

ÍTALO MACEDO SILVA

EFEITOS ALELOPÁTICOS DE MICROCISTINAS EM RÚCULA
(*Eruca sativa* Mill.)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira

Rio Claro

2011

ÍTALO MACEDO SILVA

EFEITOS ALELOPÁTICOS DE MICROCISTINAS EM RÚCULA
(*Eruca sativa* Mill.)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Comissão examinadora

Rio Claro, ____ de _____ de 2011.

Ando devagar porque já tive pressa,
E levo esse sorriso, porque já chorei demais,
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe,
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, ou
Nada sei...

Almir Sater

À minha amada mãe (Rose) e tio (Nenê), minhas inspirações
nessa vida. A toda minha família e amigos com
quem vivi e vivo momentos inesquecíveis.

AGRADECIMENTOS

Em especial à minha orientadora Madô, por ter me estendido a mão no momento em que mais precisei. Sem essa oportunidade, jamais estaria cumprindo essa jornada. Também pela atenção e grandes ensinamentos que levarei para o resto da vida.

À Talita, pela ajuda extremamente importante no início do projeto, assim como pela grande atenção dispensada. Graças a ela, pude me adaptar mais rapidamente a uma área diferente, e tive mais tranquilidade para trabalhar.

À minha muito querida amiga "Lolly Guaraná", por toda a ajuda na parte final do trabalho. Muito obrigado pela paciência, companheirismo, alegria e principalmente pela amizade que só se fortalece a cada dia.

À Profa. Dra Ana Dionisia Novembre (ESALQ-USP), por todo auxílio e estrutura cedidos para a realização dos experimentos com sementes. Em especial à técnica Helena Chamma, pelos ensinamentos, paciência, constante apoio e amizade, ambas do Laboratório de Análise de Sementes.

Ao Prof. Dr Sérgio Florentino Pascholati (ESALQ-USP), pelo empréstimo de equipamento e valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr Ricardo Kluge (ESALQ-USP), pelo apoio técnico e disponibilidade de laboratório, a todos os alunos do Laboratório de Pós-Colheita, todos sempre dispostos a ajudar. Agradecimento especial à Dra Fabiana Sasaki, pelos ensinamentos, grande apoio e dedicação com as análises da POD.

À Profa. Dra Simone Melo (ESALQ-USP), pelas valiosas dicas sobre os cuidados com o cultivo de rúcula.

Ao Prof. Dr Luiz Gallo (ESALQ-USP), pela disponibilização da casa de vegetação e ao técnico Ênio pelas dicas e auxílio na implantação dos experimentos.

Ao professor Dr Marcio Lambais (ESALQ-USP), pelo empréstimo do sonicador e aos doutorandos Adriano e Rafael pela ajuda no uso do equipamento, além do técnico Éder pela grande ajuda.

Ao Prof. Dr. Massanori Takaki pela amizade, conselhos e disponibilidade para composição das bancas de qualificação e defesa, além de valiosas dicas sobre experimentos com germinação.

Ao pessoal do Laboratório de Cianobactérias. Micheline, pela grande simpatia e bom humor, além de grande ajuda. Helton, pelas transformações em Jeremias,

papos sobre futebol e pelos diversos "causos" contados. Danilo, pela grande ajuda nos experimentos, amizade e companheirismo. Karina, embora ausente nos últimos meses de trabalho, muito obrigado pela amizade e companheirismo. À Cássia, pela simpatia, amizade e ótima companhia. E ao querido técnico Luis "Cometa" Lucatti, também pela ajuda, simpatia e amizade.

A todos os amigos que fizeram e fazem parte da minha vida Rio Clareense. Tropeço, Cis, Buda e Pinguim, Miagui, Ives (Schin) e Ives (Xaxeta), Beavis, Edmara, Amarílis, Ângela, Gnomo (Gaybriel), Peão (Fabrício), Alex, Diogo. Também às outras pessoas que tiveram algum papel durante esse tempo e cujos nomes passaram despercebido.

Aos atuais e antigos moradores da rep. Casa Rosada Country Club Resort Paradise. Jaque e Nayla, pelos primeiros anos de amizade e diversão que proporcionaram. Pulga, Camila, Nani e Lenon pelos momentos de diversão que passamos juntos. Aliado Jefferson, pela amizade e companheirismo nos churrascos e na falta do que fazer. Agradecimento especial à Millossauro, por ter se tornado uma grande companheira (parceira) nos bons e maus momentos.

À minha querida Isa Morsette, por ter sido durante um ano e meio o meu chão e o meu porto seguro. Obrigado por ter dividido a sua vida comigo e ter proporcionado a mim muitos momentos de alegria, carinho e companheirismo.

Ao meu Tio "Crisvaldo" pelo grande companheirismo, conselhos e ajuda nos momentos em que mais precisava. Muito obrigado pelo respaldo, pelas viagens e o mais importante, por ser um pai pra mim.

À minha Mãe, por ser a minha grande incentivadora e torcedora. Muito obrigado por sempre acreditar no meu potencial e nunca desistir de mim. Você é sempre será a pessoa mais importante da minha vida.

À minha tia Jove, pela alegria, por sempre acreditar em mim. Obrigado por ter voltado ao nosso convívio e pelos maravilhosos bolos.

Ao meu irmão Hélio e cunhada Verônica pela presença constante e amizade. Pelos conselhos e alegria nos fins de semana. A todos os outros nomes da minha família, todos importantes, mas que não citarei os nomes para não fica muito extenso.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, onde este trabalho foi desenvolvido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

As cianotoxinas são produzidas por diversos gêneros de cianobactérias, possuem ação hepatotóxica e foram as responsáveis por vários casos de intoxicação em mamíferos. Estudos com hortaliças têm demonstrado os efeitos das microcistinas (MCs) sobre a germinação de sementes, o desenvolvimento das plântulas e o metabolismo, além do acúmulo nos tecidos foliares. O que caracteriza uma importante via de contaminação para o homem através da irrigação com água contendo cianotoxinas. Esse trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da aplicação de extrato bruto de *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, com linhagem produtora e não produtora de MCs, para a germinação de sementes, e o desenvolvimento de plântulas e plantas de rúcula, variedade Folha larga. Sementes germinadas em papel mata-borrão foram expostas a concentrações entre 0,5 a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR equivalente durante sete dias. Plantas cultivadas em vasos contendo substrato comercial para hortaliça foram irrigadas com solução aquosa contendo 0,5 a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-totais, ou seja, considerando todas as variantes presentes no extrato com MC. Valores de massa seca correspondentes foram empregados para o tratamento com extrato bruto sem microcistina, além de controle com água. Os resultados mostraram que MC-LR equivalente causou inibição de 30% no comprimento da parte aérea das plântulas e aumento na atividade da enzima peroxidase (POD). As concentrações aplicadas de MC-totais causaram o aumento na atividade da POD apenas para a planta jovem (folhas e raízes). Com isso, os resultados indicaram que não houve efeitos alelopáticos na germinação de sementes e na formação das plântulas, cujas sementes não foram susceptíveis aos tratamentos. O mesmo ocorreu com as plantas jovens e adultas expostas aos extratos brutos, nas concentrações testadas de MC-totais. Houve diferença no estresse oxidativo entre plantas jovens e adultas frente à exposição aos extratos brutos da cianobactéria produtora de MCs. A irrigação de rúcula com MC-totais nas concentrações de 0,5 a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ provavelmente não oferece risco para a segurança alimentar, visto que não houve acúmulo nos tecidos foliares com as variantes de MCs presentes na composição dos extratos utilizados. Muitas dessas variantes são desconhecidas ou sua ação ainda não foi investigada. Extratos com composição

diferente de variantes poderiam influenciar não só nos efeitos alelopáticos como no processo de biocumulação.

Palavras-chave: cianobactérias; contaminação alimentar; horticultura; microcistinas; substâncias tóxicas.

ABSTRACT

Cyanotoxins are produced by several cyanobacteria genera. They have hepatotoxic action and have been responsible for several cases of intoxication. Studies on vegetables have shown the effects of microcystins (MCs) in seed germination, seedling development and metabolism. Another concern is the crop irrigation with water containing cyanotoxins due to the possibility of toxin accumulation in leaf tissues. This characterizes an important route of contamination to humans. The aim of this study was to investigate the effects of non-purified extracts of *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing in the germination of seeds, development of seedlings and plants of rocket (large-leaf variety). Effects of both, toxic and non-toxic strains, were evaluated. Seeds were germinated on filter paper and then exposed to MC solution (concentrations ranging from 0,5 to 100,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of MC-LR equivalent) during seven days. Plants growing in commercial substrate for vegetable were irrigated with MC solution (concentrations ranging from 0,5 to 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-total). Treatments containing the non-toxic strain extract (dry mass equivalent of the toxic treatment) and water (negative control) were carried out together with the toxic ones. MC-LR equivalent treatment caused inhibition of 30% in shoot length and increased activity of peroxidase (POD) in seedlings. The applied concentrations of MC-total caused increase in POD activity in young plant (leaves and roots). On the other hand, allelopathic effects were not found either on seeds germination or seedling development. Also, no allelopathic effects were found in the juvenile and adult plants exposed to extracts with any of the MC-total concentrations. Young and adult plants had different oxidative stress responses when exposed to extracts of the MCs-producing strain. Therefore, future studies should be conducted with individuals at the young stages of development. Finally, as there was no MC accumulation in leaf tissues, the irrigation of crops with MC-total concentrations from 0,5 to 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ must not cause risk to food safety. Many of MC variants used in this study are unknown or their action has not been investigated so far. Extracts with different variants compositions could influence not only on the allelopathic effect, but also the bioaccumulation results.

Key-words: cyanobacteria; food contamination; horticulture; microcystins; toxic substances.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1. Efeitos alelopáticos em macrófitas aquáticas.....	6
3.2. Efeitos alelopáticos em plantas terrestres.....	9
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Linhagens e condições de cultivo das cianobactérias.....	15
4.2. Obtenção dos extratos brutos de cianobactérias.....	15
4.3. Extração e determinação de microcistina no extrato bruto utilizando HPLC/LC-MS.....	16
4.4. Experimento com sementes e plântulas.....	17
4.4.1. Germinação.....	17
4.4.2. Experimento com plântulas: desenvolvimento inicial, massa fresca e seca .	18
4.4.3. Análise do teor de clorofila	19
4.4.4. Determinação da enzima peroxidase (POD).....	20
4.5. Experimento com plantas jovens e adultas.....	20
4.5.1. Determinação de microcistina no extrato bruto utilizando ELISA.....	21
4.5.2. Planta Jovem.....	23
4.5.2.1. Determinação do teor de clorofila e da enzima peroxidase (POD) em folhas e raízes.....	23

SUMÁRIO

	Página
4.5.2.2. Determinação da condutividade elétrica da membrana plasmática de folhas	24
4.5.2.3. Determinação de microcistinas em tecido foliar	24
4.5.3. Planta adulta.....	24
4.6. Análise dos dados	25
5. RESULTADOS.....	25
5.1. Experimento com sementes e plântulas.....	25
5.1.1. Germinação e plântulas normais.....	25
5.1.2. Desenvolvimento inicial de plântulas. Obtenção de massa (seca e fresca), teor de clorofila e POD.....	27
5.2. Experimentos com plantas jovens e adultas.....	30
5.2.1. Determinação do teor de clorofila	30
5.2.2. Determinação da enzima peroxidase em folhas e raízes	31
5.2.3. Determinação da condutividade elétrica da membrana plasmática de folhas	33
5.2.4. Determinação de microcistinas em tecido foliar.....	34
6. DISCUSSÃO.....	35
6.1. Experimento com sementes.....	35
6.2. Experimento com planta jovem e adulta.....	38
7. CONCLUSÕES.....	41
8. REFERÊNCIAS	42

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Relação das variantes de MCs presentes no extrato bruto da linhagem BCCUSP232 e as quantidades em $\mu\text{g.g}^{-1}$ da massa seca.....	16
2. Relação da quantidade de MC-totais (MC_{2+}), juntamente com a parcela de MC-LR equivalente aplicada por tratamento em plantas jovem e adulta.....	23

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Estrutura química da molécula de microcistina-LR, uma hepatotoxina.....	3
2. Aspecto geral das plântulas provenientes do ensaio de germinação, 7 dias após a semeadura com MC-LR equivalente.....	19
3. Plantas utilizadas no experimento com planta jovem e adulta.....	21
4. Porcentagem (%) da germinação de sementes.....	26
5. Porcentagem (%) de plântulas normais.....	26
6. Massa fresca (mg) das plântulas de rúcula.....	27
7. Massa seca (mg) das plântulas de rúcula.....	27
8. Comprimento da radícula das plântulas de rúcula.....	28
9. Comprimento da parte aérea (hipocótilo + cotilédones) das plântulas de rúcula	29
10. Teor de clorofila ($\mu\text{g.g}^{-1}$) presente nos cotilédones das plântulas de rúcula....	29
11. Atividade da enzima peroxidase ($\mu\text{Moles de H}_2\text{O}_2 \text{ decomposto.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$) das plântulas de rúcula	30
12. Teor de clorofila presente em folhas de rúculas provenientes de plantas jovens e adultas.....	31
13. Atividade da enzima peroxidase em folhas de plantas jovens e adultas de rúcula	32
14. Atividade da enzima peroxidase na raiz de plantas jovens e adultas de rúcula	33

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

Página

1. Condutividade elétrica da membrana plasmática de folhas de plantas jovens e adultas.....	34
---	----

1. INTRODUÇÃO

Os problemas gerados pela intervenção humana nos ecossistemas naturais têm causado uma infinidade de problemas. Dentre eles, vários interferem diretamente na saúde humana, tal como a eutrofização dos corpos d'água, causada pelo enriquecimento da água por nutrientes, geralmente oriunda de matéria orgânica de esgoto não tratado. Em ecossistemas eutrofizados podem ocorrer florações de algas e cianobactérias. Em consequência disso, a água apresenta, muitas vezes, a coloração esverdeada referente à biomassa desses organismos.

Essas florações promovem a redução dos níveis de oxigênio durante a decomposição dessa biomassa, causando a morte de peixes e outros organismos aquáticos. Além disso, as cianobactérias são capazes de produzir uma ampla gama de compostos tóxicos e biorreativos, que de uma forma ou de outra, acabam entrando na cadeia de consumo humana (CARMICHAEL, 2001).

Alguns autores sugerem que esses produtos secundários produzidos por cianobactérias possam ter funções alelopáticas (KEARNS, 2001; BOROWITZKA, 1995; MOORE, 1996; SMITH, 1999; SCHWARTZ et al., 1990). O termo alelopatia é definido como o efeito prejudicial e, ou, benéfico entre plantas através de interações químicas, incluindo os microrganismos (RICE, 1984).

As cianobactérias podem ser consideradas um grupo bem diversificado em termos de morfologia, fisiologia e metabolismo (CODD, 1995). Além disso, algumas possuem a capacidade de realizar fotossíntese tanto em meio aeróbico quanto anaeróbico, apresentando assim, rápido crescimento em diferentes ambientes (RESSOM et al, 1994). Além disso, algumas espécies têm a capacidade de fixar nitrogênio, e muitas delas possuem a habilidade de produzir metabólitos tóxicos, como as cianotoxinas.

As cianotoxinas são classificadas em cinco grupos funcionais, de acordo com o local de ação em mamíferos: hepatotoxinas; neurotoxinas; citotoxinas e dermatotoxinas (lipossacarídeos) (SIVONEN, 1999; SAKER, 2000). Dentre as quais, as microcistinas (hepatotoxinas) são um grupo de toxinas muito estudado, principalmente devido à ingestão acidental por seres humanos e outros animais, além de serem extremamente tóxicas a estes. Efeitos hepatotóxicos agudos e hepatocancerígenos crônicos já foram relatados (DAWSON 1998; DIETRICH, 2005).

