTO, 2011).

Para compreender o papel fisiológico e ecológico desses compostos, muitos estudos tem investigado os efeitos dessas toxinas, principalmente as MCs, e seus efeitos sobre os organismos fotoautotróficos aquáticos, como macrófitas aquáticas (Pflugmacher, 2002; Jiang *et al.*, 2011; Zheng *et al.,* 2013) e microalgas (Campos *et al.,* 2013; Bittencourt *et al*., 2015 a; Wang *et al*., 2017). Dentre os efeitos para as macrófitas aquáticas estão a redução da biomassa e o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs). Já para o fitoplâncton os efeitos são diversos, incluindo mudanças morfológicas, inibições de crescimento, modulações de pigmentos fotossintéticos e aumento na respostas antioxidantes (BÁRTOVÁ *et al*., 2011; CAMPOS *et al.,* 2013).

El-Sheekh, Khairy e El-Shenody (2010), observaram que os extratos brutos de *M. aeruginosa* produtora de MCs inibiu o crescimento de *Scenedesmus obliquus, Oscillatoria angutissima, Anabaena* sp e *Chlorella vulgaris* nas quatro concentrações de MCs testadas (25, 50, 100 e 200 $\mu g.L^{-1}$). Já Figueiredo, Giani e Bird (2007), realizaram um experimento onde foi avaliada a inibição da fotossíntese de *M. aeruginosa, Coelastrum sphaericum* e *Monoraphidium contortum* utilizando exsudatos de culturas de *Cylindrospermopsis raciborskii.*

Ainda em relação as MCs, estudos recentes demonstraram que outros metabolitos secundários, que são liberados extracelularmente, como os LPS, também mostram efeitos alelopáticos em algumas espécies de microalgas (VIKTÓRIA *et al.,* 2015; CIRÉS; BALLOT, 2016, HARKE *et al*., 2016). Zheng e colaboradores (2013) e Xu e outros (2016) por exemplo, em seus estudos utilizando macrófitas aquáticas identificaram que a germinação e o crescimento de plântulas foram interrompidos quando submetidos aos exsudatos de *M. aeruginosa*. Enquanto que no estudo realizado por Bártová e colaboradores (2011), ao utilizar concentrações de microcistinas (300µg / L^{-1}) acima do que é comumente detectado no ambiente, os autores identificaram que os extratos de MCs, não ocasionaram efeito negativo no crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata;* entretanto esta alga apresentou respostas significativas no que se refere ao aumento do estresse oxidativo.

Em relação a biossíntese de cianotoxinas, as condições ambientais aos quais as cianobactérias estão expostas também devem ser levados em consideração. De acordo com Leflaive e colaboradores (2007), a luz e as concentrações de nutrientes (nitrogênio e fosforo) também podem influenciar na produção de cianotoxina. Outro fator que também deve ser considerado durante essa biossíntese e a densidade populacional e que fase de crescimento compreende o inóculo (Wang *et al*, 2017).

Wang e colaboradores (2017), em seu trabalho analisou os possíveis efeitos alelopáticos dos exsudatos durante três fases de crescimento da cultura de *Microcystis aeruginosa* em três microalgas (*Scenedesmus quadricauda, Chlorella pyrenoidosa* e *Cyclotella meneghiniana*). Os autores relatam que o crescimentos das três algas utilizadas no estudo, foram inibidos ao serem submetidas aos exsudatos provenientes da fase exponencial e estacionária da cultura de *M. aeruginosa,* enquanto que as cepas expostas ao exsudato da fase de declínio aumentaram seu crescimento significativamente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos alelopáticos do exsudato de *M. aeruginosa* (Kützing) Kützing, com e sem toxina (MCs^+ e MCs^-), sobre a fisiologia de *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos das diferentes concentrações do exsudato da linhagem *M. aeruginosa* tóxica, sobre o crescimento e o biovolume de *Scenedesmus acuminatus*;
- Investigar se diferentes concentrações do exsudato de *M. aeruginosa* da linhagem não tóxica exercem efeito inibitório sobre o crescimento e o biovolume da espécie -alvo;
- Avaliar os efeitos promovidos pelos exsudatos de *Microcystis aeruginosa* sobre indicadores do estado fisiológico (clorofila *a* e estresse oxidativo) da cepa de *Scenedesmus acuminatus*.

4 METODOLOGIA

4.1 LINHAGENS UTILIZADAS

Foram selecionadas duas cepas de cianobactérias: *Microcystis aeruginosa,* produtora de microcistina (MC^+/BCCUSP232) e *Microcystis aeruginosa* não produtora de toxina (MC^-/BCCUSP03) as quais foram, gentilmente doadas pelo Laboratório de Cianobactérias – ESALQ/USP, coordenado pela professora Drª. Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira. Tais cepas foram selecionadas para o referido estudo, uma vez que de acordo com a literatura, tal espécie tem a capacidade de produzir compostos alelopáticos que propiciam respostas estimulatórias ou nulas em organismos-alvo.

Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing, é uma espécie colonial, cosmopolita e que comumente forma florações em ambientes eutrofizados. Possui envelope mucilaginoso incolor envolvendo as células esféricas (BICUDO; MENEZES, 2006). Quando cultivada em laboratório, *M. aeruginosa* perde a característica colonial e cresce como células esféricas livres (Figura 02).

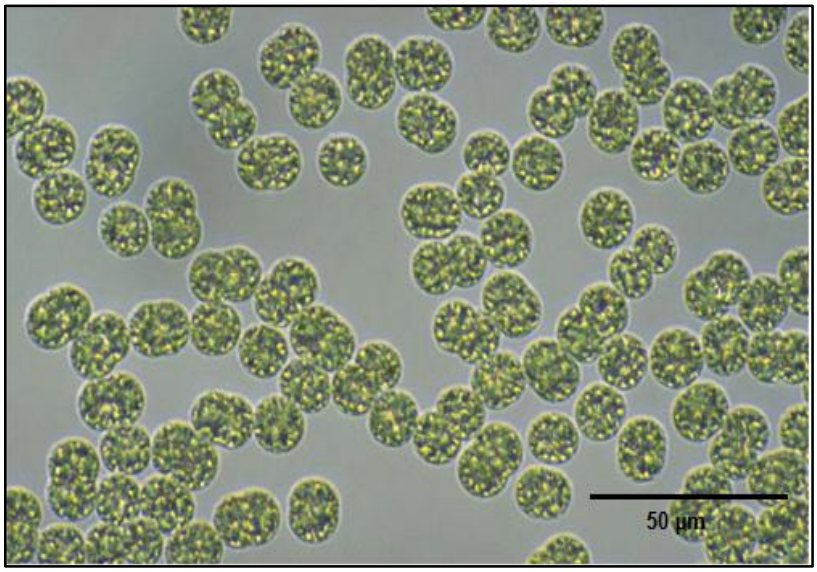

Figura 02: *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, cultivada em meio ASM1

O organismo – alvo selecionado para este estudo foi a microalga *Scenedesmus acuminatus* (Figura 03), por ter uma distribuição cosmopolita e ser resistente a variações ambientais, possuir um rápido crescimento e por esta razão, muitas vezes ser dominante no fitoplâncton dulcícola (GODINHO; GONZÁLES; BICUDO, 2010).

Scenedesmus acuminatus (Lagerheim) Chodat, tem distribuição cosmopolita, é uma espécie colonial cenóbio formado por quatro ou oito células, dispostas linear ou alternadamente. Suas células externas, podem ser lunadas ou curvadas acentuadamente para fora do cenóbio (GODINHO; GONZÁLEZ; BICUDO, 2010). Essa espécie foi isolada de amostras coletadas na Lagoa Juara, Serra - ES, no Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC).

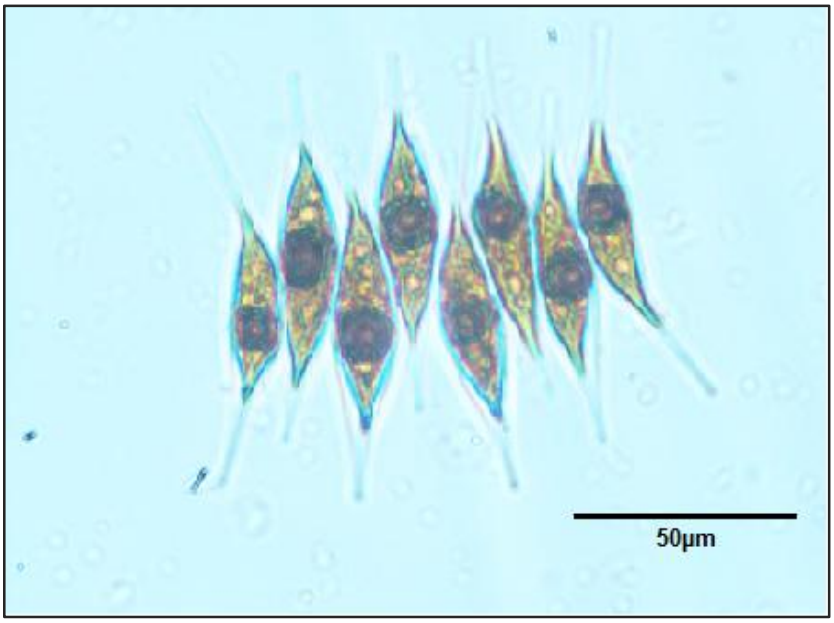

Figura 03: *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat, cultivada no meio ASM1.

4.2 CONDIÇÕES DO CULTIVO

Foram cultivados em torno de 20L de ambas as cepas de *Microcystis aeruginosa* (MC^+ e MC^-) as quais foram mantidas em erlenmeyers de 5L em meio líquido ASM1 (GORHAN; MCLACHLAN; HAMMER, 1964) previamente esterilizados, com aeração constante, pH estabilizado inicialmente entre 7,4 mantidos em câmaras climáticas Eletrolab, modelo EL202/3, utilizando lâmpadas fluorescentes de 40w do tipo *daylight* com intensidade luminosa ($40 \mu mol.m^2.s^{-1}$), fotoperíodo (14:10h, claro: escuro) e temperatura (22 ± 1°C) controlados, pelo período de um mês para aclimatação.

