

M 2014

Implicações do Uso de Água Contaminada com Microcistina na Qualidade de *Daucus carota* (Cenoura)

JOANA FILIPA FÉLIX MACHADO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA

AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM

TOXICOLOGIA E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAIS

Joana Filipa Félix Machado

Implicações do Uso de Água Contaminada com Microcistina na Qualidade de *Daucus carota* (Cenoura)

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Toxicologia e Contaminação Ambientais submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

Orientador - Doutor Alexandre Campos
Categoria - Investigador Auxiliar
Afiliação – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, CIIMAR

Co-orientador – Professor Doutor Vítor Vasconcelos
Categoria – Professor catedrático
Afiliação – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto

À minha bisavó (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Doutor Alexandre Campos que mesmo estando longe esteve sempre presente. Agradeço-lhe toda a disponibilidade, atenção e ajuda dispensadas ao longo do ano, bem como a sua boa disposição. Um “muito obrigada” nunca será o suficiente.

Ao Professor Doutor Vítor Vasconcelos, por ter suscitado em mim o interesse pela problemática das cianotoxinas bem como pela oportunidade de integração no Laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução (LEGE). Agradeço-lhe ainda a co-orientação deste trabalho.

A todos os membros do LEGE, por toda a ajuda e boa disposição. Em particular:

À Joana Azevedo por toda a ajuda com o HPLC e o LC-MS, por todas as palavras de apoio, transmissão de novos conhecimentos e simpatia sempre presentes. Obrigada pela disponibilidade e paciência.

À Marisa Freitas por toda a preocupação, críticas construtivas, ajuda e ensinamentos partilhados.

À Ana Luísa Pereira por todos os conselhos preciosos dados ao longo desta etapa.

Ao Aldo Felpeito e ao Rui Borges, por todo o apoio prestado na análise estatística.

À Micaela Vale e ao João Morais por toda a disponibilidade e ajuda.

Aos colegas de laboratório Catarina, Ana, Susana, Tiago Az. pelos conselhos, companheirismo, partilha de bons momentos e pela companhia nas longas horas de trabalho e de escrita e em especial à Rita Mendes que revelou ser uma pessoa fantástica e uma ótima amiga.

Ao REQUIMTE (Rede de Química e Tecnologia), em particular ao Edgar Pinto por toda a ajuda prestada na quantificação dos minerais

A toda a equipa do Laboratório de Biodiversidade Costeira pela simpatia, sobretudo ao Doutor Francisco Arenas (Paco) pelo espaço e material cedido durante a realização deste trabalho.

A todos os professores do mestrado, pelos conhecimentos transmitidos que tanto me ajudaram na execução deste trabalho. Aos meus colegas por todos os momentos vividos ao longo do primeiro ano. Um obrigado especial ao João, à Teresa e ao Tiago, para além de colegas tornaram-se verdadeiros amigos, estando sempre presentes nos momentos mais marcantes dos últimos dois anos, não esquecerei toda a ajuda, críticas e conselhos que me deram.e ainda à Filipa que apesar de não ter percorrido todo este trajeto connosco será sempre lembrada.

À Catarina por todo o apoio, amizade, lágrimas e aflições partilhados ao longo deste processo. Para além de colega de mestrado e laboratório revelou ser realmente uma verdadeira amiga e uma excelente pessoa.

Aos meus amigos que me acompanharam desde sempre, cuja amizade de longos anos nunca se apagará. Ao João por toda a preocupação e incentivo ao longo desta jornada de trabalho e escrita.

À minha mãe por todo o esforço e educação que tornaram possível a concretização do meu dinamismo pessoal e profissional.

À minha avó por todo o carinho e orgulho que sempre demonstrou e por sempre me ter incentivado a nunca desistir.

À minha irmã por me aturar tanto ajudar durante a escrita deste trabalho.

À minha tia Marlene por sempre ter acreditado em mim e pela sua insistência para que me concentrasse na escrita, especialmente nos momentos em que senti não ser capaz.

A todos um muito obrigado!

Este trabalho foi financiado pela Universidade do Porto através do projeto IJUP2011_3 e pelos fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto PEst-C/MAR/LA0015/2013”.

RESUMO

As florescências cianobacterianas tóxicas são reconhecidas em todo o mundo, sendo a Microcistina-LR (MC-LR) a cianotoxina mais dominante nestas ocorrências. Águas contaminadas são muitas vezes utilizadas para fins agrícolas o que pode representar um perigo para a segurança alimentar. A absorção de toxinas pelas plantas pode provocar alterações morfológicas e fisiológicas que podem levar a uma perda de produtividade, bem como à bioacumulação da toxina. O sistema radicular da planta é geralmente o mais exposto por irrigação do solo, sendo portanto as raízes vegetais mais propensas à contaminação. A cenoura (*Daucus carota*) é uma raiz-vegetal, com grande importância para a nutrição humana e economia do setor hortícola, sendo consumida amplamente em todo o mundo. É, portanto, importante avaliar os possíveis efeitos do uso de água contaminada com toxinas na irrigação destas culturas.

Este trabalho pretendeu avaliar os efeitos do uso de água contaminada com MC-LR na condição fisiológica das plantas, valor nutricional (vitaminas e minerais) bem como na acumulação de toxina. Com este propósito, plantas (com 1 e 2 meses de crescimento) foram cultivadas em solo sob condições de estufa, divididas em três grupos diferentes e regadas duas vezes por semana com água não contaminada ou com água contendo extrato bruto de *Microcystis aeruginosa* contendo 10 ou 50 µg/L MC-LR.

Os parâmetros fisiológicos avaliados não mostraram variações significativas ($P < 0,05$), tanto no peso fresco (P.F) como no peso seco (P.S), das folhas em nenhuma das concentrações de toxina testadas. Contudo as raízes expostas ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 50µg/L durante 28 dias apresentaram menor biomassa. Por outro lado a fluorescência máxima do fotossistema II, medida por modulação por amplitude de pulso, foi mais elevada nas plantas expostas ao extrato de *M. aeruginosa* contendo 10 e 50 µg MC-LR/L ao fim de 14 dias e nas plantas expostas a 10 µg MC-LR/L ao fim de 28 dias. Os resultados da acumulação da toxina nas raízes das plantas demonstraram que o valor máximo expectável de toxina, obtido por ELISA, será $5,23 \pm 0,47$ ng/g de P.F de cenoura (aproximadamente 0,32% do total de toxina administrada) podendo incluir produtos de destoxificação ou degradação da MC. Através do Microcystest e de LC-MS a concentração de toxina nos tecidos das plantas encontrou-se abaixo dos limites de deteção dos dois métodos. Quanto à quantificação da MC-LR no solo, os resultados foram também

bastante discrepantes entre os diferentes métodos utilizados. Através de ELISA recuperou-se a maior concentração de toxina, $171,47 \pm 6,76$ ng MC-LR/g P.F solo (cerca de 80,38% do total de toxina administrada). A concentração estimada de toxina no solo, através do método LC-MS, foi $112,44 \pm 32,60$ ng MC-LR/g P.F solo (cerca de 52,71% da toxina administrada). O MicroCystest foi o método onde se estimou a mais baixa concentração de toxina no solo, $41,77 \pm 7,70$ ng MC-LR/g P.F solo (cerca de 19,58% do total de toxina administrada).

O valor nutricional das cenouras após a exposição, avaliado pelos níveis de macro (AAS e Espectrofotometria) e micro minerais (ICP-MS), tal como o conteúdo de ácido ascórbico (HPLC-PDA), foi significativamente afetado. O conteúdo de β -caroteno foi também avaliado por HPLC, no entanto não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Os resultados apontam para efeitos não tóxicos do extrato bruto de *M. aeruginosa* e da toxina MC-LR nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g/L}$ em *D. carota*, em condições de exposição subcrónica a concentrações ambientais da toxina. No entanto as alterações observadas no conteúdo de macro e micro minerais bem como no conteúdo de vitaminas, tem implicações no valor nutricional da cenoura que necessitam ser esclarecidas. De acordo com a pesquisa literária, este é o primeiro trabalho a reportar os efeitos da MC-LR no crescimento e na qualidade nutritiva de *D. carota*. De futuro será importante alargar esta avaliação a outras culturas agrícolas de modo a melhor se compreender a implicação do uso de águas contaminadas na agricultura.

ABSTRACT

Toxic cyanobacterial blooms are recognized worldwide, being microcystin-LR (MC-LR) the most dominant in these occurrences. Contaminated waters are used for agricultural purposes and may represent a risk to food safety. The uptake of toxins by plants may induce morphological and physiological changes leading to a loss of productivity as well as toxin bioaccumulation. The plant root system is usually more exposed via soil irrigation, and therefore root-vegetables are more susceptible to contamination. Carrots (*Daucus carota*) are root-vegetables with great importance for human nourishment and economy being extensively consumed all over the world. It is, therefore, important to evaluate the possible effects of using water contaminated with toxins in the irrigation of these crops.

This work intended to evaluate the effects of the use of MC-LR contaminated water in plants' physiological condition, nutritional value (minerals and vitamins) as well as toxin accumulation. To achieve this purpose, young plants (1 and 2 month old) were grown in soil under greenhouse conditions. These plants were separated in three groups and they were irrigated twice a week with non-contaminated water or with a crude *Microcystis aeruginosa* extract containing respectively 10 or 50 µg/L MC-LR.

The physiological parameters evaluated showed no significant differences ($P < 0.05$) either in the fresh (F.W) or in the dry weight (D.W) of leaves in any of the toxin concentrations tested. However, roots exposed to *M. aeruginosa* toxic extract containing 50 µg/L during 28 days showed a decreased in biomass. On the other hand, maximum efficiency of photosystem II, assessed by pulse amplitude modulation, was higher in plants exposed to *M. aeruginosa* extract containing 10 and 50 µg/L after 14 days and in plants exposed to 10 MC-LR µg/L after 28 days. The results of the toxin accumulation in the roots of the plants demonstrated that the maximum expectable value of the toxin, obtained through ELISA, will be 5.23 ± 0.47 ng/g F.W of carrot (approximately 0.32% of the total administrated toxin) which can include products of detoxification or degradation of MC. Through Microcystest and LC-MS, toxin concentration was below the detection limit of the two methods. Regarding the quantification of MC-LR in the soil, the obtained results were also discrepant between the different used methods. Through ELISA test, it was recovered the highest concentration of toxin, 171.47 ± 6.76 ng F.W of soil (around 80.38% of the total administrated toxin). The toxin concentration estimated in soil through LC-MS method was

112.44 ± 32.60 ng MC-LR / g F.W (approximately 52.71% of the administered toxin). MicroCystest was the method where it was estimated the lowest concentration of MC-LR, being detected 41.77 ± 7.70 ng MC-LR / g F.W of soil (approximately 19.58% of the administered toxin). The nutritional value of the carrots after exposure, assessed by macro (AAS and spectrophotometry) and micro minerals (ICP-MS) levels as well as through the content of ascorbic acid (HPLC-PDA), was significantly affected. The content of β-carotene was also evaluated by HPLC, however, no statistically significant differences were observed.

