

TALITA CAROLINE HEREMAN

**EFEITOS DO EXTRATO BRUTO E DA MICROCISTINA-LR
EM *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE)**

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

Rio Claro
2010

TALITA CAROLINE HEREMAN

**EFEITOS DO EXTRATO BRUTO E DA MICROCISTINA-LR
EM *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE)**

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

Orientadora: Prof. Dra. Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira

Rio Claro
2010

TALITA CAROLINE HEREMAN

**EFEITOS DO EXTRATO BRUTO E DA MICROCISTINA-LR
EM *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociência do *campus* de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Comissão Examinadora

Prof^o Dr Massanori Takaki

Prof^o Dr Sérgio Florentino Pascholati

Prof^a Dra Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira

Rio Claro, 30 de março de 2010

À minha filha, Bianca, a mais perfeita realização de minha vida. À minha família e aos meus verdadeiros amigos.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira (Madô, ESALQ-USP), por sempre me incentivar a buscar primazia durante o desenvolvimento deste trabalho. Pelos ensinamentos, amizade e dedicação.

À professora Dra Ana Dionísia Novembre (ESALQ-USP), por todo auxílio e estrutura cedidos, a todos os membros do Laboratório de Análise de Sementes pelo apoio, em especial à técnica Helena Chamma, pelos ensinamentos, paciência, constante apoio e amizade.

Ao professor Dr Sérgio Florentino Pascholati (ESALQ-USP), pelo empréstimo de equipamento e valiosas sugestões, ao doutorando André Beltrame, pelo auxílio com o condutivímetro.

Ao professor 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, em especial à Dra Fabiana Sasaki, pelos ensinamentos, constante apoio e amizade.

Ao professor Dr Lázaro Peres (ESALQ-USP), pelo apoio técnico e esclarecimentos e ao Dr Rogério de Carvalho, pelos ensinamentos.

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

Ao professor Dr Ernani Pinto, pelo apoio técnico, ao Dr. Felipe Dörr, pelas análises cromatográficas das inúmeras amostras e ao pessoal do Laboratório de Análises Clínicas, pelo auxílio no processamento das mesmas. À Dra Fabyana Anjos, por sempre esclarecer minhas dúvidas e agilizar as análises.

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

À professora Dra Helaine Carrer (ESALQ-USP), pela disponibilização de laboratório e à técnica Fátima, pelo apoio.

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

Ao professor Dr Ricardo Ferraz (ESALQ-USP), pelo empréstimo de equipamento e aos técnicos Wanderlei e Vit, pelo esforço físico empregado em meu auxílio.

Ao professor Dr Massanori Takaki (UNESP- Rio Claro), pelos esclarecimentos sobre o ensaio de germinação de sementes e discussões pertinentes.

Ao professor Dr Carlos Tadeu (ESALQ-USP), pela análise estatística dos dados.

Às eternas amigas do Laboratório de Cianobactérias, agradeço por todo carinho e apoio durante os longos e ótimos anos que convivemos juntas: Bruna Buch, pelos agradáveis momentos durante os cursos e congressos e por tudo o que fez por mim; Selma Gouvêa de Barros, pela determinação, segurança e amizade singela que construímos; Viviane Picin dos Santos, pela ajuda incondicional, carinho e companheirismo; Érika Cavalcante Silva, pelo afeto, empenho e apoio; Paula Kubjida, pelos ensinamentos e alegria.

Ao amigo Fabrício Sagliete Meira Barros, por ceder o projeto inicial deste trabalho.

Ao ex-técnico e amigo Paulo “K-juru” Jaoude, pelo auxílio no início do desenvolvimento dos experimentos.

À Dora, quem me ajudou a cuidar das plantinhas e conversava com elas diariamente pedindo para que crescessem bem para que meus experimentos dessem certo.

Ao Luiz “Cometa” Lucatti, por sempre estender a mão quando pedi ajuda.

À Maria da Penha, por nos abrigar em sua casa de braços abertos.

À minha mãe Meirinha, quem cuidou de minha filha com todo amor e carinho para que eu pudesse desenvolver esta pesquisa e sempre esteve presente quando precisei.

Ao meu pai Paulo, por me ensinar valores da vida, pelo carinho e afeto.

À minha cunhada Soraia e meu cunhado Mateus, por me ajudarem por diversas vezes no desenvolvimento desta pesquisa.

À minha vó Mercedes, ao meu irmão e à Silvinha, por fazerem parte da minha vida.

Ao Simon, por todo amor e carinho.

Aos meus familiares e amigos que aqui não foram citados, mas estão sempre presentes em minha memória. Em especial a você, tia Lérica, que não pode ver este trabalho finalizado, mas sempre me apoiou em minhas decisões e torceu por mim.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, pela minha formação e àqueles que tornaram meus dias melhores simplesmente pela alegria de um sorriso ou atos singelos, mas que fizeram a diferença.

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.

À FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Devemos ser a mudança que desejamos para o mundo.

Mahatma Gandhi

Plantas cultivadas podem ser contaminadas com cianotoxinas através de irrigação com água contendo cianobactérias tóxicas. Uma espécie freqüentemente encontrada nos corpos d'água é *Microcystis aeruginosa*, produtora da microcistina (MC), uma toxina hepatotóxica. Frente a esta possibilidade, nosso objetivo foi investigar os efeitos de extrato bruto de uma linhagem produtora de microcistina (BCCUSP232) e outra não produtora (BCCUSP03) em bioensaio de germinação de sementes e crescimento da hortaliça alface e a possibilidade de bioacumulação da cianotoxina nos tecidos foliares. Sementes germinadas em papel de filtro foram expostas a concentrações entre 0,5 a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR durante sete dias, enquanto as plantas cultivadas em vasos contendo substrato comercial para hortaliça foram irrigadas com 100ml de solução aquosa contendo 0,5 a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR durante 15 dias ao final do ciclo da cultura. Valores de massa seca correspondentes foram empregados para o tratamento com extrato bruto sem microcistina, além de controle com água. Os efeitos nocivos da MC-LR puderam ser observados no desenvolvimento das plântulas expostas a 75 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, concentrações que induziram uma maior ocorrência de plântulas anormais devido ao aparecimento de necrose na radícula e encurtamento deste órgão nas plântulas normais, como também redução no teor de clorofila e aumento na atividade da enzima antioxidante peroxidase. Para as plantas adultas, a exposição às diferentes concentrações de MC-LR não interferiram no teor de clorofila e na atividade da peroxidase. Contudo, ambos os extratos (com e sem MC-LR) interferiram igualmente na permeabilidade seletiva da membrana plasmática das folhas da planta adulta, mesmo em baixa concentração, podendo assim deixá-la mais suscetível a estresses abióticos e bióticos. Embora as plantas se apresentassem saudáveis e semelhantes ao controle, houve bioacumulação da microcistina nos tecidos foliares em concentrações entre 7,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ quando exposta a 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 167,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Assim, a irrigação de alface com água contendo a concentração de microcistina permitida na água tratada para consumo humano (1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) não garante a segurança alimentar, uma vez que a metade desta concentração foi suficiente para promover a absorção da cianotoxina nos tecidos foliares. Para uma pessoa de 60kg que consumisse 60g de salada de alface exposta a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de

MC-LR ocorreria ingestão da toxina em uma concentração que ultrapassa excessivamente a permitida para consumo humano estabelecida pela Organização Mundial da Saúde ($0,04 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ de massa corpórea.dia⁻¹). Portanto, enfatiza-se a necessidade de monitoramento de diferentes rotas de exposição à microcistina pelas autoridades públicas.

Palavras-chave: alface, bioacumulação, cianotoxina, contaminação alimentar, irrigação

ABSTRACT

EFFECTS OF CRUDE EXTRACT AND MICROCYSTIN-LR ON *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE)

Crop plants may become contaminated with cyanotoxins during irrigation with water containing toxic cyanobacteria, such as *Microcystis aeruginosa*, which produces the hepatotoxin microcystin (MC). The aim of the present study was to investigate the effects of a crude extract from a microcystin-producing strain (BCCUSP232) and non-microcystin-producing strain (BCCUSP03) on germination and growth bioassays of lettuce and assess the possibility of the bioaccumulation of this cyanotoxin in leaf tissue. Seeds germinated on filter paper were exposed to concentrations of 0.5 to 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of MC-LR for seven days, while plants grown in pots containing a commercial substrate were irrigated with 100mL of an aqueous solution containing 0.5 to 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of MC-LR for 15 days at the end of the culture cycle. The corresponding dry weight values were used for treatment with the crude extract without microcystin. Control plants received only water. The harmful effects of MC-LR were observed during the development of seedlings exposed to 75 and 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, with a higher incidence of abnormal seedlings due to the onset of root necrosis as well as a shortening of roots in normal seedlings, a reduction in chlorophyll content and an increase in the activity of the antioxidant enzyme peroxidase. In adult plants, exposure to different concentrations of MC-LR did not affect the chlorophyll content or peroxidase activity. However, even at low concentrations, both extracts (with and without MC-LR) equally affected the selective permeability of the plasma membrane in leaves, which could make the plants more susceptible to biotic and abiotic stresses. Although the plants looked healthy and similar to the controls, there was an accumulation of microcystin in the leaves at concentrations of 7.2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ and 167.1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ when exposed to 0.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectively. Thus, the irrigation of lettuce with water containing the concentration of microcystin allowed in treated water for human consumption (1.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) does not ensure food security, since half of this concentration was sufficient to cause the absorption of the cyanotoxin in leaf tissue. A 60kg person, consuming 60g salad made from the lettuce exposed to 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of MC-LR, would consume microcystin at a concentration that exceeded the tolerable daily intake established by

the World Health Organization ($0.04 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of body weight. day^{-1}). Thus, there is a need for public health authorities to monitor different exposure routes of microcystin.

Key-words: bioaccumulation; cyanotoxin, food contamination; lettuce; irrigation

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Efeitos da microcistina em plantas aquáticas.....	18
2.2 Efeitos da microcistina em plantas terrestres.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Linhagens e condições de cultivo.....	25
3.2. Extração e determinação de microcistina da linhagem 232 por HPLC	25
3.3. Preparo dos extratos brutos das linhagens de <i>M. aeruginosa</i>	26
3.4. Tratamentos utilizados.....	26
3.5. Planta-teste.....	27
3.6 Bioensaio de germinação de sementes.....	27
3.7 Bioensaio de crescimento: substrato e cultivo das plantas.....	29
3.8 Análise do teor de clorofila.....	30
3.9 Análise da atividade da enzima peroxidase (POD).....	30
3.10 Permeabilidade seletiva da membrana plasmática de folhas adultas.....	31
3.11 Extração e determinação de microcistina em tecido foliar por ELISA.....	31
3.13 Análise dos dados.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Bioensaio de germinação de sementes.....	33
4.2. Bioensaio de crescimento.....	34
4.3. Acumulação de microcistina.....	35
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a ocorrência de florações de cianobactérias tem sido registrada com maior frequência em inúmeros países, principalmente em corpos d'água eutrofizados (BOUVY et al., 2000; JONES & JONES, 2002). A ocorrência dessas florações provoca um sério problema de qualidade da água, pois certas espécies podem produzir metabólitos secundários tóxicos, conhecidos como cianotoxinas (CARMICHAEL, 1992).

Dentre as cianotoxinas, uma freqüentemente encontrada nos corpos d'água do mundo todo e também uma das mais estudadas, é a microcistina (MC), a qual é produzida por algumas linhagens nos gêneros *Anabaena* Bory ex Bornet et Flahault, *Anabaenopsis* (Woloszyńska) Miller, *Hapalosiphon* Nägeli ex Bornet et Flahault, *Microcystis* Kützing ex Lemmermann, *Nostoc* Vaucher ex Bornet et Flahault, *Oscillatoria* Vaucher ex Gomon e *Planktothrix* Anagnostidis et Komárek (CARMICHAEL, 1992; SIVONEN & JONES, 1999).

As microcistinas são heptapeptídeos monocíclicos contendo uma estrutura comum de três D-aminoácidos, dois aminoácidos incomuns (N-metildehidroalanina e ADDA) e dois L-aminoácidos variáveis (BOTES et al., 1982), levando a uma alta diversidade estrutural, sendo conhecidas mais de 70 variantes (ZURAWELL et al., 2005). As microcistinas são nomeadas de acordo com os dois aminoácidos variáveis e outras modificações estruturais menores. Microcistina-LR (Figura 1), que contém os aminoácidos leucina (L) e arginina (R) nas posições dois e quatro da estrutura (SIVONEN & JONES, 1999), é a variante mais comumente detectada (DAWSON, 1998).

Com base em suas propriedades toxicológicas, as microcistinas são classificadas como hepatotoxinas. Elas são acumuladas no fígado através de transportadores iônicos multiespecíficos presentes nos canais biliares e no intestino delgado (ERIKSSON et al., 1990), onde promove alterações citoesqueléticas das células, causando morte por hemorragia intra-hepática ou insuficiência hepática (YOSHIDA et al., 1997). Em nível molecular, as microcistinas agem como potentes inibidores das proteínas fosfatases 1 (PP1) e 2A (PP2A) (MACKINTOSH et al., 1990), e estudos recentes indicam que o estresse oxidativo desempenha um importante papel na sua toxicidade (DING et al., 2001).