O caso mais grave conhecido ocorreu no Brasil, no município de Caruaru, onde 76 pacientes de uma clínica de hemodiálise morreram em decorrência do uso de água contaminada com microcistinas nas máquinas de diálise (JOCHIMSEN et al., 1998; AZEVEDO et al., 2002; YUAN et al., 2006). Esse incidente obrigou o Ministério da Saúde a criar a Portaria 518 (BRASIL, 2004) que estabeleceu o valor máximo de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina na água tratada para consumo humano.

Este valor está de acordo com o limite estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) baseado em estudo de ingestão oral da microcistina em camundongos (WHO, 1998). Na China, estudos indicaram que a taxa de mortalidade por câncer primário de fígado estava relacionada com fontes de água potável contaminadas por microcistinas (MC-LR) (LIAN, 2000; YU, 2001).

As microcistinas são produzidas por diversos gêneros de cianobactérias, dentre estes, *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Anabaenopsis*, *Nostoc* e *Hapalosiphon* (CARMICHAEL, 1992; SKULBERG et al., 1993). As microcistinas são heptapeptídeo cíclico, consistindo em sete aminoácidos, incluindo diversos D-aminoácidos: N-metildehidroalanina e β -aminoácido hidrofóbico, 3-amino-9-metoxi-2-6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico (Figura 1) (BOTES et al., 1985).

São descritas mais de 80 variantes de microcistinas, sendo a variação principalmente nos dois L-aminoácidos, juntamente com alterações de cadeias laterais, por exemplo, entre o hidrogênio ou grupos metil (SIVONEN, 1999; ZURAWELL et al., 2005). 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 pode ser considerada a mais perigosa para a saúde humana em relação à sua toxicidade, uma vez que é a mais potente em comparação às demais variantes ($DL_{50}=43 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de camundongo) (GUPTA et al., 2003).

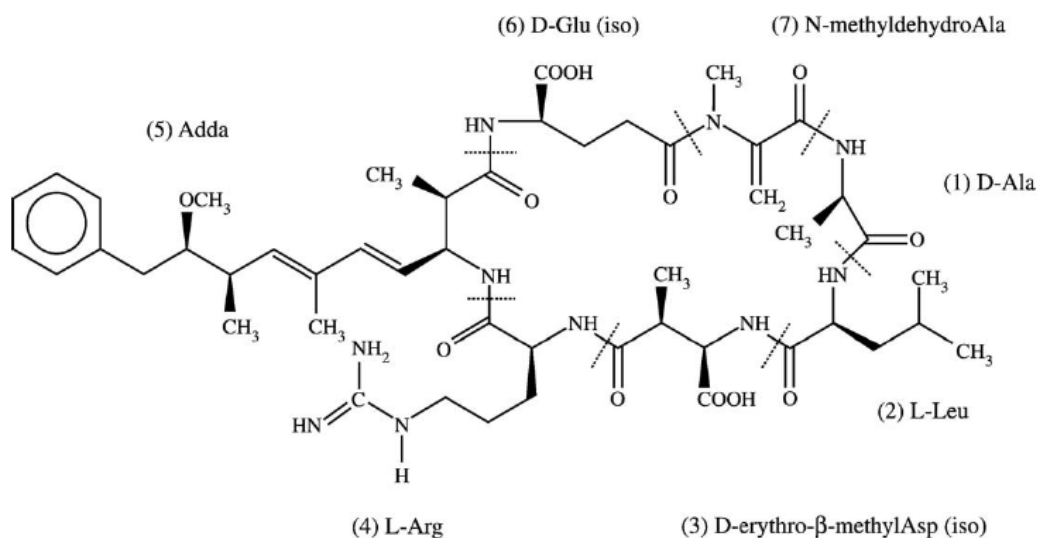


Figura 1. Estrutura química da molécula de microcistina-LR, uma hepatotóxina.

É bem documentado que as microcistinas causam a inibição de proteínas fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A), importantes enzimas que agem como catalisadores na desfosforilação de resíduos de serina/treonina em fosfoproteínas. São muito importantes para o crescimento normal das células e metabolismo, sendo esse o princípio de seu efeito tóxico em animais e plantas (MACKINTOSH et al., 1990). Também é conhecido que as microcistinas induzem danos ao DNA (RAO, 1996). Tal fato foi demonstrado por Zhou et. al. (2000) em estudos com células livres de extratos de *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing e a MC-LR purificada, que indicaram a fragmentação significativa do DNA de células de camundongo. Também foi observada alteração na atividade de algumas enzimas como lactato desidrogenase (LDH), após o envenenamento dos mesmos por microcistina (GUZMAN, 1999; DING et al., 2000, 2001b).

Enzimas antioxidantes como a catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) aumentaram significativamente em hepatócitos de carpa expostos à MC-LR. Em hepatócitos de ratos expostos ao extrato bruto de cianobactéria também foram detectados perdas de lactato desidrogenase (LDH), peroxidação de lipídios e acúmulo de espécies de oxigênio reativo. Também foram encontradas alterações nas funções mitocondriais em hepatócitos de ratos. (DING et al., 1998, 2000, 2001a, 2002).

Em plantas, as proteínas fosfatase regulam importantes processos celulares, tais como a atividade dos canais de íons, o metabolismo do carbono e nitrogênio, a expressão gênica e os processos de crescimento e de desenvolvimento. Desta forma, a MC-LR têm sido usada como modelo de inibidor de fosfatase para estudos bioquímicos desses processos (SMITH, 1996; LUAN, 1998, 2000, 2003; TOROSER, 2000).

A ação das microcistinas em plantas, além de afetar os processos que envolvem as proteínas fosfatases, também podem conduzir ao estresse oxidativo, uma vez que induzem a formação de espécies de oxigênio reativo (em inglês - ROS). Isso resulta em danos celulares tais como peroxidação de membranas lipídicas, genotoxicidade ou modulação de apoptose (DING, 2003). As ROS são geradas durante o metabolismo normal das plantas. No entanto, aumentam em quantidade quando as plantas são submetidas às condições de estresse ambientais, e por isso precisam ser eliminadas para evitar danos em nível celular (GUETA-DAHAN et al., 1997). Tem sido demonstrado que as microcistinas afetam os sistemas de defesa antioxidativos, o que inclui as enzimas superóxido dismutase, peroxidase (POD), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR), ascorbato peroxidase (APx) e dihidroascorbato redutase (DHAR) (BABICA, 2006).

Os trabalhos realizados com exposição de plantas às microcistinas demonstraram que os efeitos podem variar significativamente tanto de acordo com a variante estrutural utilizada (McELHINEY et al., 2001) e quanto às doses utilizadas nos tratamentos. Em trabalho em que folhas de *Phaseolus vulgaris* L. foram imersas em soluções com MC-LR, foi observado que várias baixas doses aplicadas afetaram os parâmetros avaliados mais que uma única dose alta (ABE et al., 1996).

Em plantas terrestres, embora o contato natural com a microcistina seja muito raro, vários estudos foram realizados para verificar os efeitos de diferentes concentrações de desta cianotoxina, tanto no desenvolvimento da planta como no acúmulo de tecidos foliares. Isso decorre do fato de que uma importante via de contaminação, até então negligenciada, tem chamado a atenção dos pesquisadores, a irrigação de culturas.

A irrigação para o cultivo de várias plantas, dentre elas as hortaliças, com água contaminada por toxinas produzidas em florações de cianobactérias pode causar tanto a redução dos níveis de produção (SAQRANE et al., 2009), quanto a

contaminação humana pelo consumo. A Organização Mundial da Saúde limita o consumo humano de microcistina nos alimentos em $0,04 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa corpórea.dia⁻¹ (WHO, 1998). Nesse contexto, a rúcula (*Eruca sativa* Mill.) representa uma boa espécie para esse estudo, pois é amplamente consumida no Brasil.

Pertencente a família Brassicaceae, com marcante sabor picante das folhas, a rúcula é utilizada em guarnição de saladas, petiscos e variedade de pratos. (SANTAMARIA et. al., 1998). Nos últimos anos, houve aumento do consumo com um crescimento de consumo com um crescimento de 78% entre os anos de 1997 e 2003 (SILVA, 2004), superiores à alface (40%), porém esta é ainda a mais consumida no Brasil. Estima-se que a área cultivada no Brasil seja de 6.000 ha por ano sendo que 85 % da produção nacional concentram-se no Sudeste do Brasil (SALA et. al., 2004).

2. OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivos avaliar o efeito de extrato bruto de *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, com linhagem produtora e não produtora de microcistinas sobre:

- a) a germinação de sementes de rúcula (*Eruca sativa* Mill.) e no desenvolvimento inicial das plântulas;
- b) no desenvolvimento da planta jovem e adulta, além da possível acumulação de microcistina no tecido foliar.

Hipóteses:

- i) Microcistinas são acumuladas nos tecidos vegetais, conferindo, conseqüentemente, risco de transferência para o homem.
- ii) Ambos os extratos brutos das cianobactérias (tóxica e não tóxica) produzem efeitos inibitórios na germinação de sementes da rúcula, além de efeitos no metabolismo das plântulas, sendo mais evidentes na linhagem com microcistina utilizada.
- iii) Plantas jovens acumulam mais microcistina do que as adultas, provavelmente devido a uma maior absorção de substâncias na fase inicial de crescimento.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Vários são os trabalhos na literatura onde foram avaliados os efeitos das microcistinas em organismos fotoautotróficos. A maioria destes trabalhos foi realizada visando avaliar possíveis funções alelopáticas das microcistinas, efeitos morfológicos, processos de desintoxicação, além de possíveis riscos à saúde humana através da bioacumulação. Desta forma, foram vários os organismos estudados, tais como macrófitas aquáticas, microalgas, invertebrados e várias espécies de plantas terrestres cultivadas. Os estudos ainda não são conclusivos quanto a função alelopática, contudo, os resultados encontrados revelaram efeitos marcantes na célula, tais como na atividade das enzimas peroxidase (POD), glutationa -S- transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), dentre outros. Alterações macroscópicas, tais como, necrose, inibição da germinação e crescimento das plantas também foram observadas.

3.1. Efeitos alelopáticos em macrófitas aquáticas

Yamasaki (1993) ao realizar estudo em lago onde ocorriam florações de cianobactérias relacionou a redução no comprimento da raiz, massa seca e absorção de oxigênio e nutrientes da macrófita *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel, uma gramínea que vive submersa, com efeitos alelopáticos produzidos pela presença de *Microcystis* sp. no ambiente. Nesse caso, a presença de microcistina não foi investigada, sendo os efeitos negativos atribuídos às condições anóxicas e à deficiência nutricional que foram influenciados pela presença das cianobactérias.

Para observar os mecanismos de desintoxicação de alguns organismos aquáticos que toleram concentrações de microcistinas presentes nos meios em que vivem, Pflugmacher et al. (1998b) demonstraram a existência de um conjugado glutaniona-MC-LR formado através da glutationa-S-transferase (GST) solúvel. Esse experimento foi realizado com plantas (*Ceratophyllum demersum* L.), invertebrados (*Dreissena polymorpha* Pallas, *Daphnia magna* Straus), ovos de peixe e peixes (*Danio rerio* Ham.) utilizando MC-LR purificada (3,75 µg), extraída de *M. aeruginosa*. Os autores afirmaram que a formação desse conjugado seria o primeiro passo no processo de desintoxicação de cianotoxinas em organismos aquáticos. Posteriormente, Pflugmacher et al. (1998a) testaram a atividade de dois tipos de GST (solúvel e microssomal) na macrófita aquática *C. demersum* L. com diferentes

concentrações de MC-LR. Nesse caso, houve um aumento na atividade da GST microsossomal em concentrações acima de $0,12 \mu\text{g.L}^{-1}$, mas ocorreu redução da atividade em concentrações acima de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$. Esse processo de ação das GSTs seria uma alternativa para a desintoxicação de macrófitas aquáticas para cianotoxinas.

A exposição das macrófitas aquáticas *C. demersum* L. e *Myriophyllum spicatum* L. às diferentes concentrações da MC-LR também revelaram efeitos tais como, inibição do crescimento, redução na produção de oxigênio fotossintético e na quantidade de pigmentos. Esses efeitos foram encontrados quando utilizadas concentrações ambientalmente relevantes de MC-LR que, segundo o autor, seria entre $0,1$ e $5,0 \mu\text{g.L}^{-1}$. Neste caso, os efeitos apareceram após 3 a 6 semanas de exposição, dependendo da concentração utilizada. Em exposição de 24h em *C. demersum* a $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR, ocorria a morte da planta, além de amarelamento e queda de folhas (PFLUGMACHER et al., 2002).

Wiegand et al. (2002) expuseram dois tipos de organismos, *Vesicularia dubyana* (C. Muell.) Broth. (vegetal) e *Daphnia magna* Straus (microcrustáceo) a dois compostos produzidos por cianobactérias, a saber, MC-LR e um metabólito inibidor da enzima serina-proteases (microcin SF608) em concentrações de $0,5$; $5,0$; $50,0$ e $500,0 \mu\text{g.L}^{-1}$. Nesse experimento foi observado o aumento da atividade da GST, enzima com função de desintoxicação, sendo significativos nas concentrações acima de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR em ambos os organismos, além da inibição da POD. Claros sintomas de estresse foram encontrados em *V. dubyana*, tais como a diminuição da produção de oxigênio fotossintético e aumento de clorofila "b", que foi causado por ambos compostos em concentrações acima de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$. Os autores salientam que os impactos causados pelas cianobactérias em outros organismos, presentes em vários estudos, podem não estar diretamente relacionados apenas às cianotoxinas conhecidas.

Romanowska-Duda (2002) testou os efeitos de MC-LR no crescimento e na morfologia da macrófita aquática *Spirodela oligorrhiza* (Kurz.) Hegelm. Para isso, expôs a planta a MC-LR purificada extraída de *M. aeruginosa*, presente em floração de reservatório de água e a comparou com a MC-LR purificada comercializada (95% pura, Sigma), proveniente da mesma espécie de cianobactéria. Os resultados indicaram que a concentração de $344 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR extraída no laboratório

reduziu o número e massa de folhas e quantidade de clorofila após 96hs. Com a cianotoxina comercial também foi observado a redução no número de folhas após 24hs de exposição em concentrações de 0,2 e 0,1 μL^{-1} , além da alteração na atividade das enzimas fosfatase ácida e RNase após 7 dias de exposição.

Pflugmacher (2004) também observou evidências de estresse oxidativo em *C. demersum* (macrófita aquática) exposto em concentração de 5,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR. Além do início da formação do conjugado glutathiona-MC-LR, encontrou o aumento no nível da enzima superóxido dismutase e de peróxido de hidrogênio, além de outras enzimas desintoxicantes de oxigênio reativo.

Absorção e acúmulo diferencial de MC-RR em raízes e folhas da macrófita aquática *Vallisneria natans* (lour.) Hara foram encontradas por Yin et al. (2005). As maiores concentrações desta cianotoxina foram encontradas nas raízes. No entanto, a quantidade absorvida foi dependente da dose e do tempo de exposição. Nesse mesmo estudo, o crescimento e desenvolvimento foram afetados apenas em concentrações maiores que 100,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-RR, indicando uma certa insensibilidade da planta à MC-RR em concentrações mais próximas aquelas encontradas em ambientes naturais.

Os estudos de Jang et al. (2006) sugeriram a ocorrência de alelopatia recíproca entre *Lemna japonicae* Landolt e *M. aeruginosa* produtora de microcistinas. Nos tratamentos em que havia a presença de ambos os organismos, houve um aumento na produção de microcistinas e inibição no crescimento de ambos os organismos. Os referidos autores tiveram a hipótese de que alguma substância desconhecida possa estar sendo produzida pela macrófita. Além disso, as microcistinas extracelulares poderiam estar agindo como aleloquímicos.

Saqrane et al. (2007) testaram o acúmulo de microcistina, desintoxicação e indução do estresse oxidativo de *Lemna gibba* L. em exposição a extratos de *M. aeruginosa* com concentrações de microcistina equivalentes de 75, 150, 220 e 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ durante 12 dias. Os resultados demonstraram uma significativa diminuição no crescimento da planta e no conteúdo de clorofila. Ocorreram alterações na atividade da enzima peroxidase e mudanças quali e quantitativas nos compostos fenólicos após 24 horas de exposição. Também foi encontrado um possível metabólito talvez oriundo da biodegradação da microcistina.