The results showed no toxic effects of *M. aeruginosa* crude extract and MC-LR toxin at 10 and 50 µg/L concentrations in *D. carota*, under conditions of subchronic exposure at environmental concentrations of the toxin. However, the observed alterations, in the content of macro and micro minerals, as well as in the vitamin content, have implications on the nutritional value of the carrots and require further clarification. According to the literature research, this is the first study reporting the effects of MC-LR in growth and in nutritional quality of *D. carota*. In the future, it will be important to extend this evaluation to other agricultural crops in order to enhance the understanding of the implications of the use of contaminated water in agriculture.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Eutrofização e Florescências Cianobacterianas: Causas e Implicações	1
1.2. Microcistinas (MCs): Estrutura Química, Modo de Ação e Toxicidade	2
1.3. Toxicidade de Microcistina em Plantas para Consumo Humano.....	5
1.3.1. Efeitos na Germinação	5
1.3.2. Efeitos na Regulação do Crescimento	6
1.3.3. Efeitos Citológicos e Morfológicos	10
1.3.4. Efeitos no Conteúdo de Clorofilas e no Processo Fotossintético	11
1.3.5. Efeitos na Assimilação de Mineirais.....	13
1.3.6. Indução de <i>Stress</i> Oxidativo	14
1.4. Bioacumulação de MC em Plantas	14
1.5. Biodisponibilidade de MC no Solo	17
1.6. Implicações da MC na Agricultura, Segurança Alimentar e Saúde Pública	17
1.7. Importância de <i>Daucus carota</i> (cenoura) na Alimentação.....	19
1.8. Objetivos	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1. Cultura de Cianobactérias e Preparação do Extrato Bruto de <i>Microcystis aeruginosa</i>	20
2.2. Quantificação da MC-LR no Extrato Bruto de <i>M. aeruginosa</i> por HPLC-PDA.....	20
2.3. Ensaio de Exposição das Plantas ao extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR	22
2.4. Avaliação do Estado Morfofisiológico das Plantas.....	24
2.4.1. Determinação do Peso Fresco e do Peso Seco	24
2.4.2. Determinação da Capacidade Fotossintética	24

2.5. Extração, Quantificação e Detecção de MC-LR nas Raízes das Plantas e no Solo	25
2.5.1. Extração da MC-LR das Raízes das Plantas	25
2.5.2. Extração da MC-LR no Solo	25
2.5.3. Detecção e Quantificação da MC-LR pela Atividade da Fosfatase (MicroCystest)	26
2.5.4. Detecção e Quantificação da MC-LR por ELISA	27
2.5.5. Detecção e Quantificação da MC-LR por LC-MS	29
2.5.6. Cálculo do Fator de Bioconcentração (FBC)	31
2.6. Quantificação de Minerais na Raiz de <i>D. carota</i> (cenoura)	31
2.6.1. Preparação das Soluções e das Amostras para Análise	31
2.6.1.1. Preparação das Soluções	31
2.6.1.2. Preparação das Amostras	32
2.6.2. Determinação do Conteúdo de Minerais	32
2.6.2.1. Análise por Espectrometria de Massa com Fonte Indutiva de Plasma (ICP-MS)	33
2.6.2.2. Análise por Espectrofotometria de Absorção Atômica com Atomização em Chama (EAA/Chama)	35
2.6.2.3. Determinação do Teor de Fósforo por Espectrofotometria	36
2.7. Extração, Quantificação e Detecção de Ácido Ascórbico na Raiz de <i>D. carota</i> (cenoura)	37
2.7.1. Extração de Ácido Ascórbico	37
2.7.2. Quantificação e Detecção de Ácido Ascórbico por HPLC-PDA	37
2.8. Extração, Quantificação e Detecção de β -Caroteno na Raiz de <i>D. carota</i> (cenoura)	38
2.8.1. Extração de β -Caroteno	38
2.8.2. Quantificação de β -Caroteno por HPLC-PDA	39
2.9. Análise Estatística	40
3. RESULTADOS	41
3.1. Quantificação da MC-LR no Extrato Bruto de <i>M. aeruginosa</i> por HPLC-PDA	41
3.2. Análise do Estado Morfofisiológico das Plantas	42

3.2.1.	Avaliação do Estado Inicial das Plantas.....	42
3.2.2.	Peso Fresco	43
3.2.3.	Peso Seco	43
3.2.4.	Capacidade Fotossintética.....	44
3.3.	Quantificação da MC-LR na Raiz de <i>D. carota</i> (cenoura)	45
3.3.1	MicroCystest.....	45
3.3.2	ELISA	45
3.3.3	LC-MS	45
3.4.	Quantificação da MC-LR no Solo.....	52
3.4.1	MicroCystest.....	52
3.4.2	ELISA	52
3.4.3	LC-MS	52
3.5.	Quantificação de Minerais na Raiz de <i>D. carota</i> (cenoura)	56
3.5.1.	ICPS-MS	56
3.5.2.	EEA/Chama.....	59
3.5.3.	Espectrofotometria.....	61
3.6.	Quantificação de Ácido Ascórbico na Raiz de <i>D. carota</i> (cenoura) por HPLC-PDA 62	
3.7.	Quantificação de β -Caroteno na Raiz de <i>D. carota</i> (cenoura) por HPLC-PDA...65	
4.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	69
4.1.	Efeitos Fisiológicos do Extrato Bruto de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR em Folhas e Raízes de <i>D. carota</i>	69
4.1.1.	Efeitos no Crescimento.....	69
4.1.2.	Efeitos na Fotossíntese	70
4.2.	Acumulação de MC-LR nas Raízes de <i>D. carota</i> e no Solo	73
4.3.	Efeitos do Extrato bruto de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR no Conteúdo de Minerais de <i>D. carota</i>	77
4.4.	Efeitos do Extrato Bruto de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR no Conteúdo de Ácido Ascórbico de <i>D. carota</i>	79

4.5. Efeitos do Extrato Bruto de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR no Conteúdo de β -Caroteno de <i>D. carota</i>	80
5. CONCLUSÃO	82
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química das microcistinas.....	3
Figura 2 – Retra padrão utilizada para o cálculo da MC-LR no extrato bruto de <i>Microcystis aeruginosa</i> através de HPLC-PDA.....	22
Figura 3 – Processo de transplantação das plantas adquiridas em viveiro.....	23
Figura 4 – Condições de crescimento das plantas do primeiro (a) e do segundo (b) ensaios.....	23
Figura 5 – Curva padrão utilizada no cálculo da MC-LR na raiz de <i>D. carota</i> através do MicroCystest.....	27
Figura 6 – Curva padrão utilizada no cálculo da MC-LR no solo através do MicroCystest.....	27
Figura 7 – Retra padrão utilizada no cálculo da MC-LR no solo por LC-MS.....	31
Figura 8 – Retra padrão utilizada no cálculo da Mn na raiz de <i>D. carota</i> através de ICP-MS.....	34
Figura 9 – Retra padrão utilizada no cálculo da Fe na raiz de <i>D. carota</i> através de ICP-MS.....	34
Figura 10 – Retra padrão utilizada no cálculo da Zn na raiz de <i>D. carota</i> através de ICP-MS.....	34
Figura 11 – Retra padrão utilizada no cálculo da Cu na raiz de <i>D. carota</i> através de ICP-MS.....	34
Figura 12 – Retra padrão utilizada no cálculo da Mo na raiz de <i>D. carota</i> através de ICP-MS.....	34
Figura 13 – Retra padrão utilizada no cálculo da Ca na raiz de <i>D. carota</i> através de EAA/Chama.....	35
Figura 14 – Retra padrão utilizada no cálculo da Mg na raiz de <i>D. carota</i> através de EAA/Chama.....	35
Figura 15 – Retra padrão utilizada no cálculo da K na raiz de <i>D. carota</i> através de EAA/Chama.....	36
Figura 16 – Retra padrão utilizada no cálculo da Na na raiz de <i>D. carota</i> através de EAA/Chama.....	36

Figura 17 - Retra padrão utilizada no cálculo da P na raiz de <i>D. carota</i> através de espectrofotometria.....	36
Figura 18 - Retra padrão utilizada no cálculo da Ácido Ascórbico na raiz de <i>D. carota</i> através de HPLC.....	38
Figura 19 - Retra padrão utilizada no cálculo da β-caroteno na raiz de <i>D. carota</i> através de HPLC	40
Figura 20 - a) Cromatograma de um padrão de MC-LR (4,8 µg/mL) e de um extrato bruto de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR. Espectros de absorção relativos ao pico da MC-LR (c) bem como aos picos de tempo de retenção próximos da mesma (b e d) obtidos por HPLC	41
Figura 21 - Peso fresco (P.F) médio das raízes a) e folhas b) de <i>D. carota</i> após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR	43
Figura 22 - Peso seco (P.S) médio das raízes a) e folhas b) de <i>D. carota</i> após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR.	44
Figura 23 - Eficiência máxima média do fotossistema II (Fv / Fm) em folhas de <i>D. carota</i> após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR.....	44
Figura 24 - a) Cromatograma TIC de um padrão de MC-LR (1,1 µg/mL) e b) espectro de massa correspondente ao tempo de retenção (6,06 min) com MeOH como eluente.....	47
Figura 25 – a) Cromatograma TIC de uma amostra das raízes das plantas controlo e b) espectro de massa correspondente ao tempo de retenção da MC-LR com MeOH como eluente	48
Figura 26 – a) Cromatograma TIC de uma amostra das raízes das plantas expostas ao extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo 50 µg/L de MC-LR e b) espectro de massa correspondente ao tempo de retenção da MC-LR com MeOH como eluente	49
Figura 27 - Cromatograma TIC de uma amostra das raízes das plantas controlo dopada com MC-LR padrão (0,55 µg/mL) e b) espectro de massa correspondente ao tempo de retenção da MC-LR com MeOH como eluente.	50
Figura 28 - a) Cromatograma TIC de uma amostra das raízes das plantas expostas a extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo 50 µg/L de MC-LR e b) espectro de massa correspondente ao tempo de retenção da MC-LR com ACN como eluente.....	51
Figura 29 - a) Cromatograma TIC de um padrão de MC-LR (1,8 µg/mL) e b) espectro de massa correspondente ao tempo de retenção (10,78 min).....	53
Figura 30 – a) Cromatograma TIC do solo controlo e b) espectro de massa correspondente ao tempo de retenção da MC-LR	54

Figura 31 - a) Cromatograma TIC do solo contaminado com extrato bruto de <i>M. aeruginosa</i> contendo 50 µg MC-LR/L e b) espectro de massa correspondente ao tempo de retenção da MC-LR	55
Figura 32 - Concentração de Fe (µg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR	57
Figura 33 - Concentração de Mn (µg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR.....	57
Figura 34 - Concentração de Cu (µg) por (g) de peso seco de cenoura pós 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR.	58
Figura 35 - Concentração de Zn (µg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR.....	58
Figura 36 - Concentração de Mo (µg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR)	58
Figura 37 - Concentração de Mg (µg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR.....	60
Figura 38 - Concentração de Na (µg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR.....	60
Figura 39 - Concentração de Ca (µg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR.....	61
Figura 40 - Concentração de K (µg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR	61
Figura 41 - Concentração de P (µg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR	62
Figura 42 - a) Cromatograma do padrão de ácido ascórbico e branco; b) espectro de absorção do pico do ácido ascórbico	63
Figura 43 -a) Cromatograma de uma amostra de extrato de cenoura e padrão de ácido ascórbico; b) espectro de absorção do pico do ácido ascórbico na amostra.....	64

Figura 44 - Concentração de Ácido Ascórbico (μg) por (g) de peso fresco de cenoura após 21 e 32 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR.....	65
Figura 45 - a) Cromatograma do padrão de β -caroteno e branco; b) espectro de absorção do pico do β -caroteno.....	66
Figura 46 - a) Cromatograma de uma amostra do extrato de cenoura e padrão de β -caroteno; b) espectro de absorção do pico do β -caroteno na amostra; c) espectro de absorção do pico do α -caroteno na amostra.....	67
Figura 47 - Concentração de β -caroteno (μg) por (g) de peso fresco de cenoura após 21 e 32 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo MC-LR.....	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Indução da inibição da germinação sementes de espécies agrícolas e hortícolas pela MC-LR	6
Tabela 2 - Efeitos da MC-LR no crescimento de algumas plantas agrícolas	7
Tabela 3 - Efeitos citológicos e morfológicos da MC-LR em algumas plantas agrícolas ..	10
Tabela 4 - Alteração do Processo Fotossintético em plantas agrícolas expostas a MC-LR	12
Tabela 5 - Efeitos da MC-LR no teor de minerais de algumas plantas agrícolas	13
Tabela 6 - Gradiente de eluição do HPLC para quantificação de MC-LR	21
Tabela 7 - Características do solo utilizado nos ensaios de exposição	23
Tabela 8 - Reagentes adicionados ao padrão e amostras na realização do MicroCystest	27
Tabela 9 - Reagentes adicionados ao padrão, controlo positivo e amostras na realização de ELISA	28
Tabela 10 - Gradiente de eluição utilizado no método LC-MS para quantificação da MC-LR na cenoura.....	30
Tabela 11 - Gradiente de eluição utilizado no método LC-MS para quantificação da MC-LR no solo.....	30
Tabela 12 - Condições do programa de digestão utilizado na preparação das amostras para quantificação de minerais	32
Tabela 13 - Condições instrumentais do equipamento de ICP-MS utilizado na quantificação de Mn, Fe, Cu, Zn, Mo.	33
Tabela 14 - Limites de deteção e de quantificação do ICP-MS.....	33
Tabela 15 - Parâmetros utilizados na quantificação dos elementos Ca, Mg, Na e K por EAA/Chama.....	35
Tabela 16 - Composição da solução de Murphy-Riley.....	37
Tabela 17 - Gradiente de eluição do HPLC para análise de β -caroteno	39
Tabela 18 - Parâmetros fisiológicos das plantas no início do ensaio 1 (dia 0)	42
Tabela 19 - Concentração basal dos diferentes micronutrientes minerais nas plantas no início do ensaio 2 (dia 0).....	42