O aumento de biomassa dos inóculos de *Scenedesmus acuminatus*, seguiram as mesmas condições de cultivo citadas acima, com exceção de que as cepas foram mantidas na sala de cultivo, com fotoperíodo de 12h de claro: escuro, durante 30 dias.

4.3 MEIO DE CULTURA

Neste experimento o meio de cultura utilizado é caracterizado como definido, por ser preparado a partir de água destilada com adição dos constituintes nutricionais (elementos químicos) como; vitaminas, sais inorgânicos macro e micronutrientes de modo enriquecer a água destilada, para estimular o crescimento das microalgas (LOURENÇO, 2006).

O meio ASM1 (Tabela 01) é composto por quatro soluções estoque (A, B, C e D) que são previamente preparadas. A cada preparação de 1L de meio de cultura é necessário adicionar as soluções estoques A, B, C e D nas respectivas proporções 20 mL, 2mL, 0,1 mL e 0,4 mL e completar com água deionizada até chegar a 1L.

Tabela 1 – Composição e concentração das soluções-estoque do meio ASM1.

Solução Estoque A	**Peso (g)**		**Para cada litro de ASM -1**
$NaNO_3/NH_4Cl_2$	1,70		
$MgCl_2.6H_2O$	0,41	Completar para 200 mL	20 mL
$MgSO_4.7H_2O$	0,49		
$CaCl_2.2H_2O$	0,29		
Solução Estoque B			
K_2HPO_4	0,87	Completar para 100 mL	2 mL
$Na_2HPO_4.7H_2O$	1,33		
Solução C			
H_3BO_3	2,48		
$MnCl_2.4H_2O$	1,39		
$FeCl_3.6H_2O$	1,08	Completar para 100 mL	0,1 mL
$ZnCl_2$	0,335		
$CoCl_2.6H_2O$	0,019		
$CuCl_2.2H_2O$	0,0014		
Solução D			
EDTA. Na_2	1,86	Completar para 100 mL	0,4 mL

Fonte: Modificado de Gorhan, Mclachlan e Hammer (1964).

4.4 OBTENÇÃO DO EXSUDATO

Para a realização deste experimento, foram preparadas previamente cinco réplicas de cada uma das cepas *Microcystis aeruginosa* (MC^+ e MC^-) em erlenmeyers de 5L cada, nas condições de cultivo já mencionadas para a obtenção dos exsudatos. As linhagens foram cultivadas até a fase exponencial de crescimento, o qual foi contabilizada densidade celular de aproximadamente 4,0 x 10^6 cel.ml^{-1}. Posteriormente, os cultivos foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante obtido foi submetido a filtração à vácuo em filtros de fibra de vidro GF1

com diâmetro de 45 mm, previamente esterilizados e secos. Após a obtenção dos exsudatos, as amostras foram submetidas ao teste de imunoensaio (ELISA) para a determinação da concentração de microcistina totais. Ao final desta etapa, o exsudato obtido foi estocado na geladeira com temperatura de 4°C até o momento de sua utilização.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MICROCISTINA NO EXSUDATO

Para determinar as concentrações totais de microcistina (MCs) dos exsudatos obtidos, foram retiradas alíquotas de 2 ml de cada cultura. Posteriormente, essas amostras foram submetidas a um teste de imunoensaio (ELISA - Ensaio do imuno adsorvente ligado à enzima) utilizando kit placa específico para microcistinas (BEACON, Portland, USA). As amostras foram analisadas em duplicata e o procedimento foi desenvolvido de acordo com as recomendações do fabricante, conforme os seguintes passos: 1° passo - foram adicionados 50µL de conjugado microcistina-enzima em cada poço da placa e, em seguida foram pipetados 50µL dos calibradores, do controle e das amostras; 2° passo - 50µL de solução de anticorpo foram adicionados em cada poço e, em seguida o conteúdo da placa foi misturado manualmente em movimentos de “8” durante 1 min; 3° passo – os poços foram envolvidos com papel filme e incubados durante 30min a temperatura ambiente; 4° passo – após este período, os poços foram lavados com solução de lavagem do kit e, posteriormente, foram adicionados 100µL de substrato em cada poço e, novamente, o conteúdo foi misturado e incubado por mais 30min; 5° passo – Depois da incubação, foram pipetados 100µL de solução “stop” (ácido clorídrico a 1N) em cada poço.

Para a leitura das amostras utilizou-se a leitora de placas Asys, modelo Expert Plus no comprimento de onda de 450nm. A faixa de detecção do kit é de 0,1 a 2,0 partes por bilhão (ppb), sendo uma curva de calibração gerada após as análises. Para valores acima do limite de detecção do kit, foram realizadas diluições das amostras com água deionizada.

4.6 PREPARAÇÃO DO EXSUDATO E ADIÇÃO AOS MEIOS DE CULTURA

A concentração de MCs no exsudato tóxico após a análise foi de 195,5 $\mu g.L^{-1}$. A partir desse valor os exsudatos foram então diluídos em três concentrações 0, 5 $\mu g.L^{-1}$, 1,0 $\mu g.L^{-1}$ e 5,0 $\mu g.L^{1}$ (MCs totais) em meio líquido ASM1 previamente esterilizado. Para os tratamentos sem microcistina (*M. aeruginosa* - BCCUSP03), o exsudato foi

preparado seguindo o mesmo procedimento citado no item 4.4. Os exsudatos provenientes da cepa (BCCUSP03/ MCs^-), foram diluídos em meio liquido ASM1. As concentrações do tratamento não tóxico (0, 5µg.L^{-1}, 1,0 µg.L^{-1} e 5,0 µg.L^{-1} MC^-), seguiram o mesmo padrão do tratamento tóxico.

4.7 DELIAMENTO EXPERIMENTAL

Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 3L contendo o exsudato nas seguintes concentrações 0,5 µg.L^{-1}, 1,0 µg.L^{-1} e 5,0 µg.L^{-1} (MCs^+ e MCs^-) os quais foram misturados a solução nutritiva (meio ASM 1), com aeração constante e pH 7,0 no início do experimento (figura 4). Todos os tratamentos foram mantidos na sala de cultivo com temperatura controlada 22 ± 1°C, intensidade luminosa de (40µmol.m^2.s^{-1}), e fotoperíodo de 12:12h (claro: escuro).

Todos os tratamentos e controle foram realizados em triplicata (n = 3), com densidade celular inicial de 1,0 x 10^5 cel.mL^{-1}. Um esquema de rodízio dos erlenmeyers na sala de cultivo foi estabelecido para garantir a uniformidade total das condições de cultivo. O experimento teve duração de 20 dias.

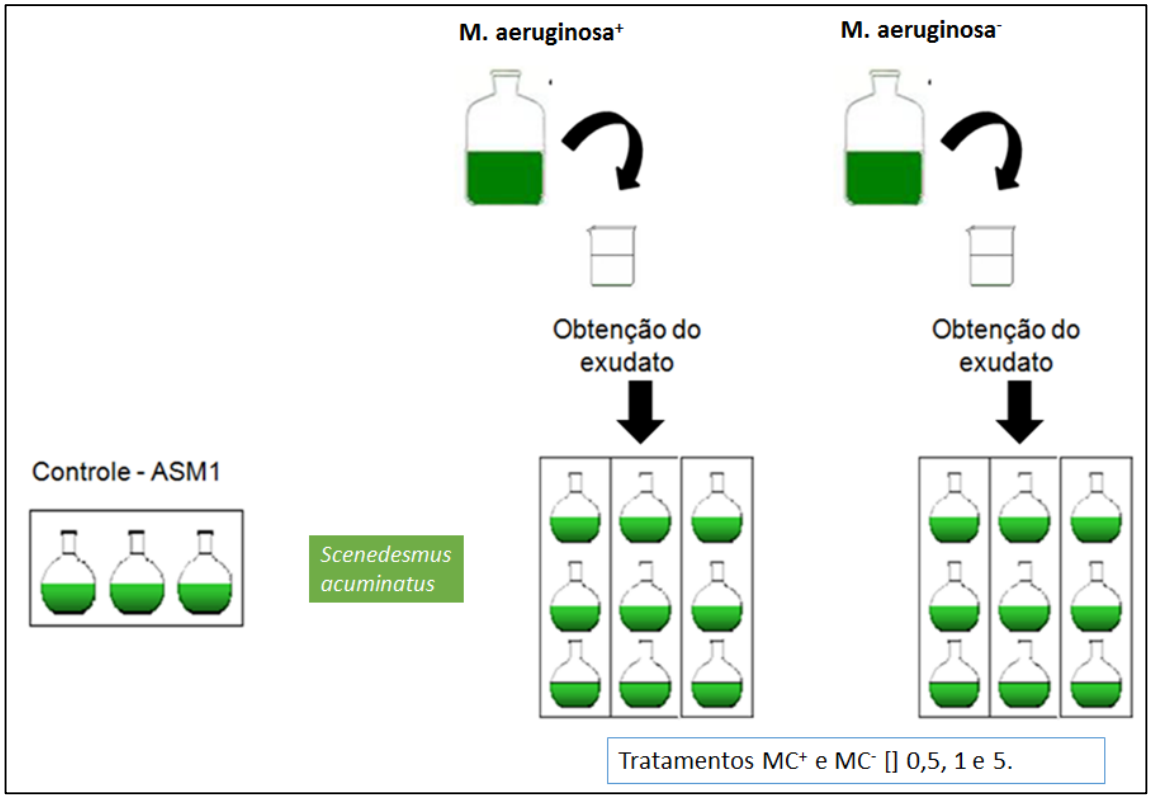

Figura 04: Deliamento experimental.