Como forma de aproveitar o potencial de algumas espécies de macrófitas resistentes às microcistinas e com capacidade de bioacumulação, [Nimptsch \(2008\)](#) testou algumas espécies em laboratório. Foram consideradas as mais eficientes *Lemna minor* L., *Myriophyllum elatinooides* Gaud. e *Hydrilla verticillata*. Essas macrófitas ficaram em água com microcistinas em concentrações de 12,1 e 9,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e em 3 dias a concentração da cianotoxina foi reduzida para 1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Vários tipos de alterações morfológicas também foram encontradas em estudos com a macrófita aquática *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. Em exposição a 12.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR ocorreu a inibição de crescimento e desenvolvimento em mais de 50% das plântulas. Também foi observada a indução da oblituração do aerênquima, alteração na lignificação da parede das células de órgãos axiais e necrose radicular. A cianotoxina também induziu o desenvolvimento prematuro de raízes laterais e a formação precoce de aerênquima ([MÁTHÉ et al., 2007](#)). Em outro estudo com a mesma planta, em tratamentos que variaram de 1,0 a 40.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR, também ocorreram várias alterações, tais como: inibição das enzimas fostatases, a partir da concentração de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, alterando a estrutura e morfologia da raiz. Foram também observadas alterações na organização dos microtúbulos em células mitóticas ([MÁTHÉ et al., 2009](#)). Embora as concentrações utilizadas sejam muito superiores aquelas encontradas naturalmente, esse estudo demonstrou os vários efeitos secundários da ação das microcistinas em tecidos vegetais.

3.2. Efeitos alelopáticos em plantas terrestres

Embora recentes, são vários os trabalhos em que foram avaliados os efeitos causados pela exposição de microcistinas em plantas terrestres nas mais variadas concentrações. Mesmo essas plantas não coexistindo no mesmo habitat em condições naturais com as principais espécies de cianobactérias produtoras de microcistinas nos ambientes aquáticos, tais estudos são justificados pela possível exposição a essas cianotoxinas através de irrigação por aspersão com a água proveniente de reservatórios com toxinas. A consequência dessa contaminação e possível acúmulo nos tecidos foliares seria a entrada da cianotoxina na cadeia alimentar humana.

Siegl et al. (1990) observaram *in vitro* e *in vivo* redução da atividade da enzima sacarose-fosfato sintase decorrente da inibição das PP1 e PP2A por ácido ocadáico e MC-LR em folhas de espinafre (*Spinacia oleracea* L.) resultando na redução da biossíntese de sacarose e fixação de gás carbônico.

Em uma horticultura comercial na Inglaterra, uma cultura de alface foi irrigada com água contendo células de *M. aeruginosa*. Após a irrigação, foi possível observar a presença de partículas verdes de 1mm de diâmetro na superfície foliar. Essas partículas foram identificadas através de microscopia óptica, como colônias e células livres de cianobactérias. Foram realizadas análises com HPLC da água utilizada, com a identificação de 3 variantes de microcistinas, sendo 3,23 µg de MC-LR equivalentes por grama da massa seca da amostra. Foi encontrada, após procedimento de imunoensaio, a presença de microcistinas nos extratos das folhas (material fresco), em diferentes concentrações, variando de acordo com a parte da folha analisada. Este foi o primeiro relato de microcistinas encontrada em plantas terrestres cultivadas para consumo humano (CODD et al., 1999).

Kurki-Helasmo e Meriluoto (1998) realizaram estudos com mudas de mostarda (*Sinapsis Alba* L.) cultivadas por 7 dias em meio sólido nutritivo, suplementado com MC-LR em concentrações de 0-40.000 µg.L⁻¹. O crescimento das mudas foi afetado nas concentrações a partir de 800 µg.L⁻¹ e mal formações foram encontradas a partir de 50.000 µg.L⁻¹. Também ocorreu a inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A correlacionadas à inibição do crescimento.

Estudos com cultura de tecidos de batata (*Solanum tuberosa* L.) revelaram a inibição no crescimento e no conteúdo de clorofila com uso das concentrações 5,0 e 50,0 µg.L⁻¹ de MC-LR purificada a partir de células de *M. aeruginosa*. Em outro experimento, do mesmo trabalho, três variantes de microcistinas inibiram o crescimento de mostarda (*Sinapsis Alba* L.) em concentrações de MC-LR (1.900 µg.L⁻¹), MC-RR (1.600 µg.L⁻¹) e LF (7.700 µg.L⁻¹). Em mudas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), apesar de não comprometerem o crescimento da planta durante 18 dias de exposição, aplicações de MC-LR afetaram o desenvolvimento das raízes, representando uma diminuição de 30% comparada ao controle (sem microcistina). Nestes estudos também foi demonstrada absorção da cianotoxina pelas plantas, visto que nas análises realizadas pelo ensaio imuno-absorvente ligado à enzima (ELISA) foram encontradas toxinas nos tecidos das plantas (inteiras) submetidas aos

tratamentos com a microscinas (cerca de $19.100 \mu\text{g.L}^{-1}$) após de 18 dias de exposição (McELHINEI et al., 2001).

Gehring et al. (2003) testaram os efeitos da MC-LR extraída de *M. aeruginosa* em agrião (*Lepidium sativum* L.) em cultivo hidropônico com concentrações de 1,0 e $10,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ durante 6 dias. Estes autores observaram a diminuição no comprimento foliar e da raiz, além da diminuição da massa fresca das mudas na concentração de $10,0 \mu\text{g.L}^{-1}$. As plantas que foram expostas a $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ diminuíram no desenvolvimento da raiz com 2 a 6 dias de exposição. A atividade das enzimas glutathione-S-transferase e glutathione peroxidase aumentaram significativamente em ambas as concentrações indicando a ocorrência de estresse oxidativo.

Chen et al. (2004) demonstraram a inibição de crescimento de arroz (*Oryza sativa* L.) e nabo (*Brassica napus* L.) devido a exposição de MC-LR nas concentrações de 0, 24, 120, 600 e $3.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR equivalente. Contudo, um efeito evidente foi observado em nabo em relação à porcentagem de germinação e também altura das mudas. Por outro lado, foi observada a inibição no alongamento das raízes primárias das mudas de arroz e nabo. O estresse oxidativo foi comprovado pela alteração na atividade nas enzimas superóxido dismutase e peroxidase. Através de análises imunoenzimáticas foram encontradas diferenças nos níveis de microcistinas encontradas nos extratos das plantas expostas.

Bibo et al. (2008) avaliaram a persistência e biodegradação da MC-RR em substrato para cultivo de plantas. Seus resultados indicaram que $6.500 \mu\text{g.L}^{-1}$ da cianotoxina foram completamente degradadas em 6 dias, sendo que esse processo foi acelerado na presença de ácido húmico. Os autores verificaram que em concentrações menores que $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ houve estímulo no crescimento do repolho (*Brassica chinensis* L.) e nabo (*Brassica napus* L.). Por outro lado, nessas mesmas plantas houve inibição de crescimento em concentrações acima de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-RR. Os autores também relataram que os efeitos inibitórios podem variar de acordo com o tempo de aplicação e com o estágio de vida da planta.

Brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck.) e mostarda (*Sinapsis Alba* L.) foram irrigados com água contendo 1,0 e $10,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas contendo 3-demethyl- MC-RR (21%), MC-RR (25%), 3-demethyl-MCLR (21%) e MC-LR (33%), além do controle, sem microcistina durante 20 dias. Foram medidas as

concentrações e fluorescência da clorofila e avaliadas características morfológicas, além da quantificação de microscistinas presentes nos tecidos vegetais. Os resultados mostraram a redução de crescimento em brócolis, mas não em mostarda. Foram detectadas concentrações de 0,9 a 2,6 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de MC-LR na massa fresca nos tecidos vegetais de ambas as espécies (JÄRVENPÄÄ et al., 2007).

Diferentes cultivares de espinafre (*Spinacia oleracea* L.) cultivados em vasos com substrato comercial foram irrigados por 6 semanas com concentração equivalente de 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ MC-LR presentes em extrato de cianobactérias (*M. aeruginosa* e *Aphanizomenon flos-aquae*). Os resultados indicaram inibição de crescimento e clorose nas folhas, além da indução de estresse oxidativo em nível celular. Como resposta ao estresse, o sistema antioxidativo foi ativado com o aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase, peroxidase e glutathione-S-transferase. Além disso, também foram produzidos outros antioxidantes de baixo peso molecular, tais como glutathione, ascorbato e tocoferol (PFLUGMACHER et al., 2007).

Em estudos com células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) BY-2 expostas a MC-RR em concentração de 60.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ durante 5 dias, foram observadas várias alterações morfológicas, tais como alongamento anormal, evidente condensação da cromatina, fragmentação dos núcleos e formação de corpos apoptóticos. Além disso, foi detectado um aumento na quantidade de espécies de oxigênio reativo (ROS-Reactive oxygen species) antes da perda de potencial de membrana mitocondrial. Esse estudo também sugere um papel crítico de espécies oxidantes como importante molécula sinalizadora. Ocorreu um aumento na concentração de ácido ascórbico, importante molécula antioxidante, já que impediu o aumento da formação de ROS, a diminuição do potencial de membrana mitocondrial e também a apoptose causada pela MC-RR (HUANG et al., 2009). Em outro estudo, também com células de tabaco BY-2, Huang et al. (2008) utilizaram concentrações de 60.000 e 120.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-RR em exposições que duraram 5 dias. Os resultados indicaram, além dos resultados mostrados anteriormente, que células expostas à maior concentração apresentaram morfologia típica de necrose, como ruptura da membrana plasmática e nuclear.

Plântulas de onze espécies de plantas terrestres com importância econômica (soja - *Glycine max* (L.) Merrill), feijão - *P. vulgaris* L., milho - *Zea mays* L., entre

outras) foram expostas a concentrações de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR e MC-LF em meio sólido, além de extrato bruto de células contendo MC-LR durante 24h. Foi encontrada maior bioacumulação nas raízes (12 a $127 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca) do que nos caules (1 a $64 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca). Observou-se também correlação das microcistinas com danos celulares medidos através da peroxidação de lipídio (PEUTHERT et al., 2007). Em outro trabalho (PEUTHERT et al., 2008), foi observado *in vivo* a redução da atividade das enzimas PP1 e PP2A produzida pela exposição à MC-LR em plantas de alfafa (*Medicago sativa* L.) cultivadas em solo de jardim e tratadas com 4mL a cada dois dias durante uma semana em uma concentração de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Resultados ligeiramente menos inibitórios foram obtidos com o extrato bruto de células de *M. aeruginosa* contendo a mesma concentração de MC-LR. Por outro lado, nenhuma inibição foi obtida com cultivo de *Synechocystis* spp. não produtora de microcistina.

Crush et al. (2008) realizaram experimento com alface (*Lactuca sativa* L.), nabo (*Brassica napa* cultivar Winfred), trevo (*Trifolium repens* cultivar Grasslands Kopu II) e azevém (*Lolium perenne* cultivar Grasslands Samson) nas quais foram realizadas de 3 a 6 aplicações de água contendo uma mistura de 10 variedades de microcistinas. Cada planta recebeu a totalidade de aproximadamente $170\mu\text{g}$ da mistura de microcistinas por aplicação. Os resultados indicaram bioacumulação de microcistinas na parte aérea de alface (tecido foliar) ($0,79 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de massa seca) e trevo ($0,20 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de massa seca), mas não foram encontradas em azevém e nabo. A concentração de microcistinas encontradas nas raízes também foi maior em alface ($0,68 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de massa seca) e trevo ($1,45 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de massa seca). Contudo também foram encontradas microcistinas em nabo e azevém, porém em quantidade baixa, $0,12$ e $0,20 \text{ mg.Kg}^{-1}$, respectivamente. Foram observadas reduções na massa seca da parte aérea de alface, nabo e azevém, e aumento na massa seca das raízes de alface e azevém.

Pereira et al. (2009) estudaram os efeitos de extratos de várias linhagens de cianobactérias (produtoras e não produtoras de microcistinas) na germinação e crescimento das raízes das gramíneas *Lolium perenne* L. e *Festuca rubra* L., além da alface (*Lactuca sativa* L.). Os resultados não mostraram efeitos das microcistinas sobre a germinação das sementes, contudo ocorreu uma inibição no crescimento radicular em testes com concentrações de $5,9$ a $56,4 \mu\text{g.L}^{-1}$. Para os autores, o fato

de que as linhagens não tóxicas terem induzido uma inibição no crescimento da raiz pode significar a interferência de outros metabólitos celulares nos sintomas de toxicidade.

Saqrane et al.(2009) testaram em duas espécies de gramíneas, (*Triticum durum* L. e *Zea mays* L.) e duas leguminosas (*Pisum sativum* L. e *Lens esculenta* Moench), os efeitos de extrato de cianobactérias oriundas de floração cuja espécie dominante foi *M. aeruginosa* contendo diversas variantes (MC-RR, MC-LR, MC-YR, MC-(H4)YR, MC-WR, e MC-FR). Após a exposição de 30 dias ao extrato com as microcistinas houve redução de crescimento e produtividade das plantas, além de efeitos deletérios no desenvolvimento e na atividade do fotossistema II. Foram poucos os efeitos encontrados na quantidade de clorofila, mas ocorreu um aumento no acúmulo de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , P e N. Os autores salientaram que os efeitos encontrados foram dependentes do tempo, concentração da toxina, espécie e órgãos da planta utilizada. Também concluíram que a irrigação de plantas com água contaminada pode afetar o rendimento e qualidade das plantas, além do risco de acúmulo, e conseqüentemente risco a saúde.

Chen et al.(2010) avaliaram brotos de maçã (*Malus pumila*) *in vitro*, nos quais aplicou extrato bruto de *M. aeruginosa* provenientes de floração em lago da China. O estudo demonstrou efeito inibitório significativo na proliferação dos brotos quando expostos a concentrações superiores a $300 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR equivalente. A determinação através da análise de imunoensaio demonstrou que a bioacumulação de microcistinas nos tecidos variou dependendo do tempo de exposição e da concentração utilizada. Com isso, o acúmulo nos tecidos vegetais foi de $510,23 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ em massa fresca, quando a cultura foi exposta a $3.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR equivalente. A atividade da POD aumentou significativamente após 7 dias de exposição à concentração de $3.000 \mu\text{g.L}^{-1}$. Aos 14 dias também houve aumento para $300 \mu\text{g.L}^{-1}$. A atividade da SOD (superóxido dismutase) aumentou apenas a partir de 14 dias de exposição nas concentrações de 300 e $3.000 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Babica et al. (2006) avaliaram uma grande quantidade de trabalhos publicados envolvendo a exposição das microcistinas à plantas terrestres, macrófitas, macroalgas e microalgas planctônicas e concluíram que há um número limitado de trabalhos com efeitos nocivos de microcistinas em concentrações menores ou iguais a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Embora a maioria dos trabalhos tenha sido realizada com o uso de concentrações de microcistinas superiores às encontradas naturalmente ($\leq 10 \mu\text{g.L}^{-1}$), os resultados demonstraram variedade de efeitos causados por essa cianotoxina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens e condições de cultivo das cianobactérias

Foram utilizadas duas linhagens clonais, não axênicas da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing pertencentes ao *Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo* (BCCUSP), sendo uma tóxica, produtora de microcistinas (MCs) (BCCUSP232) e outra não tóxica (BCCUSP03), segundo [Bittencourt-Oliveira \(2003\)](#).

Inóculos com volume de 250 ml foram mantidos em condições controladas de laboratório, em câmara climática a $22 \pm 1^\circ \text{C}$ de temperatura, fotoperíodo 14:10h (claro:escuro) e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (fotômetro LI-COR, mod. LI-250, com sensor esférico subaquático), meio de cultivo BG-11, pH 7.4, descrito por [Rippka et al. \(1979\)](#) e modificado por [Bittencourt-Oliveira \(2000\)](#).