Tabela 20 - Concentração basal dos diferentes macronutrientes minerais nas plantas no início do ensaio 2 (dia 0)	42
Tabela 21 – Quantificação de MC-LR na cenoura através deo MicroCystest após 14 e 28 dias de exposição a extrato de <i>M. aeruginosa</i> contendo 10 e 50 µg MC-LR/L	45

ABREVIATURAS

ABS - Absorvância

ADDA - Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-decafenila-4,6-dienoico

AF - Ácido Fórmico

ACN - Acetonitrilo

BHT - Hidroxitolueno Butilado

D-Ala - D-alanina

D-glu - Ácido D-isoglutâmico

D-MeAsp - Ácido D-eritro- β -metilaspártico

DGS - Direção Geral da Saúde

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EAA/Chama - Espectrofotometria de Absorção Atômica com Atomização em Chama

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

LC-MS - Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de Massa sequencial (*"Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry"*)

ERO - Espécie Reativa de Oxigênio

FBC - Fator de Bioconcentração

Fv/Fm - Eficiência Máxima do Fotossistema II

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Pressão (*"High Pressure Liquid Chromatography"*)

HPLC-PDA - Cromatografia Líquida de Alta Pressão Acoplada a um Detetor de Fotiodos (*"High Pressure Liquid Chromatography Photodiode Array"*)

IARC - Agência Internacional para Pesquisa sobre Cancro (*"International Agency for Research on Cancer"*)

IDA - Ingestão Diária Aceitável

ICP-MS - Espectrometria de Massa com Fonte Indutiva de Plasma (*"Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry"*)

LEGE - Laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução

LOD - Limite de Detecção

LOQ - Limite de Quantificação

MAPK - Cinasas Proteicas Ativadas por Mitogéneos (*"Mitogen-activated protein kinase"*)

Mdha - N-metildehidroalanina.

MC - Microcistina

MC-LR - Microcistina-LR

m/z - razão massa/carga

OATPs - Polipéptidos Transportadores de Aniões Orgânicos (*“Organic Anion Transporter Polipeptide”*)

OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAM - Modulação por Amplitude de Pulso (*“Pulse Amplitude Modulation”*)

P.F - Peso Fresco

pNP - p-Nitrofenol

pNPP - para-Nitrofenilfosfato

PP - Proteínas Fosfatases

PP1 - Proteína Fosfatase Enzimática Tipo 1

PP2 - Proteína Fosfatase Enzimática Tipo 2

P.S - Peso Seco

PTFE - Politetrafluoretileno

REQUIMTE - Rede de Química e Tecnologia

SPE - Extração em Fase Sólida (*“Solid Phase Extraction”*)

TFA - Ácido Trifluoroacético

TIC - Cromatograma Iónico Total (*“Total Ion Chromatogram”*)

TMB - Tetrametilbenzidina

1. INTRODUÇÃO

1.1. Eutrofização e Florescências Cianobacterianas: Causas e Implicações

A eutrofização é reconhecida como um problema ambiental global e uma consequência da intensificação das atividades de produção agrícola e industrial, agravada pelo aquecimento global (O'Neil *et al.*, 2012). Pode definir-se eutrofização como uma resposta biológica ao aumento da quantidade de nutrientes/matéria orgânica, especialmente de compostos de fósforo e azoto, resultando numa maior produtividade primária e numa redução da diversidade de espécies a todos os níveis tróficos. Apesar de ser um componente natural dos ecossistemas aquáticos, o fitoplâncton, sobretudo em sistemas eutrofizados, pode adquirir taxas de crescimento mais elevadas, proliferando rapidamente e originando fenómenos conhecidos por florescências (Smith *et al.*, 1999; Codd, 2000; Vasconcelos, 2006).

Os organismos fitoplânctónicos mais associados à eutrofização de ecossistemas dulciaquícolas são as cianobactérias (Chorus, 2001; Vasconcelos, 2006). A ocorrência de florescências cianobacterianas é influenciada pelas características da água e pelas condições climáticas, sobretudo pela disponibilidade de nutrientes, luminosidade, temperatura, pH, turbidez e pela estabilidade física das massas de água. Águas estagnadas, com temperatura uniforme ao longo da coluna e uma elevada quantidade de nutrientes, constituem condições ideais para a ocorrência destas florescências (Smith *et al.*, 1999; Hitzfeld *et al.*, 2000; Chorus, 2001; Figueiredo *et al.*, 2004; Vasconcelos, 2006; Apeldoorn *et al.* 2007; O'Neil *et al.*, 2012).

As cianobactérias (também conhecidas como algas azuis ou algas cianofíceas), procariontes fotossintéticos, são um grupo ancestral e diverso que engloba organismos microscópicos de distribuição ubíqua. Atualmente encontram-se identificados cerca de 150 géneros de cianobactérias que englobam perto de 2000 espécies (Mur *et al.*, 1999; Hitzfeld *et al.*, 2000; Chorus, 2001).

Estes organismos apresentam grande vantagem competitiva o que os torna nos organismos fitoplânctónicos mais frequentes nos ecossistemas dulciaquícolas eutrofizados. Apesar de serem capazes de produzir compostos com atividade biológica de

interesse, utilizados por exemplo na indústria farmacêutica, e de serem bastante importantes ao nível do ecossistema, a característica mais preocupante da ocorrência de florescências cianobacterianas é a capacidade de produção de toxinas que muitas estirpes possuem (cianotoxinas) (Mur *et al.*, 1999; Graham e Wilcox, 2000; Chorus, 2001; Mankiewicz *et al.*, 2003). Devido à produção destes metabolitos, a Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Económica (OCDE) classificou as cianobactérias como patogénicos emergentes, ainda que não possuam a capacidade de colonizar ou invadir hospedeiros (OECD 2005).

Uma vez que a água doce é essencial para o abastecimento público e para atividades recreativas, é no contexto da produção das cianotoxinas que a ocorrência de florescências cianobacterianas adquire contornos mais graves e preocupantes, representando um perigo para a saúde pública e ambiental devido aos efeitos adversos que provocam (Vasconcelos, 2006). Vários trabalhos referem que a exposição a estes metabolitos pode causar efeitos agudos ou crónicos em animais domésticos e selvagens, plantas, organismos aquáticos, aves e humanos (Vasconcelos 2001; Codd *et al.*, 2005; Sangolkar *et al.*, 2006; Apeldoorn *et al.*, 2007). A exposição humana a estes metabolitos tóxicos pode ocorrer por várias vias, incluindo ingestão crónica e/ou acidental de água contaminada; inalação ou contacto com a mucosa nasal, contacto dérmico durante atividades recreativas, como natação, canoagem ou banhos; consumo de organismos aquáticos (peixes, mariscos, entre outros) provenientes de águas contaminadas; ingestão de suplementos dietéticos feitos de cianobactérias (se os níveis de cianotoxinas não forem controlados); e por via intravenosa causada pelo uso de água contaminada em tratamentos médicos como hemodiálise (Apeldoorn *et al.*, 2007; Ibelings e Chorus, 2007). Mais recentemente o consumo de vegetais e frutos contaminados por irrigação com água contendo estes compostos tem sido também apontado como uma importante via de exposição indireta às cianotoxinas (ver 1.6) (Corbel *et al.*, 2014).

1.2. Microcistinas (MCs): Estrutura Química, Modo de Ação e Toxicidade

De entre os 150 géneros de cianobactérias identificados, cerca de 40 são produtores de metabolitos secundários designados por cianotoxinas (Hitzfeld *et al.*, 2000; Apeldoorn *et al.*, 2007). As microcistinas (MCs) são as cianotoxinas mais frequentemente detetadas em florescências de cianobactérias dulciaquícolas, tendo recebido o nome da espécie da qual foram inicialmente isoladas: *Microcystis aeruginosa* (Carmichael *et al.*, 1988; Chorus *et al.*, 2000). De um modo geral, o género *Microcystis* é o que apresenta uma distribuição mais ampla e global em águas eutrofizadas. Em Portugal, este género é também apontado como o mais comum (Vasconcelos, 1996; Chorus, 2001; Vasconcelos,

2006). No entanto, outros géneros são também produtores destas cianotoxinas: *Anabaena*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Nostoc*, *Anabaenopsis* (Dawson, 1998; Kuiper-Goodman *et al.*, 1999; Hitzfeld *et al.*, 2000; Vasconcelos 2001; Wiegand e Pflugmacher, 2005, Apeldoorn *et al.*, 2007).

As MCs (Figura 1) são um grupo de hepatopéptidos monocíclicos não ribossomais, constituídos por quatro aminoácidos D conservados [D-alanina (D-Ala)¹ – ácido D-eritro-β-metilaspártico (D-MeAsp)³ – ácido D-isoglutâmico (D-glu)⁶ – N-metil-desidro-alanina (Mdha)⁷], dois aminoácidos L variáveis [(L-X)² (L-Z)⁴] e um aminoácido específico, ADDA (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-decafenila-4,6-dienoico)⁵. É a estrutura cíclica da molécula, bem como ao aminoácido ADDA, que se atribui a toxicidade das MCs. Assim, qualquer alteração ao nível da cadeia deste aminoácido conduz a uma alteração da toxicidade da toxina (Dawson, 1998; Hitzfeld *et al.*, 2000; Vasconcelos, 2001; Wiegand e Pflugmacher, 2005, Chen *et al.*, 2006a, Apeldoorn *et al.*, 2007).

Podem ainda ocorrer várias alterações na molécula, que acontecem tanto ao nível dos aminoácidos variáveis (metilações, etc.), como dos radicais R1 e R2, levando à existência de mais de 60 isoformas diferentes (Vasconcelos, 2001; Chen *et al.*, 2006a). De entre todas as variantes de MCs, a microcistina-LR (MC-LR), com leucina na posição X e arginina na posição Z (Figura 1), é a isoforma mais frequente (Dawson, 1998; Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

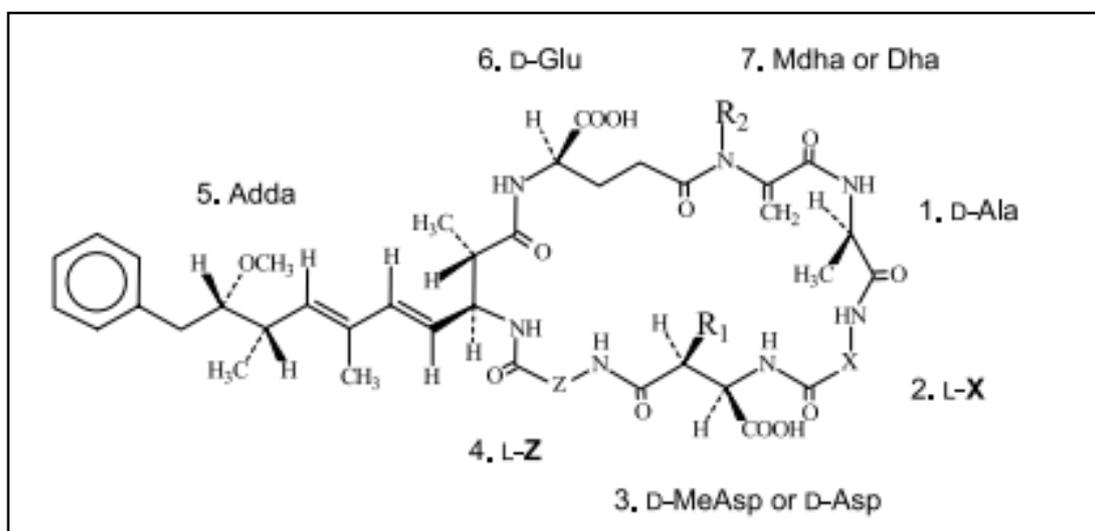


Figura 1 - Estrutura química das MCs. (Chen *et al.*, 2006a)

Devido ao seu alto peso molecular, que varia entre 800 a 1100 Da, (Hitzfeld *et al.*, 2000) e à sua hidrofiliçidade, as MCs não são capazes de transpor facilmente as membranas biológicas (Vasconcelos, 2006). No entanto, podem penetrar nos hepatócitos através de um sistema de transporte ativo, envolvendo polipéptidos transportadores de aniões orgânicos (OATPs), também responsáveis pelo transporte de vários compostos

orgânicos, tais como os ácidos biliares (Fischer *et al.*, 2005). Por este motivo, as MCs são conhecidas como hepatotoxinas, sendo o fígado o principal órgão alvo. Contudo, estes transportadores não são expressos somente no fígado, mas também no trato gastrointestinal, rins e cérebro, havendo evidências de que a MC-LR pode ser transportada através da barreira hematoencefálica, o que indica que além do fígado outros órgãos podem ser afetados (Zegura *et al.*, 2011).