4.8 COLETA DE DADOS

4.8.1 Densidade celular

Para a determinação da densidade celular de todas as unidades experimentais, alíquotas de 2mL foram retiradas e imediatamente preservadas com lugol acético a 5%, em câmara de fluxo laminar, a cada dois dias.

A estimativa da densidade celular dos cultivos foi realizada por contagem direta em câmara de Fuchs – Rosenthal, por meio do microscópio óptico, sendo necessário contar no mínimo 400 células a partir de um dos 16 quadrados que compõe a câmara. A densidade celular foi expressa em cél.mL^{-1} (LOURENÇO, 2006).

4.8.2 Biovolume

Para determinação do biovolume alíquotas de 2 ml foram retiradas de todas as unidades experimentais nos dias 5°, 10°, 15° e 20° dias de cultivo. Com o auxílio da câmera digital Nikon, modelo DS-Fi2, acoplada ao microscópio de captura de imagem Nikon Eclipse –E200, foram realizados registros fotográficos e medidas no programa Tsview.

O volume celular de *Scenedesmus acuminatus* foi estimado, seguindo a metodologia descrita por Olenina, 2006, onde 20 indivíduos de cada tratamento foram medidos, considerando sua altura e diâmetro. A forma geométrica aplicada para *S. acuminatus* é de um duplo cone. O volume celular médio (µm3) foi calculado utilizando a fórmula abaixo:

$$\mathbf{V = \pi/12 * d^2 * h}$$

Onde:

V = volume

d = diâmetro

h =altura

O biovolume (mm3. L^{-1}) foi calculado multiplicando o volume celular médio (µm3) pelo nº de células contadas (cél.mL-1).

$$\text{Biovolume (mm3. L}^{-1}) = \text{nº de células.mL}^{-1} * \text{volume celular (µm3)} * 10^{-6}$$

4.8.3 Análise de clorofila *a*

O teor de clorofila "*a*" foi determinado quatro vezes durante o experimento por meio de espectrofotometria. As coletas foram realizadas nos dias 5, 10, 15 e 20 de cultivo, seguindo a metodologia descrita por Lourenço (2006). Alíquotas de 25 mL foram retiradas de todas as unidades experimentais e posteriormente foram filtradas em filtro de fibra de vidro GF1 com diâmetro de 45 mm. A extração dos pigmentos se deu através da maceração dos filtros de fibra de vidro, com o material retido, usando acetona 90% a frio como solvente. Após a maceração a solução foi acondicionada em tubos de centrifuga envoltos por papel alumínio e armazenados a 4°C por 24h. Após esse período, o material foi centrifugado e o sobrenadante lido em espectrofotômetro nos comprimentos de onda recomendados. Todo o processo foi realizado na ausência de luz. Para a determinação da concentração de clorofila *'a'* foi utilizada a equação proposta por (LORENZEN, 1967).

4.8.4 Análise de proteínas e estresse oxidativo (CAT, APx e SOD)

A atividade enzimática, bem como a quantificação de proteína total, foi realizada através de amostras coletadas as 24h, 120h, 240h, 360h e 480h após as células-alvos serem submetidas aos tratamentos. Foram retirados alíquotas de 80mL de todas as unidades experimentais, as quais, foram homogeneizadas em tampão de fosfato 0,1 M (pH 6,5) contendo polivinilpirrolidona a 1% (PVP) e centrifugando a 15.000 rpm por 15 minutos, a 4°C.

O sobrenadante contendo o extrato de enzima foi reservado em microtubos e armazenado em ultra freezer (-80°C).

A atividade da Catalase (CAT) foi quantificada por meio da reação composta de 50 µL de amostra, 200 µL de H_2O_2 (12,5mM) e 1700 µL de tampão fosfato Na_2PO_4 (50mM, pH 7,0). As leituras foram realizadas a cada 15s durante 3 minutos, utilizando espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm. Os resultados foram expressos como µmol H_2O_2 min^{-1} mL^{-1}proteína (IBRAHIM *et al.,* 2015; AEBI, 1984).

Para a análise da enzima APx (ascorbato peroxidase) foi preparada uma solução contendo 2000 µL de tampão fosfato (100 mM, pH 7,0), 200 µL de ácido ascórbico (0,5 mM), 200 µL de H_2O_2 (0,1 mM) e 50 µL de amostra. As leituras foram realizadas

em espectrofotômetro a 290nm, durante 3 min, com intervalos de 15 em 15s. Para a determinação da atividade da enzima foi utilizado o coeficiente de extinção molar do ascorbato de 0,0028 µmol cm^{-1} e o resultado expresso em µmol ascorbato min^{-1} mL^{-1} proteína (NAKANO; ASADA, 1981).

A atividade da SOD (superóxido dismutase) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). Para a determinação da atividade bruta da SOD foi preparado meio de reação da enzima contendo 100 µL de tampão fosfato de potássio 0,1mM pH 6,5; 40 mL de metionina 13mM; 40 mL de riboflavina 5,3 mM; 240 mL de água deionizada e 40 mL de NBT.

Posteriormente, em 3 tubos de ensaio foram pipetados 2 mL da solução mista (composta por metionina, riboflavina e NBT) e 100 µL de tampão fosfato pH 6.5 0.1 M. Os três tubos foram envolvidos em papel alumínio e identificados como brancos do escuro, nos quais foram adicionados 100 µl de amostra. Das três medidas foi obtida uma média para branco do escuro. Os tubos branco claro e demais tubos foram pipetados as mesmas concentrações citadas acima, mais 100 µl de amostra. Por fim, os tubos foram mantidos por 10 minutos em câmara de fotorredução (lâmpada fluorescente de 15W). As leituras das amostram foram realizadas por espectrofotometria configurado para o comprimento de onda de 600 nm.

A atividade da SOD foi calculada segundo a fórmula:

SOD = A amostra branco claro / (A amostra – A branco escuro) – 1.

A = absorbância em 600nm.

Para a quantificação das concentrações de proteínas totais solúveis usou-se o kit Quick Start TM Bradford Protein Assay da BIORAD que segue o método descrito por Bradford (1976). Para a leitura em espectrofotômetro, 100 µl de amostra foi adicionado ao tubo de ensaio contendo 5 mL do reagente, o qual foi diluído anteriormente em água deionizada, na proporção de 1:4. O tubo é agitado em vortex e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. A leitura da absorbância é realizada no comprimento de onda de 595 nm. Para os pontos da curva padrão foram realizadas 5 diluições compreendidas na faixa de 0,2 a 0,9 mg/mL de albumina.

4.9 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Por meio dos resultados obtidos através da densidade celular foi possível produzir uma curva de crescimento para cada tratamento, além de, viabilizar os cálculos da taxa de crescimento, do tempo de duplicação e do rendimento máximo das cepas.

A taxa de crescimento (**μ**) e tempo médio de duplicação (**G**) foram calculadas segundo as equações descritas por Fogg e Thake (1987). Os cálculos das taxas de crescimento utilizaram como base os valores compreendidos na fase exponencial do crescimento dos tratamentos.

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1)\,(t_2 - t_1)$$

Onde:

μ = velocidade específica do crescimento

N_1 e N_2 = número de células nos tempos t_1 e t_2

A partir do μ é possível calcular o tempo médio de duplicação:

$$G = \ln_2 / \mu$$

O rendimento máximo (R) de cada tratamento foi determinado através da equação:

$$R = R_1 - R_0$$

Onde:

R_1 = número máximo de células/mL

R_0 = número inicial de células/mL

4.10 TESTES ESTATÍSTICOS

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade, com posterior análise de variância ANOVA seguido de teste de Tukey. Para os dados não paramétricos foi realizado o teste Kruskal - Wallis, ao nível

de ao nível de 5 % de probabilidade. O programa utilizado para a realização dos testes foi o ASSISTAT versão 7.7 beta Universidade Federal de Campina Grande, PB, Brazil (SILVA e AZEVEDO, 2016).

5 RESULTADOS

5.1 DENSIDADE CELULAR

Os exsudatos MCs^+ e MCs^- provocaram diferentes efeitos alelopáticos na densidade celular de *Scenedesmus acuminatus.* As menores concentrações do tratamento MCs^- (0.5 $\mu g.L^{-1}$ e 1 $\mu g.L^{-1}$) não tiveram efeito algum sobre a densidade da cepa alvo utilizada (Figura 05 A), enquanto que as maiores concentrações dos tratamentos tóxicos (MCs^+ 1 $\mu g.L^{-1}$ e 5 $\mu g.L^{-1}$) demostraram ter um efeito inibitório significativo em relação ao controle a partir do 8° dia de cultivo ao nível de 5% de significância (figura 5 B).