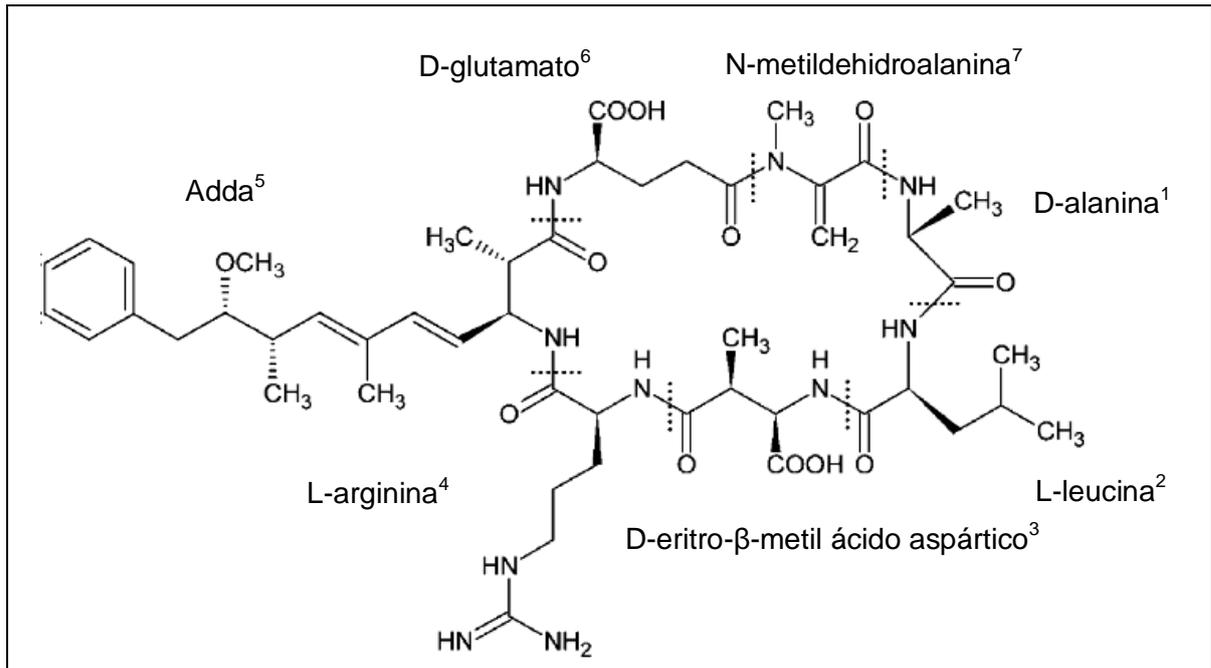


Figura 1) Estrutura da MC-LR, com massa molecular de 995,5Da. Adaptado de Babica et al. (2006).

Em animais, o envenenamento pela ingestão de água contaminada por cianobactérias tem sido relatado há mais de 130 anos (FRANCIS, 1878) e casos de intoxicação continuam ocorrendo com freqüência, incluindo a mortandade de peixes (CHELLAPPA et al., 2008), gado (MEZ et al., 1997), cães (EDWARDS et al., 1992), aves (BRIAND et al., 2003; HAMILL, 2001) e até mesmo seres humanos (AZEVEDO et al., 2002; CARMICHAEL et al., 2001; HAWKINS et al., 1985).

O caso mais grave envolvendo a população humana foi a chamada “Síndrome de Caruaru” ocorrida na cidade de Caruaru, nordeste do Brasil, em 1996, quando 76 pacientes de uma clínica de hemodiálise foram a óbito devido à presença de microcistina na água utilizada nas máquinas de diálise (AZEVEDO et al., 2002; JOCKIMSEN et al., 1998; YUAN et al., 2006).

Este grave incidente de exposição aguda levou o Ministério da Saúde a baixar a Portaria 518 (BRASIL, 2004), que estabelece a concentração de microcistina permitida na água tratada para consumo humano, tendo seguido o mesmo valor de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ assumido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 1998). Esta se baseou em um estudo de longo prazo (13 semanas) de administração de MC-LR via oral em camundongos, onde chegou-se a um nível de efeito adverso não observável de $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa corpórea.dia⁻¹ (FAWELL et al., 1994). Utilizando

índice de incerteza de 1000, sendo 10 pela variação interespecífica, 10 pela variação intraespecífica e 10 pelas limitações da base de dados para toxicidade crônica e carcinogênica, foi calculada a absorção diária tolerável (Tolerable Daily Intake - TDI) de $0,04 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de massa corpórea.dia⁻¹ (WHO, 1998).

No entanto, a segurança destes valores não está garantida, uma vez que os riscos de exposição crônica a baixas doses da toxina ainda não estão bem estabelecidos. Na China, uma maior incidência de câncer de fígado foi relacionada à exposição crônica a fontes de água contaminadas com microcistina em concentrações de $0,062$ a $0,46 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (UENO et al., 1996). Os autores propuseram redução do limite permitido na água para consumo humano para $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A fisiologia natural e as funções ecológicas da microcistina, assim como das demais cianotoxinas, não estão bem esclarecidas (KAEBERNICK & NEILAN, 2001), mas acredita-se que elas estão envolvidas na regulação da estrutura de comunidades naturais (KEATING, 1978; LEFLAIVE & TEN-HAGE, 2007) e na redução da herbivoria (DeMOTT et al., 1991; JANG et al., 2003). No entanto, a microcistina também tem demonstrado produzir efeitos alelopáticos sobre vegetais aquáticos (PFLUGMACHER, 2002).

A alelopatia, segundo Rice (1974), é qualquer efeito direto ou indireto, benéfico ou maléfico, produzido por plantas e microrganismos sobre outra planta após a liberação de compostos químicos para o ambiente. Para os vegetais aquáticos, o que geralmente se observa é redução da biomassa após absorção da cianotoxina, que pode ser bioacumulada nos tecidos (MITROVIC et al, 2005; PFLUGMACHER et al., 1998a; SAQRANE et al., 2007; YIN et al., 2005a). Desta forma, uma fonte de contaminação para a cadeia alimentar aquática é adicionada, o que alerta para a existência de mecanismos de biomagnificação (aumento gradual do acúmulo de moléculas nocivas através dos níveis tróficos).

Esse evento foi claramente demonstrado para a neurotoxina β -metilamina-L-alanina (BMAA) produzida por *Nostoc* sp.. Na ilha de Guam, Oceania, existe uma alta incidência de doenças neurodegenerativas no povo Chamorro, o qual inclui em sua dieta morcegos (*Pteropus mariannus* Desmarest) que se alimentam de sementes de *Cycas micronesica* Hill (Cycadophyta) associada com a cianobactéria em suas raízes (COX et al., 2003).

Frente a essas possibilidades, a caracterização dos riscos das cianotoxinas em relação à saúde humana requer a identificação das rotas de exposição, com

especial atenção à exposição crônica, mais difícil de ser identificada (DIETRICH & HOEGER, 2005).

Uma via de exposição que vem merecendo atenção é o consumo de hortaliças e outros produtos da agricultura contaminados com cianotoxinas (CODD et al., 1999a; DIETRICH & HOEGER, 2005). Os vegetais terrestres podem entrar em contato com água contaminada com cianotoxinas via irrigação (CODD et al., 1999b; CRUSH et al., 2008), prática que se tornou comum após a modernização das técnicas de produção, sendo necessária para aumentar de forma substancial o rendimento das culturas. Porém, as águas superficiais provenientes de reservatórios podem estar contaminadas com cianotoxinas. Para vários vegetais inclusos na dieta humana foi encontrada bioacumulação da microcistina (CHEN et al., 2004; CODD et al., 1999b; CRUSH et al., 2008; JÄRVENPÄÄ et al., 2007; KURKI-HELASMO & MERILOUTO, 1998; PEUTHERT et al., 2007; SAQRANE et al. 2009), em concentrações que variam desde $1,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (PEUTHERT et al., 2004) até $190.850 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (SAQRANE et al., 2009), o que alerta para um melhor controle das condições de irrigação destas culturas e para os riscos de saúde pública.

A bioacumulação da microcistina pelos vegetais varia conforme fatores como espécie, estágio de desenvolvimento, tempo de exposição, concentração e substrato (JÄRVENPÄÄ et al., 2007; SAQRANE et al., 2009). A microcistina apresenta fitotoxicidade, afetando amplos parâmetros fisiológicos, como desenvolvimento, fotossíntese, atividade de enzimas, *status* oxidativo, entre outros (BABICA et al., 2006).

Desta forma, necessita-se de um melhor conhecimento sobre a capacidade de absorção da microcistina por plantas terrestres e a possibilidade de bioacumulação da molécula nos tecidos vegetais, visando um melhor reconhecimento das chances de contaminação humana.

Além disso, os efeitos de extrato bruto de linhagens não produtoras de microcistina sobre vegetais deve ser melhor investigado, uma vez que as cianobactérias produzem vários compostos potencialmente tóxicos, estando entre eles os lipopolissacarídeos (LPSs). Estes são constituintes das membranas celulares de bactérias gram-negativas, incluindo cianobactérias e demonstram toxicidade em diversos organismos (SIVONEN & JONES, 1999), mas são removidos, ao menos parcialmente, na maioria dos ensaios durante o processo de purificação ou semi-purificação da microcistina.

Os objetivos deste estudo foram: a) avaliar os efeitos do extrato bruto de uma linhagem de *M. aeruginosa* produtora de microcistina e outra não produtora sobre a germinação de sementes de alface (*L. sativa*) e o desenvolvimento inicial das plântulas, bem como da planta adulta através de possíveis efeitos inibitórios no crescimento, no teor de clorofila, na atividade da enzima peroxidase e na condutividade elétrica da membrana plasmática; b) investigar o possível risco de transferência da microcistina para o homem através da cadeia alimentar pela incorporação da microcistina nos tecidos vegetais.

Nossa hipótese é que o extrato da linhagem produtora de microcistina provocaria mais efeitos nocivos do que o da não produtora e que a toxina acumularia nas folhas da planta adulta.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Efeitos da microcistina em plantas aquáticas

Os efeitos nocivos provocados por toxinas de cianobactérias, principalmente a microcistina, sobre as plantas aquáticas têm sido investigados visto a possibilidade de esses organismos entrarem em contato com as cianotoxinas diretamente pela água circundante.

O primeiro relato de efeitos tóxicos em vegetal aquático ocorreu em 1993, quando Yamasaki relacionou a redução no comprimento da raiz, na massa seca e na absorção de oxigênio e nutrientes na macrófita *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel com efeitos alelopáticos produzidos por floração de cianobactérias pertencentes ao gênero *Microcystis*, embora a presença de microcistina não tenha sido avaliada.

Pflugmacher et al. (1998a) detectaram a absorção de 11,2% de MC-LR na macrófita submersa *Ceratophyllum demersum* L. exposta durante sete dias a uma concentração de 2.500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Ao avaliarem a atividade das enzimas glutathione S-transferases (GSTs) de algumas macrófitas, observaram um possível metabolismo de desintoxicação similar ao ocorrente para outras substâncias tóxicas. Logo depois, Pflugmacher et al. (1998b) identificaram, por espectrometria de massa, o primeiro composto produzido neste processo, cuja massa molecular corresponde à conjugação da microcistina com glutathione (GSH), reação catalisada pelas GSTs.

Smith & Doan (1999) fizeram uma revisão sobre os metabólitos de cianobactérias com bioatividade contra fotossíntese em cianobactérias, algas e plantas superiores, abordando brevemente a microcistina e concluíram que estes compostos devem estar envolvidos na regulação de populações naturais aquáticas.

Pietsch et al. (2001) verificaram maior redução da fotossíntese e elevação da enzima peroxidase tanto em microalga (*Scenedesmus armatus* (Chodat) G.M. Smith) quanto em macrófita (*C. demersum*) expostas a extrato bruto contendo MC-LR e RR em uma concentração de 0,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em relação a estas variantes purificadas. Os autores concluíram que a maior toxicidade do extrato bruto ocorreu devido à presença de lipopolissacarídeos, os quais podem ter inibido a atividade das GSTs, reduzindo assim a capacidade de desintoxicação do organismo.

Wiegand et al. (2002) mostraram em um ensaio com macrófita (*Vesicularia dubyana* (C. Muell.) Broth.) e invertebrado (*Daphnia magna* Straus) que efeitos tóxicos causados por florações de cianobactérias podem decorrer de outros compostos presentes além das microcistinas, como a microcina SF608, um inibidor de proteases de serina.

Romanowska-Duda & Tarczynská (2002) verificaram maior toxicidade de extrato semi-purificado contendo MC-LR proveniente de uma floração de *M. aeruginosa* (Kützing) Kützing quando comparado com concentrações semelhantes (10 a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$) de MC-LR comercial em determinados parâmetros, tais como biomassa, conteúdo de clorofila, atividade de fosfatases ácidas e de RNase na macrófita livre flutuante *Spirodela oligorrhiza* (Kurz.) Hegelm.

Pflugmacher (2002) discutiu sobre um possível efeito alelopático da MC-LR no ecossistema aquático baseando-se nos resultados de produção de oxigênio fotossintético, no padrão de clorofila *a* e *b* e de taxa de crescimento em macrófitas aquáticas expostas a concentrações de 0,1 a 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de toxina.

Pflugmacher (2004) observou estresse oxidativo durante biotransformação da MC-LR, via glutatona conjugado, em *C. demersum* exposta a 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes avaliadas e conteúdo de GSH.

Yin et al. (2005a) observaram redução no crescimento de *Vallisneria natans* (lour.) Hara, uma macrófita submersa, devido à absorção de MC-RR por sementes e plântulas expostas durante trinta dias a uma concentração de 10 a 10.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com acumulação diferencial e dose-dependente entre as raízes (0,6 a 14.800 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca) e folhas (0,3 a 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca).

Mitrovic et al. (2005) encontraram redução no crescimento e aumento da atividade da enzima peroxidase nas macrófitas livre flutuantes *Lemna minor* L. e *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel. ex Wimm. expostas durante cinco dias a concentrações de 10.000 a 20.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR. Houve correlação positiva entre a concentração da cianotoxina aplicada e o conteúdo nos tecidos de *L. minor* expostas a 3.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (46 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca), 10.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (107 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca) e 20.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (288 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca).