As MCs são potentes inibidoras específicas de proteínas fosfatases (PP) da família serina/treonina, especialmente 1 e 2A (PP1 e PP2A), às quais se ligam irreversivelmente, tanto em animais como em plantas. As PP, são importantes no crescimento e diferenciação celular, metabolismo e controlo hormonal, replicação e expressão de genes bem como na síntese proteica (Mackintosh *et al.*, 1990; Dawson, 1998; Hitzfeld *et al.*, 2000; Mankiewicz *et al.*, 2003, Wiegand e Pflugmacher, 2005; Chen *et al.*, 2006a). O mecanismo de inibição resulta sobretudo da ligação do aminoácido ADDA ao centro ativo das PP1 e PP2A, através de ligação não-covalente (MacKintosh *et al.*, 1995; Hitzfeld *et al.*, 2000 Bischoff, 2001; Wiegand e Pflugmacher, 2005; Dawson, 1998). Este mecanismo conduz a uma hiperfosforilação das proteínas com efeitos diretos como a deformação do citoesqueleto dos hepatócitos, colapso da arquitetura hepática e hemorragia intra-hepática severa (Dawson, 1998; Bishoff, 2001; Wiegand e Pflugmacher, 2005). A inibição das PP resulta ainda em efeitos indiretos que afetam a sinalização do crescimento celular e processos de diferenciação, resultando numa proliferação celular descontrolada e consequente promoção de tumores (Vasconcelos, 2001; Mankiewicz *et al.*, 2003). Estas toxinas modulam a expressão de oncogenes, de proto-oncogenes, de citocinas e do fator de necrose tumoral α (um promotor tumoral), afetando a divisão celular, sobrevivência celular e apoptose (IARC; 2010). Alguns estudos epidemiológicos associam a exposição crónica de humanos a baixas doses de MC, por via oral, ao aumento da incidência de cancro hepático (hepatocarcinoma) (Yu, 1995; Ueno *et al.*, 1996, Hitzfeld *et al.*, 2000) e colorretal (Zhou *et al.*, 2002). Com base nos trabalhos relativos à promoção de tumores pelas MCs, a Agência Internacional para Pesquisa sobre Cancro (IARC) classificou a MC-LR como possível carcinogénico para humanos (grupo 2B). Contudo, os mecanismos de ação estão ainda por esclarecer (IARC; 2010). É de salientar que não há informações suficientes disponíveis para a classificação de outras variantes de MCs (IARC; 2010).

Recentemente, verificou-se que a indução de *stress* oxidativo por esta toxina está também envolvida na hepatotoxicidade da MC. A indução de espécies reativas de oxigénio (EROs) e os consequentes efeitos genotóxicos foram observados a concentrações nanomolares, que são relevantes para exposições crónicas, indiciando que estas toxinas atuam não só como promotores mas também como agentes iniciadores de tumores (Zegura *et al.*, 2011). Alguns estudos sugerem que o *stress* oxidativo e alterações da função

mitocondrial são os principais processos de indução da apoptose pela MC-LR (Ding e Ong, 2003).

A severidade da toxicidade induzida por este tipo de toxinas vai depender da concentração e da duração da exposição, os quais influenciam a quantidade de toxina absorvida, destoxicada e excretada (Mankiewicz *et al.*, 2003).

1.3. Toxicidade de Microcistina em Plantas para Consumo Humano

A toxicidade da MC em plantas varia com a concentração da toxina, o período de exposição, a espécie e o estado de desenvolvimento da mesma (Crush *et al.*, 2008).

Nas plantas, a MC atua também ao nível da inibição das PP1 e PP2A (MacKintosh *et al.*, 1990) e na produção de EROs (Pflugmacher *et al.*, 2006; Pflugmacher *et al.*, 2007a, b), podendo exercer uma resposta dualista, estimulando ou inibindo a mitose, dependendo da dose de exposição (Máthé *et al.*, 2013). Uma vez que nas plantas vasculares estas proteínas estão envolvidas na regulação de importantes processos moleculares, celulares e fisiológicos (Sheen, 1993; Takeda *et al.*, 1994), a sua exposição à MC-LR pode levar a várias perturbações na fisiologia e crescimento (Saqrane *et al.*, 2008). Sabe-se que a inibição das PP nas plantas, afeta por exemplo, o desenvolvimento dos tecidos, a expressão de genes, a regulação dos canais iónicos, o metabolismo do carbono e do azoto e o processo fotossintético (Siegl *et al.*, 1990; Sheen, 1993; Smith e Walker, 1996; Luan, 1998; Toroser e Huber, 2000).

1.3.1. Efeitos na Germinação

Recentemente, os efeitos da MC na germinação de sementes tem atraído o interesse de muitos autores, uma vez que a inibição deste processo pode levar a potenciais perdas económicas (Corbel *et al.*, 2014). Deste modo a germinação de várias plantas agrícolas expostas a MC-LR foi já investigada utilizando quer toxina pura quer extrato bruto contendo MC-LR (Tabela 1). Todos estes trabalhos sugerem que de facto a exposição a MC através de água contaminada pode representar uma ameaça para a qualidade e produtividade das culturas agrícolas expostas.

Sugere-se ainda que a exposição ao extrato bruto contendo MC-LR pode afetar de forma mais significativa as atividades metabólicas das sementes durante o processo de germinação do que a MC-LR pura (Pflugmacher, 2007; Pflugmacher *et al.*, 2007b). Mais ainda, o efeito da MC na germinação depende da sensibilidade da planta. Chen *et al.* (2004) verificaram que enquanto para *Brassica napus* a exposição a extrato bruto contendo 600 µg MC-LR/L levou a uma inibição significativa da germinação, no caso de *Oryza sativa* a

inibição da germinação não foi afetada, mesmo com uma concentração mais elevada (3000 µg MC-LR/L).

Tabela 1 - Indução da inibição da germinação de sementes de espécies agrícolas e hortícolas pela MC-LR

Espécie	MC-LR (µg/L)	Referência
<i>Brassica napus</i>	600-3000 **(b)	Chen <i>et al.</i> (2004)
<i>Lens esculenta</i>	8700 **(b)	Saqrane <i>et al.</i> (2008)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	16680-22240 **(b)	El Khalloufi <i>et al.</i> (2012)
<i>Medicago sativa</i>	5,0 *(a) e **(b)	Pflugmacher <i>et al.</i> (2006)
	2220-22240 **(b)	El Khalloufi <i>et al.</i> (2011)
<i>Pisum sativum</i>	1600 **(b)	Saqrane <i>et al.</i> (2008)
<i>Triticum aestivum</i>	0,5 *(a) e **(b)	Pflugmacher <i>et al.</i> (2007b)
<i>Triticum durum</i>	2900 **(b)	Saqrane <i>et al.</i> (2008)
<i>Vicia faba</i>	50-100 **(b)	Lahrouni <i>et al.</i> (2012)
<i>Zea mays</i>	5,0 *(a) e **(b)	Pflugmacher (2007)
	2900 *(b)	Saqrane <i>et al.</i> (2008)

*(a) – exposição a MC-LR pura

** (b) – exposição a extrato bruto contendo MC-LR

1.3.2. Efeitos na Regulação do Crescimento

Chen *et al.* (2013) reportaram que a MC-LR é capaz de perturbar o transporte polar e a distribuição da auxina em raízes de arroz. O transporte desta fitohormona é essencial em todas as fases do desenvolvimento da planta, de forma a assegurar um crescimento coordenado nos órgãos e níveis celulares e para fornecer uma adequada capacidade de resposta a estímulos ambientais (Lomax *et al.*, 1995). Garbers *et al.* (1996) demonstraram que as PP estão envolvidas no transporte da auxina. Assim, a inibição destas proteínas pela MC poderá afetar o transporte da hormona, e desta forma desregular o crescimento da planta. Para além disso, Tobias e Wilson (1997) verificaram que o alongamento e a forma da raiz de *Arabidopsis* é sensível à presença de vários inibidores da fosforilação das proteínas, demonstrando que a fosforilação das mesmas pode ter um papel na organização de microtúbulos corticais e, portanto, na morfogénese. Os mesmos autores concluíram ainda que, as PP1 e 2A desempenham um papel na regulação da expansão e forma da raiz.

Vários trabalhos têm demonstrado os efeitos da MC no crescimento das plantas

expostas a esta toxina (Tabela 2). A exposição ao extrato bruto contendo MC-LR produz em geral um efeito mais acentuado na inibição do crescimento que a exposição a MC-LR pura (Gehring *et al.*, 2003; Pflugmacher *et al.*, 2006; Pflugmacher, 2007; Pflugmacher *et al.*, 2007b). A severidade dos efeitos mostrou ainda ser dependente da sensibilidade da espécie exposta (McElhiney *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Saqrane *et al.*, 2008; Saqrane *et al.*, 2009).

Tabela 2 - Efeitos da MC-LR no crescimento de algumas plantas agrícolas

Espécie	MC-LR ($\mu\text{g/L}$)	Parâmetro Avaliado	Efeito	Referência
<i>Brassica napus</i>	120-3000 **(b)	Peso Fresco	Inibição	Chen <i>et al.</i> (2004)
		Altura das Plântulas	Inibição	
<i>Brassica rapa</i>	25-100 **(b)	Comprimento da Parte Aérea	Sem Efeito	Chen <i>et al.</i> (2012b)
	400-6400 **(b)	Comprimento da Parte Aérea	Inibição	
<i>Brassica oleracea</i>	1-10 *(a)	Crescimento	Sem Efeito	Järvenpää <i>et al.</i> (2007)
<i>Lactuca sativa</i>	5,9 – 56,4 **(b)	Crescimento de Raízes	Inibição	Pereira <i>et al.</i> (2009)
<i>Lens esculenta</i>	11600 **(b)	Comprimento do Epicótilo	Inibição	Saqrane <i>et al.</i> (2008)
		Comprimento da Raiz Primária	Inibição	
		Número de Raízes Laterais	Inibição	
<i>Lens esculenta</i>	500-42000 **(b)	Altura	Inibição	Saqrane <i>et al.</i> (2009)
		Número de Folhas	Inibição	
		Peso Fresco e Peso Seco	Inibição	
<i>Lepidium sativum</i>	10 *(a)	Peso Fresco Total	Inibição	Gehring <i>et al.</i> (2003)
		Comprimento das Raízes	Inibição	
		Comprimento das Folhas	Inibição	
	1 **(b)	Crescimento das Raízes	Inibição	
<i>Lycopersicon esculentum</i>	2220-22240 **(b)	Crescimento	Inibição	El Khalloufi <i>et al.</i> (2012)
		Biomassa Fresca	Inibição	
<i>Malus pumila</i>	300-3000 **(b)	Crescimento	Inibição	Chen <i>et al.</i> (2010)

Tabela 2 (Continuação)

Espécie	[MC-LR] (µg /L)	Parâmetro Avaliado	Efeito	Referência
<i>Medicago sativa</i>	5 *(a) e **(b)	Desenvolvimento da Raiz Primária	Inibição	Pflugmacher <i>et al.</i> (2006)
	2222-22240 **(b)	Crescimento	Inibição	El Khalloufi <i>et al.</i> (2011)
	10-20 **(b)	Peso Seco da Raiz	Inibição	El Khalloufi <i>et al.</i> (2013)
		Peso Seco da Parte Aérea	Inibição	
<i>Oryza sativa</i>	120-3000 **(b)	Comprimento das Raízes	Inibição	Chen <i>et al.</i> (2004)
	600-3000 **(b)	Altura das Plântulas	Inibição	
	24-3000 **(b)	Peso Fresco	Sem Efeito	
	0,26-78 **(b)	Peso Fresco	Sem Efeito	Azevedo <i>et al.</i> (2014)
	50 **(b)	Peso Fresco e Peso Seco	Sem Efeito	Prieto <i>et al.</i> (2001)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	1-5000 *(a)	Crescimento das Plântulas	Sem Efeito	McElhiney <i>et al.</i> (2001)
<i>Pisum sativum</i>	11600 **(b)	Comprimento do Epicótilo	Inibição	Saqrane <i>et al.</i> (2008)
		Comprimento da Raiz Primária	Inibição	
		Número de Raízes Laterais	Inibição	
	500-42000 **(b)	Altura	Inibição	Saqrane <i>et al.</i> (2009)
		Número de Folhas	Inibição	
		Peso Fresco e Peso Seco	Inibição	
<i>Sinapis alba</i>	2000 *** (c)	Crescimento	Inibição	Kurki-Helasma e Meriluoto (1998)
	3500-30000 **(b)	Peso Fresco	Inibição	M-Hámvas <i>et al.</i> (2003)
		Comprimento Total	Inibição	
		Comprimento Hipocótilo	Inibição	
		Comprimento das Raízes	Inibição	
		Comprimento dos Cotilédones	Inibição	
		Formação de Raízes Laterais	Inibição	
		Crescimento dos Cotilédones	Inibição	
	Peso Fresco	Inibição		
	500-5000 *(a)	Crescimento	Inibição	McElhiney <i>et al.</i> (2001)
1-10 *(a)	Crescimento	Sem Efeito	Järvenpää <i>et al.</i> (2007)	
<i>Solanum tuberosum</i>	5-5000 *(a)	Crescimento	Inibição	McElhiney <i>et al.</i> (2001)