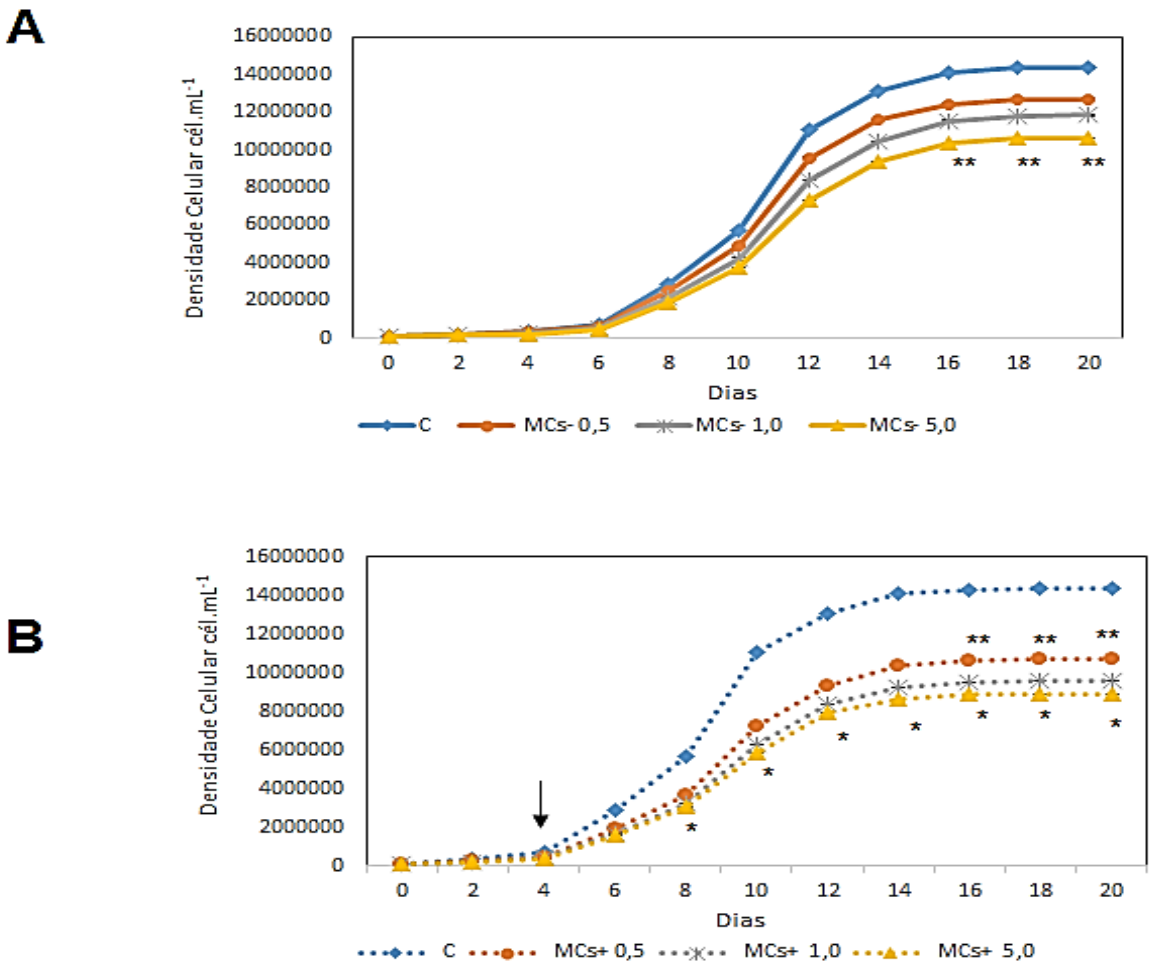

Figura 05: Densidade celular de *Scenedesmus acuminatus*. A: Tratamentos com o exsudato de *M. aeruginosa* – MCs^-. B: Tratamentos com o exsudato de *M. aeruginosa* – MCs^+. Início da fase *lag* para o tratamento MC^+ 5.0 (Seta preta). Diferença significativa de densidade celular entre os tratamentos 1.0, 5.0 MC^+ em relação ao controle (*) e entre os tratamentos MC^- 5.0 e MC^+ 0.5 após o 16° de cultivo (**) $p < 0,05$.

Os tratamentos (MCs^- 5.0 $\mu g.L^{-1}$ e MCs^+ 0.5 $\mu g.L^{-1}$) apresentaram redução na densidade celular de *Scenedesmus acuminatus* a partir do 16° de experimentação em relação ao controle, permanecendo assim, até o último dia de cultivo (Figura 05 A e B).

Note que a fase *lag* (adaptação) do tratamento MCs^+ 5.0 foi mais duradoura, uma vez que esta fase durou 4 dias (Figura 05 "seta preta"), enquanto que, os tratamentos MCs^+ 0.5 e 1 apresentaram uma fase de indução de dois dias e MCs^- 0.5, 1 e 5 não apresentaram esta fase de crescimento.

Quanto a fase exponencial de crescimento, os tratamentos MCs^- 0.5, 1.0 e 5.0 $\mu g.L^{-1}$ e MCs^+ 0.5 $\mu g.L^{-1}$ apresentaram a mesma resposta de crescimento, já que iniciaram esta fase a partir do 4° dia de tratamento. Entretanto os inóculos expostos as concentrações MCs^+ 1.0 e 5.0 $\mu g.L^{-1}$ demostraram crescimento tardio, uma vez que esta fase teve início somente a partir do 6° dia de cultivo. Todos as estirpes iniciaram a fase estacionaria a parti do 16° dia e permaneceram assim, até o fim deste trabalho.

Os valores de taxa de crescimento (μ), tempo de duplicação (G) e rendimento máximo (R) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$) em todas as concentrações testadas (tabela 2).

Tabela 2 - Valores da taxa de crescimento (μ), tempo de duplicação (G) e rendimento máximo (R) para a cultura de *Scenedesmus acuminatus* submetido aos tratamentos com microcistina ($MCs^{+)}$, sem microcistina (MCs^-) e controle.

	μ	G	R
Controle	0,24573 a	2,97602 f	14 $x10^7$ a
MCs^- [0.5 $\mu g.L^{-1}$]	0,23641 b	2,98762 e	12 $x10^7$ b
MCs^- [1.0 $\mu g.L^{-1}$]	0,23292 c	3,02503 d	11 $x10^7$ c
MCs^- [5.0 $\mu g.L^{-1}$]	0,23201 c	3,08868 d	10 $x10^7$ d
MCs^+ [0.5 $\mu g.L^{-1}$]	0,22442 d	3,14330 c	10 $x10^7$ d
MCs^+ [1.0 $\mu g.L^{-1}$]	0,22053 f	3,214729 b	9 $x10^7$ e
MCs^+ [5.0 $\mu g.L^{-1}$]	0,21561 e	3,21901 a	8 $x10^7$ f

* As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

O controle obteve os maiores valores de taxa de crescimento (0,24573) e rendimento máximo (14 x10^7), enquanto que, os ensaios MCs^+ 5.0 e 1.0 µg.L^{-1} apresentaram os menores valores para esses parâmetros (0,21561 e 0,22053) e (8 x10^7 e 9 x10^7) respectivamente.

5.2 BIOVOLUME

A variabilidade do biovolume celular é fortemente influenciado pelas condições de cultivo, as quais, a cepa é submetida. Os resultados deste estudo demostraram, que houve variação significativa do biovolume em todos os tratamentos, nos quatros dias de coleta (tabela 3).

Tabela 3 - Valores de biovolume ($mm^3.L^{-1}$) correspondente as coletas do dia 5°, 10°, 15° e 20° em todas as unidades experimentais.

	Biovolume ($mm^3.L^{-1}$)			
Tratamentos	5°	10°	15°	20°
Controle	82,16 a	143,17a	137,18 a	163,5 a
MCs^- [0.5 µg.L^{-1}]	22,02 c	30,51 b	41,25 b	103,30 b
MCs^- [1.0 µg.L^{-1}]	17,42 c	20,39 c	31,70 c	32,19 c
MCs^- [5.0 µg.L^{-1}]	23,05 c	24,03 c	22,96 c	18,40 d
MCs^+ [0.5 µg.L^{-1}]	34,45 b	30,71 b	26,67 cd	26,43 cd
MCs^+ [1.0 µg.L^{-1}]	32,30 b	23,07 c	20,03 c	19,25 d
MCs^+ [5.0 µg.L^{-1}]	24,03 c	22,39 c	22,24 c	21,62 d

* As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Kruskal- Wallis.

O controle, apresentou os maiores valores de biovolume do início ao final do experimento, 82,16 $mm^3.L^{-1}$ e 163,5 $mm^3.L^{-1}$ respectivamente. No entanto, *S. acuminatus* submetido aos tratamentos com (MCs^+ 0.5, 1.0 e 5.0) e sem (MCs^- 5.0) microcistina apresentou, redução do seu biovolume a partir do 10° dia de exposição ao exsudatos (Figura 06).

O estresse causado pelos tratamentos MCs^+ (1.0 e 5.0) e MCs^- (5.0), foram mais evidentes no último dia de cultivo, uma vez que esses tratamentos apresentaram os menores valores de biovolume (19,25, 21,2 e 18,40 $mm^3.L^{-1}$) em relação as demais concentrações testadas (tabela 3).

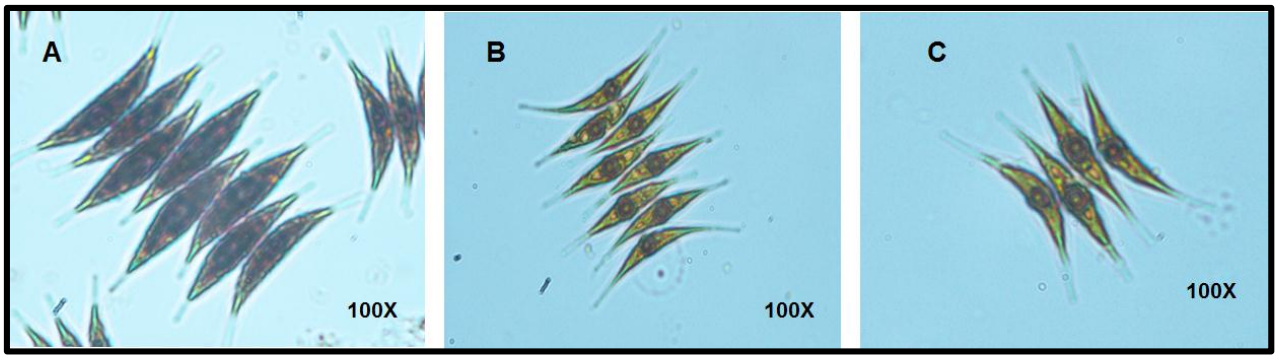

Figura 06: Diferença no biovolume de *Scenedesmus acuminatus* em diferentes tratamentos no 10° dia de cultivo. A – Controle, B – MCs^- 5,0, C – MCs^+ 5,0.

5.3 ANÁLISE DE CLOROFILA *a*

Os valores de clorofila *a*, apresentados na figura 7, correspondem aos dias 05, 10, 15 e 20 de coleta. Houve aumento da clorofila a do 5° ao 10° dia de cultivo em todas as unidades experimentais; sendo que, os maiores valores registrados de clorofila foram observados no 10° dia de cultivo (27,31 e 26,40 $\mu g.mL^{-1}$), nos tratamentos controle e MCs^- 0.5 respectivamente.