Alíquotas do inóculo de cada linhagem foram transferidas separadamente para Erlenmeyers de 6L contendo 4L de meio de cultivo e mantidos em condição não controlada na bancada de laboratório. Ao atingirem o final da fase exponencial de crescimento (aproximadamente $1,6 \times 10^6$ células. ml^{-1}), os cultivos foram transferidos para um galão de vidro com capacidade de 20L para homogeneização de todo o volume. Posteriormente, foram centrifugados (10.000 rpm, 15min, 20°C), congelados a -20°C e liofilizados.

4.2. Obtenção dos extratos brutos de cianobactérias

Os extratos brutos de ambas as linhagens (BCCUSP03 e BCCUSP232) foram obtidos após ressuspensão do material liofilizado em água deionizada esterilizada em tubo de vidro e ultrassonicados (Microson Ultrasonic Cell Disruptor, Misonix, USA) em banho de gelo por cinco minutos a 22,5 kHz. Os extratos foram congelados a -80°C quando não utilizados imediatamente.

4.3. Extração e determinação de microcistina no extrato bruto utilizando HPLC/LC-MS

A determinação da concentração de MCs no extrato bruto da linhagem com MC (BCCUSP232) (Tabela 1) foi realizada no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP utilizando HPLC/LC-MS. Para isto foi utilizada a metodologia descrita em [Bittencourt-Oliveira et al. \(2005\)](#). As MCs foram extraídas com MeOH/H₂O acidificada 0,1% (1:1, v/v) e submetidas ao banho de ultrassom por 30 min. Após centrifugação do material (10.000 rpm, 15 min, 4° C) o sobrenadante foi evaporado em SpeedVac (Savant, City, US State), O material seco foi ressuspendido em 1,0 ml de água Milli-Q e injetado em coluna Sep-Pak C18 (C18, Waters, Milford, MA). Para o pré-condicionamento foi feita a ativação e lavagem com MeOH 100% (3 ml) e H₂O (3 ml) e os passos de eluição foram: (i) 3 ml de MeOH 30%, (ii) 5 ml de MeOH 100%.

Esta fração foi evaporada em SpeedVac e o extrato ressuspendido com 200 µL da fase móvel para análise no sistema HPLC equipado com uma coluna C18 (Phenomenex, Luna C18, 5 µm, 0,46 x 25 cm). A fase móvel utilizada foi NH₄CH₃COO 20 mM (pH 5)/ACN (27%) e a corrida foi isocrática de 50 min, em fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A detecção foi fixada em comprimento de onda de 238 nm com o detector PDA. As curvas de calibração foram obtidas com padrões de MC-LR, YR, RR e LA (Sigma Aldrich).

Tabela 1. Relação das variantes de MCs presentes no extrato bruto da linhagem BCCUSP232 e as quantidades em µg.g⁻¹ da massa seca.

Variante	Quantidade (µg.g⁻¹)
ddRR A	6.420,8
ddRR B	1.726,8
Drr	17.089,5
RR	243,4
dYR	348,8
ddLR	1.849,6
dLR	4.530,2
LR	192,8

4.4. Experimento com sementes e plântulas

Os experimentos de bioensaio de germinação de sementes foram realizados no Laboratório de Sementes do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP. Foram utilizadas sementes (Isla sementes, Porto Alegre, RS) de rúcula, variedade Folha Larga (*Eruca sativa* Mill).

Os tratamentos utilizados foram: C: Controle, usando apenas água deionizada destilada; MC₁₊: extrato bruto contendo MC-LR equivalente da linhagem BCCUSP232; e MC₁₋: extrato bruto sem MCs da linhagem BCCUSP03.

4.4.1. Germinação

Para o bioensaio de germinação de sementes, as caixas plásticas (10,5 x 10,5 x 3,5) foram previamente esterilizadas com solução de hipoclorito de sódio a 10 % durante uma hora, lavadas com água destilada, secas em estufa e mantidas sob luz ultravioleta em fluxo laminar durante 45 minutos, junto às folhas de papel mata borrão para esterilização. As câmaras climatizadas foram lavadas e desinfetadas com solução de formol a 37 %.

Foram utilizadas oito concentrações: 0,5; 2,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µg.L⁻¹, calculados para MC-LR equivalente. As concentrações utilizadas para o extrato bruto sem MCs (BCCUSP03) foram correspondentes às massas secas do cultivo BCCUSP232 utilizado para se obter as concentrações MC-LR equivalente.

O experimento de germinação foi constituído por quatro repetições de cinquenta sementes para cada tratamento, semeadas nas caixas plásticas tendo como substrato duas folhas de papel mata borrão, as quais foram saturadas com as soluções em cada concentração (0,0; 0,5; 2,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µg.L⁻¹) dos tratamentos. A seguir, as placas foram levadas para câmara climatizada com condições constantes de luz (branca) e temperatura a 20°C por sete dias. A primeira contagem das sementes germinadas foi realizada no 4º dia de avaliação, e conforme necessidade, as folhas de papel de filtro de todos os tratamentos foram reumedecidas com água deionizada.

A contagem de germinação foi realizada no 4º e 7º dias, tendo como critério a protrusão radicular com 2 mm de comprimento. Após 7 dias da semeadura, foram contabilizadas as porcentagens de germinação conforme as Regras para Análises

de Sementes (BRASIL, 1992). Também foi contabilizada a porcentagem de plântulas normais.

4.4.2. Experimento com plântulas: desenvolvimento inicial, massa fresca e seca

A partir das plântulas obtidas no bioensaio de germinação, no 7º dia (Figura 2), foi realizada a análise do desenvolvimento das plântulas. Foram medidos com auxílio de régua com graduação em milímetros: o comprimento da raiz primária, do hipocótilo e cotilédones (parte aérea) de 5 plântulas por repetição tomadas aleatoriamente. Após serem medidas, estas mesmas plântulas foram pesadas individualmente em balança de precisão para obtenção da massa fresca. Para obtenção da massa seca, as plântulas foram colocadas em sacos de papel e temperatura constante de 70º C em estufa, por 48 horas, para desidratação e posterior pesagem.

Os cotilédones de outras 3 plântulas normais, por repetição, que não as submetidas à desidratação, foram cortados, pesados em balança de precisão e imediatamente submetidos à extração da clorofila (ver item 4.4.3). As demais plântulas foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -20º C em freezer para posterior extração e análise da atividade da enzima peroxidase (POD) (item 4.4.4).



Figura 2. Aspecto geral das plântulas provenientes do ensaio de germinação, 7 dias após a sementeira com MC-LR equivalente. Estão representadas algumas caixas com os tratamentos MC₁+ (MC-LR equivalente) e MC₁- (sem MC).

4.4.3. Análise do teor de clorofila

Os cotilédones obtidos de três plântulas de cada repetição do bioensaio de germinação foram incubados em tubos Falcon contendo 3 mL de MeOH 100 %, envoltos em papel alumínio e mantidos sob agitação em *shaker* a 20°C por 48h, permitindo assim, a extração completa dos pigmentos foliares. Em seguida, uma alíquota de 2 mL de cada tubo foi coletada para a determinação espectrofotométrica das absorbâncias a 662 nm (clorofila *a*) e 645 nm (clorofila *b*). Todo o procedimento foi realizado em condições de penumbra.

Os teores de clorofila *a*, *b* e *a + b* foram calculados segundo [Lichtenthaler \(1987\)](#) conforme as fórmulas a seguir, onde *A* corresponde aos valores de absorbância nos respectivos comprimentos de onda.

$$\text{Clorofila } a = [11,24 \times A_{662}] - [2,04 \times A_{645}]$$

$$\text{Clorofila } b = [20,13 \times A_{645}] - [4,19 \times A_{662}]$$

$$\text{Clorofila } a + b = [7,05 \times A_{662}] + [18,09 \times A_{645}]$$

Somente os valores do conteúdo de clorofila *a + b* dos tecidos foram apresentados em µg de pigmento por grama de massa fresca (µg.g⁻¹).

4.4.4. Determinação da enzima peroxidase (POD)

A extração da POD foi realizada macerando-se, em almofariz com nitrogênio líquido, 300 mg de plântulas inteiras, lavadas, obtidas no bioensaio de germinação de sementes. Foram acrescentados ao macerado, 5 ml de tampão fosfato (0,2M, pH 6,8) e polivinilpirolidone (PVP), sendo o procedimento realizado em banho com gelo. As amostras foram centrifugadas a 4° C, 10.000 rpm por 10min e posteriormente, o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático para a quantificação.

Foram elaboradas duas soluções para determinação da POD: A e B. Para preparo da Solução A, 2,2 mL de H₂O₂ (35%) foram diluídos com água destilada até volume de 10mL, sendo retirado desta solução 0,5 ml e o volume completado com tampão fosfato (0,2 M) até 50ml. A Solução B foi preparada diluindo-se 83,3mg de aminoantipirina em 10mL de água destilada e 163mg de fenol diluídos em 70 mL de água destilada. Posteriormente as duas soluções foram reunidas e o volume completado para 100 mL, também com água destilada.

A quantificação da POD foi realizada por espectrofotometria utilizando o comprimento de onda de 505 nm. Foram adicionados 1,0 ml do extrato enzimático, 0,5 mL da solução A e 0,5 mL da solução B em tubos de ensaio onde as amostras permaneceram em banho-maria a 30°C durante 5 minutos. Após este período, a reação foi encerrada adicionando 2 mL de álcool etílico absoluto. Os resultados foram expressos em $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ decompostos} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de massa fresca. A metodologia utilizada foi adaptada de [Lima \(1994\)](#).

4.5. Experimento com plantas jovens e adultas

Foram utilizadas mudas de rúcula, variedade Folha Larga (*Eruca sativa* Mill) adquiridos de produtor local, com 30 dias após germinação (IBS Mudas, Piracicaba, SP). A denominação de planta jovem foi dada àquelas em que as folhas ainda não haviam se formado ou estavam em início de formação. Para as plantas denominadas adultas, as folhas já estavam completamente formadas (figura 3).

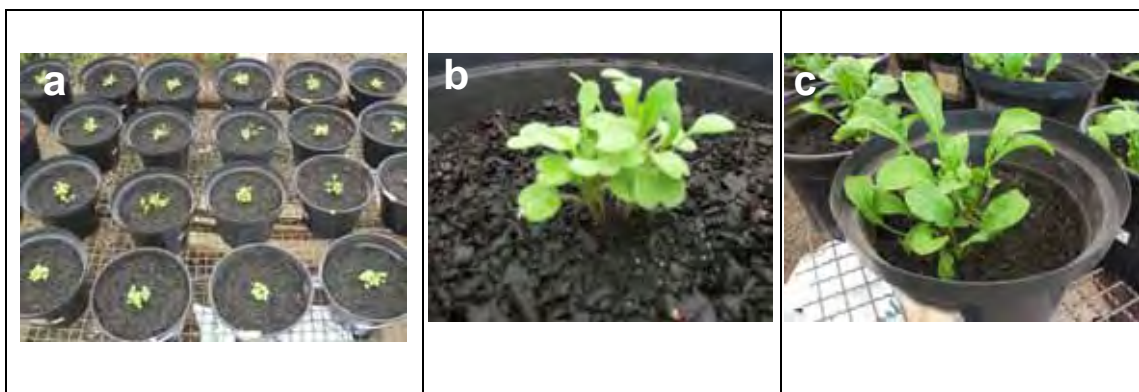


Figura 3. Plantas utilizadas no experimento com planta jovem e adulta. a) Experimento em casa de vegetação no qual a cada conjunto de três vasos correspondem a um tratamento. b) Detalhe de planta utilizada no experimento com planta jovem. Tratamentos com e sem toxina começaram a ser aplicados logo após o transplante para os vasos. Nesse estágio, as folhas ainda estão sendo formadas, com a predominância dos cotilédones. c) Detalhe de planta utilizada como planta adulta. Tratamentos com e sem MC foram iniciados dez dias após o transplante para os vasos. Nesse estágio as folhas já estavam completamente formadas.

As condições de cultivo das cianobactérias produtoras (BCCUSP232) e não produtoras (BCCUSP03) de MC e a obtenção dos extratos a serem utilizados neste experimento foram as mesmas descritas nos itens 4.1 e 4.2. Foram utilizadas soluções com a presença de MC-totais do extrato tóxico (MC₂₊) e não tóxico (MC₂₋). A denominação MC₂₊ foi dada ao conjunto de todas as variantes de MCs presentes nas amostras de extrato bruto da linhagem BCCUSP232 (MC-totais) (Tabela 1). Foram aplicadas as seguintes concentrações de MCs totais: 0,5; 2,0; 5,0; e 10,0 µg.L⁻¹, além do controle sem MC, irrigado apenas com água destilada. Todos os tratamentos foram realizados com trélicas.

A quantidade em massa seca do extrato bruto sem MCs da linhagem BCCUSP03 (MC₂₊) utilizada para o preparo das soluções foi correspondente à massa seca utilizada do cultivo BCCUSP232 para se obter as concentrações de MCs-totais.

4.5.1. Determinação de microcistina no extrato bruto utilizando ELISA

Com o objetivo de verificar se ocorreu algum tipo de degradação da MC durante o tempo que se passou desde a realização das análises por HPLC/LC-MS e

o início deste experimento com plantas, foi realizada análise quantitativa através de imunoenensaio (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay - Ensaio Imunoabsorvente de Ligação de Enzima).

Foram pesados 5 mg de extrato bruto da linhagem BCCUSP232, suspensos em 3 mL de água destilada, em tubos de vidro, o qual foi submetido a ultrassom por 5min. A lise total das células foi confirmada através de microscópio óptico.

As frações de MCs obtidas foram analisadas através de kit ELISA em placas específicas (BEACON, Portland, USA). Trata-se de um método competitivo indireto constituído de anticorpos policlonais usado para quantificar MCs, apresentando 100% de reatividade com MC-LR, 87% com MC-RR, 48% com MC-YR. O procedimento foi desenvolvido de acordo com as recomendações do fabricante, conforme os seguintes passos: adição de 50µL de conjugado microcistina-enzima em cada poço da placa e, em seguida, na adição de 50 µL dos calibradores, do controle e das amostras. Logo após, adicionados 50 µL de solução de anticorpo.

O conteúdo foi misturado através de agitação manual durante 30 s e os poços cobertos com parafilme e incubados durante 30 min a temperatura ambiente. Após este período, os poços foram lavados com solução de lavagem do kit, e posteriormente, adicionados 100µL de substrato em cada poço. Novamente, o conteúdo foi misturado manualmente e incubado por mais 30min. Depois da incubação, foram pipetados 100µL de "solução de parada" (ácido clorídrico a 1N) em cada poço. Para a leitura das amostras foi utilizada uma leitora de placas (Asys, modelo Expert Plus) no comprimento de onda de 450nm. Uma curva de calibração foi construída usando concentrações de MC-LR de 0,1; 0,3; 0,8 e 2,0 ppb ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) para a determinação da concentração de MCs das amostras. As amostras foram analisadas em duplicata. Para valores acima do limite de detecção foram realizadas diluições com água deionizada. Os resultados foram expressos em μg de equivalentes de MCs por grama de massa fresca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Para o experimento com planta jovem e adulta, foram utilizadas quatro concentrações de MC (Tabela 2) além do controle, em triplicata.

Tabela 2. Relação da quantidade de MC-totais (MC₂₊), juntamente com a parcela de MC-LR equivalente aplicada por tratamento em plantas jovem e adulta.

MC-totais ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	MC-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
0,5	0,08
2,0	0,28
5,0	0,71
10,0	1,42

4.5.2. Planta Jovem

Para o experimento com as denominadas plantas jovens, mudas foram transplantadas para vasos com capacidade 7L (nº 24) contendo 6L (aproximadamente 4 kg) de substrato para hortaliça em vaso (Basaplant, Artur Nogueira, Brasil). Imediatamente após o transplante, foi iniciada a aplicação das soluções dos tratamentos MC₂₊ e MC₂₋ (0,5; 2,0; 5,0; e 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$), além do controle. Foram aplicados diariamente 150 mL das soluções em cada vaso, durante 15 dias. As plantas foram mantidas em casa de vegetação pertencente ao Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) da ESALQ/USP.