Tabela 2 (Continuação)

Espécie	[MC-LR] ($\mu\text{g/L}$)	Parâmetro Avaliado	Efeito	Referência
<i>Spinacia oleracea</i> (var Ballta, Saran, Gamma e Merlin)	0,5 **(b)	Crescimento	Inibição	Pflugmacher <i>et al.</i> (2007a)
		Número de Folhas	Inibição	
		Tamanho das Folhas	Inibição	
<i>Spinacia oleracea</i> (var, Parys, Matador)				
<i>Triticum aestivum</i>	0,5 *(a) e **(b)	Comprimento das Raízes	Inibição	Pflugmacher <i>et al.</i> (2007b)
		Comprimento da Parte Aérea	Inibição	
<i>Triticum durum</i>	11600 **(b)	Comprimento do Epicótilo	Inibição	Saqrane <i>et al.</i> (2008)
		Comprimento da Raiz Primária	Inibição	
		Número de Raízes Laterais	Inibição	
	500-42000 **(b)	Altura	Inibição	Saqrane <i>et al.</i> (2009)
		Número de Folhas	Inibição	
		Peso Fresco e Peso Seco	Inibição	
<i>Vicia faba</i>	50-100 **(b)	Número de Total de Folhas	Sem Efeito	Lahrouni <i>et al.</i> (2013)
		Comprimento da Parte Aérea	Sem Efeito	
		Peso seco Parte da Aérea	Inibição	
		Comprimento das Raízes	Inibição	
		Peso Seco das Raízes	Inibição	
<i>Zea mays</i>	11600 **(b)	Comprimento do Epicótilo	Inibição	Saqrane <i>et al.</i> (2008)
		Comprimento da Raiz Primária	Inibição	
		Número de Raízes Laterais	Inibição	
	500-42000 **(b)	Altura	Inibição	Saqrane <i>et al.</i> (2009)
		Número de Folhas	Inibição	
		Peso Fresco e Peso Seco	Inibição	
	5 *(a) e **(b)	Comprimento das Raízes Primárias	Inibição	Pflugmacher (2007)
		Comprimento da Parte Aérea	Inibição	

*(a) – exposição a MC-LR pura

**(b) – exposição a extrato bruto contendo MC-LR

***(c) – exposição a H-dihidro-MC-LR

1.3.3. Efeitos Citológicos e Morfológicos

Diversas alterações citológicas em plantas expostas a MC foram já reportadas em vários estudos (Tabela 3). Estas alterações podem estar relacionadas com o impacto negativo no crescimento e desenvolvimento das plantas expostas a esta toxina.

Tabela 3 - Efeitos citológicos e morfológicos da MC-LR em algumas plantas agrícolas

Espécie	MC-LR (µg/L)	Efeito	Referência
<i>Brassica napus</i>	120-3000 *(b)	Alteração da Cor das Folhas das Plântulas	Chen <i>et al.</i> (2004)
	3000 *(b)	Necrose na Parte Terminal das Raízes	
		Cotilédones Cloróticos e/ou Necróticos	
<i>Lens esculenta</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Triticum durum</i> <i>Zea mays</i>	11600 *(b)	Atraso na Diferenciação da Raiz	Saqrane <i>et al.</i> (2008)
		Atraso na Formação do Cilindro Vascular	
		Ausência de Endoderme	
		Ausência de Células do Periciclo	
		Atraso na Formação do Xilema Primário	
	Ausência de Fibras		
<i>Lycopersicon esculentum</i>	22240 *(b)	Necrose das Folhas	El Khalloufi <i>et al.</i> (2012)
<i>Oryza Sativa</i>	3000 *(b)	Sem Raízes Primárias	Chen <i>et al.</i> (2004)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	1000 *(a)	Necrose das Folhas	McElhiney <i>et al.</i> (2001)
	1120 *(a)	Alteração da Cor das Raízes	
<i>Sinapis alba</i>	22000 *(b)	Necrose dos Cotilédones	M-Hámvas <i>et al.</i> (2003)
		Ausência de Tricomas no Pecíolo	
<i>Solanum tuberosum</i>	50-5000 *(a)	Necrose dos Tecidos da Parte Aérea	McElhiney <i>et al.</i> (2001)
	100-1000 *(a)	Diminuição do Número de Raízes	
	1000-5000 *(a)	Sem raízes	
<i>Spinacia oleracea</i> (var Ballta, Saran, Gamma e Merlin)	0,5 **(b)	Clorose das Folhas	Pflugmacher <i>et al.</i> (2007a)
<i>Spinacia oleracea</i> (var, Parys, Matador)		Indução da Floração	
<i>Vicia faba</i>	50-100 **(b)	Necrose das Raízes	Lahrouni <i>et al.</i> (2013)

*(a) – exposição a MC-LR pura

** (b) – exposição a extrato bruto contendo MC-LR

1.3.4. Efeitos no Conteúdo de Clorofilas e no Processo Fotossintético

O conteúdo de clorofilas é, em geral, um bom indicador da condição das plantas. A inibição do processo fotossintético em plantas terrestres expostas a MC foi já descrito para várias espécies (Tabela 4) apesar de ainda não se conhecer o seu mecanismo. Um eventual efeito direto no aparelho fotossintético pressupõe a hipótese da toxina ser assimilada sobretudo ao nível das raízes e puder atravessar barreiras celulares de modo a ser translocada até às folhas. Todavia, apesar de esta hipótese não estar excluída, pensa-se que a inibição ocorrerá através de uma ação indireta da toxina que parece ser capaz de induzir *stress* oxidativo nas plantas (Peuthert e Pflugmacher, 2010; El Khalloufi *et al.*, 2011). De facto, a inibição da fotossíntese pelas EROs está já documentada (Noctor e Foyer, 1998).

Um estudo realizado por Gutiérrez-Praena *et al.*, (2014) detetou uma alteração na função de diversas proteínas intervenientes no processo fotossintético relacionadas com a síntese de ATP cloroplastidial, fixação de carbono, fotossíntese e metabolismo de carboidratos. Os autores concluíram que estes marcadores proteicos parecem evidenciar o decréscimo da capacidade das plantas em sintetizar ATP e realizar a fotossíntese após exposição à MC-LR (100 µg/L). A alteração (diminuição) da expressão de algumas proteínas intervenientes na fotossíntese foi também verificada por Azevedo *et al.* (2014) após exposição a 13 µg/L. Contudo, esta alteração na fotossíntese não foi verificada quando os autores determinaram a eficiência máxima do fotossistema II.

Tabela 4 - Alteração do Processo Fotossintético em plantas agrícolas expostas a MC-LR

Espécie	[MC-LR] ($\mu\text{g/L}$)	Parâmetro Avaliado	Efeito	Referência
<i>Brassica oleracea</i>	1-10 *(b)	Eficiência Máxima do Fotossistema II	Sem Efeito	Järvenpää <i>et al.</i> (2007)
		Teor de Clorofila <i>a</i> e de Clorofila <i>b</i>	Sem Efeito	
		Rácio Clorofila <i>a</i> para <i>b</i>	Sem Efeito	
<i>Lens esculenta</i>	2100-4200 **(b)	Teor de Clorofila Total	Redução	Saqrane <i>et al.</i> (2009)
	500-4200 **(b)	Eficiência Máxima do Fotossistema II	Redução	
<i>Lycopersicon esculentum</i>	2200-22240 **(b)	Eficiência Máxima do Fotossistema II	Redução	El Khalloufi <i>et al.</i> (2012)
	100 *(a)	Eficiência Máxima do Fotossistema II	Sem Efeito	Gutiérrez-Praena <i>et al.</i> (2014)
	100 **(b)	Eficiência Máxima do Fotossistema II	Redução	
<i>Medicago sativa</i>	11120-22240 **(b)	Eficiência Máxima do Fotossistema II	Redução	El Khalloufi <i>et al.</i> (2011)
	5-20 **(b)	Teor de Clorofila total	Redução	El Khalloufi <i>et al.</i> (2013)
<i>Oryza sativa</i>	0,26-78 **(b)	Eficiência Máxima do Fotossistema II	Sem Efeito	Azevedo <i>et al.</i> (2014)
<i>Pisum sativum</i>	500-4200 **(b)	Teor de Clorofila Total	Sem Efeito	Saqrane <i>et al.</i> (2009)
		Eficiência Máxima do Fotossistema II	Redução	
<i>Sinapis alba</i>	1-10 *(b)	Eficiência Máxima do Fotossistema II	Sem Efeito	Järvenpää <i>et al.</i> (2007)
		Teor de Clorofila <i>a</i> e de Clorofila <i>b</i>	Sem Efeito	
		Rácio Clorofila <i>a</i> para <i>b</i>	Sem Efeito	
<i>Solanum tuberosum</i>	50-5000 *(a)	Teor de Clorofila Total	Redução	McElhiney <i>et al.</i> (2001)
<i>Spinacia oleracea</i>	0,5 **(b)	Taxa de Produção de Oxigénio	Redução	Pflugmacher <i>et al.</i> (2007a)
<i>Triticum aestivum</i>	0,5 *(a) e **(b)	Teor de Clorofila <i>a</i> e de Clorofila <i>b</i>	Redução	Pflugmacher <i>et al.</i> (2007b)
		Taxa de Produção de Oxigénio	Redução	
<i>Triticum durum</i>	500-4200 **(b)	Teor de Clorofila Total	Sem Efeito	Saqrane <i>et al.</i> (2009)
		Eficiência Máxima do Fotossistema II	Redução	
<i>Vicia faba</i>	100 **(b)	Teor de Clorofila total	Redução	Lahrouni <i>et al.</i> (2013)
	50-100 **(b)	Eficiência Máxima do Fotossistema II	Redução	
<i>Zea mays</i>	4200 **(b)	Teor de Clorofila total	Redução	Saqrane <i>et al.</i> (2009)
	500-4200 **(b)	Eficiência Máxima do Fotossistema II	Redução	

*(a) – exposição a MC-LR pura

**(b) – exposição a extrato bruto contendo MC-LR

1.3.5. Efeitos na Assimilação de Mineirais

Alguns trabalhos demonstraram que a MC-LR provoca alterações no teor de minerais das plantas (Tabela 5), no entanto, a informação disponível sobre este tema é ainda escassa. Em geral, o teor de minerais é aumentado, sobretudo na raiz, após exposição da planta à toxina, sendo este aumento geralmente proporcional à concentração de MC (Saqrane *et al.*, 2009; El Khalloufi *et al.*, 2012). Será assim importante uma investigação sobre os mecanismos de ação da MC-LR neste processo, uma vez que uma adequada assimilação de minerais é fundamental para garantir o crescimento e desenvolvimento das plantas (Grusak, 2001). Lahrouni *et al.* (2013) sugerem que as variações na concentração de minerais podem derivar de uma disrupção da permeabilidade das membranas causada pela MC.