Babica et al. (2006) acreditam que há pouca probabilidade da microcistina agir como composto alelopático sobre os organismos competidores fotoautotróficos, uma vez que os efeitos inibidores observados na maioria dos trabalhos foram

alcançados com concentrações muito acima daquelas encontradas comumente na natureza ($<10 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Jang et al. (2007), em um ensaio com *M. aeruginosa* e *Lemna japonica* Landolt, uma macrófita livre flutuante, observaram respostas alelopáticas recíprocas com redução na biomassa de ambas as espécies e aumento dos conteúdos intra e extracelulares de microcistina.

Leflaive & Ten-Hage (2007) discutiram sobre os compostos alelopáticos e as toxinas de microalgas, incluindo cianobactérias. Comparando-as com base em seus aspectos evolutivos, ecológicos e fisiológicos, concluíram que pelo menos algumas toxinas devem ter função alelopática sobre os competidores fotoautotróficos, estando entre elas a microcistina.

Máthé et al. (2007) fizeram um estudo histológico com cultura de tecidos de *P. australis* exposta a concentrações entre 2.500 e 40.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR e observaram danos maiores nas raízes devido à obliteração do aerênquima por calos.

Em indivíduos da macrófita livre flutuante *Lemna gibba* L., crescidos durante doze dias em meio de cultivo contendo MC-RR e MC-WR em concentrações entre 75 e 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$, Saqrane et al. (2007) encontraram redução no crescimento, no conteúdo de clorofila *a* e *b* e estresse oxidativo. Por HPLC, avaliou-se a bioacumulação da toxina nos tecidos vegetais e somente a MC-RR e uma variante não conhecida foram detectadas (com concentrações entre 1.000 a 2.440 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca), indicando um possível metabolismo de degradação da toxina pela planta.

Saqrane et al. (2009) avaliaram o uso da fluorescência da clorofila para detecção de danos induzidos por microcistina em planta aquática (*L. gibba*) exposta a MC-RR e MC-WR em concentrações de 10 a 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ por 24h. Encontraram que a redução na razão F_v/F_m foi tempo e dose-dependente e em todas as concentrações o estresse foi reversível, concluindo ser este um método rápido, sensível e fácil de implantar para detectar este tipo de estresse.

Máthé et al. (2009) investigaram os efeitos da MC-LR na organização dos microtúbulos e na cromatina mitótica das raízes de *P. australis* e observaram que a indução de células mitóticas anormais coincidia com concentrações ($>500 \mu\text{g.L}^{-1}$) em que a inibição das proteínas fosfatases era superior a 50%.

2.2 Efeitos da microcistina em plantas terrestres

A possibilidade dos vegetais terrestres, principalmente aqueles incluídos na dieta humana, de entrarem em contato com cianotoxinas via irrigação com água contaminada tem levado os pesquisadores a avaliarem os efeitos destes compostos, principalmente a microcistina, nestes organismos.

MacKintosh et al. (1990) verificaram também em nabo (*Brassica napus* L.) a redução da atividade das proteínas fosfatases 1 (PP1) e 2A (PP2A) quando expostas a MC-LR, assim como encontrado em animais.

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.

Ko's et al. (1995) relataram inibição do crescimento de mudas de mostarda (*Synapis alba* L.) expostas por oito dias a concentrações entre 100 e 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina (provavelmente MC-LR), com $\text{DL}_{50} = 3.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ e propuseram o uso desta espécie para detectar a cianotoxina.

Com a finalidade de simular as condições de irrigação em plantas cultivadas, Abe et al. (1996) realizaram aplicação tópica de solução aquosa contendo MC-LR em folhas primárias de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Encontraram redução na taxa líquida de fotossíntese nas folhas expostas a 10.000 e 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Aplicações múltiplas de concentrações menores produziram um efeito ainda mais inibitório.

Kurki-Helasma & Meriluoto (1998) cultivaram durante sete dias sementes de mostarda (*S. alba*) em meio nutritivo solidificado, contendo concentrações de MCs purificadas entre 500 e 40.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para a MC-RR houve redução dose-dependente no comprimento das plântulas e na atividade das PP1 e PP2A, com $\text{DL}_{50} = 800 \mu\text{g.L}^{-1}$. A absorção da MC-LR também foi dose-dependente com $\text{DL}_{50} = 2.000 \mu\text{g.L}^{-1}$, sendo encontrada uma concentração de 5,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca em plântulas com aparência saudável.

Codd et al. (1999b) encontraram colônias e células individuais de *M. aeruginosa* em folhas de alface comercial (*Lactuca sativa* L.) após dez dias da última irrigação com água em que, posteriormente, verificou-se conter a cianobactéria e microcistinas em uma concentração de 3,23 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ de massa seca de floração. O conteúdo de microcistina foi avaliado por imunoensaio e obteve-se um valor de

2.490 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa seca nas folhas centrais (denominado de “heart”), 94 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ na zona basal e 880 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ na zona distal de folhas medianas.

McElhiney et al. (2001) observaram efeitos fitotóxicos no desenvolvimento de plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.) e feijão (*P. vulgaris*) expostas à MC-LR, assim como diferenças significativas na toxicidade das variantes MC-RR ($\text{DL}_{50} = 1.600 \mu\text{g.L}^{-1}$), MC-LR ($\text{DL}_{50} = 1.900 \mu\text{g.L}^{-1}$) e MC-LF ($\text{DL}_{50} = 7.700 \mu\text{g.L}^{-1}$) sobre o crescimento de sementes de mostarda (*S. alba*).

M-Hamvas et al. (2003) avaliaram dois indicadores de estresse em plantas, o conteúdo de antocianina e a atividade da enzima DNAse de fita simples (sDNAse), em sementes de mostarda (*S. alba*) germinadas em papel de filtro umedecido com concentrações de MC-LR entre 3.500 e 30.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os pesquisadores encontraram valores indicativos de alterações fisiológicas, como também redução no comprimento e na massa seca das plântulas, com $\text{DL}_{50} = 19.900 \mu\text{g.L}^{-1}$ para aquelas germinadas em fotoperíodo e $\text{DL}_{50} = 14.700 \mu\text{g.L}^{-1}$ para as germinadas no escuro.

Gehring et al. (2003) avaliaram o desenvolvimento e atividade de enzimas desintoxicantes em sementes de mastruço (*Lepidium sativum* L.) expostas durante seis dias a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR ou extrato livre de células contendo 1,0 ou 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR e propuseram o uso desta planta para detecção da toxina em detrimento da mostarda por ser mais sensível a concentrações menores de microcistina.

Chen et al. (2004), ao exporem sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e nabo (*B. napus*) a diferentes concentrações de extrato livre de células contendo três variantes da microcistina (MC-LR, MC-RR e MC-YR) por dez dias a concentrações entre 24 e 3000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, observaram efeitos fitotóxicos principalmente para o nabo, que apresentou as menores porcentagens de germinação e massa seca. O acúmulo de toxina nos tecidos vegetais foi dose-dependente, com valor máximo de 0,651 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa fresca.

Yin et al. (2005b) avaliaram a atividade de enzimas antioxidantes de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh expostas a 10, 100, 1.000 e 5.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-RR por 24 e 48h e encontraram valores indicativos de estresse oxidativo somente nas duas maiores concentrações durante o maior tempo de exposição.

Yin et al. (2006) relataram apoptose de células em suspensão BY-2 de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) expostas a concentrações acima de 1.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-RR, com relação dose e tempo-dependente. Huang et al. (2008) verificaram que este

processo é mediado pela presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) e perda do potencial da membrana mitocondrial.

Järvenpää et al. (2007) irrigaram mudas de brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck.) e mostarda (*S. alba*) crescidas em solo e vermiculita (60:40, v/v) com água contendo microcistinas nas concentrações de 1,0 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e obtiveram uma ligeira inibição (10%) somente no crescimento do brócolis. Por espectrometria de massa, conseguiram detectar somente uma (MC-LR) das quatro variantes da mistura, sendo que a toxina somente foi detectada nas raízes das plantas em concentrações de 900 a 2.600 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa fresca.

Peuthert et al. (2007) encontraram maior bioacumulação nas raízes (12 a 127 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca) que nos caules (1,0 a 64 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca) em plântulas de onze espécies terrestres (soja - *Glycine max* (L.) Merrill, feijão - *P. vulgaris*, milho - *Zea mays* L., entre outras) com importância econômica expostas a MC-LR e LF e extrato livre de células contendo MC-LR durante 24h a uma concentração de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em meio solidificado, ocorrendo correlação com dano celular medido através da peroxidação de lipídeo.

Stüven & Pflugmacher (2007) evidenciaram respostas a estresse oxidativo através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes em plântulas de mastruço (*L. sativum*) expostas a MC-LR comercial e extrato livre de células contendo MC-LR e MC-RR de linhagem de *M. aeruginosa* em uma concentração de 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os parâmetros avaliados para extrato livre de células de uma cultura de cianobactéria não tóxica (*Synechococcus elongatus* (Näegeli) Näegeli) foram semelhantes ao controle.

Pflugmacher et al. (2007) cultivaram seis variedades de espinafre (*Spinacia oleracea* L.) em solo de jardim por seis semanas, irrigando-as duas vezes por semana com 50ml de solução aquosa de extrato livre de células contendo 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR. Observaram redução no crescimento, na produção de oxigênio fotossintético, clorose e estresse oxidativo. Houve diferença na sensibilidade entre as variedades da espécie.

Saqrane et al. (2008) germinaram sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.), lentilha (*Lens esculenta* Moench), milho (*Z. mays*) e trigo (*Triticum durum* L.) em filtros de papel umedecidos com extrato livre de células contendo MC-LR em concentrações entre 1.600 a 11.600 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e observaram uma relação dose-dependente na inibição da germinação e na redução do comprimento do epicótilo,

da raiz primária e do número de raízes laterais devido a anomalias causadas no periciclo. Além disso, os danos foram irreversíveis para a espécie mais sensível (*P. sativum*) e reversíveis para a menos sensível (*L. esculenta*).

Peuthert et al. (2008) observaram *in vivo* a redução da atividade das 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 livre de células de *M. aeruginosa*, contendo a mesma concentração de MC-LR e nenhuma inibição foi obtida com cultivo de *Synechocystis* spp. não produtor de microcistina.

Bibo et al. (2008) verificaram aumento na velocidade de germinação de sementes de nabo (*B. napus*) e repolho (*Brassica chinensis* L.) expostas a baixas concentrações de extrato livre de células proveniente de floração contendo MC-RR (1,0 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e redução em concentrações maiores (100 e 1.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$), sendo que o grau de inibição variou conforme o estágio de vida das plantas, com indivíduos mais novos e com tempo de exposição mais prolongado sendo mais afetados. Observaram também que a toxina é degradada mais rapidamente em solo contendo ácidos húmicos.

Crush et al. (2008) aplicaram 100ml de extrato bruto proveniente de floração contendo 1.700 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de dez variantes da microcistina (principalmente MC-RR e MC-LR) durante três ou seis dias diretamente na raiz ou na parte aérea de alface (*L. sativa*), nabo (*B. napus*), azevém perene (*Lolium perenne* L.) e trevo (*Trifolium repens* L.) crescidos em areia. Verificaram diferença na bioacumulação (valores entre 50 e 1.890 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa seca) conforme a forma de aplicação, não sendo encontrada a toxina nas folhas quando aplicada diretamente na raiz, indicando ausência de translocação da molécula.

Saqrane et al. (2009) observaram redução no crescimento, na produtividade, na atividade do fotossistema II e aumento no acúmulo de nutrientes minerais na raiz de plantas de ervilha (*P. sativum*), lentilha (*L. esculenta*), milho (*Z. mays*) e trigo (*T. durum*) irrigadas a cada três dias durante trinta dias com 200ml de extrato livre de células proveniente de floração contendo seis variantes da microcistina em concentrações de 500, 1.050 e 4.200 $\mu\text{g.L}^{-1}$. O acúmulo de cada variante diferiu entre as espécies e os órgãos vegetais, com concentrações entre 180 a 190.850 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca.

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Linhagens e condições de cultivo

Foram utilizadas duas linhagens clonais e não axênicas de *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, ambas pertencentes ao *Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo* (BCCUSP), sendo uma tóxica (BCCUSP232), produtora de microcistina e outra não produtora (BCCUSP03), segundo Bittencourt-Oliveira (2003).

Inóculos de 250ml foram mantidos em condições controladas de cultivo, em câmara climática a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, fotoperíodo 14:10h (claro:escuro) e intensidade luminosa de $30\mu\text{mol}\cdot\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (fotômetro LI-COR, mod. LI-250, com sensor esférico subaquático). O meio de cultivo utilizado foi o BG-11, pH 7.4, descrito por Rippka et al. (1979) e modificado por Bittencourt-Oliveira (2000), pela substituição do citrato de amônio férrico por $\text{FeCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$.

Alíquotas do inóculo de cada linhagem foram transferidas separadamente para erlenmeyers de 6L contendo 4L de meio de cultivo e mantidos em condição natural. Ao atingirem o final da fase exponencial de crescimento, o número de células por mililitro foi contabilizado com o uso de câmara de contagem *Fuchs-Rosenthal* com o auxílio de microscópio binocular Nykon, sendo obtido o valor aproximado de $1,6 \times 10^6$ células. ml^{-1} . Os cultivos foram transferidos para galão com capacidade de 60L para homogeneização do material, para então serem centrifugados (10.000g, 15min, 20°C), congelados a -20°C e posteriormente liofilizados.