A fim de reproduzir as condições de irrigação por aspersão, as soluções de cada tratamento foram aplicadas nas folhas das plantas, permitindo que o excesso escorresse para o substrato. Foram realizadas adubações extras com uma solução contendo nitrato de cálcio, nitrato de potássio, fosfato monoamônico (MAP), sulfato de magnésio, micronutrientes e ferro, a cada 3 dias. Não foi aplicado nenhum tipo de defensivo agrícola durante todo o ciclo de desenvolvimento da cultura.

4.5.2.1. Determinação do teor de clorofila e da enzima peroxidase (POD) em folhas e raízes

Um dia após o término da aplicação dos tratamentos, um disco foliar de 1 cm de diâmetro foi cortado de uma folha mediana de cada planta com a ajuda de um vazador. Os discos foliares foram pesados em balança de precisão e submetidos à extração de clorofila (conforme item 4.4.3). Para medir a atividade da POD, 300 mg da folha e 300 mg da raiz das plantas de cada vaso, foram pesadas e maceradas com nitrogênio líquido e, posteriormente, acrescentados 5 mL de tampão fosfato (0,2

M, pH 6,8) e polivinilpirolidone (PVP). A quantificação da POD foi realizada como descrita previamente no item 4.4.4.

4.5.2.2. Determinação da condutividade elétrica da membrana plasmática de folhas

A condutividade elétrica da membrana plasmática das folhas de rúcula foi avaliada com auxílio de condutivímetro (HI 9043, Hanna Instruments). Para tanto, foram cortados quinze discos por planta de três folhas medianas (cinco de cada folha) para a realização da análise da permeabilidade seletiva da membrana plasmática.

Foram utilizados dois béqueres contendo 20 mL de solução de sacarose 0,2 M e 15 discos foliares para cada tratamento, em duplicata. As leituras da condutividade elétrica foram realizadas a cada 30 min, durante as primeiras 3 horas, e depois a última leitura foi realizada na 24^o hora, para todas as amostras.

4.5.2.3. Determinação de microcistinas em tecido foliar

Para a determinação da MC nos tecidos foliares, foram maceradas 50 mg de massa seca de uma folha inteira em almofariz utilizando nitrogênio líquido. Cada folha foi retirada de uma planta (3 plantas por tratamento) expostas a diferentes concentrações de MCs (0,5; 2,0; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e do controle (apenas com água destilada).

O material proveniente da maceração das folhas foi depositado em tubos de vidro e submetido ao ultrassonicador por 5 min a fim de se obter a completa lise das células, a qual foi confirmada através de microscópio óptico. O restante do procedimento foi previamente descrito no item 4.5.1.

4.5.3. Planta adulta

Plantas no mesmo estágio de desenvolvimento do experimento com planta jovem foram transplantadas para vasos com capacidade para 7 L (n^o 24) contendo 6 L (aproximadamente 4 kg) de substrato para hortaliça em vaso (Basaplant, Artur Nogueira, Brasil). Também foram mantidas em casa de vegetação pertencente ao Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) da ESALQ/USP. Contudo, até o 10^o dia após o transplante, as plantas somente foram irrigadas diariamente com água

destilada, com um volume suficiente para manter o substrato permanentemente úmido, além de adubações extras (item 4.5.2). Após esse período, as plantas apresentaram folhas bem desenvolvidas, sendo este o estágio adequado para o início da aplicação dos tratamentos.

A partir do 11º dia após o transplante, iniciou-se a aplicação das soluções contendo 150 mL do extrato bruto dos tratamentos (MC-totais) e água destilada para o tratamento controle, durante 15 dias. A partir de quinze dias foram realizadas as determinações do teor de clorofila, da enzima peroxidase (POD), da condutividade elétrica da membrana plasmática e MCs nos tecidos foliares, descritos anteriormente nos itens 4.5.2.1, 4.5.2.2 e 4.5.2.3.

4.6. Análise dos dados

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância com comparação de médias por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro utilizando o programa Statistica (Statsoft). Nos ensaios com resultados significativos foi utilizado o teste de Dunnett para verificar quais tratamentos apresentaram diferenças significativas (5%) em relação ao controle. Gráficos em barras com as médias e erro padrão de cada tratamento foram confeccionados no programa Excel.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento com sementes e plântulas

5.1.1. Germinação e plântulas normais

Não houve efeito dos extratos com (MC₁₊) sem (MC₁₋) MC-LR equivalente sobre a germinação das sementes de rúcula (Figura 4). Igualmente, não houve variação entre os tratamentos (MC₁₊ e MC₁₋) e estes não apresentaram diferenças em relação ao controle (Figura 6).

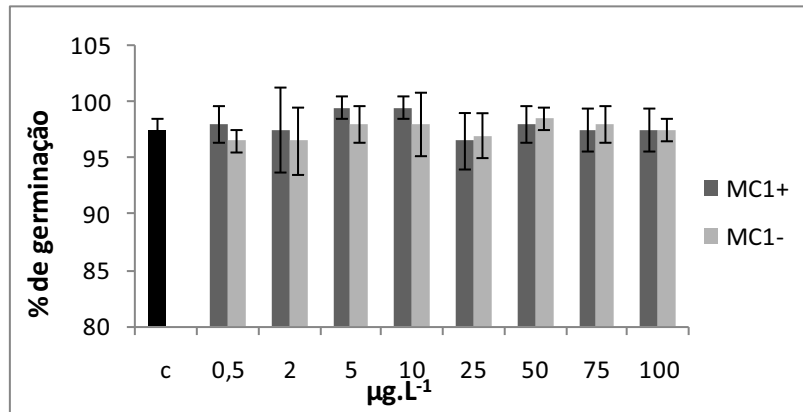


Figura 4. Porcentagem (%) da germinação de sementes. Nenhum dos tratamentos com extrato bruto diferiu entre si e do controle ($p > 0,05$). Valores das médias ($n=4$) com desvio padrão. C: controle. MC₁₊: extrato bruto com MC-LR equivalente; MC₁₋: extrato bruto sem MC.

Os resultados também não demonstraram efeitos sobre a germinação de plântulas das sementes que foram consideradas normais (Figura 5), não afetando suas estruturas a ponto de torná-las não viáveis.

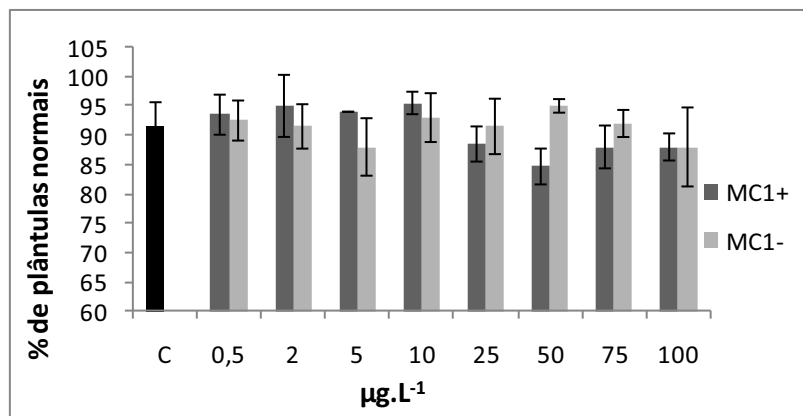


Figura 5. Porcentagem (%) de plântulas normais. Nenhum dos tratamentos com extrato bruto diferiu entre si e do controle ($p > 0,05$). Valores das médias ($n=4$) com desvio padrão. C: controle. MC₁₊: extrato bruto com MC-LR equivalente; MC₁₋: extrato bruto sem MC.

5.1.2. Desenvolvimento inicial de plântulas. Obtenção de massa (seca e fresca), teor de clorofila e POD

Os resultados não indicaram a influência dos extratos com (MC₁₊) e sem (MC₁₋) MC-LR equivalente (Figura 6) em plântulas obtidas no ensaio de germinação. Os extratos com e sem MC-LR equivalente não diferiram do controle e nem entre si. Exceto os tratamentos 2,0 µg.L⁻¹ MC₁₋ e 50 µg.L⁻¹ MC₁₊, que diferiram do controle (Figura 7).

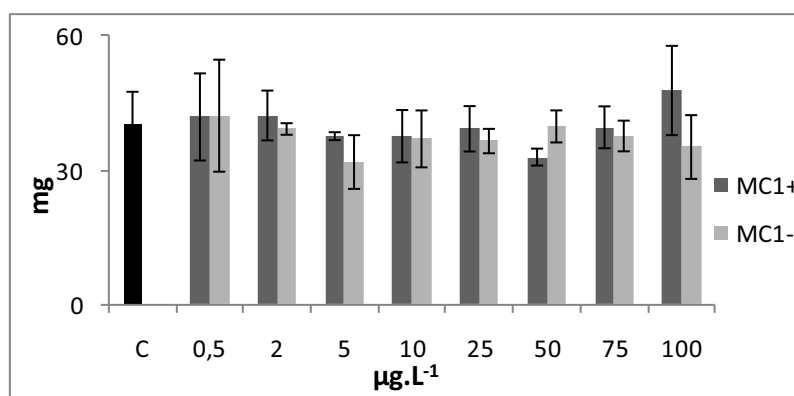


Figura 6. Massa fresca (mg) das plântulas de rúcula. Nenhum resultado diferiu do controle ($p > 0,05$). Valores das médias com desvio padrão ($n=4$). C: controle. MC₁₊: extrato bruto com MC-LR equivalente; MC₁₋: extrato bruto sem MC-LR.

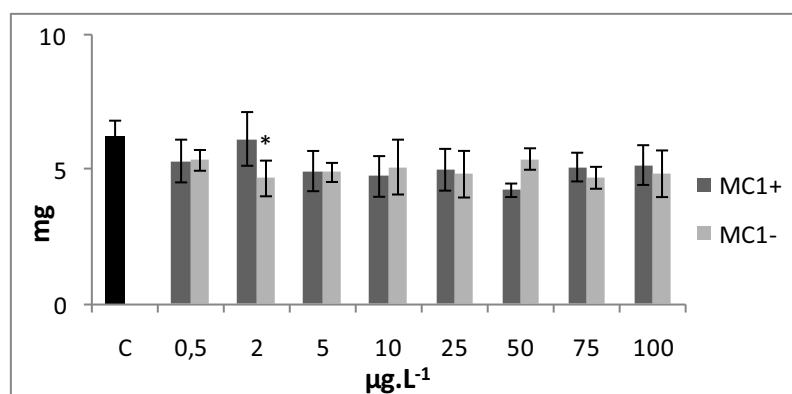


Figura 7. Massa seca (mg) das plântulas de rúcula. Apenas dois tratamentos com extrato bruto (2 MC₁₋ e 50 MC₁₊) diferiram do controle ($p < 0,05$) pelo teste de Dunnet (*). Valores das médias ($n=4$). C: controle. MC₁₊: extrato bruto com MC-LR equivalente; MC₁₋: extrato bruto sem MC.

Não houve efeito significativo dos extratos com (MC₁₊) e sem (MC₁₋) MC-LR equivalente sobre o comprimento da raiz primária das plântulas (Figura 8), demonstrando que as concentrações utilizadas nos tratamentos com extrato bruto não foram suficientes para causar alterações no referido órgão. Nenhum dos tratamentos (MC₁₊ e MC₁₋) diferiu do tratamento controle e nem entre si.

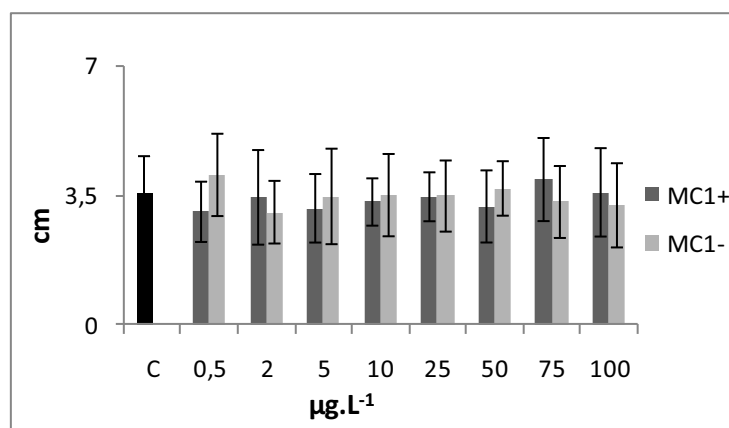


Figura 8. Comprimento da raiz primária das plântulas de rúcula. Nenhum dos tratamentos com extrato bruto diferiu do controle ou entre si. Valores das médias (n=4). C: controle. MC₁₊: extrato bruto com MC-LR equivalente; MC₁₋: extrato bruto sem MC.

Os resultados para o comprimento da parte aérea (hipocótilo + cotilédones) das plântulas (Figura 9) demonstraram que houve influência da MC-LR equivalente. Houve efeito de dose, para os extratos com MC-LR equivalente (MC₁₊) utilizados, visto que as concentrações maiores (50, 75 e 100 µg.L⁻¹) (MC₁₊) causaram a inibição de crescimento da parte aérea e estes diferiram do controle e das outras concentrações.

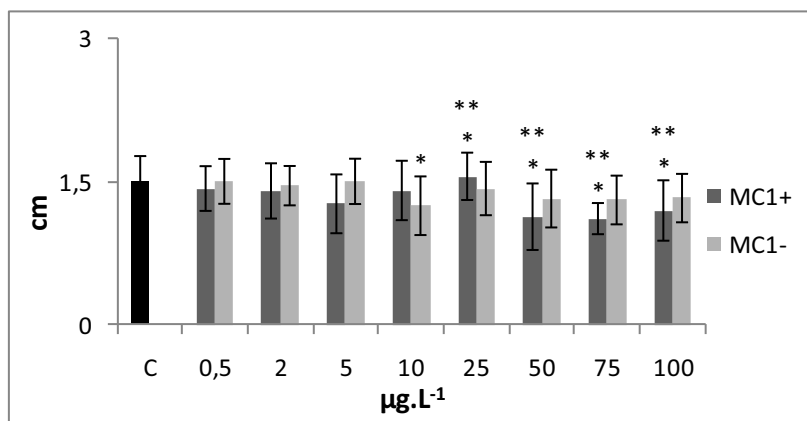


Figura 9. Comprimento da parte aérea (hipocótilo + cotilédones) das plântulas de rúcula. As maiores concentrações dos extratos com MC-LR equivalente diferiram do controle ($p < 0,05$) pelo teste de Dunnett (*) e entre si pelo teste de Tukey (**). Valores das médias ($n=4$). C: controle. MC₁₊: extrato bruto com MC-LR equivalente; MC₁₋: extrato bruto sem MC.

Não houve alteração no teor de clorofila presente nos cotilédones das plântulas (Figura 10). Nenhum dos extratos com (MC₁₊) e sem (MC₁₋) MC-LR equivalente diferiu do controle ou entre si. Contudo, a média dos tratamentos com extrato contendo MC diferiu da média do controle e dos extratos sem MC. Foi encontrada menor concentração de clorofila nas plântulas expostas aos extratos com MC-LR equivalente.