Tabela 5 - Efeitos da MC-LR no teor de minerais de algumas plantas agrícolas

Espécie	[MC-LR] (µg /L)	Mineral Avaliado	Efeito	Referência
<i>Lens esculenta;</i> <i>Triticum durum;</i> <i>Pisum sativum;</i> <i>Zea mays;</i>	500-4200 *(a)	Cálcio	Aumento na raiz	Saqrane <i>et al.</i> (2009)
		Sódio		
		Potássio		
		Fósforo		
		Azoto		
<i>Lycopersicon esculentum</i>	2200-22240 *(a)	Cálcio	Aumento na raiz	El Khalloufi <i>et al.</i> (2012)
		Sódio		
		Potássio		
<i>Vicia faba</i>	50-100 *(a)	Cálcio	Decréscimo na parte aérea	Lahrouni <i>et al.</i> (2013)
			Sem efeito na raiz	
		Sódio	Aumento na parte aérea	
			Aumento na raiz	
		Potássio	Decréscimo na parte aérea	
			Decréscimo na raiz	
		Azoto	Decréscimo na parte aérea	
	Decréscimo na raiz			
100 *(a)				

*(a) – exposição a extrato bruto contendo MC-LR

1.3.6. Indução de Stress Oxidativo

A par com a inibição específica das PP1 e 2A (Dawson, 1998), o aumento das defesas antioxidantes induzidas pela MC sugere que, o *stress* oxidativo é um dos principais mecanismos que contribui para a fitotoxicidade da MC (Pflugmacher *et al.*, 2006; Pflugmacher *et al.*, 2007a, b). Apesar da produção de EROs ser um fenómeno natural nas plantas, a formação excessiva destas moléculas pode ser desencadeada por vários fatores externos, assim como por vários xenobióticos e pela sua biotransformação, podendo levar a danos no DNA, proteínas, carboidratos e lípidos. Vários sistemas são conhecidos por fornecerem proteção contra estes danos: sistemas de defesa não enzimáticos (glutathione (GSH), ácido ascórbico, compostos fenólicos tocoferóis, carotenoides) e enzimáticos (superóxido-dismutase (SOD), a catalase (CAT), peroxidase (POD), glutathione-peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX), glutathione-s-transferase (GST) e glutathione reductase (GR)) (Cadenas, 1995; Apel e Hirt, 2004).

De facto, a promoção de *stress* oxidativo pela MC foi já reportada para várias espécies de plantas utilizadas na alimentação humana e com grande interesse económico (Peuthert *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; El Khalloufi *et al.*, 2011; El Khalloufi *et al.*, 2012; Lahrouni *et al.*, 2013).

A indução do *stress* oxidativo varia conforme se trate de uma exposição a extrato bruto cianobacteriano ou à toxina purificada, sendo os efeitos mais acentuados no primeiro caso (Pflugmacher *et al.*, 2006; Pflugmacher *et al.*, 2007b, Peuthert *et al.*, 2007) e conforme as espécies (Chen *et al.*, 2004, Peuthert *et al.*, 2007) podendo inclusivamente variar dentro da mesma espécie. Pflugmacher *et al.* (2007) demonstraram que a exposição de diferentes variedades de *S. oleracea* a MC induziu alterações distintas na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, POD, CAT, GST e GR) e dos sistemas de defesa não enzimáticos (GSH, tocoferóis e ascorbato). Em variedades de *P. vulgaris* foram também observadas diferentes respostas das enzimas GST, GR e POD após exposição a 5 µg MC-LR/L (Pichardo e Pflugmacher, 2011).

Foi ainda verificada uma alteração na transcrição de algumas proteínas conhecidas por atuarem na resposta ao *stress* em *O. sativa* e *L. esculentum*, após exposição a MC-LR (Azevedo *et al.*, 2014, Gutiérrez-Praena *et al.*, 2014).

1.4. Bioacumulação de MC em Plantas

Acredita-se que, devido ao seu elevado peso molecular (cerca de 1000 Da), a difusão da MC não ocorre facilmente através das membranas, e que por isso a sua bioacumulação não ocorre de forma facilitada (WHO, 1999). Em animais, alguns tipos de

células expressam transportadores específicos (OATPs), que contribuem para a acumulação da toxina (Meier-Abt *et al.*, 2007). Não foram ainda identificados transportadores específicos de MC-LR em plantas, contudo, diversos tipos de transportadores membranares com afinidade para diferentes péptidos e aminoácidos têm sido identificados (Tegeuder e Rentsch, 2010). De facto, vários trabalhos têm demonstrado a capacidade de plantas na acumulação da MC. Pensa-se que este fenómeno ocorre através da absorção da toxina, sobretudo pelas raízes da planta, que podem estar expostas à mesma aquando da irrigação com água contaminada. A acumulação da MC em plântulas, raízes e folhas de plantas terrestres ocorre de forma dependente do tempo e da concentração de exposição, bem como da espécie em estudo, sendo em geral observado um maior *uptake* pelas raízes. De facto, tem sido sugerido por vários autores que, em geral, a toxina é captada na raiz, ocorrendo depois a sua translocação para as restantes partes da planta (Peuthert *et al.*, 2007; Crush *et al.*, 2008; Saqrane *et al.*, 2009).

Para caracterizar a capacidade de acumulação de um tóxico nas plantas é frequentemente utilizado o fator de bioconcentração (FBC), que estabelece a relação entre a concentração do elemento na planta e a concentração do mesmo no solo (Pratas *et al.*, 2012). Assim, o FBC pode ser calculado dividindo a concentração da toxina nos tecidos da planta pela concentração de exposição, assumindo-se que a bioacumulação ocorre quando este valor é superior a 1 (Prieto *et al.*, 2011).

Peuthert *et al.* (2007) reportaram o *uptake* de MC-LR e MC-LF por raízes de plântulas de onze espécies com interesse agrícola e a sua translocação para a parte aérea. A maior concentração de MC foi medida nas raízes das plantas, tendo a mesma variado entre 12 e 125 ng/ g de peso fresco (P.F). A concentração da toxina (MC-LR) na parte aérea variou entre 4 e 44 ng/g P.F. O FBC médio para as raízes foi 8,4, tendo no caso da parte aérea, o valor sido perto de metade (3,6). Das raízes, a toxina parece ter sido transportada para a parte aérea e folhas primárias, uma vez que nenhuma das duas esteve em contacto direto com a toxina. Foi ainda averiguada a absorção para exposição a extrato bruto de MC-LR (5 µg/L) verificando-se que o FBC médio (8,8 e 4,0 no caso de raízes e parte aérea, respetivamente) foi semelhante ao observado para a MC-LR pura.

Várias concentrações de MC foram detetadas em diferentes órgãos de quatro plantas estudadas (*T. durum*, *Z. mays*, *P. sativum* e *L. esculenta*) por Saqrane *et al.* (2009). Em geral, as maiores concentrações foram observadas nas raízes, seguidas pelas folhas e caules. No mesmo estudo, os autores concluíram que a espécie com maior capacidade acumuladora foi *P. sativum*. Após a exposição à maior concentração de MC (4200 µg/L), o conteúdo de MC encontrado na planta foi de 191 µg/g P.F em raízes, 70 µg/g P.F no caule e 157 µg/g P.F em folhas.

Mohamed e Al Shehri (2009) reportaram acumulação de MC em folhas e raízes de seis plantas usadas para consumo humano (*Raphanus sativus*, *Eruca sativa*, *L. sativa*, *Anethum graveolens*, *Petroselinum hortense* e *B. oleracea*). As plantas foram colhidas de plantações perto de poços de água usados na irrigação, que se encontravam contaminados com MC (0,3 – 1,8 µg/L). Os resultados mostraram que a acumulação da MC nas plantas estava positivamente relacionada com a concentração de MC existente nos poços e que a acumulação de MC varia significativamente entre diferentes espécies de plantas hortícolas. A maior concentração foi detetada em *R. sativus* (1,2 µg/g P.F) e a menor em *B. oleracea* (0,07 µg/g P.F). Para além disso, concluíram que, apesar de coletivamente as raízes acumularem significativamente maior concentração de toxina que as folhas, *A. graveolens* constituía uma exceção, ao acumular maior quantidade de MC nas folhas.

Recentemente, Chen *et al.* (2012a) demonstraram a acumulação de MC em grãos de arroz colhidos do lago Taihu (China). Chen *et al.* tinham já em 2004 verificado a acumulação de MC em *O. sativa* e em *B. napus*. Maiores quantidades de MC-LR foram recuperadas de *B. napus* (2,61 a 651 ng MC-LR/ g P.F para exposição entre 24 a 3000 µg/L) que de *O. sativa* (2,94 a 5,40 ng MC-LR/ g P.F para exposição entre 120 a 3000 µg/L), demonstrando novamente que diferentes espécies de plantas podem acumular MC a diferentes taxas. Chen *et al.* (2010) demonstraram ainda a acumulação de MC em rebentos de *M. pumila* após sete e catorze dias de exposição a concentrações entre 30 a 3000 µg MC-LR/L, tendo a quantidade de MC acumulada quase duplicado no segundo tempo.

A acumulação de MC em frutos também já foi detetada. Gutiérrez-Praena *et al.* (2014) reportaram a acumulação de MC-LR em frutos, raízes e folhas de *L. esculentum*, após uma semana de exposição a MC-LR pura e a extrato bruto de MC-LR (100µg/L MC-LR). A concentração de toxina mais baixa foi verificada nos frutos verdes (5,15 – 5,41 µg/kg P.F) e a mais alta nas raízes (1635,21 µg/kg P.F) da planta. Ao contrário do que tinha sido anteriormente reportado noutros estudos, a concentração de toxina decresceu após duas semanas de exposição, tendo-se encontrado abaixo do limite de deteção (0,58 µg/L MC-LR) do método de quantificação. A acumulação de toxina nos frutos (1,16 µg MC-LR/kg P.S) desta espécie após irrigação com água de um lago contaminada com MC tinha já sido reportada por Romero-Oliva *et al.* (2014). Adicionalmente, os autores reportaram no mesmo estudo a acumulação da toxina nos frutos de *Capsicum annum* (1,03 µg MC-LR/kg P.S).

Para além da acumulação de MC no interior da planta, a irrigação pode levar a acumulação nas partes externas da mesma (Codd *et al.*, 1999). A irrigação de *L. sativa* com água com *M. aeruginosa* resultou em colónias e células isoladas das cianobactérias alojadas nas folhas da planta, dez dias após a irrigação. A MC-LR foi detetada nas folhas

centrais (2,5 mg/Kg de P.S), na zona distal (0,833 mg/Kg P.S) e basal (0,094 mg/Kg P.S) de folhas maduras. O estudo concluiu que, mesmo após lavagens, as células cianobacterianas não foram removidas (Codd *et al.*, 1999).

1.5. Biodisponibilidade de MC no Solo

A utilização de água na agricultura, proveniente de sistemas eutrofizados, contaminada com cianobactérias tóxicas, para além dos efeitos tóxicos nas culturas irrigadas, levanta o problema sobre a persistência das toxinas no solo e sobre a sua biodisponibilidade para as plantas. Chen *et al.* (2006b) apontaram as MCs como poluentes de elevada mobilidade no solo, estando essa mobilidade relacionada sobretudo com o teor de argila do mesmo. Mais ainda, a persistência da toxina no solo dependerá da eficiência de degradação (por exemplo, por fotólise, hidrólise ou degradação microbiana) podendo persistir em solos agrícolas por períodos relativamente longos, com um tempo de semi-vida variando entre seis e dezoito dias (Chen *et al.*, 2006b). Os autores propuseram ainda que o mecanismo de adsorção da MC não ocorre apenas por processos físicos, mas também pela ligação da toxina aos iões metálicos que se encontram nas partículas do solo. Devido aos átomos de azoto e oxigênio que as MCs possuem na sua estrutura química, estas toxinas podem quelar com os iões metálicos presentes no solo.

Apesar da informação sobre a adsorção das MCs em terrenos agrícolas ser particularmente escassa, é sugerido que a adsorção é baixa, podendo potencialmente resultar na sua elevada biodisponibilidade para as plantas e para os organismos existentes no meio. Em vários estudos foi referido que o maior processo de dissipação das cianotoxinas no solo é através da degradação microbiana (Miller e Fallowfield, 2001; Chen *et al.*, 2006b). De facto, várias bactérias presentes no solo como *Arthrobacter* sp. *Brevibacterium* sp. e *Rhodococcus* sp. parecem ser capazes de degradar as MCs (Manage *et al.*, 2009). Bourne *et al.* (2001) reportaram ainda que *Sphingomonas* sp. possui um agrupamento de genes envolvidos na degradação de MC-LR.