Para a linhagem produtora de microcistina (BCCUSP232) foram produzidos 55,3L de cultivo cuja biomassa seca obtida foi de 2,89g. Para a linhagem não produtora (BCCUSP03) foram cultivados 55L, sendo obtidos 3,04g de massa seca.

3.2 Extração e determinação de microcistina da linhagem BCCUSP232 por HPLC

Uma alíquota de 20mg (massa seca) do cultivo da linhagem produtora de microcistina (BCCUSP232) foi analisada pelo Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP quanto à presença e quantidade de microcistinas pela técnica de HPLC (Cromatografia

Líquida de Alta Performance), conforme o protocolo a seguir (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2005, com modificações).

Resumidamente, as microcistinas foram extraídas com MeOH/H₂O acidificada 0,1% (1:1, v/v) e submetidas ao banho de ultrassom por 30min. Após centrifugação do material (10.000g, 15min, 4°C) o sobrenadante foi evaporado em SpeedVac (Savant, City, US State). O material seco foi ressuspensão em 1,0ml de água e injetado em coluna Sep-Pak C18 (C18, Waters, Milford, MA). Os passos de pré-condicionamento incluíram a ativação e lavagem com MeOH 100% (3ml) e H₂O (3ml) e os passos de eluição foram: (i) 3ml de MeOH 30% e (ii) 5ml de MeOH 100%. As microcistinas foram encontradas na penúltima eluição.

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

A análise cromatográfica detectou uma concentração de 37,38µg de microcistina por grama de material seco do cultivo da linhagem BCCUSP232, sendo 28,19µg (75,4%) de MC-LR e 9,19µg (24,6%) de MC-RR.

3.3 Preparo dos extratos brutos das linhagens de *M. aeruginosa*

Os extratos brutos foram obtidos após ressuspensão do material liofilizado em água deionizada esterilizada em tubo de vidro e ultrasonicados em banho de gelo por 5min a 15W e 22,5kHz em sonicador (Microson Ultrasonic Cell Disruptor, Misonix, USA). Os extratos obtidos com as células rompidas foram diluídos em água deionizada esterilizada para obter as concentrações desejadas dos tratamentos e congelados a -80°C, quando não usados imediatamente.

3.4 Tratamentos utilizados

Para a realização dos experimentos foram desenvolvidos três tratamentos: K: Controle, usando apenas água deionizada esterilizada ou destilada; MC: Extrato

bruto contendo microcistina (BCCUSP232); EB: Extrato bruto sem microcistina (BCCUSP03).

Para o bioensaio de germinação, utilizou-se oito concentrações de MC-LR nos valores de 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MC0,5), 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MC2), 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MC5), 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MC10), 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MC25), 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MC50), 75 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MC75) e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MC100), extrato contendo mais 24,6% de MC-RR.

Como nosso objetivo principal era investigar o risco de contaminação humana, através de consumo de hortaliça irrigada com concentrações naturais de microcistina, empregamos somente as quatro menores concentrações (0,5, 2, 5 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) no bioensaio de crescimento.

As concentrações usadas no extrato bruto sem microcistina (BCCUSP03) foram correspondentes à massa seca do cultivo BCCUSP232 utilizada para se obter as concentrações de microcistina, ou seja, por ordem crescente de concentração: 17,74 mg.L^{-1} (EB0,5), 70,95 mg.L^{-1} (EB2), 177,36 mg.L^{-1} (EB5), 354,74 mg.L^{-1} (EB10), 886,84 mg.L^{-1} (EB25), 1.773,68 mg.L^{-1} (EB50), 2.660,52 mg.L^{-1} (EB75), 3.547,36 mg.L^{-1} (EB100).

3.5 Planta-teste

A planta selecionada para a realização dos testes foi a alface (*L. sativa*), variedade crespa, uma hortaliça pertencente à família Asteraceae e freqüentemente utilizada na horticultura brasileira e de elevado consumo pela população mundial.

3.6 Bioensaio de germinação de sementes

Os experimentos de bioensaio de germinação de sementes foram realizados no Laboratório de Sementes da ESALQ/USP. Foram utilizadas sementes sem defensivos do cultivar Grand Rapids - TBR da ISLA SEMENTES (Porto Alegre, Rio Grande do Sul).

Para cada tratamento, realizou-se quatro repetições de cinquenta sementes semeadas aleatoriamente em caixas plásticas transparentes, tendo como substrato duas folhas de papel de filtro tipo mata borrão, as quais foram saturadas com 13ml das soluções dos tratamentos. Em seguida, as placas foram levadas para câmara climatizada com condições constantes de luz e temperatura de 20°C por sete dias.

Ao quarto dia de avaliação, as folhas de papel de filtro de todos os tratamentos foram reumedecidas com 1,0ml de água deionizada esterilizada.

Antes da semeadura, as sementes foram superficialmente esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante cinco minutos, lavadas com água deionizada em abundância e deixadas para secar em papel toalha por 3h.

As caixas plásticas foram esterilizadas com solução de hipoclorito de sódio a 10% durante uma hora, lavadas com água destilada, secas em estufa e mantidas sob luz ultravioleta ($\lambda = 256\text{nm}$) em fluxo laminar durante 45min, junto às folhas de papel de filtro para esterilização. A câmara climatizada foi lavada e desinfetada com solução de formol a 37%.

A contagem de germinação foi realizada diariamente, tendo como critério a protrusão radicular com 2mm de comprimento. Após sete dias da semeadura, foram contabilizadas as porcentagens de germinação e de produção de plântulas normais, conforme as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 1992). A porcentagem de plântulas normais foi calculada a partir do total de sementes germinadas.

Também foi realizada a medição, com auxílio de régua com graduação em milímetros, do comprimento da radícula, do hipocótilo e dos cotilédones de cinco plântulas normais por repetição tomadas aleatoriamente. Estas mesmas plântulas foram pesadas individualmente em balança de precisão para obter a massa fresca. A massa seca foi obtida após serem colocadas em sacos de papel e permanecerem por 48h em estufa a temperatura constante de 70°C.

Os cotilédones de outras três plântulas normais por repetição foram cortados, pesados em balança de precisão (aproximadamente 25mg de massa fresca) e imediatamente submetidos à extração de clorofila. As demais plântulas foram congeladas em nitrogênio líquido para posterior extração e análise da atividade da enzima peroxidase (POD).

3.7 Bioensaio de crescimento: substrato e cultivo das plantas

Para os testes com as plantas, utilizaram-se mudas comercializadas por produtor local (IBS MUDAS, Rod. Piracicaba-Rio Claro, KM 20). Sementes do cultivar Vanda (Sakata Seed, Bragança Paulista, São Paulo) foram semeadas em bandejas de duzentas células preenchidas com substrato comercial Plantmax[®] e mantidas sob cultivo protegido.

Aos trinta dias de crescimento, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade para 7L contendo 6L (aproximadamente 4kg) de substrato para hortaliça em vaso (Basaplant, Artur Nogueira, São Paulo), que consiste de uma mistura de casca de *Pinus*, turfa, carvão e vermiculita.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação pertencente ao Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) da ESALQ/USP. Até o 10º dia após o transplante, as plantas somente foram irrigadas manualmente com água destilada, duas vezes ao dia com um volume suficiente para manter o substrato permanentemente úmido. Neste período, aplicou-se adubação extra com uma solução contendo sulfato de magnésio (427 mg.L^{-1}), nitrato de cálcio (478 mg.L^{-1}) e nitrato de potássio (134 mg.L^{-1}) a cada três dias.

Os tratamentos iniciaram-se ao 11º dia após o transplante e duraram quinze dias, sendo utilizadas três plantas para cada tratamento. Durante este período, somente foram aplicados as soluções dos tratamentos, com duas adubações extras em um volume de 50ml ao 6º e 12º dias após início dos tratamentos.

A fim de reproduzir as condições de irrigação tipo aspersão, as soluções de cada tratamento foram aplicadas nas folhas das plantas, permitindo que o excesso escorresse para o substrato, duas vezes ao dia, em um volume de 60ml pela manhã e 40ml ao fim da tarde. Portanto, cada planta recebeu 1.500ml da solução contendo as diferentes concentrações dos extratos durante o experimento.

Não foi aplicado nenhum tipo de defensivo durante todo o ciclo de desenvolvimento da cultura.

Ao 56º dia do ciclo, um dia após o término da aplicação dos tratamentos, discos foliares de 1,0cm de diâmetro foram cortados de folhas medianas de cada planta com a ajuda de um vazador, pesados em balança de precisão e submetidos à extração de clorofila. Outros quinze discos por planta de três folhas medianas (cinco de cada folha) foram utilizados para análise de condutividade elétrica.

Demais partes da planta (folhas e raiz) foram lavadas com água destilada em abundância para remover possível toxina aderente, secas em papel toalha, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -20°C para posteriores análises da atividade da enzima peroxidase e bioacumulação da microcistina nos tecidos, conforme metodologia a seguir.

3.8 Análise do teor de clorofilas

Para a determinação bioquímica do teor de clorofilas, os materiais provenientes dos bioensaios de germinação e de crescimento foram incubados em tubos Falcon contendo 3mL 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 2mL 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.

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

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

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

O conteúdo de clorofila *a + b* dos tecidos foi expresso em µg de pigmento por grama de massa fresca (µg.g⁻¹).

3.9 Análise da atividade da enzima peroxidase

Para este ensaio, utilizou-se aproximadamente 300mg de massa fresca das amostras provenientes do bioensaio de germinação de sementes e de crescimento previamente congeladas em nitrogênio líquido. A metodologia utilizada foi adaptada de Lima (1994).

A extração foi realizada macerando-se em almofariz com nitrogênio líquido e acrescentados 5ml de tampão fosfato a 0,2M (pH 6,8) e polivinilpirolidone (PVP), sendo o procedimento realizado em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 4°C, 12.000g por 10min, utilizando-se o sobrenadante como extrato enzimático para quantificação.

Para determinação da POD foram elaboradas duas soluções: A e B. Para preparo da Solução A, 2,2mL de H₂O₂ (35%) foram diluídos com água destilada até volume de 10mL, sendo retirado desta solução 0,5ml e o volume completado com

tampão fosfato (0,2M) até 50ml. A Solução B foi preparada diluindo-se 83,3mg de aminoantipirina em 10mL de água destilada e 163mg de fenol diluídos em 70mL de água destilada, em seguida realizou-se a junção dos dois reagentes e o volume foi completado para 100ml com água destilada.

A quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando o comprimento de onda de 505nm. Em tubos de ensaio foram colocados 1,0ml do extrato enzimático, 0,5 mL da solução A e 0,5mL da solução B. As amostras permaneceram em banho-maria a 30°C durante 5min, após este período, a reação foi encerrada adicionando 2mL de álcool etílico absoluto. Os resultados foram expressos em $\mu\text{Moles de H}_2\text{O}_2 \text{ decomposto} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de massa fresca.

3.10 Permeabilidade seletiva da membrana plasmática de folhas adultas

A permeabilidade seletiva da membrana plasmática de folhas de plantas adultas foi avaliada indiretamente com auxílio de condutivímetro (HI 9043, Hanna Instruments) em solução de sacarose 0,2M. Para tanto, os discos foliares dos diferentes tratamentos foram emersos em béqueres contendo 20ml da solução e avaliados periodicamente em diferentes intervalos de tempo por um período de 24h. Os resultados foram expressos em $\mu\text{Siemes} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\mu\text{S} \cdot \text{s}^{-1}$).

3.11 Extração e determinação de microcistina em tecido foliar por ELISA

A bioacumulação da cianotoxina nos tecidos foliares foi investigada macerando-se 1g de massa fresca de uma folha inteira e mediana de cada planta (três por tratamento) expostas às diferentes concentrações de microcistina (0,5, 2, 5 e 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e controle (irrigada somente com água) em almofariz com nitrogênio líquido e acrescentados 4ml de água deionizada. O material contido em tubo de vidro foi submetido ao banho de ultrassom por 5min e centrifugado duas vezes por 10min a 12.000g e 20°C, a fim de se obter a completa lise das células, a qual foi confirmada através de microscópio óptico. As frações obtidas do tecido foram analisadas através de imunoenensaio (ELISA - Ensaio do Imunoadsorvente Ligado à Enzima) utilizando kit placa específico para microcistinas (BEACON, Portland, USA). Trata-se de um método competitivo indireto constituído de anticorpos policlonais usado para quantificar microcistinas e nodularinas, apresentando 100% de reatividade com MC-LR, 87% com MC-RR, 48% com MC-YR e 31% com nodularina.

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 50µL dos calibradores, do controle e das amostras. Logo após, adicionou-se 50µL de solução de anticorpo. O conteúdo foi misturado através de agitação manual durante 30s e os poços foram cobertos com parafilme e incubados durante 30min a temperatura ambiente. Após este período, os poços foram lavados com solução de lavagem do kit e, posteriormente, foram adicionados 100µL de substrato em cada poço e, novamente, o conteúdo foi misturado e incubado por mais 30min. Depois da incubação, foram pipetados 100µL de solução “stop” (ácido clorídrico a 1N) em cada poço. Para a leitura das amostras utilizou-se a leitora de placas Asys, modelo Expert Plus no comprimento de onda de 450nm. Uma curva de calibração foi construída usando-se concentrações de MC-LR de 0; 0,1; 0,3; 0,8 e 2,0 ppb ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) para a determinação da concentração 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 MC-LR por grama de massa fresca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

3.13 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 SAS. Nos ensaios com resultados significativos, utilizou-se o teste de Dunnett para verificar quais tratamentos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle. Gráficos em barras com as médias e erro padrão de cada tratamento foram confeccionados no programa Excel.

4.1 Bioensaio de germinação de sementes

As médias seguidas do erro padrão e os resultados dos testes estatísticos de Tukey e Dunnet para os parâmetros avaliados encontram-se na Figura 2, com exceção para os valores de comprimento da radícula e parte aérea que estão na Figura 4.