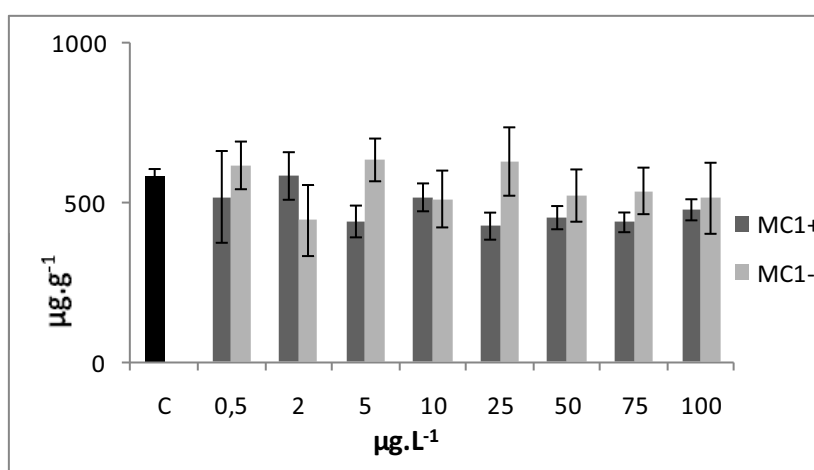


Figura 10. Teor de clorofila ($\mu\text{g.g}^{-1}$) presente nos cotilédones das plântulas de rúcula. Nenhum dos tratamentos contendo extrato bruto com e sem MC-LR equivalente diferiu do controle ou entre si. Valores das médias ($n=4$). C: controle. MC₁₊: extrato bruto com MC-LR equivalente; MC₁₋: extrato bruto sem MC.

A atividade da enzima peroxidase (Figura 11) foi maior para os tratamentos com o extrato bruto onde continha MC-LR equivalente (MC₁₊) em relação aquele que não apresentava MC (MC₁₋) e ao controle (C). Também ocorreu inibição da atividade dessa enzima nas menores concentrações de MC-LR equivalente. Apenas concentrações maiores do extrato não tóxico (MC₁₋) não diferiram do grupo controle. Contudo os resultados não demonstraram qualquer padrão para a alteração dessa atividade.

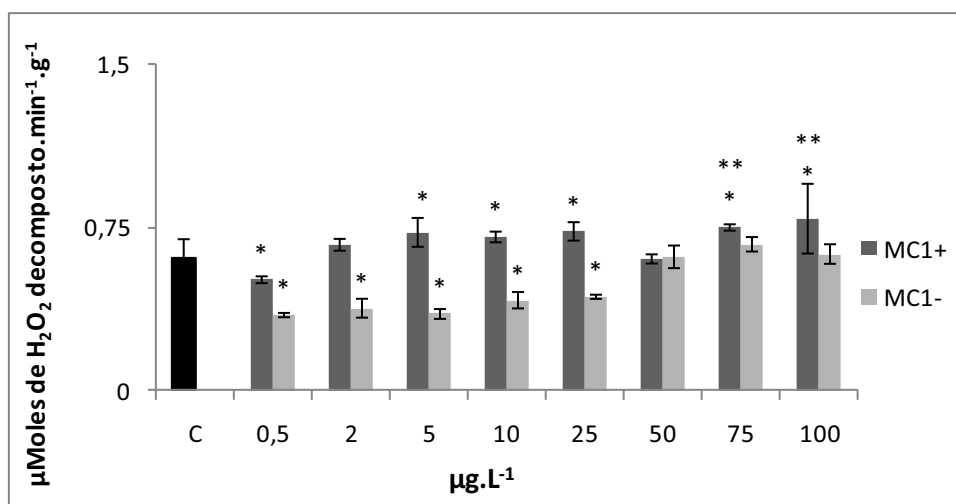


Figura 11. Atividade da enzima peroxidase ($\mu\text{Moles de H}_2\text{O}_2 \text{ decomposto.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$) das plântulas de rúcula. A média dos tratamentos contendo extrato bruto com e sem microcistina diferiram significativamente ($p < 0,05$) do controle pelo teste de Dunnett (*) e entre si pelo teste de Tukey (**). Valores das médias ($n=4$). C: controle. MC₁₊: extrato bruto com MC-LR equivalente; MC₁₋: extrato bruto sem MC-LR.

5.2. Experimentos com plantas jovens e adultas

5.2.1. Determinação do teor de clorofila

Não houve interferência dos extratos com (MC₂₊) e sem (MC₂₋) MC-totais na quantidade de clorofila nas folhas de rúcula nos experimentos realizados. Desta forma, não houve diferença no teor de clorofila nos tratamentos para plantas jovens (Fig. 12a) e adultas (Fig. 12b) e destes para o controle.

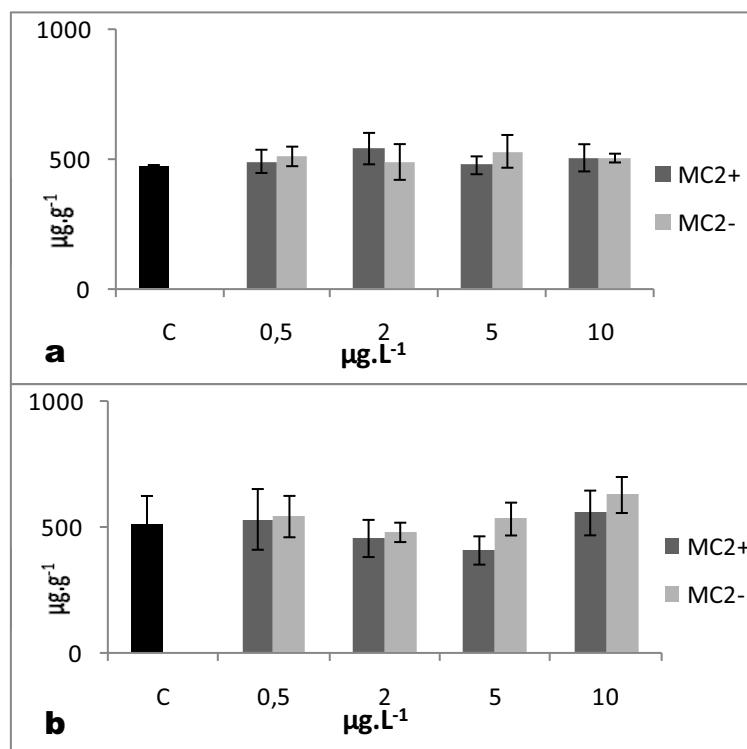


Figura 12. Teor de clorofila presente em folhas de rúculas provenientes de plantas (a) jovens e (b) adultas. Não houve diferença entre os diferentes estágios de desenvolvimento e nem em relação ao controle pelo teste de Tukey e Dunnet. Valores das médias (n=3). C: controle. MC₂₊: extrato bruto com MC-totais; MC₂₋: extrato bruto sem MCs.

5.2.2. Determinação da enzima peroxidase em folhas e raízes

A atividade da enzima peroxidase (POD) presente nas folhas de rúcula expostas aos extratos com (MC₂₊) e sem (MC₂₋) MC-totais em plantas jovens (Figura 13a) indicou aumento na presença dos extratos brutos com MC-totais. Este aumento foi gradativo de acordo com a concentração de MC-totais aplicada, indicando maior estresse oxidativo nas maiores concentrações. Nos tratamentos com MC-totais, apenas o tratamento com 2,0 µg.L⁻¹ não diferiu do tratamento controle.

Por outro lado, nas plantas adultas (Figura 13b) não houve efeito dos extratos com (MC₂₊) e sem (MC₂₋) sobre a atividade da POD. Contudo, dois tratamentos diferiram do controle (2,0 µg.L⁻¹ MC₂₊ e 0,5 µg.L⁻¹ MC₂₋).

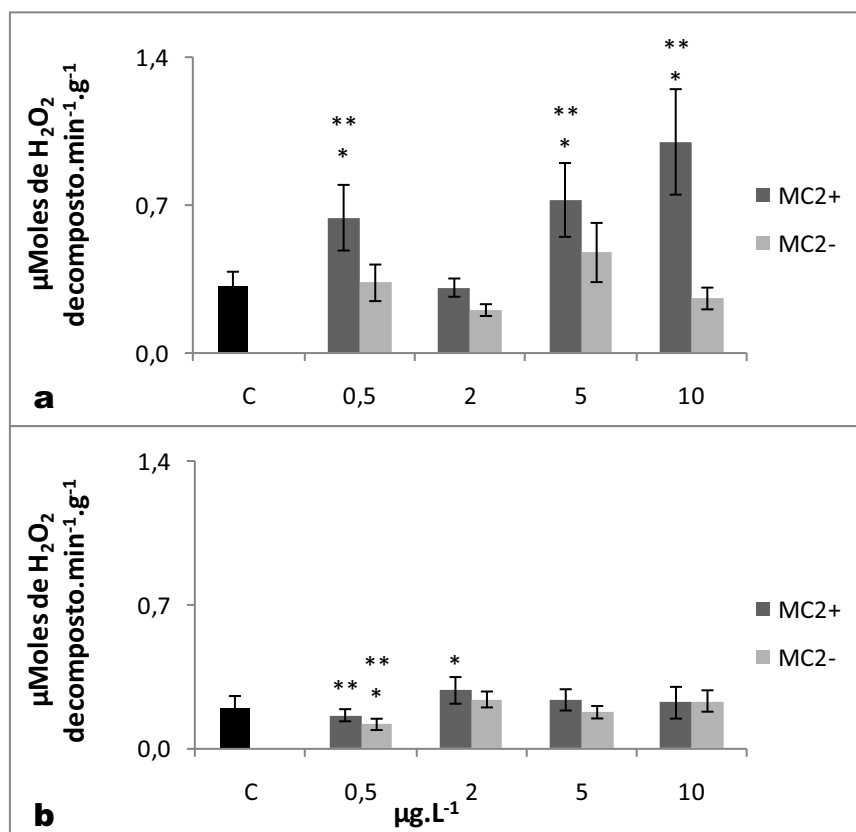


Figura 13. Atividade da enzima peroxidase em folhas de (a) plantas jovens e (b) adultas de rúcula. Houve diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos entre si pelo teste de Tukey (**) e em comparação com a média do controle pelo teste de Dunnett (*) para os extratos com e sem MC-totais utilizadas em ambos experimentos. Valores das médias com ($n=3$). C: controle. MC₂₊: Extrato bruto com MC-totais e MC₂₋: Extrato bruto sem MCs.

A atividade da POD na raiz de plantas jovens (Figura 14a) demonstrou, assim como para as folhas, efeito dos extratos com MC-totais sobre a atividade da enzima. Houve um aumento na atividade da enzima nas maiores concentrações de MC-totais utilizadas. Desta forma, apenas os tratamentos com 5,0 e 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ do extrato bruto contendo MC-totais diferiu do controle e dos demais.

Para o experimento com a planta adulta (Figura 14b), embora os valores tenham sido menores que os da planta jovem, a atividade da POD na raiz das plantas diferiu em alguns tratamentos com (0,5 e 2,0 MC₂₊) e sem (0,5 MC₂₋) MC-

totais, porém sem um padrão aparente. Os valores encontrados nos tratamentos com MCs foram maiores que o controle.

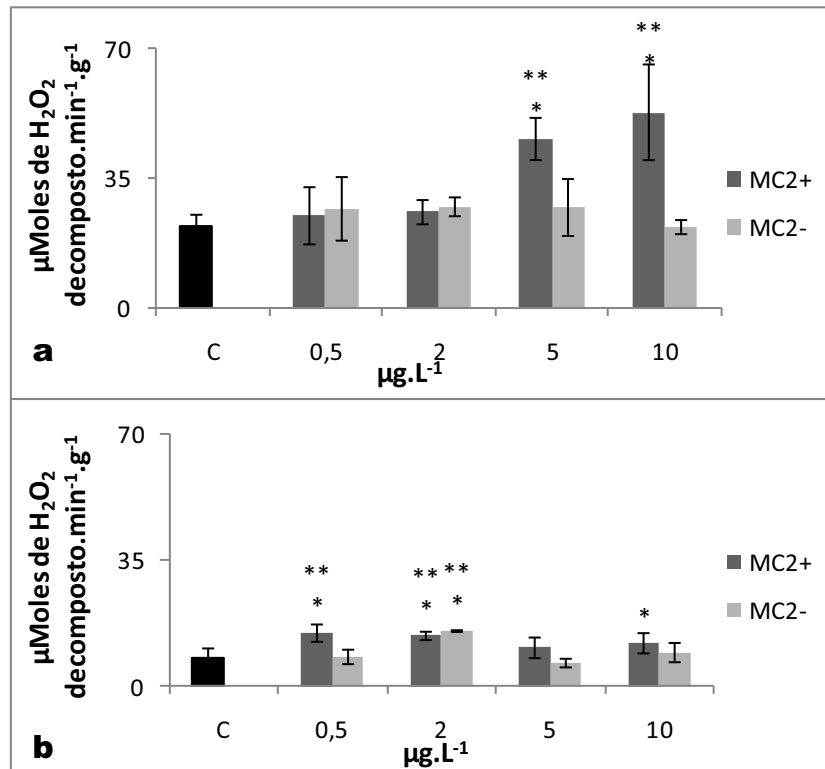


Figura 14. Atividade da enzima peroxidase na raiz de plantas (a) jovens e (b) adultas de rúcula. Houve diferença ($p < 0,05$) nos tratamentos entre si pelo teste de Tukey (**) e em comparação com a média do controle pelo teste de Dunnett (*) para os extratos com e sem MC-totais utilizados em ambos os experimentos. Valores das médias ($n=3$). C: controle. MC₂₊: Extrato bruto com MC-totais e MC₂₋: Extrato bruto sem MCs.

5.2.3. Determinação da condutividade elétrica da membrana plasmática de folhas

Com relação à condutividade elétrica da membrana plasmática de plantas jovens (Figura 15a), nenhum dos extratos com (MC₂₊) e sem (MC₂₋) MC-totais diferiu do controle e entre si. Para a planta adulta (Figura 15b), apenas a concentração de 2 μg.L⁻¹ (MC₂₊) diferiu do controle. No entanto, quando comparadas as médias dos tratamentos com e sem MC-totais com o controle, houve diferença ($p=0,0314$) entre o controle e o tratamento com MCs (MC₂₊).

Quando os resultados dos dois experimentos foram comparados, porém, houve diferença ($p=0,0189$). Os valores encontrados para a planta adulta foram maiores que os da planta jovem.

Também foi possível observar que nos dois experimentos, o valor encontrado para o controle foi menor que todos os outros tratamentos, embora não tenha sido significativo.

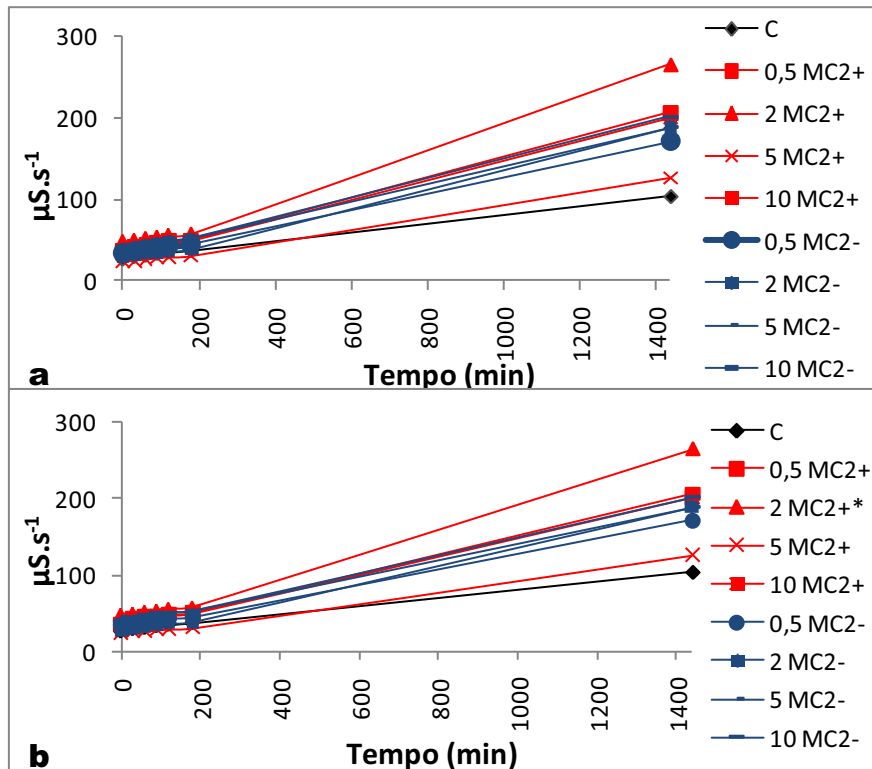


Figura 15. Condutividade elétrica da membrana plasmática de folhas de planta (a) jovem e (b) adulta. Apenas a concentração $2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (MC_{2+}) diferiu do tratamento controle pelo teste de Dunnet (*) para o experimento na planta adulta. Valores das médias ($n=3$). C: controle. MC_{2+} : Extrato bruto com MC-totais; MC_{2-} : Extrato bruto sem MCs. $0,5 \text{ MC}_{2+}$: $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$; 2 MC_{2+} : $2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$; 5 MC_{2+} : $5,0 \mu\text{g.L}^{-1}$; 10 MC_{2+} : $10,0 \mu\text{g.L}^{-1}$; $0,5 \text{ MC}_{2-}$: $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$; 2 MC_{2-} : $2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$; 5 MC_{2-} : $5,0 \mu\text{g.L}^{-1}$; 10 MC_{2-} : $10,0 \mu\text{g.L}^{-1}$.