1.6. Implicações da MC na Agricultura, Segurança Alimentar e Saúde Pública

As florescências cianobacterianas são graves fontes de poluição em ambientes aquáticos. A presença destes microrganismos pode representar uma grave ameaça à qualidade da água, pois muitos deles produzem uma grande diversidade de toxinas que podem ser prejudiciais para a saúde humana (Mohamed e Al Shehri, 2009). Apesar da maioria destas florescências ocorrerem em sistemas aquáticos abertos, podem também

ocorrer em reservatórios usados para consumo. Para além disso, águas contaminadas são frequentemente usadas na agricultura para irrigação de culturas. O uso de águas superficiais contaminadas com MC-LR, na agricultura, tem sido reportado em vários países incluindo Finlândia (Spoof *et al.*, 2003), Espanha (Aboal e Puig, 2005), Tunísia (El Herry *et al.*, 2008), Turquia (Gurbuz *et al.*, 2009), Marrocos (Oudra *et al.*, 2011), Arábia Saudita (Mohamed e Al Shehri, 2009), Índia (Prakash *et al.*, 2009), China (Liu *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2012a), Nova Zelândia (Wood *et al.*, 2006), Guatemala (Romero-Oliva *et al.*, 2014) e em concentrações elevadas (até 29000 µg/L) na Argélia (Nasri *et al.*, 2008). Como referido nos subcapítulos anteriores (1.3.1 a 1.3.5), a absorção da toxina pelas plantas pode induzir alterações morfológicas e fisiológicas, que podem levar a uma perda de produtividade devido à inibição da germinação e do crescimento e a prejuízos ao nível económico. Por outro lado, o uso de águas contaminadas na agricultura para irrigação representa preocupações adicionais na segurança alimentar, devido aos elevados níveis da toxina que têm sido detetados em tecidos/órgãos de plantas utilizadas para consumo humano (subcapítulo 1.6). A introdução da toxina na cadeia alimentar através destes alimentos é assim uma possibilidade e um provável problema de saúde pública. No entanto, o impacto das MCs nas plantas e sua capacidade de entrar na cadeia alimentar através desta via não é totalmente compreendido sendo necessário um estudo aprofundado para uma maior compreensão do tema (Kittler *et al.*, 2012).

Relativamente às águas de consumo humano a OMS recomenda o estabelecimento de planos de monitorização de cianotoxinas (WHO, 1999). O valor guia para a MC-LR em águas para consumo foi introduzido com um limite máximo recomendado de 1µg de MC-LR por litro (WHO, 1999). Em Portugal a monitorização desta cianotoxina é obrigatória pelo Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de agosto, tendo o valor da OMS sido transposto para a legislação portuguesa. De salientar, que os valores limite estabelecidos pela OMS têm em consideração apenas os efeitos agudos da MC-LR não contemplando os efeitos crónicos e cancerígenos (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999). Mais ainda, estes planos de monitorização não contemplam as águas destinadas à produção agrícola, criando-se assim uma situação de risco para a segurança alimentar.

Estas toxinas têm a capacidade de bioacumular ao longo da cadeia trófica, podendo provocar efeitos crónicos, resultando num problema acrescido de saúde pública (Dietrich e Hoeger 2005; Apeldoorn *et al.*, 2007). Existem numerosos trabalhos que reportam a acumulação de MCs em organismos aquáticos (revisto por Apeldoorn *et al.*, 2007). A OMS estabeleceu um valor guia provisório para a MC-LR em alimentos, tendo definido o limite máximo de ingestão diária aceitável (IDA), como 0,04 µg/kg de peso fresco (WHO, 1999).

1.7. Importância de *Daucus carota* (cenoura) na Alimentação

Daucus carota L. (cenoura) é um dos dez vegetais mais importantes do mundo na alimentação humana (Simon, 2000). São raízes-vegetais conhecidas particularmente pelas suas propriedades antioxidantes, sendo ricas em vitamina A, C e E, bem como em β -carotenos e compostos polifenólicos (Luciano *et al.*, 2009; Yen *et al.*, 2007). Sendo o β -caroteno o precursor da vitamina A, e estando o mesmo presente em grandes quantidades na cenoura (Bauernfeind, 1972), a sua ingestão torna-se bastante importante, como fonte desta vitamina no Homem (Novotny *et al.*, 1995; Strube e OveDragsted, 1999). Para além disso, estes vegetais contêm também diversos minerais essenciais. A absorção de potássio, cálcio, ferro e zinco, é normalmente insuficiente nas dietas humanas, reforçando a ideia da importância do consumo deste alimento (Nicolle *et al.*, 2004). No entanto, sabe-se que as condições de crescimento e as práticas de manuseamento afetam as concentrações destes elementos nas raízes, os quais são importantes na determinação do valor nutricional e das características organolépticas.

Tem sido reportado que a aplicação de fertilizantes pode modificar as concentrações de carotenoides, como o β -caroteno, e de ácido ascórbico (vitamina C) nas raízes das cenouras (Singh *et al.*, 2012). Deste modo, será importante compreender se a presença de MCs pode ter o mesmo efeito. Uma vez que o sistema radicular da planta é geralmente o local de maior acumulação (Peuthert *et al.*, 2007; Crush *et al.*, 2008; Saqrane *et al.*, 2009) e sendo *D. carota* uma raiz comestível, será ainda importante averiguar o risco de acumulação de toxinas nesta cultura hortícola.

1.8. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral a aquisição de novos conhecimentos sobre a toxicidade da MC-LR em raízes-vegetais, neste caso em *D. carota*, bem como compreender em que medida este processo afeta a qualidade desta cultura hortícola. Assim, os objetivos específicos deste estudo foram os seguintes: 1) avaliar o efeito da MC em parâmetros fisiológicos como o crescimento e a capacidade fotossintética da planta; 2) determinar a acumulação da MC-LR nas raízes e no solo; 3) avaliar a qualidade nutricional da planta, através da quantificação do conteúdo de minerais, ácido ascórbico e β -caroteno, em condições controlo e de exposição à MC-LR.

Devido à importância que *D. carota* tem na nutrição humana, o estudo dos efeitos da MC, ao nível fisiológico, bioquímico e capacidade de acumulação da toxina, poderá permitir obter dados importantes para a implementação de medidas que permitam controlar o uso de águas contaminadas ou reduzir o impacto negativo desta fonte de contaminação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultura de Cianobactérias e Preparação do Extrato Bruto de *Microcystis aeruginosa*

A toxina necessária para a realização dos ensaios de toxicidade nas plantas foi obtida através de um liofilizado de *M. aeruginosa* (LEGE 91094), cedido pelo Laboratório de Ecotoxicologia, Genética e Evolução (LEGE), e que foi obtido através da cultura da estirpe em condições estéreis, em meio Z8 (Kótai, 1972), a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, num regime de luz / obscuridade de 14h / 10h com luz branca fluorescente de $22 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade (Gutiérrez-Praena *et al.*, 2014). Após 45 dias de cultura, a biomassa foi recolhida por centrifugação, congelada a -80°C e liofilizada (Telstar, Lyoquest, Terrassa, Espanha).

A biomassa liofilizada foi pesada, ressuspendida em água numa proporção de 0,2g de biomassa para 5 mL de água e homogeneizada com a ajuda de um agitador magnético. Recorreu-se a ultrasons para induzir a lise celular, num banho de água a temperatura ambiente durante 15 minutos (Sonorex™ Super RK 100H, Bandelin, Berlim, Alemanha), e seguidamente, com uma sonda metálica, realizaram-se 5 ciclos de 1 minuto a 16Hz (VibraCell 50, Sonics & Material Inc., Danbury, CT, Estados Unidos), mantendo-se a amostra em banho de gelo. O homogeneizado foi submetido a ultracentrifugação (Optima™ L-100 XP Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, CA, Estados Unidos) a uma velocidade de 24000 rpm, durante 60 minutos., a 4°C . O sobrenadante foi recolhido e mantido a -20°C , para posterior quantificação da toxina por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

2.2. Quantificação da MC-LR no Extrato Bruto de *M. aeruginosa* por HPLC-PDA

O extrato bruto foi analisado por cromatografia líquida de alta pressão acoplada a um detetor de fotoiodos (HPLC-PDA), de forma a detetar e quantificar a MC-LR de acordo com a metodologia descrita por Ramanan *et al.* (2000), com algumas modificações. O

princípio do método baseia-se na separação cromatográfica e detecção dos elementos constituintes da amostra, comparando o tempo de retenção e espectro de absorvância das mesmas com padrões de MC-LR.

A solução padrão de MC-LR utilizada foi adquirida na Cyano Biotech GmbH (Berlim, Alemanha, lote nº 018K1209), de concentração 10,025 µg/mL e pureza de 98%.

O sistema de cromatografia utilizado foi o Alliance e2695 HPLC acoplado ao PDA 2998 (Waters, Milford, MA, Estados Unidos). A separação foi obtida usando a coluna Lichrospher 100 RP-18 (250mm × 4,6mm i.d., 5µm) e uma pré-coluna Purosphere Star® RP-18 endcapped (4 × 4mm, 5µm) (Merck, Whitehouse Station, NJ, Estados Unidos), ambas mantidas a uma temperatura de 45°C.

Todos os solventes utilizados foram filtrados (Pall GH Polypro 47 mm, 0,2µm, Pall Corporation, Port Washington, NY, Estados Unidos) e desgaseificados em banho de ultrasons (Sonorex™ Super RK 100H).

A fase móvel foi constituída por:

- Metanol (MeOH) + Ácido Trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v)
- Água Milli-Q + TFA 0,1% (v/v)

A separação cromatográfica foi feita com um fluxo de 0,9 mL/min, usando o gradiente de eluição cujo programa se encontra na tabela seguinte:

Tabela 6 - Gradiente de eluição do HPLC para quantificação de MC-LR

Tempo (min)	Canal A MeOH (%)	Canal B H ₂ O Milli Q (%)
0	55	45
5	65	35
10	80	20
15	100	0
15,1	55	45
20	55	45

O tempo de retenção do pico de MC-LR foi 10,44 min. A MC-LR foi detetada devido à sua capacidade de absorvância UV aos 238nm e quantificada, por comparação, dos tempos de retenção e das áreas dos picos dos cromatogramas das amostras com os padrões. O sistema foi calibrado usando 7 diluições do padrão de MC-LR (0,5 a 20 µg/mL) em MeOH 50% (Figura 2). Cada concentração do padrão e cada amostra foram injetadas em duplicado (20 µL). Os limites de detecção (LOD=0,2 µg/mL) e de quantificação da toxina (LOQ= 0,5 µg/mL) foram calculados através do sinal-ruído de 3 e 10, respetivamente. O *software* usado foi o Empower 2 Chromatography.

No decorrer dos ensaios de exposição, ao início de cada semana, uma alíquota de extrato bruto foi descongelada e a toxina quantificada, como descrito, para confirmação da sua concentração, e posterior preparação da solução de rega com a toxina na diluição pretendida (10 e 50 µg/L).

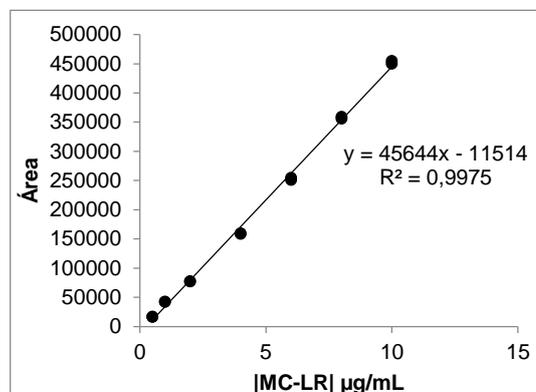


Figura 2 - Retra padrão utilizada para o cálculo da [MC-LR] no extrato bruto de *Microcystis aeruginosa* através de HPLC-PDA

2.3. Ensaio de Exposição das Plantas ao extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR

Foram realizados três ensaios de exposição com plantas da espécie *D. carota* adquiridas em viveiro e pertencentes à mesma variedade (Soprano) que, no laboratório, antes do início dos ensaios de exposição, foram transplantadas para copos de plástico transparente com uma capacidade de 350 mL. (Figura 3). Durante o ensaio, as plantas cresceram em condições de solo (Tabela 7) e de estufa (Figura 4), tendo sido submetidas duas vezes por semana a água não contaminada (40 mL) ou a água contaminada com extrato bruto de *M. aeruginosa* diluído para diferentes concentrações de MC-LR (40 mL de água com 10 µg/L e 50 µg/L MC-LR), consideradas ecologicamente relevantes. Nos dias em que a toxina não foi administrada, e a planta necessitava de água, esta foi colocada nos tabuleiros onde as mesmas se encontravam a crescer. A humidade do solo foi controlada através do uso de um medidor com 4 níveis de intensidade (A a D, sendo que A corresponde a solo seco e D ao nível mais elevado de humidade) mantendo-se a mesma entre os níveis intermédios B e C.