Houve uma ligeira redução na porcentagem de germinação de sementes para as duas maiores concentrações dos extratos tanto com microcistina (MC) quanto sem a toxina (EB) em relação ao controle (Fig. 2a). Entretanto, diferenças significativas entre os tratamentos podem ser observadas através dos demais parâmetros avaliados.

Uma significativa redução na ocorrência de plântulas normais foi encontrada para o tratamento com microcistina principalmente para as duas maiores concentrações aplicadas (MC75 e MC100) (Fig. 2b). Nestas concentrações, houve uma alta incidência de plântulas com necrose na radícula na região do meristema radicular (Figura 3a-b), com porcentagens em relação às anormais de 84,6% para MC75 e de 88,1% para MC100. Este sintoma também foi observado para os tratamentos EB75 e EB100, porém em porcentagens inferiores (48,8% e 56%, respectivamente).

Para as concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ambos os extratos não foi observada necrose na radícula. Entretanto, este órgão apresentou-se levemente escurecido em algumas plântulas, as quais foram classificadas como normais por apresentarem-se saudáveis. Escurecimento na radícula também ocorreu para as concentrações 75 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ambos os extratos.

Para os tratamentos MC75 e MC100, algumas plântulas ($\pm 12\%$) com necrose na raiz principal que apresentaram bom desenvolvimento de raízes laterais (Fig. 3d) foram classificadas como normais seguindo critérios estabelecidos nas Regras (BRASIL, 1992). Para estes tratamentos também se observou morte de sementes com início de desenvolvimento da radícula (Fig. 3c).

Na Figura 4, podem-se observar diferenças entre os tratamentos (EB e MC) para os comprimentos da radícula e da parte aérea das plântulas normais. Com

aplicação de doses de 75 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ambos os tratamentos ocorreu redução significativa em relação ao controle no comprimento da radícula, com os menores valores para o tratamento com microcistina.

Por outro lado, em relação à parte aérea, houve interferência significativa da concentração do extrato sem microcistina (EB) no aumento do comprimento do hipocótilo e dos cotilédones. Para o tratamento com microcistina (MC) houve um padrão diferente, com tendência de aumento no comprimento do hipocótilo até 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Além desta concentração houve progressiva redução, mas com valores sem diferença estatística em relação ao controle (K). Os cotilédones de MC apresentaram-se maiores que o controle em todas as concentrações e com valores semelhantes ao tratamento EB, com exceção para 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, concentração em que foi observado o maior aumento no comprimento para EB100.

Aumento significativo na massa fresca em relação ao controle foi observado para os tratamentos EB75 e EB100 e para MC10, mas a massa seca somente aumentou no tratamento EB100 (Fig. 2c-d).

Houve redução de 24% no teor de clorofila para os tratamentos MC50 e MC75, alcançando a maior redução (30%) em MC100 (Fig. 2e).

Elevação na atividade da enzima peroxidase foi observada para algumas concentrações dos dois tratamentos sem um padrão dose-dependente. Entretanto, o maior aumento (3,09x) foi encontrado para o tratamento MC100 (Fig. 2f).

4.2 Bioensaio de crescimento

As médias mais o erro padrão e os resultados estatísticos do teste de Tukey e análise de Dunnet encontram-se na Figura 5, com exceção para os valores de condutividade elétrica que são apresentados na Figura 6.

Durante todo o período de aplicação dos tratamentos nas plantas não foi observada nenhuma diferença morfológica expressiva. Todas as plantas apresentaram-se vistosas e semelhantes ao controle.

O teor de clorofila não diferiu entre os tratamentos ($p=0,7918$) (Fig. 5a). Embora tenha ocorrido redução na atividade da POD nas folhas (Fig. 5b) e na raiz (Fig. 5c), principalmente para o tratamento com microcistina (MC), ela não foi significativa ($p=0,3170$ e $p=0,5854$, respectivamente).

Para a permeabilidade seletiva da membrana plasmática, os tratamentos com e sem microcistina não diferiram entre si ($p=0.7242$), mas sim em relação ao controle ($p=0,0014$), havendo influência do tempo e da concentração ($p<0,001$) no aumento da perda de eletrólitos para o meio.

4.3 Acumulação de microcistina

Em todos os extratos provenientes dos tecidos foliares das plantas submetidas às diferentes concentrações de MC-LR foi detectada a presença da cianotoxina pelo teste de ELISA. Houve tendência de aumento gradual na concentração de microcistina no interior dos tecidos foliares de acordo com o aumento da concentração aplicada, com valores entre 7,2 e 167,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Tabela 1). Esses valores se assemelham aos encontrados para outros vegetais incluídos na dieta humana (Tabela 2) e equivalem a uma ingestão diária estimada entre 0,0072 e 0,167 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa corpórea (Tabela 1). Para as amostras controle (K) irrigadas somente com água, os resultados foram negativos.

5. DISCUSSÃO

Para constatar a ação alelopática de metabólitos de diferentes organismos, inclusive de cianobactérias, os bioensaios de germinação de sementes têm grande importância, pois permitem controlar diversas variáveis (GEHRINGER et al., 2003). Assim como observado para outros aleloquímicos (FERREIRA & AQUILA, 2000), a germinação das sementes de alface foi menos sensível ao extrato contendo MC-LR que o desenvolvimento inicial das plântulas, onde os efeitos negativos da cianotoxina puderam ser verificados.

Yin et al. (2005a) também não observaram interferência da MC-RR na germinação de sementes da macrófita *V. natans*. Porém, as plântulas tiveram a massa fresca e o comprimento dos cotilédones reduzidos quando expostos às concentrações de 100, 1.000 e 10.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, inclusive com encurtamento da radícula na maior concentração. A inibição da germinação de sementes somente tem sido relatada quando expostas a doses acima de 1.600 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina (CHEN et al., 2004; SAQRANE et al., 2008), concentrações bem superiores às observadas normalmente na natureza, que variam entre 0,5 a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (FASTNER et al., 1999; HIROOKA et al., 1999; VIEIRA et al., 2005), mas que podem ocorrer em situações de grande aumento da densidade celular (SIVONEN & JONES, 1999) e uso de algicidas (JONES & ORR, 1994).

O sintoma mais comumente observado quando há presença de substâncias alelopáticas interferindo no desenvolvimento da plântula é a necrose da radícula (FERREIRA & AQUILA, 2000). Esta anormalidade pode ser observada com frequência para as duas maiores concentrações de MC-LR aplicadas neste estudo, ocorrendo na região do meristema apical radicular. Entretanto, este efeito não deve decorrer exclusivamente da presença da toxina no extrato, uma vez que para concentrações equivalentes do extrato bruto sem microcistina (EB100) também foi observado, embora em menor proporção, agindo a toxina, portanto, como um potencializador do sintoma.

Necrose na presença de microcistina também foi observada por Abe et al. (1996) em folhas de feijão (*P. vulgaris*), em cotilédones de mostarda (*S. alba*) por M-Hamvas et al. (2003) e em cotilédones e radícula de nabo (*B. napus*) por Chen et al. (2003), porém em concentrações bem mais altas (a partir de 3.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$). O motivo

pelo qual ocorreu necrose nos tecidos vegetais é desconhecido. Contudo, recentemente Huang et al. (2008) verificaram indução de apoptose pela MC-RR em células de fumo (*N. tabacum*), processo mediado pela presença de ROS e interferência na permeabilidade da membrana mitocondrial.

Aumento na concentração de ROS foi evidenciado para o tratamento MC100 através de elevação na atividade da POD, o que poderia desencadear o processo de apoptose nas células do meristema radicular. Entretanto, para o tratamento MC75 em que o sintoma foi comum, não houve uma elevação na atividade da POD tão expressiva. Além disso, a atividade da enzima foi avaliada para a plântula inteira, não sendo possível discriminar se houve diferença de expressão entre os órgãos e entre plântulas normais e anormais. Contudo, elevação na atividade da POD ocorreu em quase todas as concentrações de MC-LR aplicadas, apontando contribuição do estresse oxidativo nos efeitos deletérios da cianotoxina.

Além de causar anormalidade na radícula das plântulas, as altas concentrações dos extratos, principalmente aquelas contendo MC-LR, reduzem o crescimento deste órgão das plântulas normais. Não é de nosso conhecimento dados sobre os efeitos de extrato bruto de linhagem não produtora de microcistina em crescimento de plantas. Com relação à microcistina, o que geralmente observa-se é redução principalmente às altas concentrações. Gehringer et al. (2003) encontraram maior redução no comprimento da radícula e dos cotilédones de plântulas de *L. sativum* expostas a extrato livre de células contendo $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR em relação à mesma concentração desta toxina purificada, mostrando a presença de outros compostos orgânicos no extrato intensificando o encurtamento dos órgãos.

Assim, outras substâncias presentes no extrato de *M. aeruginosa*, além da MC-LR, podem ter influenciado o desenvolvimento da radícula das plântulas de alface. Contudo, pode ter ocorrido um efeito negativo adicionado do potencial osmótico dos extratos (ASTARITA et al., 1996), principalmente para as maiores concentrações aplicadas.

Na macrófita *P. australis*, Mathé et al. (2009) verificaram que a ocorrência de raízes mais curtas decorreu da diminuição da divisão mitótica das células meristemáticas devido à inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A, quando em contato com a MC-LR. Estes autores também observaram produção de raízes

laterais a $5.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR, mas estas se apresentavam inviáveis devido à desestruturação dos microtúbulos das células.

Frente a isto, embora algumas plântulas de alface submetidas a concentrações de 75 e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR, que apresentaram necrose na raiz principal, tenham tido bom desenvolvimento de raízes laterais, a sua viabilidade é incerta, o que poderia reduzir ainda mais o sucesso da cultura. Produção de raízes secundárias quando raiz principal necrosada foi observada por Chen et al. (2004) em arroz (*O. sativa*), mas a viabilidade dessas plântulas também não foi avaliada.

Em relação à parte aérea, ao contrário ao observado para a radícula, ocorreu aumento gradual no comprimento conforme aumento na concentração do extrato bruto sem microcistina. Segundo Rice (1984), aparentemente a maior parte, senão todos os compostos orgânicos que são inibitórios em alguma concentração, são estimulantes quando presentes em menores concentrações. Assim, o extrato bruto de *M. aeruginosa* contém substâncias que desempenham um efeito alelopático estimulante gradual no comprimento da parte aérea das plântulas de alface, resultando em um aumento das massas fresca e seca. Contudo, este efeito é reduzido quando há a presença de MC-LR no extrato em concentrações acima de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Resultados semelhantes foram encontrados por Bibo et al. (2008) em nabo (*B. napus*), onde o comprimento total e a massa fresca das plântulas foram aumentados quando tratadas com extrato bruto proveniente de floração contendo $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-RR. Por outro lado, houve diminuição nos valores acima desta concentração.

A maior redução do hipocótilo em relação aos cotilédones na presença da MC-LR, deve decorrer de o primeiro estar mais exposto à cianotoxina por ficar em maior contato com as folhas de papel de filtro, o que justifica também a maior nocividade causada na radícula, órgão que se desenvolve durante todo o período do teste em contato com as folhas.

A microcistina tem mostrado causar efeitos adversos à fotossíntese, afetando não só o conteúdo e o padrão de clorofilas (PFLUGMACHER, 2002; WIEGAND et al. 2002), mas também o fotossistema II (SAQRANE et al., 2009). Para as plântulas de alface, ocorreu redução de até 30% no teor de clorofila para a concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR (MC100). Valores semelhantes foram observados por Saqrane et al. (2007) em *L. gibba*, com diminuição de aproximadamente 35% quando expostas

a MC-RR e MC-WR em concentrações de 75 e 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$, alcançando maior redução a 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (65%).

A exposição de culturas plantadas em água contaminada com cianotoxinas, além de poder trazer prejuízos econômicos, alerta para um problema maior, que é a possibilidade de bioacumulação da cianotoxina nos tecidos vegetais, principalmente nas partes comestíveis da planta. Embora as plantas de alface expostas às diferentes concentrações de MC-LR não tenham apresentado nenhuma alteração morfológica expressiva, bem como interferência significativa no teor de clorofila e na atividade da enzima antioxidante peroxidase, as análises de ELISA detectaram a presença da cianotoxina nos tecidos foliares.

Mitrovic et al. (2005) também não observaram alteração no crescimento e na atividade da peroxidase na macrófita *L. minor*, mas encontraram uma concentração de 46 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ nos tecidos quando expostas a 3.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR. Embora apresentassem aparência saudável, Kurki-Helasma & Meriluoto (1999) verificaram bioacumulação de 5,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ em plântulas de mostarda (*S. alba*) expostas a 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR.

Contudo, os resultados de condutividade elétrica apontam para a existência de outro(s) composto(s) nos extratos das linhagens BCCUSP03 e 232 de *M. aeruginosa* comprometendo a permeabilidade da membrana plasmática das folhas da planta adulta, o que pode deixá-la mais suscetível a infecções e estresses abióticos. Bury et al. (1998) encontraram efeitos danosos na atividade da $\text{Na}^{+2}/\text{K}^{+}$ ATPase de células de brânquias de tilápia (*Oreochromis mossambicus* Peters) quando em contato com linhagens de *M. aeruginosa* produtoras de MC-LR. Entretanto, eles não puderam ser reproduzidos com MC-LR purificada (BURY et al., 1996) e, após caracterização dos compostos, foram atribuídos aos lipídeos, principalmente os insaturados.