A partir do 15° os valores de clorofila *a* na maioria dos tratamentos começaram a decair, os quais, assim permaneceram, até o último dia de coleta. *S. acuminatus* submetida a concentração de MCs^+ 5.0 registrou no 20° dia de cultivo o menor valor de clorofila *a* (3,43 $\mu g.mL^{-1}$) em relação aos demais tratamentos.

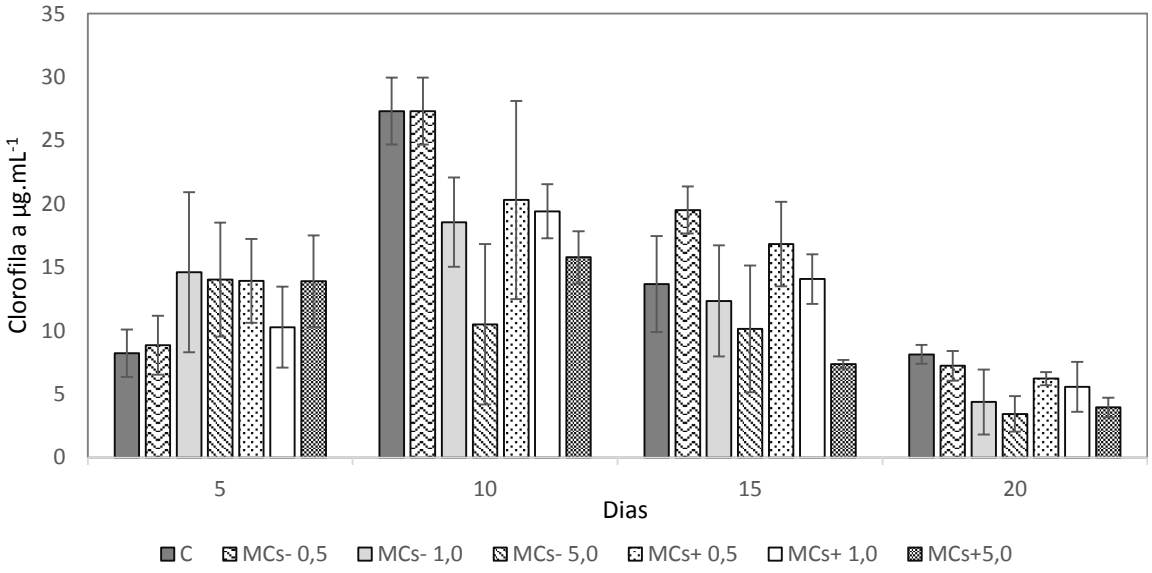

Figura 07: Conteúdo de clorofila '*a*' ($\mu g.mL^{-1}$) correspondente as coletas do dia 5°, 10°, 15° e 20° em todas as unidades experimentais.

5.4 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

O excesso de EROs (espécies reativas de oxigênio) podem causar inúmeras respostas bioquímicas danosas ao organismo. Sendo assim, a ativação de mecanismos de desintoxicação são extremamente necessários, uma vez que o excesso desses radicais livres são provenientes do estresse oxidativo ocasionado por algum fator estressor ao organismo. Enzimas como, a SOD (superóxido dismutase), APx (ascorbato peroxidase) e CAT (catalase) agem em sincronia, neutralizando esses radicais.

Os resultados do presente estudo demostraram que não houve diferença significativa entre os ensaios cultivados na presença (MCs^+ 0,5; 1 e 5) ou ausência (MCs^- 0,5; 1 e 5) de microcistina em relação ao controle, quanto á atividade das enzimas CAT e APx em todos os dias de coleta (figura 8 [a e b]).

A atividade da enzima SOD apresentou aumento nos dias 5, 10 e 15 nos tratamentos na presença de toxicidade (MCs^+ 5; 1 e 0,5), seguido dos tratamentos sem toxicidade (MCs^- 5; 1 e 0,5) respectivamente em relação ao controle (figura 8 c).

Os tratamentos MCs^+ (5.0 e 1.0) registraram os maiores valores da atividade da SOD (48,12 e 41,02 $SOD.ml^{-1}$proteína) respectivamente, a parti do 10° dia e permaneceram assim, até o 15° dia de experimentação.

Já os tratamentos MCs^- (5.0, 1.0 e 0.5) apresentaram menor atividade desta enzima, no 10° e 15° dia de cultivo (34,79, 34,22 e 33,52 $SOD.ml^{-1}$proteína), (29,95, 22,79 e 24,65 $SOD.ml^{-1}$proteína) respectivamente em relação as maiores concentrações do tratamento tóxico. No entanto, no 20° dia de experimentação os tratamentos MCs^+ 5.0 e 1.0 sofreram uma redução na atividade desta enzima em relação ao controle.

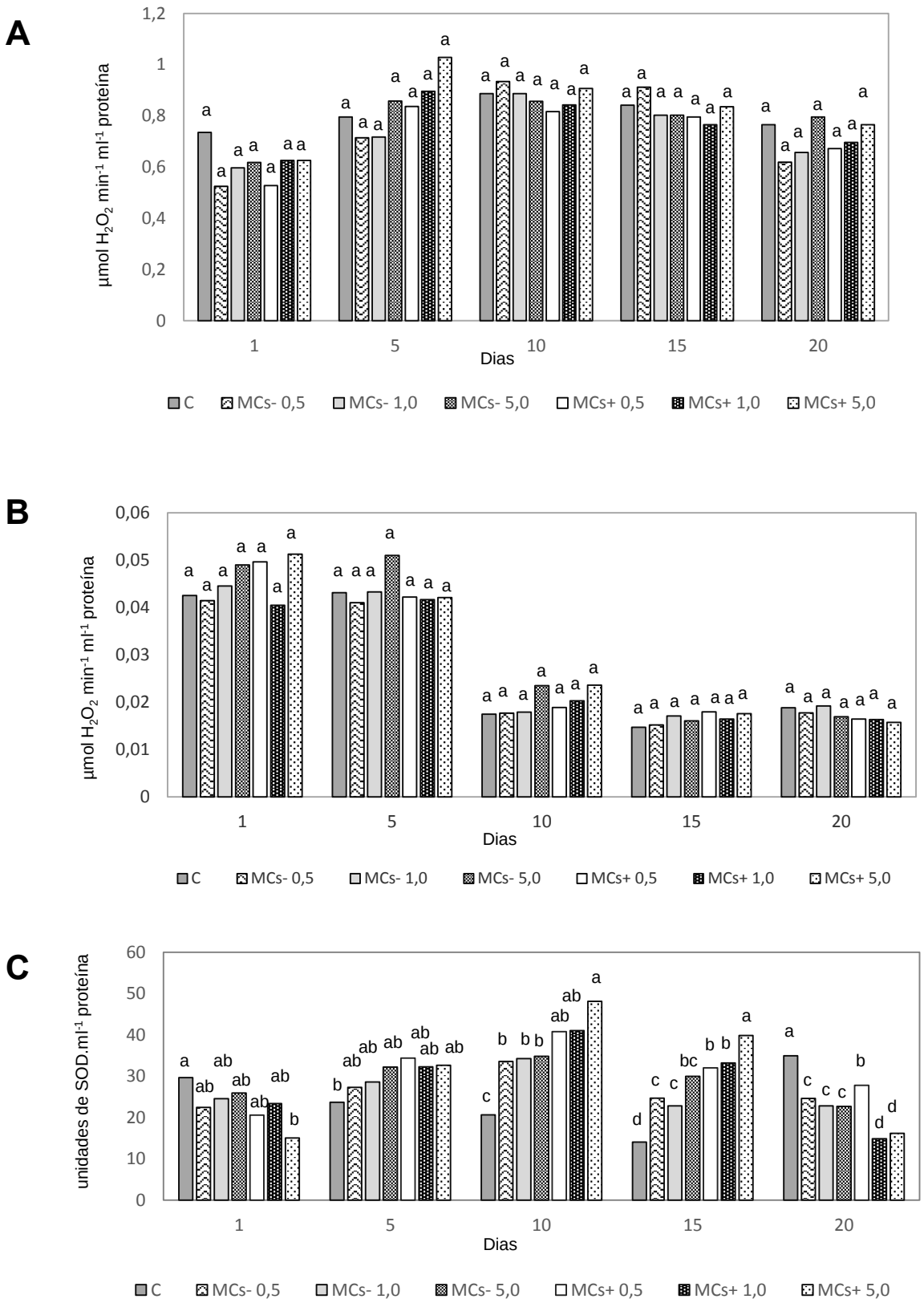

Figura 08: Atividade enzimática do cultivo de *Scenedesmus acuminatus* exposta ao exsudato de *M. aeruginosa* (MCs^+ e MCs^-). A - atividade da catalase. B - atividade da APx. C - atividade da SOD. As médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Os exsudatos MCs^+ e MCs^- não demostraram um padrão de resposta alelopática no que se refere a densidade celular de *Scenedesmus acuminatus*, visto que, a cepa-alvo utilizada responde de forma heterogênea ao estresse provocado pela toxina (Figura 05 a e b). Ou seja, os resultados demonstram que *Scenedesmus acuminatus* ao ser cultivada nas maiores concentrações de exsudato na presença de microcistina (MCs^+ 5,0 e 1,0), obteve os menores valores de densidade celular (8 $x10^7$ e 9 $x10^7$ $cel.ml^{-1}$), respectivamente, em relação ao controle (14 $x10^7$ $cel.ml^{-1}$) (Figura 05 b).

Babica e colaboradores (2007) em seu estudo, ao utilizar concentrações de até 10 $\mu g.L^{-1}$ de MC-LR e MC- RR não obteve diferenças significativas no crescimento de várias espécies de microalgas. Já no presente estudo, concentrações abaixo do que foi utilizadas por Babica, apresentaram efeitos inibitórios no crescimento de *Scenedesmus acuminatus* a partir de 1.0 $\mu g.L^{-1}$ de exsudato na presença de MCs (Figura 05 b).