5.2.4. Determinação de microcistinas em tecido foliar

A análise dos extratos provenientes dos tecidos foliares das plantas expostas às concentrações de microcistinas nos experimentos com planta jovem e adulta de rúcula demonstrou que não houve acúmulo da cianotoxina nos tratamentos com

extratos contendo MC-totais utilizados. Os resultados para as plantas expostas ao extrato não tóxico também foram negativos. Durante toda a duração dos experimentos com plantas jovens e adultas, não foram observadas diferenças morfológicas entre as plantas expostas aos extratos com e sem MC-totais.

6. DISCUSSÃO

6.1. Experimento com sementes

Experimentos com germinação de sementes na presença de MCs foram realizados em vários trabalhos para avaliar o efeito inibitório da MC em condições mais controladas e em menor tempo (ABE et al. 1996; CHEN et al., 2004; PFLUGMACHER et al, 2007; SAQRANE et al. 2008; Yin et al.,2005). No entanto, as respostas às MCs são variáveis entre os táxons, inclusive com diferentes níveis de sensibilidade até dentro da mesma espécie (PFLUGMACHER et al, 2007; SAQRANE et al., 2008). As respostas também podem variar de acordo com a quantidade de MC aplicada e o tempo de exposição (SAQRANE et al., 2009).

No presente estudo, não foi observado qualquer efeito das concentrações de MC-LR equivalente sobre a germinação de sementes de rúcula e nem na produção de plântulas normais. Esses resultados são coerentes com os de outros trabalhos nos quais foram aplicadas concentrações semelhantes de MCs na germinação de sementes de plantas terrestres, como por exemplo, Chen et al. (2004) com nabo e arroz (24 e 120 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR), Pereira et al.(2009) com alface (5,9 e 56,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR) . No entanto, Hereman (2010) em experimento semelhante ao presente estudo, com sementes de alface, encontrou efeito inibitório dos extratos brutos com e sem MC-LR equivalente sobre a germinação, quando utilizou as concentrações de 75 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Ao contrário do presente estudo, também foram encontradas plântulas com sinais de necrose na raiz das plântulas expostas às maiores concentrações.

A inibição da germinação, quando presentes em outros trabalhos tais como Chen (2004) e Saqrane (2009), ocorreu em concentrações muito superiores às utilizadas no atual trabalho com rúcula. Saqrane (2009) em experimento de germinação com *Lens esculenta*, *Zea mays*, *Triticum durum* e *Pisum sativum*, constatou diferença na resposta das espécies, sendo a primeira considerada a mais resistente. Enquanto *Lens esculenta* apresentou taxa de 74,67% de germinação na

maior concentração ($11.600 \mu\text{g.L}^{-1}$) de MC-LR equivalente, *Pisum sativum* teve apenas 3% das sementes germinadas nessa mesma concentração. Chen (2004) observou redução na porcentagem de germinação de sementes de arroz e nabo em concentrações acima de $600 \mu\text{g.L}^{-1}$. Desta forma, não é possível afirmar o grau de resistência para a rúcula, com relação a porcentagem de germinação em relação às espécies anteriormente citadas. Para isso, teríamos que aplicar concentrações de MC-LR superiores à maior utilizada nessa pesquisa ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Sintomas como a redução do comprimento da raiz primária, parte aérea (hipocótilo + cotilédones) e diminuição da massa fresca e seca são muito comuns em experimentos realizados com MC (LR, YR e RR) e geralmente esses sintomas ocorrem em altas concentrações de MCs (BIBO et al., 2008; CHEN et al., 2004; KURKI-HELASMO & MERILUOTO, 1998; SAQRANE et al., 2009). Hereman (2010) encontrou redução no comprimento da raiz primária de plântulas de alface nas maiores concentrações de MC-LR (75 e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$), além da presença de necrose, porém não houve efeito da MC sobre a massa seca e fresca das plântulas. Saqrane (2008) encontrou efeitos de inibição nesses parâmetros em plântulas (*Lens esculenta*, *Zea mays*, *Triticum durum* e *Pisum sativum*) submetidas a concentrações de $11.600 \mu\text{g.L}^{-1}$. Bibo (2008), igualmente encontrou inibição no comprimento da parte aérea, raiz primária, massa seca e fresca de plântulas de nabo e repolho a partir de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. Contudo, nessa pesquisa não houve efeitos de MCs nas plântulas de rúcula sobre o comprimento da raiz primária em nenhum dos tratamentos utilizados com e sem MC-LR equivalente e nem necrose dos tecidos.

Isto demonstra que a rúcula apresentou tolerância para as concentrações de MC-LR equivalentes utilizadas ($0,5$; $2,0$; $5,0$; $10,0$; $25,0$; $50,0$; $75,0$ e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$), visto que também foram verificadas alteração na massa seca e fresca. Porém, os resultados para o comprimento da parte aérea demonstraram que houve inibição de crescimento a partir de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ apenas para os tratamentos com MC-LR equivalente. O motivo pelo qual isso ocorreu não ficou claro, pois não ocorreu inibição no crescimento da raiz primária.

Uma possível explicação para a inibição da parte aérea nas maiores concentrações de MC-LR talvez esteja nos experimentos de Saqrane *et al.* (2008), que através de cortes histológicos da raiz primária de *Pisum sativum* verificaram atraso na diferenciação e formação do cilindro vascular além de inibição da

formação das raízes laterais. As raízes primárias expostas a MC-LR ($11.600 \mu\text{g.L}^{-1}$) também indicaram ausência de células da endoderme e do periciclo. O atraso na formação do xilema primário e ausência de fibras também foram observados. Neste estudo observamos apenas a inibição do comprimento da parte aérea, quando aplicadas as maiores concentrações de MC-LR equivalentes ($50,0$, $75,0$ e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$) para as plântulas de rúcula. Alterações no tecido radicular podem ter ocorrido pela ação da MC-LR, mas não a ponto de prejudicar o seu crescimento, porém, é possível que tenha ocorrido a alteração da disponibilidade de nutrientes para a parte aérea, afetando-a. Contudo, cortes histológicos não foram realizados para encontrar um possível indicativo para esta explicação.

Os tratamentos com a MC-LR equivalente não foram suficientes para afetar a quantidade do teor de clorofila presente nos cotilédones das plântulas de rúcula. Esse resultado corrobora com os resultados para a alface, nas mesmas concentrações (Hereman, 2010). No entanto, Abe et al. (1996) verificaram efeitos da MC-LR no conteúdo de clorofila em *Phaseolus vulgaris* L. quando utilizaram concentrações acima de $9.950 \mu\text{g.L}^{-1}$, muito maiores que as aqui aplicadas.

A atividade da enzima peroxidase (POD) é elevado sempre que ocorre algum tipo de estresse oxidativo nas plantas, causado pelo aumento da formação de espécies de oxigênio reativo (sigla em inglês - ROS) (DING, 2003). Praticamente todos os tratamentos utilizados com a MC-LR equivalente, em nosso estudo com plântulas de rúcula causaram o aumento na atividade da POD. Contudo não houve um padrão aparente nos resultados. Isso pode ter sido reflexo do uso da plântula inteira, não sendo possível identificar qual órgão contribuiu com a maior alteração. Não ficou claro também o motivo pelo qual os tratamentos sem MC apresentaram valores abaixo do tratamento controle até a concentração $25 \mu\text{g.L}^{-1}$. Como comparação, Hereman (2010) encontrou resultados parecidos para a alface. Contudo houve aumento na atividade da POD na maior concentração de MC-LR utilizada ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$). A exposição de diversas variedade de espinafre à baixa concentração de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR equivalente, durante 6 semanas causou o aumento da atividade da referida enzima (Pflugmacher et al., 2007). Chen et al.(2004) encontraram aumento na atividade da POD a partir de $24 \mu\text{g.L}^{-1}$ de extrato contendo MC-LR, -RR e -YR.

6.2. Experimento com planta jovem e adulta

Informações da literatura indicam que as MCs têm sido demonstrado que as MCs podem afetar não somente a quantidade de clorofilas (PFLUGMACHER, 2002; WIEGAND et al. 2004), mas também o fotossistema II de plantas expostas (SAQRANE *et al.*, 2009). Contudo, para as plantas de rúcula, não foram encontradas alterações na quantidade da clorofila presente, tanto nas folhas de plantas jovens, quanto adultas. As concentrações aplicadas neste estudo foram as mais frequentemente encontradas na natureza (entre 0,5 e 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs) (FASTNER et al., 1999; HIROOKA et al., 1999; VIEIRA et al., 2005).

Os tratamentos utilizados por Hereman (2010), com o mesmo tempo de exposição (15 dias), também não afetaram o teor de clorofila presente nas folhas de alface. Järvenpää et al. (2007) também não encontraram alterações nos valores para o teor de clorofila em experimento com brócolis em concentrações de 0, 1 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de quatro variantes de MCs, incluindo MC-LR (33%) e -RR (25%). Por outro lado, McElhiney (2001) encontrou redução no conteúdo de clorofila, com as concentrações parecidas com as utilizadas nesse experimento em cultura de tecidos de *Solanum tuberosum* (5-10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR) expostas por 16 dias. Isso demonstra que os efeitos variam de acordo com a espécie e forma de exposição à MC.

A atividade da enzima peroxidase (POD) apresentou respostas diferentes para a planta jovem e adulta. O estágio de desenvolvimento da planta teve influência na resposta com relação à formação de ROS. A planta jovem apresentou valores muito maiores que a planta adulta com relação à atividade da POD tanto nas folhas como para a raiz, além do efeito de dose. Isso indica que planta em seu estágio mais jovem quando é irrigada com MC é sensível ao estresse oxidativo, diferente do que ocorre quando a aplicação passa a ocorrer com a planta com suas folhas já formadas.

Os resultados encontrados também mostram maior atividade da POD nas raízes, em relação às folhas. Esse é um indício de que a raiz da rúcula é eficiente para o processo de desintoxicação, quando em estresse. Este resultado difere do trabalho de Hereman (2010) para a alface, em que ocorreu a redução da atividade da POD em ambos os órgãos da planta nos tratamentos com MCs em relação ao controle, e maiores valores para as folhas. Chen *et al.* (2004) encontraram

diferenças na resposta em plantas de nabo e arroz expostas a MCs (24 a 3.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) por 10 dias. Sendo que apenas o nabo apresentou um aumento significativo na atividade da POD na concentração de 3.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto o arroz não apresentou diferença com relação ao controle. Com base nesses resultados com nabo e arroz, os autores sugeriram que o arroz, por ser uma espécie de ambiente aquático, poderia apresentar mais resistência em relação às MCs. Em condições bem mais controladas (cultivo *in vitro*), Chen *et al.* (2010) não encontrou alterações na atividade da POD de brotos maçã em concentrações de 30 e 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs, demonstrando que os efeitos sobre a atividade da POD também variam de acordo com a espécie e as formas de exposição.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos com e sem MC e controle da permeabilidade seletiva da membrana plasmática das folhas de rúcula da planta jovem e adulta. Em concentrações maiores, a planta poderia se tornar mais susceptível a infecções e estresses abióticos. Esses resultados foram parecidos com os encontrados por Hereman (2010), com folhas de alface, submetidas às mesmas condições.

Acúmulo de MCs em plantas tem sido demonstrada em vários experimentos (CHEN *et al.*, 2004, 2010; CRUSH *et al.*, 2008; HEREMAN, 2010; JÄRVENPÄÄ *et al.*, 2007). Por outro lado, a utilização de diferentes concentrações de MCs não alterações de MCs nos tecidos foliares de plantas de rúcula. Hereman (2010) utilizando plantas de alface com as mesmas concentrações de MCs-totais de mesma linhagem tóxica (BCCUSP232), tempo de exposição à MC, substrato e método de detecção (ELISA) que foram utilizados no presente estudo, encontrou nos tecidos foliares quantidades da MC proporcionais àquelas aplicadas nos tratamentos com MCs. Desta forma, foram encontradas 167,066 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ no tratamento com 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs no tecido foliar da alface.

Para os experimentos com planta jovem e adulta de rúcula, o extrato bruto da linhagem BCCUSP232 foi quantificado previamente pelo imunoensaio (ELISA). Essa análise indicou a presença de 1.325 μg de MC por grama de extrato bruto da linhagem BCCUSP232. Uma quantidade menor de MC foi encontrada em relação à análise com HPLC/LC-MS, embora ainda alta. Esse valor foi utilizado como referência nos cálculos para MC-totais e foi usado na preparação das soluções para os tratamentos nos referidos experimentos (planta jovem e adulta).

Embora a concentração de MC quantificada pelo imunoensaio tenha sido alta, a quantidade de MC-LR (variante mais tóxica) presente no extrato bruto (Tabela 1) foi pequena (0,6%). Desta forma, como não foi possível identificar todas as variantes quantificadas pelo imunoensaio ELISA, não foi possível prever a real toxicidade dos tratamentos. A análise realizada previamente por HPLC/LC-MS, demonstrou a presença de diversas variantes demetiladas (dRR, ddRR A e dLR) com toxicidade desconhecida.

O extrato bruto utilizado por Hereman (2010) tinha uma quantidade maior de MC-LR (75,4 %) e MC-RR (24,6 %), que são as variantes mais conhecidas e de maior toxicidade (GUPTA *et al.*, 2003). Contudo, a menor quantidade dessas variantes no extrato bruto utilizado com a rúcula, pode ter influenciado nos resultados para a bioacumulação em folhas.

Vários motivos podem explicar a ausência de acúmulo nos tecidos foliares de rúcula. Embora tenha ocorrido a possibilidade de adsorção pelo substrato e, ou, degradação bacteriana da MC em presença de matéria orgânica, como observado por Bibo *et al.* (2008), isso não parece provável. No atual trabalho, foi utilizado o mesmo substrato comercial que Hereman (2010) utilizou em seus experimentos. A explicação talvez seja as variantes presentes no extrato bruto utilizado, ou mesmo em função do processo de desintoxicação que envolveria a formação de glutathione conjugada em plantas (Pflugmacher *et al.* 2007). Também não foi descartada a possibilidade de que o acúmulo de MCs tenha ocorrido nas raízes, e neste caso não houve translocação para as folhas. Como o objetivo do nosso trabalho foi verificar o acúmulo de MCs em partes comestíveis da rúcula, não foi realizada análise nas raízes. Saqrane *et al.* (2009) demonstraram a ocorrência de translocação diferencial de diferentes variantes de MCs nos diferentes órgãos de *Lens esculenta*, *Zea mays*, *Triticum durum* e *Pisum sativum*. No referido trabalho ocorreu variação na presença de cada variantes no caule, folhas e raízes. Houve diferença também com relação as espécies e de acordo com as concentrações utilizadas. Os autores também sugerem a possibilidade de diferentes graus de resistência das plantas entre as diferentes variantes.

Com base nesses resultados, é possível afirmar que nas condições em que foram realizados o experimento com a planta jovem e adulta, as MCs presentes no

extrato bruto tóxico não representaram uma ameaça à produtividade da rúcula e possivelmente não ofereceriam risco à saúde humana.