Bioacumulação da microcistina por alface já foi observada anteriormente por Codd et al. (1999b) e Crush et al. (2008). Os valores observados nos tecidos foliares das plantas expostas às diferentes concentrações de microcistina neste trabalho se assemelham aos registrados por Codd et al. (1999b) em alface comercial, que variaram entre 9,4 e 249 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca, conforme a disposição da folha na planta. Estes valores foram encontrados após dez dias da última irrigação com água contendo a cianotoxina, mas a quantidade total de microcistina a que a planta foi exposta não pode ser estabelecida.

Esta mesma variação de concentração (entre 74 e 84 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca) foi observada por Crush et al. (2008) para a espécie quando aplicada nas folhas 100ml de solução aquosa de extrato bruto contendo microcistina em uma concentração de 1.700 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com absorção de menos de 1% tanto durante três quanto seis dias de exposição. Os autores não observaram translocação da toxina da raiz para a parte aérea quando a solução foi aplicada diretamente no substrato (no caso areia), como observado por Järvenpää et al. (2007) em brócolis (*B. oleracea*) e mostarda (*S. alba*). No entanto, casos de translocação também já foram registrados (CHEN et al., 2003; KURKI-HELASMO & MERILUOTO, 1999; PEUTHERT et al., 2007; SAQRANE et al., 2009).

Embora tenhamos aplicado concentrações de microcistina mais de 100 vezes inferiores a utilizada por Crush et al. (2008), foi observada maior bioacumulação quando aplicamos 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Isto provavelmente deva-se ao maior tempo de exposição de nossas plantas (15 dias). Para a macrófita aquática *V. natans* ocorreu maior acumulação quando exposta a 10.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina que a 1.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, mas a absorção relativa foi maior para a menor concentração (Yin et al., 2005a).

Não só a forma de aplicação da toxina influencia a sua absorção, como também o tipo de substrato. Järvenpää et al. (2007) testaram a absorção de MC-RR e MC-LR por solo, vermiculita e solo/vermiculita (60:40, v/v) e encontraram maior absorção pela vermiculita, principalmente da MC-RR, com eliminação da maioria da toxina da fase aquosa em apenas duas horas. Desta forma, as concentrações observadas em nossas plantas poderiam ser ainda mais altas caso fossem cultivadas em solo (e se as microcistinas chegassem às folhas via translocação), visto que o substrato utilizado constitui-se principalmente de vermiculita.

A irrigação com água contendo a metade da concentração de microcistina permitida na água tratada (1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) foi suficiente para promover a absorção da cianotoxina nos tecidos foliares da alface neste trabalho. O mesmo foi observado em tecido muscular e hepático em espécies de tilápia (*Tilapia rendalli* Boulenger e *Oreochromis niloticus* L.) ocorrentes nos reservatórios de Furnas e Funil, sudeste do Brasil, com acumulação de 800 a 32.100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (DEBLOIS et al., 2008). Acumulação de microcistina tem sido registrada para diversos organismos aquáticos e tem chamado a atenção para os riscos de contaminação humana e incorporação da cianotoxina na cadeia alimentar. Para o zooplâncton foi observada uma

concentração entre 300 a 16.400 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (FERRÃO-FILHO et al., 2002), para gastrópode (*Sinotaia histrica* Gould) entre 40 e 9.030 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (XIE et al., 2007), em bivalve (*Dreissena polymorpha* Pallas) entre 3.900 e 11.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (DIONISIO-PIRES et al., 2004) e 2.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ em crustáceo (*Procambarus clarkii* Girard) (VASCONCELOS et al., 2001). Contudo, valores inferiores, entre 2,4 e 337,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ foram encontradas em músculo de tilápias (*T. rendalli*) expostas a 17 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina na lagoa Jacarepaguá, Rio de Janeiro (MAGALHÃES et al., 2001).

Assim, as concentrações normalmente observadas em organismos aquáticos, que ficam permanentemente em contato com a água contendo a microcistina, foram verificadas em nossas plantas de alface, o que enfatiza a necessidade de monitoramento de diferentes rotas de exposição pelas autoridades públicas.

Segundo os nossos resultados, se uma pessoa de 60kg consumir entre 50 a 60g de salada de alface (aproximadamente 6 folhas), poderá estar ingerindo entre 0,43 a 10,02 μg de microcistina por refeição (entre 0,007 a 0,167 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa corpórea), podendo ultrapassar o valor diário tolerável de 0,04 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa corpórea.dia⁻¹ recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998).

6.CONCLUSÕES

1. A hipótese inicial foi aceita para o desenvolvimento inicial da alface, uma vez que o extrato da linhagem produtora de microcistina (BCCUSP232) provocou mais efeitos danosos que o da linhagem não produtora (BCCUSP03), principalmente no desenvolvimento da radícula, no teor de clorofila e no *status* oxidativo;

2. A irrigação de plantas de alface com extrato de *M. aeruginosa* produtora ou não de microcistina pode interferir na permeabilidade seletiva da membrana plasmática das folhas;

3. A irrigação de alface com água contendo a concentração de microcistina permitida na água tratada para consumo humano ($1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$) não garante a segurança alimentar, uma vez que a metade desta concentração foi suficiente para promover a absorção da cianotoxina nos tecidos foliares;

4. As folhas de alface irrigadas com água contendo microcistina acumulam a cianotoxina em concentrações que podem exceder o valor diário tolerável estabelecido pela OMS;

5. A ocorrência de cianobactérias tóxicas produtoras de microcistina em águas superficiais utilizadas para irrigação pode representar um risco para a saúde pública e, conseqüentemente, esta rota de exposição deve ser monitorada pelas autoridades públicas.

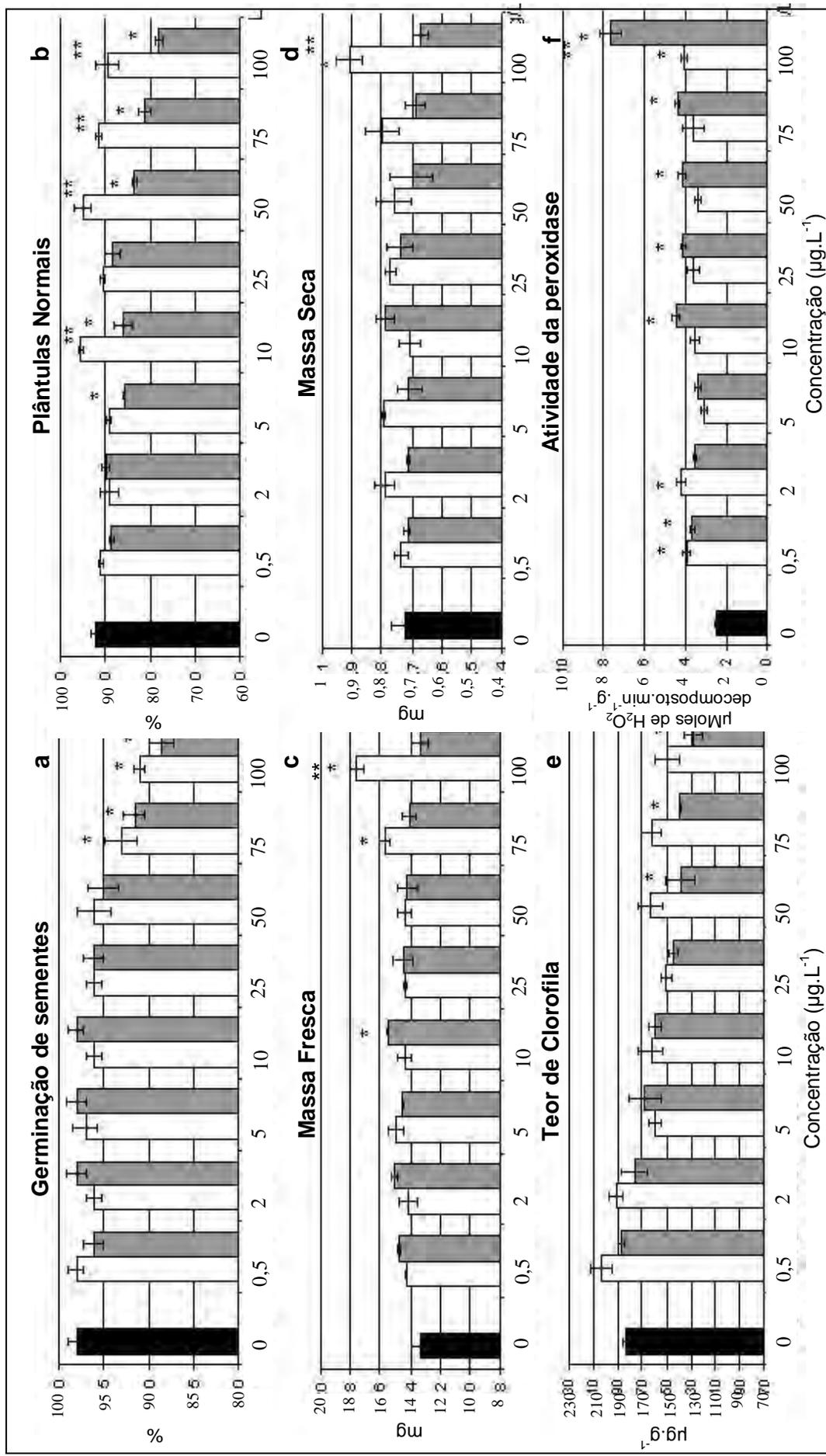


Figura 2) Porcentagem de germinação de sementes (a), de plântulas normais (b), massa fresca (c) e seca (d), teor de clorofila (e) e atividade da peroxidase (f) em bioensaio de germinação de sementes de alfafa. ■ Extrato bruto sem microcistina (EB), □: Extrato bruto com microcistina (MC). A média dos tratamentos com e sem microcistina diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey (**) e em comparação com a média do controle pelo teste de Dunnett (*). Média \pm Erro padrão, $n = 4$.

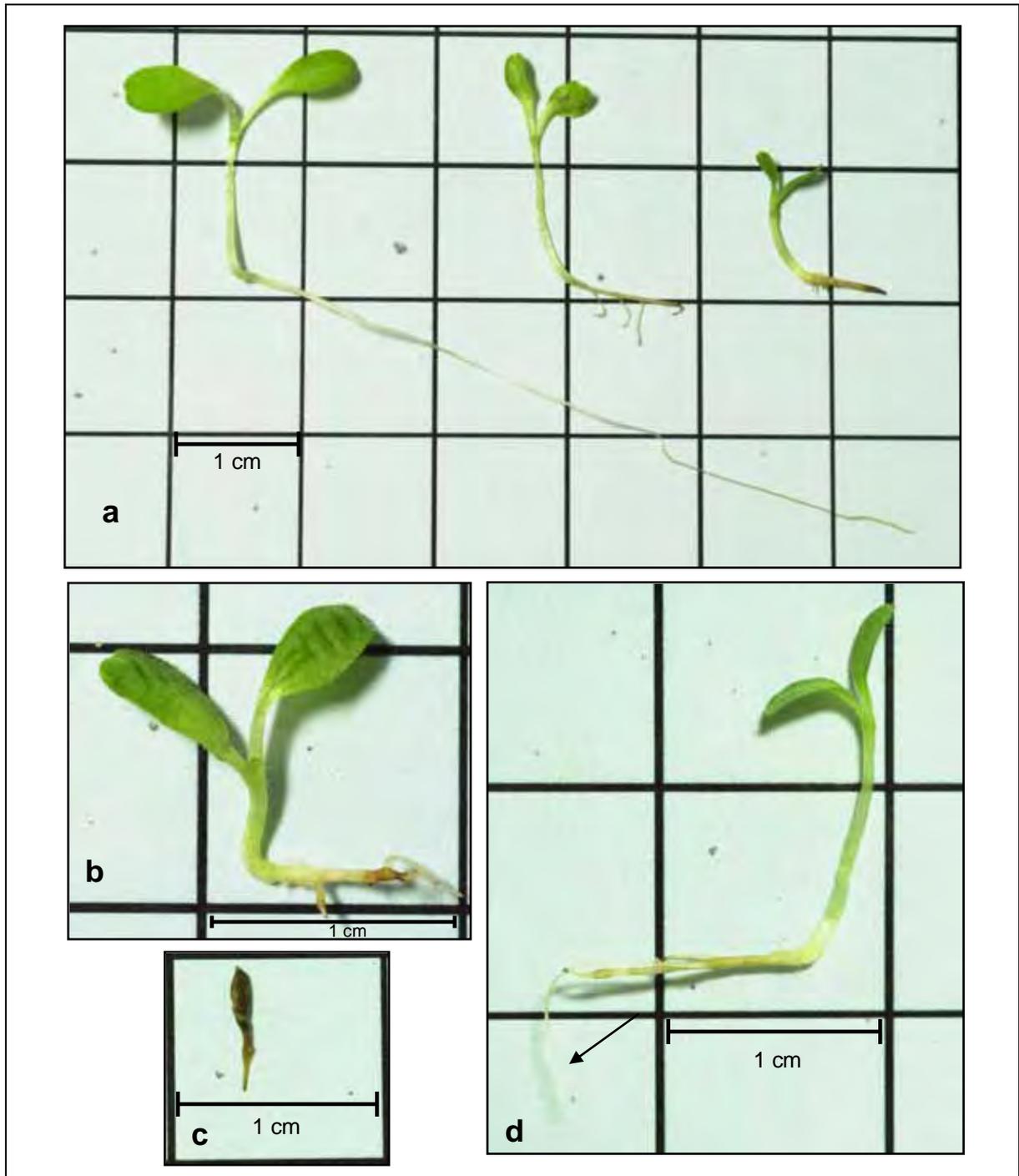


Figura 3) Plântulas de alface provenientes do bioensaio de germinação. **a)** Da esquerda para a direita: plântula normal controle (K), plântula anormal tratada com $75 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina (MC75), plântula anormal tratada com $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina (MC100), **b)** detalhe de uma plântula anormal com necrose na radícula e diminuição da parte aérea provocadas pelo extrato sem microcistina na concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (EB100), **c)** morte de semente com início de germinação em $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina (MC100), **d)** Presença de raiz lateral (seta) em plântula com necrose na raiz principal observada nas concentrações de 75 e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina (MC75 e MC100).