Os efeitos negativos provenientes dos aleloquímicos liberados no exsudato tóxico a partir de 1.0 $\mu g.L^{-1}$ são preocupantes, já que a Organização Mundial de Saúde, estabelece como limite máximo aceitável para microcistina na água destinada ao consumo humano o valor de 1.0 $\mu g.L^{-1}$, entretanto, como podemos observar neste trabalho, concentrações a partir desse valor limite já demonstra ser nociva ao crescimento da cepa-alvo testada.

Os resultados do presente estudo, demostram que existe uma correlação forte entre a redução da densidade celular da estirpe utilizada e as concentrações de MCs^+ as quais foram submetidas, visto que, o incremento celular de *Scenedesmus acuminatus* é reduzido a medida que aumenta as concentrações dos exsudatos na presença de MCs.

Wang e colaboradores (2017), observaram uma inibição no crescimento de *Scenedesmus quadricauda* em torno de 50% em relação ao controle, nas maiores concentrações provenientes do exsudatos de *M. aeruginosa* produtora de MCs. Estes resultados evidenciam que, os aleloquímicos provenientes dos exsudatos com maiores concentrações de microcistinas, tendem a ocasionar efeitos inibitórios no crescimento da cepa-alvo.

El-Sheekh, Khairy e El-Shenody (2010), relatam respostas semelhantes ao que foi obtido neste trabalho. Os autores testaram extratos brutos de *M. aeruginosa* em quatro espécies de microalgas (*Scenedesmus obliquus, Oscillatoria angutissima, Anabaena* sp. e *Chlorella vulgaris*) e observaram que o efeito inibitório, proveniente do extrato bruto de MCs, foi mais potencializado nas maiores concentrações (25, 50, 100 e 200 $\mu g.L^{-1}$) testadas.

Os tratamentos MCs^- 0.5 e 1.0 não apresentaram influência inibitória significativas sobre o crescimento de *Scenedesmus acuminatus* (Figura 05 a). Os resultados do presente estudo, corroboram com os de Bittencourt e colaboradores (2015 a), ao testar extratos brutos de *M. aeruginosa* (MCs^- 5.0 e 10 $\mu g.L^{-1}$) no crescimento de *Scenedesmus acuminatus* e *Monoraphidium convolutum*, observaram que ambos os extratos não apresentaram efeito inibitório significativo nas cepas investigadas. Leão, Vasconcelos e Vasconcelos (2008) relatam o mesmo padrão de resposta, uma vez que, os exsudatos de *Cylindrospermopsis raciborskii* não causou nenhum efeito alelopatico no crescimento de *Ankistrodesmus falcatus.*

Scenedesmus acuminatus apresentou uma redução na densidade celular em relação ao controle a partir do 16° dia de experimentação nos tratamentos MCs^- (5.0) e MCs^+ (0.5) (Figura 05 a e b). A inibição do crescimento desta estirpe pode estar associada a outras condições da cultura como o déficit de nutrientes e o auto sombreamento que, somados a presença de aleloquímicos, podem agir de forma sinergética, inibindo o crescimento celular.

As espécies de fitoplâncton expostas a cianotoxina podem responder de forma variada ao potencial aleloquímico ao qual estão sendo cultivadas. Nos trabalhos de Campos e colaboradores (2013), Pinheiro e colaboradores (2013) e Bittencourt e outros (2013), por exemplo, foi possível observar que espécies de fitoplâncton utilizadas em todos os trabalhos responderam de forma heterogênea quanto ao estímulo ou inibição do crescimento, quando submetidas aos extratos brutos de cianotoxinas. Ou seja, dependendo da sensibilidade do organismo-alvo utilizado, o efeito provocado pelo aleloquímico pode ser estimulador, inibidor ou nulo ao crescimento.

Em relação aos efeitos das MCs^+ e MCs^- na fases de crescimento de *Scenedesmus acuminatus*, o tratamento MCs^+ 5.0 foi o que apresentou a maior fase de adaptação, uma vez que este inóculo iniciou a fase *log* apenas no 6° dia de cultivo, contrariando

os resultados obtidos por Mohamed (2008), que relatou resposta inibitória inicial das culturas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus quadriculata* expostas a extratos brutos de MC-LR durando apenas três dias. Esses resultados evidenciam que os aleloquímicos provenientes do exsudato MCs^+ 5, mesmo no início do tratamento, demostram ter efeitos inibitórios no crescimento da cepa- alvo testada.

Quanto a taxa de crescimento (µ), tempo de duplicação (G) e rendimento máximo (R), todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$) (tabela 2). As cepas submetidas ao controle obtiveram os maiores valores de taxa de crescimento (0,24573), e rendimento máximo (14 $x10^7$). Os tratamentos MCs^+ 5.0 e 1.0 apresentaram as menores taxas de crescimento (0,21561 e 0,22053) o maior tempo de duplicação (3,21901 e 3,214729) e o menor rendimento máximo (8 $x10^7$ e 9 $x10^7$ $cel.ml^{-1}$) em relação as demais culturas testadas, demostrando que esses parâmetros estão diretamente relacionados ao estresse ocasionado pela concentração de microcistina no exsudato utilizado. Ou seja, em condições normais de cultura, a densidade celular de um determinado organismo tende a aumentar com o passar dos dias. Ao passo que, quanto maior for a concentração de microcistina em que a célula-alvo for submetida, menor será seu rendimento celular (tabela 2).

Apesar dos tratamentos MCs^+ (1.0 e 5.0) terem demonstrado efeito potencializado na inibição do crescimento de *Scenedesmus acuminatus*, os tratamentos MCs^- 5.0 e MCs^+ 0.5 também demonstraram, em alguns dias de cultivo, afetar de forma negativa o incremento celular da linhagem-alvo (Figura 05 a e b). Os resultados do presente estudo foram similares àqueles obtidos por Bittencourt e colaboradores (2015 a); onde ao testarem a co-cultura de *M. convolutum* com cepas de *Microcystis aeruginosa,* produtora e não produtora de toxinas, registraram decréscimo no crescimento da alga testada em 50% em ambos os tratamentos (MC^+ e MC^-).

Tais diferenças no crescimento podem ser explicadas por possíveis interações (antagonismo ou sinergismo) das microcistinas com outros compostos presentes no exsudado como, por exemplo, os lipopolissacarídeos. Além disso, alguns autores (BABICA *et al*., 2007; BITTENCOURT *et al*., 2013; WANG *et al*. 2017) acreditam que a sensibilidade das espécies-alvo testadas a um determinado aleloquímicos seja espécie-especifico, ou seja, existem outros fatores como: a adaptação genética, condições da cultura e a ativação de mecanismos de enzimas de defesa do estresse oxidativo que agem como mecanismos de proteção ao agente estressor.

Em relação ao biovolume, as culturas presentes no controle apresentaram-se saudáveis durante todo o experimento, sendo observada uma coloração verde claro no início do ensaio que com o passar dos dias tornou-se verde escuro em todas as unidades experimentais.

Os resultados obtidos de biovolume foram equivalentes aos que foram registrados na curva de crescimento, sendo que as colônias presente no ensaio MCs^+ 5,0 obtiveram o menor resultado, seguido dos tratamentos MCs^+ 1.0 e MCs^- 5.0, como mostra a tabela 3.

De forma geral, as colônias de *Scenedesmus acuminatus* submetidas ao exsudato com e sem (MCs) apresentaram, no início do experimento, colônias com 4 células e um pirenoide, mais ou menos central, na maioria das células. Os ensaios tóxicos MCs^+ (0.5, 1.0 e 5.0), bem como o ensaio não toxico MCs^- (5.0) apresentavam valores inferiores de biovolume em relação ao controle desde o início do experimento.

A partir do 10° dia de experimentação, os efeitos dos aleloquímicos presentes no exsudato sobre o biovolume de *Scenedesmus acuminatus,* em relação ao controle, foram mais expressivos. Enquanto o controle apresentava 143,17 $mm^3.L^{-1}$ de biovolume, os tratamentos MCs^+ (0.5, 1.0 e 5.0) e MCs^- (5.0) registraram valores médios de (30,71, 23,07, 22,39 e 24,03 $mm^3.L^{-1}$), respectivamente.

Estes valores foram semelhantes aos que foram obtidos por Duker e colaboradores (2013), onde ao cultivar duas clorofíceas (*Scenedesmus obliquus e Oocystis marsonii*) em cultivos mistos com *M. aeruginosa*, observaram que ambas as algas sofreram redução significativa em seus volumes celulares em relação ao controle. *Oocystis marsonii*, por exemplo, apresentou no controle volumes celulares inicias e finais de 7 a 100 $mm^3. L^{-1}$, respectivamente, enquanto que na cultura mista seu volume celular no último dia de experimento não passou de 14 $mm^3.L^{-1}$.

No presente estudo, os ensaios MCs^+ (1.0 e 5.0) e MCs^- (5.0), apresentaram os menores valores de biovolume (18,40, 19,25 e 21,2 $mm^3.L^{-1}$), respectivamente, no último dia de coleta (tabela 3). Sendo assim, o que se pode inferir a partir desses resultados é que o biovolume, assim como a densidade celular, foi fortemente influenciado pelos aleloquímicos presentes no exsudato de *Microcystis aeruginosa.*

Quanto ao teor de clorofila *'a'*, todos os tratamentos apresentaram aumento nas concentrações desse pigmento do 5° ao 10° de cultivo. Entretanto, a partir do 15° dia,

os valores de clorofila ‘*a’* na maioria dos tratamentos decaíram, permanecendo assim, até o último dia de coleta.

O declínio no teor de clorofila é dependente do aumento das concentrações nas quais as cepas-alvo foram expostas. *S. acuminatus*, por exemplo*,* reduziu expressivamente seu teor de clorofila após 15 dias de exposição ao exsudato toxico (MCs^+ 5.0), chegando a atingir valores médios de 3,93 $\mu g.mL^{-1}$ no último dia de cultivo (Figura 07).