7. CONCLUSÕES

1- MCs presentes nos extratos utilizados não tiveram efeitos alelopáticos na germinação de sementes e na formação das plântulas de rúcula nas concentrações testadas de 0,5 a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR equivalente. Sementes de rúcula não foram susceptíveis aos tratamentos com MCs.

2-Plantas jovens e adultas de rúcula não sofreram efeitos alelopáticos pela exposição aos extratos brutos de *M. aeruginosa*, tanto produtora como não produtora de MCs (nas concentrações testadas de 0,5 a 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-Totais) em relação aos parâmetros investigados, com exceção da POD.

3- A diferença no estresse oxidativo entre plantas jovens e adultas frente à exposição aos extratos brutos da cianobactéria produtora de MCs reforça a necessidade de que futuros estudos sejam realizados com indivíduos nesse estágio de desenvolvimento.

4- A utilização da irrigação para o cultivo de rúcula com MC-totais, nas concentrações de 0,5 a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, possivelmente não oferece risco para a segurança alimentar, visto que não houve acúmulo nos tecidos foliares, com as variantes utilizadas.

5 – As variantes de MCs presentes na composição dos extratos tóxicos podem ter influência nos efeitos alelopáticos observados nos diversos estudos realizados, visto que a LD50 desde compostos é variável. Além disso, muitas variantes são desconhecidas ou sua ação ainda não foi investigada o que poderia influenciar não só nos efeitos alelopáticos como no processo de biocumulação.

8. REFERÊNCIAS

ABE, T.; LAWSON, T.; WEYERS, J. D.; CODD, G. A. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* leaves: implications for current spray irrigation practice. **New Phytologist**.133:651–58. 1996.

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

BABICA P, BLÁHA L, MARSALEK B. Exploring the natural role of microcystins – A review of effects on photoautotrophic organisms. **Journal of Phycology**, n. 42; p. 9–20. 2006.

BIBO, L.; YAN, G.; BANGDING, X.; JIANTONG, L.; YONGDING, L. A laboratory study on risk assessment of microcystin-RR in cropland. **Journal of Environmental Management**, n. 86, p. 566–574, 2008.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. **Harmful Algae**, n. 2, p. 51-60, 2003.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Development of *Microcystis aeruginosa* Kützing (Cyanophyceae/Cyanobacteria) under cultivation and its taxonomic implications. **Algological Studies**, n. 99, p. 29-37, 2000.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; KUJBIDA, P.; CARDOZO, K. H. M.; CARVALHO, V. M.; MOURA, A. N.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komárek *et al.*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 326, p. 687-694, 2005.

BOROWITZKA, MA. Microalgae as sources of pharmaceutical and other biologically active compounds. **Journal of Applied Phycology**. n.7, p. 3–15, 1995.

BOTES, D.P., et al. Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**. n. 1, p. 2747–2748, 1985.

BRASIL. Portaria 518, de 25 de março de 2004. Aprova o controle e vigilância da qualidade da água e seu padrão de potabilidade. **Ministério da Saúde, Brasília**. Publicado no Diário Oficial da União (DOU), 26 de março de 2004, Seção 1, pg. 266. 2004.

BRASIL. Regras para análise de sementes. SNDA/DNDV/CLAV, **Ministério da Agricultura e Reforma Agrária**, Brasília. 1992.

CARMICHAEL, W. W. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: “The Cyanohabs”. **Human and Ecological Risk Assessment**. n. 7, p.1393– 407, 2001.

CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 72, p.445–459, 1992.

CHEN, J. et al. Bioaccumulation of microcystin and its oxidative stress in the apple (*Malus pumila*). **Ecotoxicology**. n. 19. p. 796–803. 2010.

CHEN, J.; SONG, L.; DAI, J.; GAN, N.; LIU, Z. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). **Toxicon**, n. 43, p. 393-400, 2004.

CODD, G. A., METCALF, J. S.; BEATTIE, K. A. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. **Toxicon**, n. 37(8), p. 1181-1185. 1999.

CODD, G.A. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. **Water Science and Technology**. 32, 149–156, 1995.

CRUSH, J. R.; BRIGGS, L. R.; SPROSEN, J. M.; NICHOLS, S. N. Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. **Environmental Toxicology**, n. 23, p. 246-252, 2008.

DAWSON, R. M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**, n. 36, p. 953–62. 1998.

DIETRICH, D.; HOEGER, S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? **Toxicology and Applied Pharmacology**. n. 203, p.273–89. 2005.

DING, W. X., ONG, C. N. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity—minireview. **FEMS Microbiology Letters**. n.220, p.1–7, 2003.

DING, W.X., SHEN, H.M., ONG, C.N. Calpain activation after mitochondrial permeability transition in microcystin-induced cell death in rat hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n.291, p. 321–331. 2002.

DING, W.X., SHEN, H.M., ONG, C.N. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. **Hepatology**, n. 32, p. 547–555, 2000.

DING, W.X., SHEN, H.M., ONG, C.N. Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, n. 64, p.507–519, 2001a.

DING, W.X., SHEN, H.M., ONG, C.N., Pivotal role of mitochondrial Ca^{2+} in microcystin-induced mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 285, p. 1155–1161, 2001b.

DING, W.X., SHEN, H.M., SHEN, Y., ZHU, H.G., ONG, C.N. Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. **Environmental Health Perspectives**, n. 106, p. 409–413, 1998.

FASTNER, J.; NEUMANN, W.; WIRSING, B.; WECKESSER, J.; WIEDNER, C.; NIXDORF, B.; CHORUS, I Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in german fresh water bodies. **Environmental Toxicology**, n. 14, p. 13-22, 1999.

GEHRINGER, M. M.; KEWADA, V.; COATES, N.; DOWNING, T. G. The use of *Lepidium sativum* in a plant bioassay system. **Toxicon**, n. 41, p. 871-876, 2003.

GUETA-DAHAN, Y., YANIV, Z., ZILINSKAS, B.A., BEN-HAYYIM, G. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. **Planta**, n. 203, p. 460–469, 1997.

GUPTA, N., PANT, S.C., VIJAYARAGHAVAN, R., RAO, P.V. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. **Toxicology**, n.188, p. 285–296, 2003.

GUZMAN, R.E., SOLTER, P.F. Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure. **Toxicologic Pathology**. n.27, p. 582–588, 1999.

HEREMAN, T. C. **Efeitos do extrato bruto e da microcistina-LR**. 2010. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas – Biologia vegetal). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP, 2010.

HIROOKA, E. Y.; PINOTTI, M. H.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; UENO, Y. Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Paran, Brazil using ELISA. **Natural Toxins**, n. 7, p. 103-109, 1999.

HUANG, W.; XING, W.; LI, D.; LIU, W. Morphological and ultrastructural changes in tobacco BY-2 cells exposed to microcystin-RR. **Chemosphere**. n. 76. p.1006-1012. 2009.

HUANG, W.; XING, W.; LI, D.; LIU, W. Microcystin-RR induced apoptosis in tobacco BY-2 suspension cells is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. **Toxicology in Vitro**, n. 22, p. 328-337, 2008.

JANG, M.; HA, K.; TAKAMURA, N. Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). **Toxicon**, n. 49, p. 727-733, 2006.

JRVENP, S.; LUNDBERG-NIINIST, C.; SPOOF, L.; SJVALL, O.; TYYSTJRVI, E.; MERILUOTO, J. Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography–mass spectrometry. **Toxicon**, n. 49, p. 865-874, 2007.

JOCHIMSEN, E.M., CARMICHAEL, W.W., AN, J., DENISE, M.C., COOKSON, S.T., HOLMES, C.E.M., ANTUNES, M.B.C., MELO, F.D.A., LYRA, T.M., BARRETO, V.S.T., AZEVEDO, S.M.F.O., JARVIS, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, n.338, p. 873-878, 1998.

KEARNS, K.D., HUNTER, M.D. Toxin-producing *Anabaena flosaquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. **Microbial Ecology**. n.42 (1), p. 80–86. 2001.

KURKI-HELASMO, K. & MERILUOTO, J. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) Seedlings. **Toxicon**, n.36, p.1921–1926, 1998.

LIAN M, LIU Y, YU SZ, *et al.* A cross-sectional study on the effects of microcystin in drinking water to the health of human beings. **Chinese Journal of Epidemiology**, n. 21, p. 437–440, 2000.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer, L.; Douce, R. (Orgs). **Methods in Enzimology**. Academic Press, London, UK, n. 148, p. 350-381, 1987.

LIMA, G. P. P. **Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas e atividade da peroxidase e redutase do nitrito em calos de arroz (*Oriza sativa* L. cv. IAA 4440)**. Tese Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, 1994.

LUAN, S. Protein phosphatases in plants. **Annual Review of Plant Biology**. n.54, p.63–92. 2003.

LUAN, S. Protein phosphatases: structure, regulation, and function. **Advances in Botanical Research**, n. 32, p.67–107. 2000.

LUAN, S. Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. **Trends in Plant Science**. n.3. p.271–275. 1998.

MACKINTOSH, C., BEATTIE, K., KLUMPP, S., COHEN, C. & CODD, G. A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEBS Letters**, n.264, p.187–92. 1990.

MÁTHÉ, C. et al. Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets. **Aquatic Toxicology**. n. 92, p. 122-130, 2009.

MÁTHÉ, C. et al. Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, induces growth inhibition and histological alterations in common reed (*Phragmites australis*) plants regenerated from embryogenic calli. **New Phytologist**, n. 176, p. 824-835, 2007.

MCELHINEY, J., LAWTON, L. A. & LEIFERT, C. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. **Toxicon**, n.39, p.1411–1420, 2001.

MOORE, R.E. Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. n.16, p. 134–143, 1996.

NIMPTSCH, J.; WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S.; Cyanobacterial toxin elimination via bioaccumulation of MC-LR in aquatic macrophytes: An application of the "Green liver concept". **Environmental Science Technology**. n°42. p.8552-8557. 2008.

PEREIRA, S.; SAKER, M.L.; VALE, M.; VASCONCELOS, V.M. Comparison of sensitivity of grasses (*Lolium perenne* L. and *Festuca rubra* L.) and Lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to water contaminated with microcystins. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. n.83. p.81-83. 2009.

PEUTHERT, A.; LAWTON, L.; PFLUGMACHER, S. *In vivo* influence of cyanobacterial toxins on enzyme activity and gene expression of protein phosphatases in alfalfa (*Medicago sativa*). **Toxicon**, n. 52, p. 84-90, 2008.

PEUTHERT, A.; CHAKRABARTI, S.; PFLUGMACHER, S. Uptake of Microcystins-LR and -LF (Cyanobacterial Toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). **Environmental Toxicology**, n. 22, p. 436-442, 2007.

PFLUGMACHER, S.; AULHORN, M.; GRIMM, B. Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants. **New Phytologist**, n. 175, p. 482-489, 2007.

PFLUGMACHER, S. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. **Aquatic Toxicology**. 70:169–78. 2004.

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

PFLUGMACHER, S.; CODD, G. A.; CHRISTIAN, E. W.; STEINBERG, C. E. W. Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. **Environmental Toxicology**, n. 14, p. 111-115, 1998a.

PFLUGMACHER, S. et al. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. **Biochemica et Biophysica Acta**, n. 1425, p. 527-533, 1998b.

RAO, P.V.L., BHATTACHARYA, R., The cyanobacterial toxin microcystin- LR induced DNA damage in mouse liver in vivo. **Toxicology**, n.114, p. 29–36. 1996.

RESSOM, R., et al. Health Effects of toxic Cyanobacteria (Blue-Green Algae). **Australian Government Publishing Service**, Canberra, p. 27–69, 1994.

RICE, E. L. Allelopathy. **New York: Academic Press**. 2nd ed. 1984.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, n. 111, p. 1-61, 1979.

ROMANOWSKA-DUDA, Z. & TARCZYNSKA, M. Influence of microcystin-LR and hepatotoxic cyanobacterial extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*. **Environmental Toxicology**. n.17, p.434–440, 2002.

SAKER, M.L., GRIFITHS, 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**. n. 39, p. 349– 354, 2000.

SALA FC; ROSSI F; FABRI EG; RONDINO E; MINAMI K; COSTA CP. Caracterização varietal de rúcula. In: Anais do 44^o CBO. **Hort. Bras.**, Campo Grande, 22. Suplemento CD-ROM, 2004.

SANTAMARIA, P.; ELIA, A.; PAPA, G.; SERIO, F. Nitrate and ammonium nutrition in chicory and rocket salad plants. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 21, n. 9, p. 1779- 1789, 1998.

SAQRANE, S.; OUAHID, Y.; GHAZALI, Y.; OUDRA, B.; BOUARAB, L.; CAMPO, F. F. Physiological changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* cultivars, caused by irrigation with water contaminated with microcystins: A laboratory experimental approach. **Toxicon**, n. 53, p. 786-796, 2009.

SAQRANE, S.; GHAZALI, I. E. L.; OUDRA, B.; BOUARAB, L.; VASCONCELOS, V. Effects of cyanobacteria producing microcystins on seed germination and seedling growth of several agricultural plants. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, n. 43, p. 443-451, 2008.

SAQRANE, S.; GHAZALI, I. E.; OUAHID, Y.; HASSNI, M.; HADRAMI, I. E.; BOUARAB, L.; CAMPO, F. F.; OUDRA, B.; VASCONCELOS, V. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. **Aquatic Toxicology**, n. 83, p. 284-284, 2007.

SCHWARTZ R.E. et al. Pharmaceuticals from cultured algae. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. n.5, p. 113–124. 1990.

SIEGL, G.; MACKINTOSH, C.; STITT, M. Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves. Evidence from the effects of ocadaic acid and microcystin. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, n. 270, p. 198-202, 1990.

SILVA M.A.B. **GEAGESP**. Seção de Economia. São Paulo-SP. Comunicação pessoal, 2004.

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

SKULBERG, O. M.; CARMICHAEL, W. W.; CODD, G. A.; SKULBERG, R. **Algal Toxins in Seafood and Drinking Water**; Falconer, I. R., Ed.; Academic Press, London; p. 187-209, 1993.

SMITH, G.D.; DOAN, N.T. Cyanobacterial metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algae and higher plants. **Journal of Applied Phycology**. n.11, p. 337–344, 1999.

SMITH, R. D.; WALKER, J. C. Plant protein phosphatases. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. n.47, p.101–125, 1996.

TOROSER, D. & HUBER, S. C. Carbon and nitrogen metabolism and reversible protein phosphorylation. **Advances in Botanical Research** . n.32, p.435–458, 2000.

VIEIRA, J. M. S. et al. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, n. 45, p. 901-909, 2005.

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

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, n.203, p.201–218, 2004.

WIEGAND, C.; PEUTHERT, A.; PFLUGMACHER, S; CARMELI, S. Effects of Microcin SF608 and Microcystin-LR, Two Cyanobacterial Compounds Produced by *Microcystis* sp., on Aquatic Organisms. **Environmental Toxicology**, n. 17, p. 400-406, 2002.

YAMASAKI, S. Probable effects of algal bloom on the growth of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. **Journal of Plant Research**, n. 106, p. 113-120, 1993.

YIN, L. Y., HUANG, J. Q., LI, D. H. & LIU, Y. D. Microcystin-RR uptake and its effects on the growth of submerged macrophyte *Vallisneria natans* (Lour.) Hara. **Environmental Toxicology**. n.20, p.308–13, 2005.

YUAN, M.; CARMICHAEL, W. W.; HILBORN, E. D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. **Toxicon**, n. 48, p. 627-640, 2006.

YU SZ, ZHAO N, ZI XL. The relationship between cyanotoxin (Microcystin, MC) in pond-ditch water and primary liver cancer in China. **Chinese Journal of Oncology**. n.23, p.96–99. 2001.

ZHOU, B.B., Elledge, S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, n.23 (408), p. 433–439, 2000.

ZURAWELL, R.W., CHEN, H., BURKE, J.M., PREPAS, B.R., Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environment. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, n.8, p.1–37.<<http://aym.juntaex.es>> (last accessed 22.01.08), 2005.