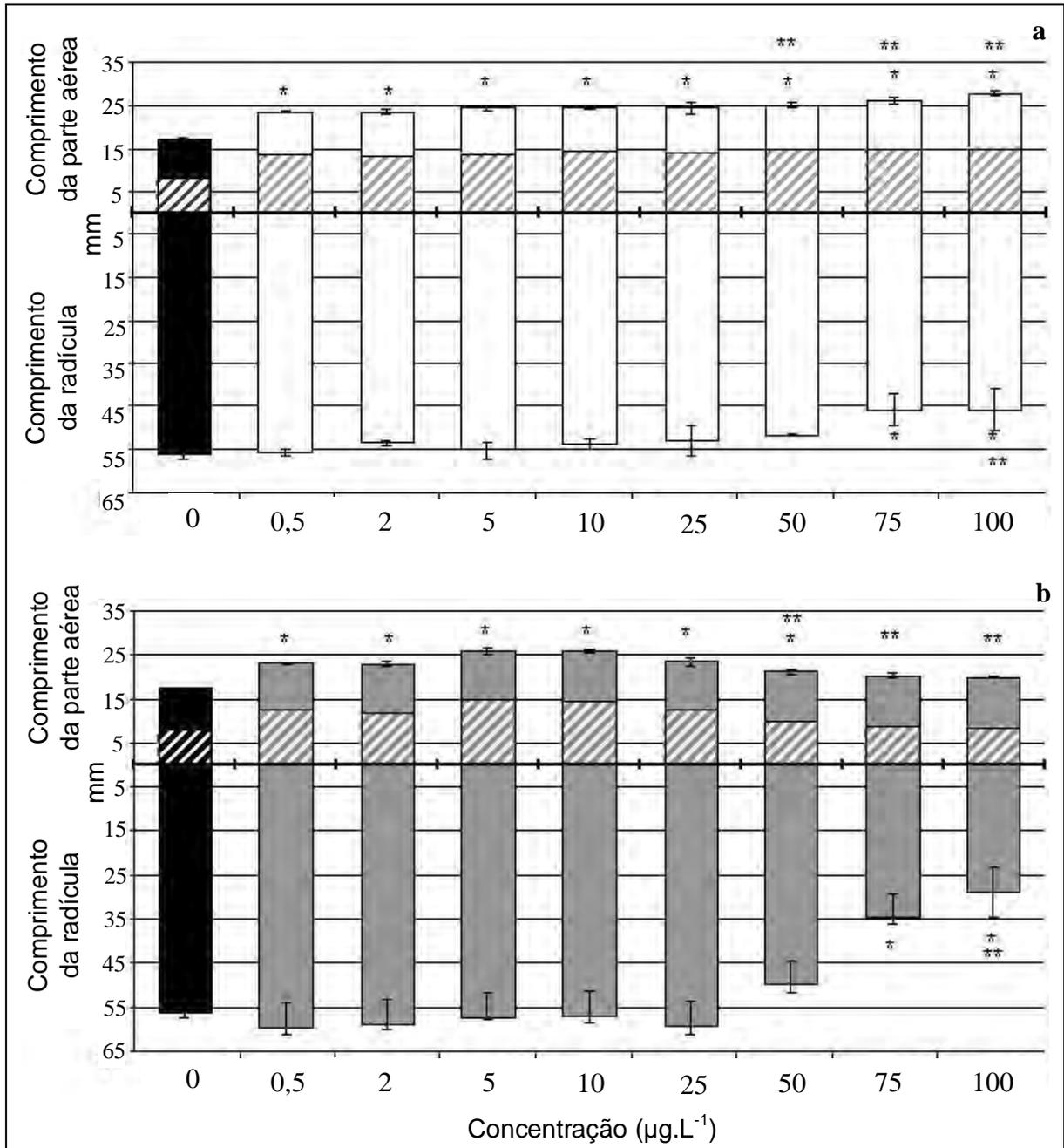


Figura 4) Comprimento da parte aérea e da radícula de plântulas normais provenientes de bioensaio de germinação. O comprimento da parte aérea consiste da medição do hipocótilo (área hachurada) e cotilédones. **a)** Tratamento com extrato bruto sem microcistina (EB), **b)** Tratamento com extrato bruto contendo microcistina (MC). Barra em preto consiste no tratamento controle somente com água (K). A média dos tratamentos com e sem microcistina diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey (**) e em comparação com a média do controle pelo teste de Dunnett (*). Média \pm Erro padrão, $n = 4$ replicatas de cinco plântulas normais.

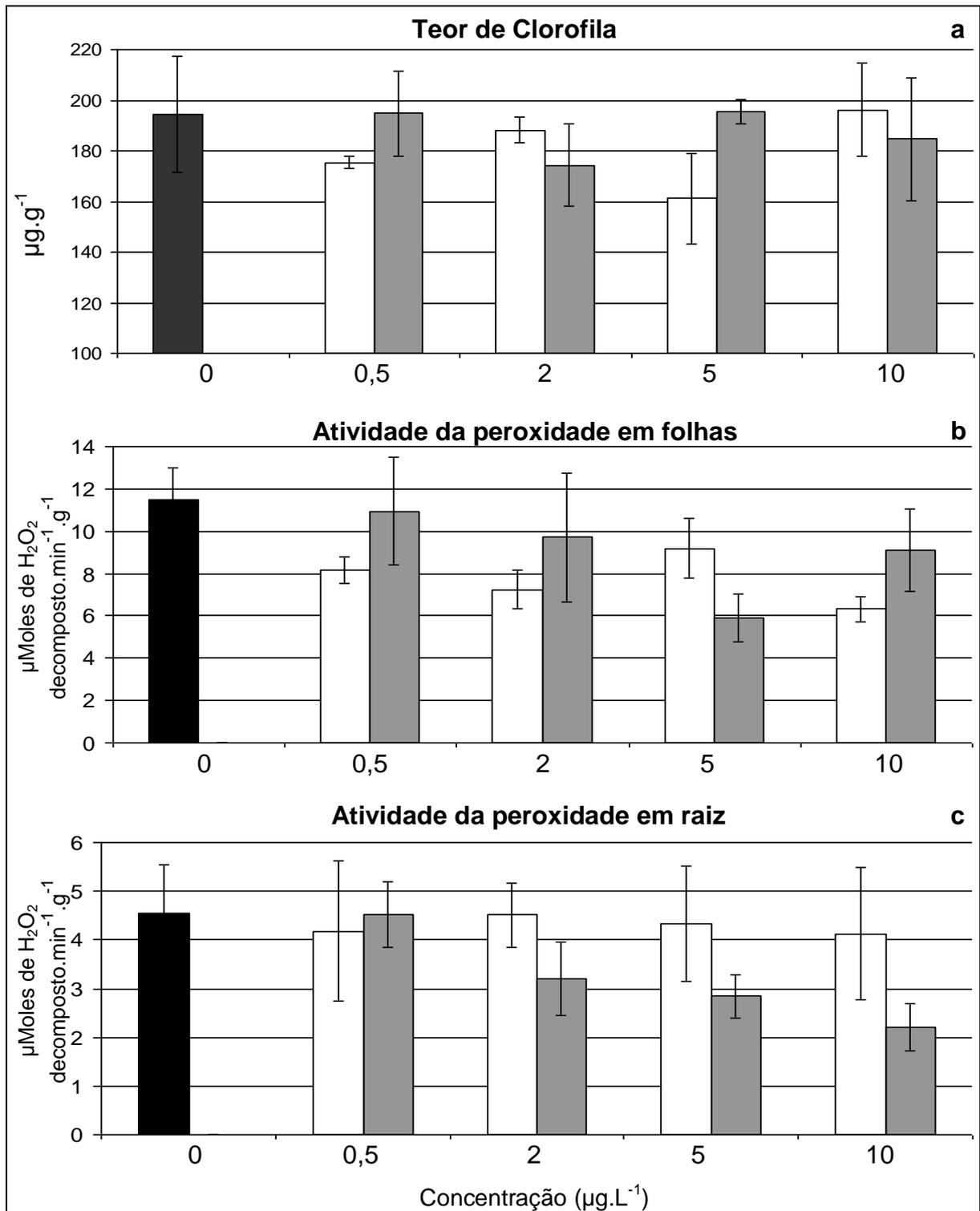


Figura 5) Conteúdo de clorofila (a), atividade da peroxidase em folhas (b) e em raiz (c) em bioensaio de crescimento de plantas de alface. ■: Controle (K), □: Extrato bruto sem microcistina (EB), ■: Extrato bruto com microcistina (MC). Nenhuma média dos tratamentos com e sem microcistina diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey e em comparação com a média do controle pelo teste de Dunnett. Média \pm Erro padrão, $n = 3$.

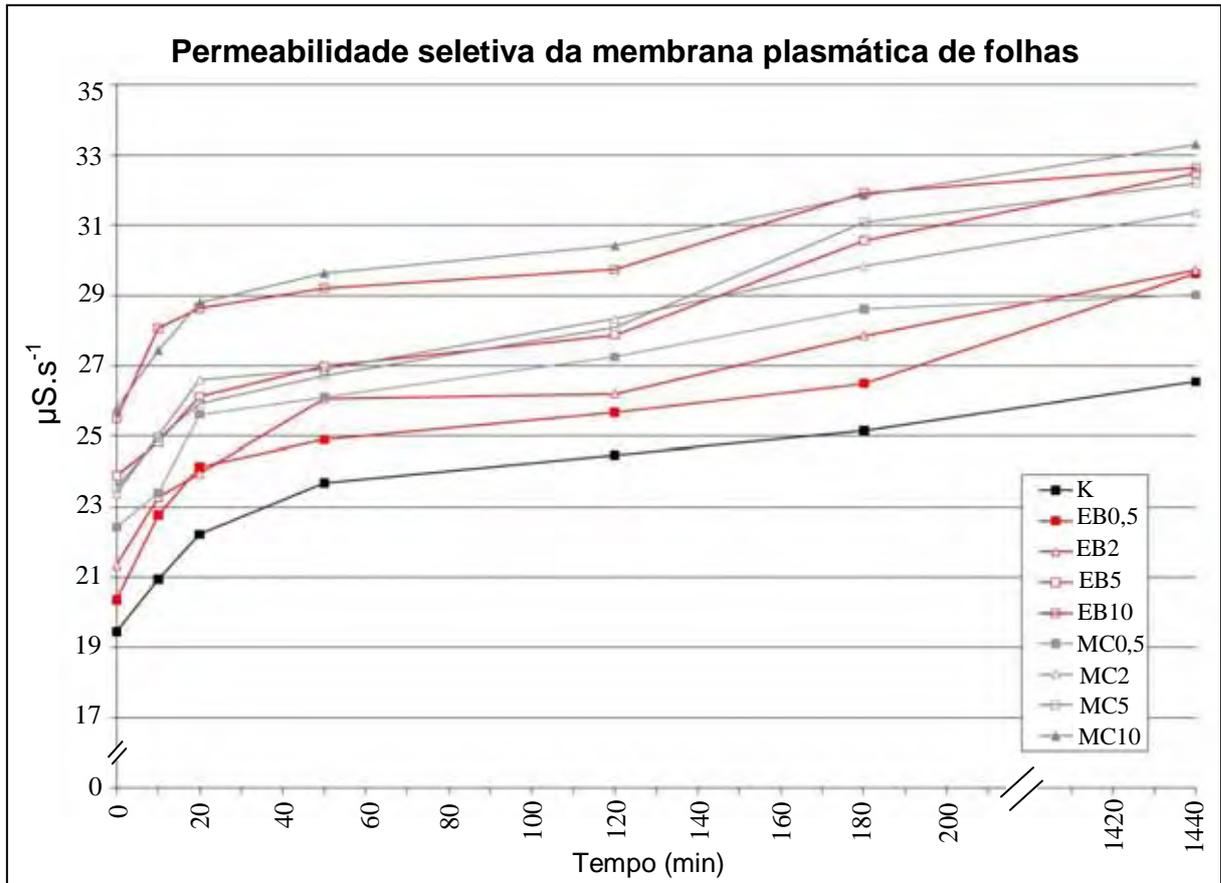


Figura 6) Permeabilidade seletiva da membrana plasmática de folhas oriundas do bioensaio de crescimento de plantas de alface. K: Controle, EB: Extrato bruto sem microcistina, MC: Extrato bruto com microcistina. Nenhuma média dos tratamentos com e sem microcistina diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,7242$), mas sim em comparação com a média do controle pelo teste de Dunnett ($p < 0,001$). Valores são a média de leituras de discos provenientes de três plantas ($n = 3$).

Tabela 1) Concentração de microcistina em tecidos foliares de alface, após irrigação com solução aquosa de extrato bruto contendo a cianotoxina em diferentes concentrações durante quinze dias e projeção de ingestão da microcistina por refeição. K: somente água, MC0,5: 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, MC2: 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, MC5: 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e MC10: 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. IDE = Ingestão Diária Estimada de 60g por pessoa de 60kg. Valores são expressos como equivalentes a MC-LR. Média \pm Desvio padrão, $n = 3$.

Tratamento	Concentração nos tecidos foliares ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Com o consumo de 60g, ingere-se (μg):	IDE ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa corpórea)*
K	negativo	0	0
MC0,5	7,17 \pm 1,95	0,432	0,0072
MC2	15,70 \pm 7,70	0,942	0,0157
MC5	13,16 \pm 7,75	0,792	0,0132
MC10	167,07 \pm 18,8	10,02	0,167

* Obs: o valor diário tolerável recomendado pela Organização Mundial da Saúde é de 0,04 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa corpórea.