Os resultados registrados neste experimento, foram semelhantes àqueles registrados por Chia e colaboradores (2015), que ao testar concentrações de 6.25, 12.50, 25 e 50 $\mu g.L^{-1}$ de anatoxina ‘a’ purificada (ATX) em *M. aeruginosa,* observaram que o teor de clorofila *‘a’* da referida alga, reduziu de forma dependente da concentração, ou seja, o declínio na concentração de clorofila *‘a’* foi maior nas estirpes expostas a elevadas concentrações de ATX.

A fitotoxicidade das MCs^+ nos teores de clorofila *‘a’*, também foram registrados em outros organismos fotoautotróficos aquáticos. As macrófitas aquáticas *Potamogeton malaianus* e *Potamogeton crispus* demostraram uma diminuição no teor de clorofila *‘a’* após serem submetidas aos exsudatos tóxicos de *Microcystis aeruginosa (*ZHENG *et al*., 2013; XU *et al.*, 2016*).*

O declínio da concentração de clorofila *‘a’* pode acarretar uma série de prejuízos a cepa-alvo, afetando principalmente a fotossíntese e, possivelmente, as reações de fixação de carbono. O aumento no teor de clorofila *‘a’* no 5° e 10° dia de cultivo, pode estar relacionado a ativação do complexo de defesa das enzimas antioxidantes que atuam inibindo o excesso de EROs provenientes do estresse oxidativo ocasionado pela exposição da cepa-alvo aos exsudatos. No entanto, a redução da clorofila *‘a’* no último dia de experimento, indica que a atividade de resposta dessas enzimas começou a decair, mostrando que provavelmente houve um dano no aparelho fotossintético desses indivíduos.

Kummerova e outros (2006) e Vánová e colaboradores (2009) relatam que os aleloquímicos provenientes de cianobactérias demostram em vários estudos a inibição do PSII e PSI através do bloqueio de elétrons. Sendo assim, é possível inferir que o comprometimento no teor de clorofila *‘a’*, está associado ao aumento dos níveis de H_2O_2 dentro das células que resultam na inibição de uma série de enzimas fotossintéticas, como frutose bisfosfatase, ribulose fosfato quinase e ribulose

bisfosfato carboxilase (Rubisco), o que provoca redução significativa em todo o processo fotossintético (DUMMERMUTH *et al*., 2003; MIKULA *et al.,* 2012).

Das enzimas analisadas, CAT e APX não apresentaram um aumento significativo em sua atividade entre os ensaios cultivados na presença (MCs^+ 0.5, 1.0 e 5.0) ou ausência (MCs^- 0.5; 1.0 e 5.0) de microcistina em relação ao controle (Figura 08 a e b).

Enquanto que a SOD registrou aumento da sua atividade em todos os ensaios em contato com o exsudato na presença ou ausência de MCs a partir do 5° dia de experimentação (Figura 08 c). Então, o aumento na produção de EROs nos ensaios de *S. acuminatus* provenientes dos aleloquímicos presentes nos exsudatos desencadeou a ativação do complexo antioxidante. O aumento mais significativo da atividade desta enzima, foi registrado nos dias 10° e 15° nos tratamentos tóxicos MCs^+ 5, 1 e 0,5, respectivamente (Figura 08 c). Tais resultados estão de acordo com os obtidos por Chia e colaboradores (2015), que ao expor *M. aeruginosa* durante 120h à cianotoxina ATX, registrou aumento da atividade da SOD nos tratamentos que apresentavam as maiores concentrações de toxina.

O aumento significativo da atividade da SOD nos tratamentos em contato com o exsudato, em relação ao controle, pode esta relacionado ao fato desta enzima estar presente nos cloroplastos e mitocôndrias, sendo portanto, ativada primeiro na linha de defesa contra o estresse oxidativo (MALLICK; MOHN, 2000; ALSCHER *et al.,* 2002). A alta atividade SOD observada em resposta à exposição as MCs implicou em uma produção aumentada do radical superóxido. Isso ocorre porque SOD atua catalisando a transformação do superóxido em peróxido de hidrogênio, protegendo as células dos efeitos tóxicos desses radicais (ALSCHER *et al.,* 2002).

A resposta antioxidante observada nas cepas de *Scenedesmus acuminatus*, após a exposição as MCs, pode explicar como a referida alga foi capaz de suportar o efeito da toxina em alguns dias de cultivo.

No entanto, no 20° dia de experimentação os tratamentos MCs^+ 5.0 e 1.0 sofreram uma redução na atividade desta enzima em relação ao controle, esses resultados evidenciam que provavelmente houve um aumento do estresse oxidativo de modo que esta enzima não conseguiu mais conter os danos causados.

7 CONCLUSÕES

Com base nas respostas fisiológicas de *Scenedesmus acuminatus,* submetidos aos exsudatos MCs^+ e MCs^-, conclui-se que os ensaios expostos às menores concentrações de MCs^- (0.5 e 1.0 $\mu g.L^{-1}$) não promoveram nenhum efeito inibitório no crescimento de *S. acuminatus.* No entanto, as maiores concentrações dos exsudatos MCs^+ (5.0 e 1.0 $\mu g.L^{-1}$) utilizadas, acarretaram reduções expressivas no crescimento da referida alga.

S. acuminatus demonstrou maior sensibilidade nas maiores concentrações dos exsudatos tóxicos MCs^+ (5.0 e 1.0 $\mu g.L^{-1}$) quanto ao biovolume e teor de clorofila *'a'*. Porém, o exsudato não tóxico, em sua maior concentração, MCs^- (5.0 $\mu g.L^{-1}$), também mostrou exercer potencial alelopático no biovolume da cepa testada, refutando assim, a hipótese deste estudo, visto que, os tratamentos MCs^+ 1.0 e MCs^- 5.0 demostram efeitos inibitórios no crescimento, biovolume e teor de clorofila *'a'* da cepa-alvo.

Além disso, foi possível verificar um aumento da atividade da enzima SOD em todos os tratamentos. A ativação de mecanismos de desintoxicação observados nas cepas de *Scenedesmus acuminatus,* após a exposição às MCs, pode explicar os mecanismos através dos quais essa alga foi capaz de suportar o efeito da toxina, em alguns dias de cultivo.

Os resultados obtidos neste estudo são preocupantes, principalmente no que se refere a fitotoxicidade das MCs em relação ao organismo teste, uma vez que 1.0 $\mu g.L^{-1}$, valor máximo aceitável de microcistina na água destinada ao consumo humano, já apresenta efeitos nocivos ao crescimento da cepa-alvo testada.

Sendo assim, este estudo propõe que mais estudos sejam realizados a fim de entender o potencial alelopático desses metabólicos, visto que, as respostas bioquímicas desencadeada por esses aleloquímicos pode mudar de acordo com a espécie cultivada, condições de cultivo e quantidade de toxina disponível.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALSCHER, R. G *et al*, Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

ALVES, F. B. **Aspectos ecofisiológicos das cianobactérias em uma lagoa costeira urbana (LAGOA JUARA, SERRA, ES).** 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015.

ARÁOZ, R; MOLGÓ, J; DE MARSAC, N. Tandeau. Neurotoxic cyanobacterial toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 5, p. 813-828, 2010.

AZEVEDO, S. M. F.O. *et al.* Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. **Toxicology**, v. 181, p. 441-446, 2002.

BABICA, Pavel et al. Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. **Phycologia**, v. 46, n. 2, p. 137-142, 2007.

BÁRTOVÁ, K. *et al*. 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, 2011.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do brasil**: Chave para identificação e descrições. 2. ed. São Carlos: Rima, 2006.

BITTENCOURT- OLIVEIRA, M C. *et al*. Allelopathic interactions between microcystin-producing and non-microcystin-producing cyanobacteria and green microalgae: implications for microcystins production. **Journal of applied phycology**, v. 1, n. 27, p. 275-284, 2015, a.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C *et al.* Effects of toxic and non-toxic crude extracts on different *Microcystis* species (Cyanobacteria). **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 21, p. 2596-2600, 2013.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. *et al*. Sensitivity of salad greens (*Lactuca sativa L*. and *Eruca sativa* Mill.) exposed to crude extracts of toxic and non-toxic cyanobacteria. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 273-278, 2015, b.

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, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

BRASIL. Portaria 518, de 25 de março de 2004. Aprova o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <http://app.cidades.gov.br/snisweb/src/pdf/Portaria-518-2004.pdf >. Acessado em: 29 jun. 2016.

CALIJURI, M. C; ALVES, M.S. A; DOS SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. RiMa, 2006.

CAMPOS, A. *et al*. Effects on growth, antioxidant enzyme activity and levels of extracellular proteins in the green alga *Chlorella vulgaris* exposed to crude cyanobacterial extracts and pure microcystin and cylindrospermopsin. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 94, p. 45-53, 2013.

CARMICHAEL, W. A world overview One-hundred-twenty-seven years of research on toxic cyanobacteria Where do we go from here?. In: **Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the science and research needs**. Springer New York. p. 105-125, 2008.

CARVALHO, L. R. *et al*. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga Reservoirs, SP, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, n. 1, p. 141-148, 2007.

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

CIRÉS, S; BALLOT, A. A review of the phylogeny, ecology and toxin production of bloom-forming Aphanizomenon spp. and related species within the Nostocales (cyanobacteria). **Harmful Algae,** v. 54, p. 21-43, 2016.

CODD, G. A. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. **Water Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 149-156, 1995.

CORBEL, S. *et al*. Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. **Chemosphere**, v. 96, p. 1-15, 2014.

CRUSH, J. R.; BRIGGS, L. R.; SPROSEN, J. M.; NICHOLS; S. N. Effect of irrigation

DAKSHINI, K. M. M. et al. Algal allelopathy. **The Botanical Review**, v. 60, n. 2, p. 182-196, 1994.