Tabela 2) Concentrações de microcistina encontradas em diversos vegetais incluídos na dieta humana.

Espécie	Concentração no tecido ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca)	Concentração de MC* aplicada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Tempo de exposição (dias)	Referência Bibliográfica
Plântulas de arroz (excluiu radícula)	2,94 a 5,4	120 a 3000	10	Chen et al. (2004)
Plântulas de nabo (excluiu radícula)	2,61 a 651	24 a 3000	10	Chen et al. (2004)
Plântulas de mostarda (excluiu radícula)	5,3 a 87	2.500 a 5.000	7	Kurki-Helasma & Meriluoto (1998)
Brócolis (raízes)	0,9 a 2,4	10	20	Järvenpää et al. (2007)
Mostarda (raízes)	2,5 a 2,6	10	19	Järvenpää et al. (2007)
Trigo (folhas)	15.710	500 a 4.200	30	Saqrane et al. (2008)
Milho (folhas)	5.820	500 a 4.200	30	Saqrane et al. (2008)
Alface (folhas)	9,4 a 249**	?	?	Codd et al. (1999)
Alface (folhas)	74 a 84**	1.700	3 ou 6	Crush et al. (2008)
Alface (folhas)	7,2 a 167,1	0,5 a 10	15	Este trabalho

* microcistina

** os valores nos trabalhos originais foram expressos em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa seca. Para efeito de comparação, assumiu-se que 1g de massa seca de folha de alface equivale a 10g de massa fresca, conforme proposto por Crush et al. (2008).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, T.; LAWSON, T.; WEYERS, J. D. B.; CODD, G. A. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytologist*, n. 133, p. 651-658, 1996.

ALBAY, M.; AKCAALAN, R.; AYKALU, G.; TUFECKI, H.; BEATTIE, K. A.; COOD, G.A. Occurrence of toxic cyanobacteria before and after copper sulphate treatment in a water reservoir, Istanbul, Turkey. *Algological Studies*, n. 148, p. 67-78, 2003.

ASTARITA, L. V.; FERREIRA, A. G.; BERGONCI, J. I. *Mimosa bimucronata*: allelopathy and osmotic stress. *Allelopathy Journal*, n 3(1), p. 43-50, 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.; MARSÁLEK, 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. 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. 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.; 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.

BOTES, D. P.; VILJOEN, C. C.; KRUGER, H.; WESSELS, P. L.; WILLIAMS, D. H. Configuration assignments of the amino acid residues and the presence of N-methyldehydroalaivine in toxins from the blue green alga *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, n. 20(6), p. 1037-1042, 1982.

BOUVY, M.; FALCÃO, D.; MARINHO, M.; PAGANO, M.; MOURA, A. N. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquatic Microbial Ecology*, n. 23, p. 13-27, 2000.

BURY, N. R.; FLIK, G.; EDDY, F. B.; CODD, G. A. The effects of cyanobacterium and the cyanobacterial toxin microcystin-LR on Ca^{+2} transport and Na^{+}/K^{+} -ATPase in tilapia gills. *Journal of Experimental Biology*, n 199, p. 1319-1326, 1996.

BURY, N. R.; CODD, G. A.; WENDELAAR, S. E.; BONGA; FLIK, G. Fatty acids from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with potent inhibitory effects on fish gill Na^{+}/K^{+} -ATPase activity. *The Journal of Experimental Biology*, n. 201, p. 81-89, 1998.

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

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.

BRIAND, J. F.; JACQUET, S.; BERNARD, C.; HUMBERT, J. F. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research*, n. 34, p. 361-377, 2003.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites - The Cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, n. 72, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W. W.; AZEVEDO, S. M. F. O.; AN., J. S.; MOLICA, R. J. R.; JOCHIMSEN, E. M.; LAU, S.; RINEHART, K. L.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, n. 109. p. 663-668, 2001.

CHELLAPPA, N. T.; CHELLAPPA, S. L.; CHELLAPPA, S. Harmful phytoplankton blooms and fish mortality in a eutrophicated reservoir of northeast Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, n. 1(4), p.833-841, 2008.

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.; BELL, S. G.; KAYA, K.; WARD, C. J.; BEATTIE, K. A. & METCALF, J. S. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology*, n. 34, p. 405-415, 1999a.

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. 1999b.

COX, P. A.; BANACK, S. A.; MURCH, S. J. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, n. 100(23), p. 13.380-13.383, 2003.

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. 953-962, 1998.

DeMOTT, W. R.; ZHANG, Q. X.; CHARMICHAEL, W. W. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, n. 36, p. 1346-1357, 1991.

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. 273-289, 2005.

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.

DIONISIO-PIRES, L. M.; KARLSSON, K. M.; MERILUOTO, J. A. O.; KARDINAAL, E.; VISSER, P. M.; SIEWERTSEN, K.; VAN DONK, E.; IBELING, B. W. Assimilation and depuration of microcystin-LR by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology*, n. 69, p. 385-396, 2004.

EDWARDS, C.; BEATTIE, K. A.; SCRIMGEOUR, C. M.; CODD, G. A. Identification of anatoxin-a in a benthic Cyanobacteria (blue-green-algae) and in associated dog poisoning at Loch Inch, Scotland. *Toxicon*, n. 30(10), p. 1165-1175, 1992.

ERIKSSON, J. E.; GRONBERG, L.; NYGARD, S.; SLOTTE, J. P.; MERILUOTO, J.A.O. Hepatocellular uptake of ³H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochemical et Biophysica Acta*, n. 1025, p. 60-66, 1990.

FALCONER, I. R. Mechanism of toxicity of cyclic peptide toxins from blue-green algae. In: FALCONER, I. R. (Org.). *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London, 1993. p. 165-176.

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.

FAWELL, J.; JAMES, C.; JAMES, H. Toxins from blue-green algae: Toxicological assessment of Microcystin-LR and a method for its determination in water. Report No. FR 0359/2/D0E 3358/2, *Foundation for Water Research*, Marlow, UK, 1994. p. 46.

FERRÃO-FILHO, A. D. S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B.; AZEVEDO, S. M. F. O. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. *Aquatic Toxicology*, n. 59, p. 201-208, 2002.

FERREIRA, A. G. & AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, n. 12 (edição especial), p 175-204, 2000.

FRANCIS, G. Poisonous Australian Lake. *Nature*, n. 18, p. 11-12, 1878.

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.

HAMILL, K. D. Toxicity in benthic freshwater cyanobacteria (blue-green algae): first observations in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, n. 35, p. 1057-1059, 2001.

HAWKINS, P. R.; RUNNEGAR, M. T. C.; JACKSON, A. R. B.; FALCONER, I. R. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green algae)

Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszyńska) Seenayya et Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 50, p. 1292-1295, 1985.

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

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.-H.; HA, K.; JOO, G.-J., TAKAMURA, N. Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshwater Biology*, n. 48, p. 1540-1550. 2003.

JANG, M.; HA, K.; TAKAMURA, N. Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). *Toxicon*, n. 49, p. 727-733, 2007.

JÄRVENPÄÄ, S.; LUNDBERG-NIINISTÖ, C.; SPOOF, L.; SJÖVALL, O.; TYYSTJÄRVI, E.; MERILUOTO, J. Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography–mass spectrometry. *Toxicon*, n. 49(6), p. 865-874, 2007.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J.; CARDO, D.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. B. C.; MELO-FILHO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V.; AZEVEDO, S. M. F. O.; JARVIS, W. R. Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine*, n. 36: p. 873-878, 1998.

JONES, G. L. & ORR, P. T. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Resource*, n. 28, p. 871-876, 1994.

JONES, S. B. & JONES, J. R. Seasonal variation in cyanobacterial toxin production in two Nepalese lakes. *International Association of Theoretical and Applied Limnology*, n. 28, p. 1017-1022, 2002.

KAEBERNICK, M. & NEILAN, B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology*, n. 35, p. 1-9, 2001.

KEATING, K. I. Blue-green algal inhibition of diatom growth: transition from mesotrophic to eutrophic community structure. *Science*, n. 199, p.971-973, 1978.

KÓS, P.; GORZÓ, G.; SURÁNYI, G.; BORBÉLY, G. Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Analytical Biochemistry*, n. 225, p. 49-53, 1995.

KURKI-HELASMO, K. & MERILUOTO, J. 1998. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Toxicon*, n. 36(12), p. 1921-1926, 1998.

LEFLAIVE, J. & TEN-HAGE, L. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology*, n. 52, p. 199-214, 2007.

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

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.

MacKINTOSH, C.; BEATTIE, K. A.; KLUMPP, S.; COHEN, P., CODD, G. A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, n. 264(2), p. 187-192, 1990.

MAGALHÃES, V. F.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S. M.F.O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*, n. 39, p. 1077-1085. 2001.

MÁTHÉ, C.; M-HAMVAS, M.; VASAS, G.; SURÁNYI, G.; BÁCSI, I.; BEYER, D.; TÓTH, S.; TÍMÁR, M.; BORBÉLY, G. 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.

MÁTHÉ, C.; BEYER, D.; ERDÖDI, F., SERFÖZÖ, Z.; SZÉKVOLGYI, L., VASAS, G., M-HAMVAS, M., JÁMBRIK, K.; GONDA, S.; KISS, A., SZIGETI, Z. M., SURÁNYI, G. 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.

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.

MEZ, K.; BEATTIE, K. A.; CODD, G. A.; HANSELMANN, K.; HAUSER, B.; NAEGELI, H.; PREISIG, H. R. Identification of microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *Europe Journal of Phycology*, n. 32, p. 111-117, 1997.

M-HAMVAS, M.; MÁTHÉ, C.; MOLNÁR, E.; VASAS, G.; GRIGORSZKY, I.; BORBELY, G. Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L. seedlings. *Aquatic Toxicology*, n. 62, p. 1-9, 2003.

MITROVIC, S. M.; ALLIS, O.; FUREY, A.; JAMES, K. J. 2005. Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, n. 61, p. 345-352, 2005.

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(4), p. 436-442, 2007.

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.

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.; WIEGAND, C.; OBEREMM, A.; BEATTIE, K. A.; KRAUSE, E., CODD, G. A.; STEINBERG, C. E. W. 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.

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. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquatic Toxicology*, n. 70, p. 169-178, 2004.

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.

PIETSCH, C.; WIEGAND, C.; AMÉ, M. V.; NICKLISCH, A.; WUNDERLIN, D.; PFLUGMACHER, S. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environmental Toxicology*, n. 16, p. 535-542, 2001.

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. The influence of microcystin-LR and hepatotoxic cyanobacterial extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*. *Environmental Toxicology*, n. 17, p. 434-440, 2002.

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.

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.; GHAZALIA, I. E. L.; OUDRA, B.; BOUARAB, L.; DEKAYIR, S.; MANDI, L.; OUAZZANI, N.; VASCONCELOS, V. M. Detection of microcystin

contamination by the measurement of the variability of the *in vivo* chlorophyll fluorescence in aquatic plant *Lemna gibba*. *Toxicon*, n. 53, p. 9-14, 2009.

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.

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.

SIVONEN, K. & JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I. & BARTRAM, J. (Orgs.). *Toxic cyanobacteria in water: A guide to the Public Health Consequences, Monitoring and Management*. J.E and FN Spon, London, 1999. pp. 41-111.

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.

STÜVEN, J. & PFLUGMACHER, S. Antioxidative stress response of *Lepidium sativum* due to exposure to cyanobacterial secondary metabolites. *Toxicon*, n. 50, p. 85-93, 2007.

UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; WATANABE, M. F.; PARK, H. D.; CHEN, G. C.; CHEN, G.; YU, S. Z. Detection of microcystin, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water supplied in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, n. 17(6), p. 1317-1321, 1996.

VASCONCELOS, V.; OLIVEIRA, S.; TELES, F. O. Impact of a toxic and non-toxic strain of *Microcystis aeruginosa* on the crayfish *Procambarus clarkii*. *Toxicon*, n. 39, p. 1461-1470, 2001.

VIEIRA, J. M. S.; AZEVEDO, M. T. P.; AZEVEDO, S. M. F. O.; HONDA, R. Y.; CORRÊA, B. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon*, n. 45, p. 901-909, 2005.

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(4), p. 400-406, 2002.

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

XIE, L.; YOKOYAMA, A.; NAKAMURA, K.; PARK, H. Accumulation of microcystins in various organs of the freshwater snail *Sinotaia histrica* and three fishes in a temperate lake, the eutrophic Lake Suwa, Japan. *Toxicon*, n. 39, p. 646-652, 2007.

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.; HUANG, J.; LI, D.; LIU, Y. Microcystin-RR uptake and its effects on the growth of submerged macrophyte *Vallisneria natans* (Lour.) Hara. *Environmental Toxicology*, n. 20(3), p. 308-313, 2005a.

YIN, L.; HUANG, J.; HUANG, W.; LI, D.; LIU, Y. Responses of antioxidant system in *Arabidopsis thaliana* suspension cells to the toxicity of microcystin-RR. *Toxicon*, n. 46, p. 859-864, 2005b.

YIN, L.; HUANG, J.; LI, W.; LIU, Y. Microcystin-RR-induced apoptosis in tobacco BY-2 cells. *Toxicon*, n. 48, p. 204-210, 2006.

YOSHIDA, T.; MAKITA, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; SEKIJIMA, M.; TAMARU, S.I.; UENO, Y. Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. *Natural Toxins*, n. 5, p. 91-95, 1997.

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.

ZURAWELL, R. W.; CHEN, H.; BURKE, J. M.; PREPAS, E. E. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, n. 8(1), p. 1-3, 2005.