DUMMERMUTH, A. L. et al. Responses of marine macroalgae to hydrogen-peroxide stress. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 289, n. 1, p. 103-121, 2003.

DUMMERMUTH, A. L. et al. Responses of marine macroalgae to hydrogen-peroxide stress. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 289, n. 1, p. 103-121, 2003.

DUNKER, S; JAKOB, T; WILHELM, C. Contrasting effects of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa on the growth and physiology of two green algae, Oocystis marsonii and Scenedesmus obliquus, revealed by flow cytometry. **Freshwater biology**, v. 58, n. 8, p. 1573-1587, 2013.

DUY, Tai Nguyen et al. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. In: **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Springer New York, p. 113-185, 2000.

EL-SHEEKH, M. M.; KHAIRY, H. M.; EL-SHENODY, R. A. Allelopathic effects of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kützing on the growth and photosynthetic pigments of some algal species. **Allelopathy Journal**, v. 26, n. 2, 2010.

FALCONER, I. R. *et al*. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) Microcystis aeruginosa in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. **Environmental Toxicology**, v. 9, n. 2, p. 131-139, 1994.

FALCONER, I. R.; HUMPAGE, A. R. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 2, n. 1, p. 43-50, 2005.

FIGUEREDO, C. C.; GIANI, A; BIRD, D.F. Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion. **Journal of Phycology**, v. 43, n. 2, p. 256-265, 2007.

FOGG, G. E.; THAKE, B. **Algae Cultures and Phytoplankton Ecology.** 3.ed. London: University of Wisconsin Press, p. 269, 1987.

GODINHO, L. R.; GONZÁLEZ, A.A.C.; BICUDO, C.E.M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 30: Chlorophyceae (família Scenedesmaceae). **Hoehnea**, São Paulo, p.513-533, ago. 2010.

GORHAM, P. R.; MCLACHLAN, R. W.; HAMMER, U. T. **Isolation and culture of toxic strains of Anabaena,** flos-aquae Breb. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh., v. 19, p. 796–804, 1964.

GRANELI, E; WEBERG, M; SALOMON, P. S. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: the role of eutrophication. **Harmful algae**, v. 8, n. 1, p. 94-102, 2008.

GRIUPTA, N. *et al*. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. **Toxicology**, v. 188, n. 2, p. 285-296, 2003.

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, 2013.

HARKE, M. J. *et al*. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, Microcystis spp. **Harmful Algae**, v. 54, p. 4-20, 2016.

HUMPAGE, A. R.; FALCONER, I. R. Microcystin-LR and liver tumor promotion: effects on cytokinesis, ploidy, and apoptosis in cultured hepatocytes. **Environmental Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 61-75, 1999.

IBRAHIM, M. A. R. *et al*. Effect of solar UV radiation on antioxidant enzymes and phenols biosynthesis in lettuce (Lactuca sativa). **Arab Universities Journal of Agricultural Sciences**, v. 23, n. 1, 2015.

JIANG, J. *et al*. Microcystin-LR induced oxidative stress and ultrastructural alterations in mesophyll cells of submerged macrophyte Vallisneria natans (Lour.) Hara. **Journal of hazardous materials**, v. 190, n. 1, p. 188-196, 2011.

JOCHIMSEN, E. M. *et al*. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 873-878, 1998.

JONSSON, P. R.; PAVIA, H; TOTH, G. Formation of harmful algal blooms cannot be explained by allelopathic interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 27, p. 11177-11182, 2009.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. **Cyanoprokariota: 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales**. In: BUDEL, B.; KRIENITZ, L.; GÄRTNER, G.; SCHAGERL, M. (Orgs). **SüBwasserflora von Mitteleupora. Spektrum Akademischer Verlag.** München, Germany. v. 19, nº 2. p.759, 2005.

KOSCHEK, P. R. **Interação entre Monoraphidium e Microcystis crescidas em meio com matéria orgânica excretada e em cultivo misto.** 2008. p.85 Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Ciências Biológicas (biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

KUMMEROVÁ, M. *et al*. Evaluation of fluoranthene phytotoxicity in pea plants by Hill reaction and chlorophyll fluorescence. **Chemosphere**, v. 65, n. 3, p. 489-496, 2006.

LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, M. T. S. D; VASCONCELOS, V. M. Allelopathic activity of cyanobacteria on green microalgae at low cell densities. **European Journal of Phycology**, v. 44, n. 3, p. 347-355, 2009.

LEFLAIVE, J. *et al.* Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. **Freshwater Biology**, v. 52, n. 2, p. 199-214, 2007.

LORENZEN, C. J. Determination of chlrophyll and phaeophytin: spectrophotometric equations. **Limnol. Oceanogr**., v. 12, p.343-346, 1967.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e aplicações.** 1 ed. São Carlos: RiMa, 587 p. 2006.

MACKINTOSH, C. *et al*. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEBS letters**, v. 264, n. 2, p. 187-192, 1990.

MALLICK, N; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, n. 2, p. 183-193, 2000.

MARTINS, C. F. **Avaliação da presença de microcistina-LR por HPLC-PDA em amostras de mananciais da Região da Grande Vitória.** 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J. S.; CODD, G. A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. ***Rev. Bras. Biol*.** vol.59, n.3, p.361-376, 1999.

MERILUOTO, J; CODD, G.A. **Toxic Cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis**. Abo Akademi University Press. p.149, 2005.

MIKULA, P. *et al*. 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, 2012.

MOHAMED, Z. A. Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 6, p. 504, 2008.

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

NAKANO, Y; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and cell physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

OLENINA, I. **Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic** Sea. 2006.

OLIVEIRA, F. V. *et al*. Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e consequências das florações. **Oecologia Australis**, v. 13, n. 2, p. 247-258, 2009.

OLIVEIRA, R. S. C. **Efeito do exsudato de Scenedesmus obliquus (TURPIN) KÜTZING, 1833 (CHLOROPHYCEAE) no crescimento e em parâmetros fotossintéticos de Pseudokirchneriella subcapitata (KORSHIKOV) F.HINDÁK, 1990 (CHLOROPHYCEAE).** 2017. 45 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

PAERL, H. W. Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (cyanobacteria). **Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge**, v. 261315, 1988.

PAPADIMITRIOU, T. *et al*. Artificially-born “killer” lake: phytoplankton based water quality and microcystin affected fish in a reconstructed lake. **Science of the total environment**, v. 452, p. 116-124, 2013.

PFLUGMACHER, S. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. **Environmental toxicology**, v. 17, n. 4, p. 407-413, 2002.

PINHEIRO, C. et al. Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. **Hydrobiologia**, v. 705, n. 1, p. 27-42, 2013.

RAMOS, C. S. P *et al*. Estudo da presença da toxina microcistina na água de reservatório de Mundaú (Garanhuns-PE) pelas metodologias ELISA e CLAE. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 2, p. 169-177, 2014.

RICE, E. I. **Allelopathy**, 2 ed. Academic Press, Orlando, Florida, p. 422, 1984.

SÁ *et al*. Ocorrência de uma floração de cianobactérias tóxicas na margem direita do Rio Tapajós, no Município de Santarém (Pará, Brasil). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 159-166, 2010.

SAKER, M. L.; GRIFFITHS, D. J. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. **Phycologia**, v. 39, n. 4, p. 349-354, 2000.

SANT’ANNA, C. L. *et al.* Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras. **Publicação eletrônica, Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Ficologia. www. ibot. sp. gov. br, São Paulo**, 2012.

SEDMAK, Bojan; ELERŠEK, Tina. Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplanktons. **Microbial ecology**, v. 50, n. 2, p. 298-305, 2005.

SIVONEN, K.K., JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water. Spon, London, p. 41– 111. 1999.

SMITH, J. L.; HANEY, J. F. Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (Lepomis gibbosus). **Toxicon**, v. 48, n. 5, p. 580-589, 2006.

SYCHROVÁ, E. et al. Estrogenic activity in extracts and exudates of cyanobacteria and green algae. **Environment international**, v. 39, n. 1, p. 134-140, 2012.

TUNDISI, J. G. **Água no século XXI: enfrentando a escassez**. Rima, 2003.

VÁNOVÁ, L. *et al*. Fluoranthene influences endogenous abscisic acid level and primary photosynthetic processes in pea (*Pisum sativum L*.) plants in vitro. **Plant growth regulation**, v. 57, n. 1, p. 39-47, 2009.

VIKTÓRIA, B. *et al.* Effects of cylindrospermopsin producing cyanobacterium and its crude extracts on a benthic green alga—competition or allelopathy?. **Marine drugs**, v. 13, n. 11, p. 6703-6722, 2015.

WANG, L. *et al.* Allelopathic effects of *Microcystis aeruginosa* on green algae and a diatom: Evidence from exudates addition and co-culturing. **Harmful Algae**, v. 61, p. 56-62, 2017.

WEHR, J. D; SHEATH, R. G; KOCIOLEK, J. P. **Freshwater algae of North America: ecology and classification**. Elsevier, 2005.

WHO. Cyanobacterial toxins: microcystin-LR guidelines for drinking-water quality. **World Health Organization**, Geneva, p. 95-110, 1998.

WU, X. et al. Cyanobacteria blooms produce teratogenic retinoic acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 24, p. 9477-9482, 2012.

XU, R. *et al.* Growth phase-dependent allelopathic effects of cyanobacterial exudates on Potamogeton crispus L. seedlings. **Hydrobiologia**, v. 767, n. 1, p. 137, 2016.

ŻAK, A; KOSAKOWSKA, A. Allelopathic influence of cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* on green algae *Chlorella vulgaris*. In: **Insights on Environmental Changes**. Springer International Publishing. p. 141-150, 2014.

ZHENG, G. *et al.* Cyanobacteria can allelopathically inhibit submerged macrophytes: effects of Microcystis aeruginosa extracts and exudates on *Potamogeton malaianus*. **Aquatic botany**, v. 109, p. 1-7, 2013.

ZHOU, B. S.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, n. 6811, p. 433-439, 2000.