Tabela 7 - Características do solo utilizado nos ensaios de exposição

Marca	SiroPlant
pH em CaCl ₂	5,5 – 6,5
Humidade	50% - 60%
Condutividade	0,6 – 1,2 CE
Azoto (N)	150 – 250 mg/L
Fósforo (P ₂ O ₅)	150 – 250 mg/L
Potássio (K ₂ O)	300 – 500 mg/L
Matéria Orgânica	> 70%

**Figura 3**- Processo de transplantação das plantas adquiridas em viveiro**Figura 4**- Condições de crescimento das plantas do primeiro (a) e do segundo (b) ensaios

O primeiro ensaio teve início a 17 de Setembro 2013 com duração de 28 dias e foi realizado com plantas de um mês de idade para posterior determinação de pesos fresco e seco, capacidade fotossintética e quantificação de MC-LR nos tecidos de *D. carota*.

O segundo ensaio foi iniciado a 08 de Outubro 2013 com plantas com dois meses de crescimento, também com duração de 28 dias, para quantificação de minerais.

O terceiro ensaio, iniciado a 11 de Abril de 2014 com plantas com um mês de idade e duração de 32 dias, teve como objetivo a quantificação de vitaminas (ácido ascórbico e β -caroteno).

Para o primeiro e segundo ensaio realizaram-se três réplicas experimentais ($n=3$), para cada tratamento (controlo, 10 $\mu\text{g/L}$ e 50 $\mu\text{g/L}$), tendo-se avaliado os parâmetros pretendidos ao tempo 0, 14 e 28 dias. No terceiro ensaio analisaram-se também três réplicas por tratamento (controlo, 10 $\mu\text{g/L}$ e 50 $\mu\text{g/L}$), alterando-se, contudo, o tempo das análises para 21 e 32 dias.

No final dos diferentes tempos de recolha das plantas foram medidos vários parâmetros fisiológicos (capacidade fotossintética e peso fresco) e os tecidos foram guardados a -80°C , para futuras análises bioquímicas (quantificação de toxina, vitaminas e minerais).

2.4. Avaliação do Estado Morfofisiológico das Plantas

2.4.1. Determinação do Peso Fresco e do Peso Seco

O peso fresco das folhas e raízes provenientes do primeiro ensaio foi determinado a diferentes tempos (0, 14 e 28 dias), através da sua pesagem numa balança semi-analítica. De seguida, o material biológico foi congelado a -80°C .

Posteriormente, duas plantas de cada réplica experimental foram liofilizadas (Telstar, Lyoquest) por um período de uma semana. Após a liofilização, as amostras foram pesadas numa balança analítica, determinando-se assim o seu peso seco.

2.4.2. Determinação da Capacidade Fotossintética

A capacidade fotossintética das plantas foi determinada através de modulação por amplitude de pulso (PAM), utilizando o instrumento de medição PAM 2000 (Walz, Effeltrich, Alemanha), ao tempo 0, 14 e 28 dias. As plantas foram transferidas para uma sala escura onde permaneceram por 30 minutos. Após este período de adaptação, as folhas foram iluminadas com um pulso de luz saturante e a fluorescência emitida foi imediatamente registada pelo instrumento. Este procedimento permite medir a eficiência máxima do fotossistema II (F_v/F_m), o qual está diretamente relacionado com o estado funcional do complexo proteico e a eficiência fotossintética das plantas (Maxwell e Johnson, 2000).

2.5. Extração, Quantificação e Detecção de MC-LR nas Raízes das Plantas e no Solo

A MC-LR foi detetada e quantificada aos 14 e 28 dias de exposição, de forma a poder avaliar-se a possibilidade de bioacumulação da toxina nos tecidos. Apenas as raízes da planta foram analisadas, uma vez que para o consumo humano, esta é a parte da planta com maior importância nutricional, necessitando de maior controlo relativamente à presença de substâncias tóxicas. Procedeu-se também à quantificação e deteção da MC-LR no solo que recebeu a solução de *M. aeruginosa* contendo a maior concentração de MC-LR (50 µg/L), durante 28 dias (duração do ensaio de exposição das plantas).

A deteção e quantificação da toxina foi realizada com recurso a um *kit* enzimático (MicroCystest), um *kit* imunológico (ELISA) e Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS).

2.5.1. Extração da MC-LR das Raízes das Plantas

As amostras, de massa conhecida, foram homogeneizadas em MeOH 80% (v/v) + TFA 0,1% (v/v), numa proporção de 1g de P.F para 5mL de solvente, com auxílio de um homogeneizador de lâminas. O homogeneizado permaneceu em repouso por um período de aproximadamente 60 minutos para aumentar recuperação da toxina dos tecidos. Posteriormente, o mesmo foi submetido a ultrasons (5 ciclos de 1 min, 50 Hz) (VibraCell 50), em banho de gelo, tendo sido subsequentemente centrifugado a uma velocidade de 4600 rpm, por 20 min, a 4°C, (Sorvall RT Legend Benchtop Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Procedeu-se, de seguida, à recolha dos sobrenadantes, dos quais 10 mL foram evaporados (Acid-resistant Centrivap Concentrator, Labconco, Kansas City, MO, Estados Unidos) e ressuspensos em 500 µL de MeOH 80%, de forma a concentrar a amostra para posterior quantificação (MicroCystest e LC-MS). No caso das amostras para quantificação por ELISA, foram evaporados também 10 mL (Acid-resistant Centrivap Concentrator, Labconco) do sobrenadante recolhido, de forma a concentrar a amostra, no entanto, a ressuspensão foi efetuada em 500 µL de H₂O, de forma a evitar interferências do MeOH com o *kit*.

2.5.2. Extração da MC-LR no Solo

Procedeu-se à extração da toxina usando 4g de solo homogeneizado em 20 mL de MeOH 80% + TFA 0,1% (1g de P.F para 5mL de solvente), onde permaneceu por um período de aproximadamente 60 minutos. A solução resultante foi submetida a ultrasons

(5 ciclos de 1 min) (VibraCell 50) em banho de gelo e centrifugada (4600 rpm, 20 min, 4°C). Procedeu-se, de seguida, à recolha do sobrenadante, posteriormente utilizado para deteção e quantificação de MC-LR pelo MicroCystest.

Para a quantificação da MC por ELISA e por LC-MS os sobrenadantes foram sujeitos a dois tratamentos distintos. No caso das amostras para quantificação por ELISA, de modo a evitar interferências do MeOH no *kit*, evaporou-se 1 mL (Acid-resistant Centrивap Concentrator, Labconco) do sobrenadante recolhido, tendo a ressuspensão sido efetuada no mesmo volume de H₂O uma vez que as mesmas não necessitavam de ser concentradas. Para a quantificação por LC-MS, 10 mL dos sobrenadantes foram evaporados (Acid-resistant Centrивap Concentrator, Labconco) e ressuspendidos em 500 µL de MeOH 80% de forma a concentrar a amostra.

2.5.3. Deteção e Quantificação da MC-LR pela Atividade da Fosfatase (MicroCystest)

A quantificação das amostras foi realizada através do *kit* enzimático MicroCystest, (Zeulab, Saragoça, Espanha) com LOD entre 0,11 e 0,18 µg/L e LOQ entre 0,18 e 0,25 µg/L, validados pelo fornecedor para água de torneira e de reservatório, respetivamente. O princípio do método baseia-se na inibição da atividade da enzima fosfatase devido à presença da toxina MC-LR.

Uma vez que altas concentrações de TFA e MeOH podem desnaturar a fosfatase, procedeu-se previamente a uma diluição de 1/20 das amostras, tal como sugerido no manual de utilização do *kit*. Os padrões de MC-LR (0,2, 0,4, 0,8 e 2,0 µg/L), foram fornecidos no *kit* e utilizados para estabelecer uma curva padrão, que foi utilizada para determinar as concentrações de MC-LR nas raízes e no solo. Previamente, foi realizada uma solução de fosfatase através da adição 3 mL de tampão de diluição de fosfatase ao concentrado de fosfatase fornecido no *kit*.

As reações enzimáticas decorreram em microplacas de 96 poços. Para a reação enzimática foram adicionados 50 µL de padrão de MC-LR ou de amostra, seguidos de 70 µL de fosfatase e 90 µL de solução cromogénica contendo o substrato específico p-nitrofenilfosfato (pNPP) (Tabela 8). Após 30 minutos de incubação a 37°C, adicionaram-se 70 µL de solução stop à reação e a absorvância (Abs) da mistura foi lida a 405 nm, num leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek Instruments, Winooski, VT, Estados Unidos), equipado com *software* Gen5 1.06. Todas as leituras foram efetuadas em duplicado.

Tabela 8 - Reagentes adicionados ao padrão e amostras na realização do MicroCystest

Solução Adicionada	Quantidade de Solução adicionada (µL)
Padrão MC-LR / Amostra	50
Fosfatase	70
Tampão de Diluição de Fosfatase (µL)	70
Solução Cromogénica (µL)	90
Solução Stop (µL)	70

Em condições normais, a fosfatase é capaz de hidrolisar o substrato específico para-nitrofenilfosfato (pNPP) em p-nitrofenol (pNP), que pode ser detetado a 405nm. Uma vez que a MC-LR é um inibidor natural das fosfatases, amostras que contenham MC-LR deverão inibir a atividade da enzima de forma proporcional à quantidade de toxina presente. Com auxílio dos padrões de MC-LR traçou-se uma curva padrão (Figura 5 e 6), através da representação gráfica da Abs dos padrões a 405 nm, no eixo y e o logaritmo da concentração de MC-LR no eixo x:

$$y = a \ln x + b$$

A concentração de MC-LR foi calculada de acordo com as instruções do *kit*, usando a seguinte equação:

$$x = EXP \left(\frac{y - b}{a} \right)$$

onde x é a concentração (µg/L) de MC-LR na amostra e y a Abs a 405 nm.

Os efeitos de matriz foram corrigidos subtraindo-se o valor das amostras controlo às amostras expostas à toxina.

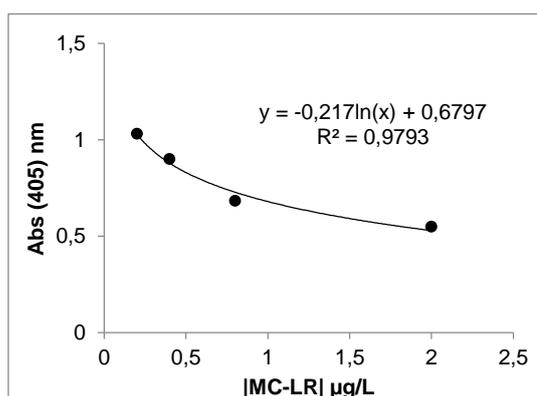


Figura 5 – Curva padrão utilizada no cálculo da [MC-LR] na raiz de *D. carota* através do MicroCystest

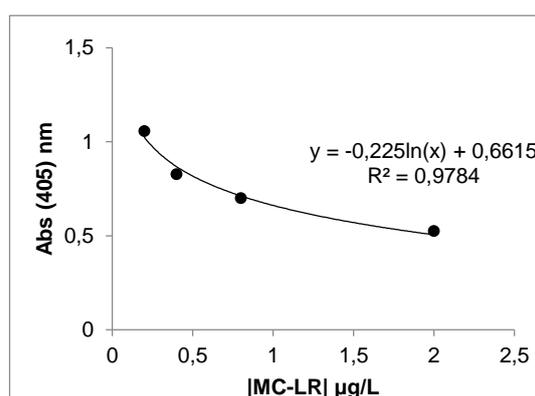


Figura 6 – Curva padrão utilizada no cálculo da [MC-LR] no solo através do MicroCystest

2.5.4. Detecção e Quantificação da MC-LR por ELISA

Foi utilizado o *kit* de ELISA referente à deteção e quantificação de Microcistinas e

Nodularinas (Microcystins-ADDA ELISA, Microtiter Plate, Abraxis®, Warminster, PA, USA) para quantificar a MC presente nas raízes da planta e no solo.

O LOD do *kit* de ELISA utilizado é de 0,1 µg/L e o LOQ de 0,15 µg/L. O princípio do método baseia-se na reação imunoquímica da formação de complexos antígeno-anticorpo, neste caso, no reconhecimento de MC, Nodularinas (Nod) e das suas variantes químicas, por anticorpos específicos que têm como alvo o ADDA. A toxina, quando presente na amostra, e o análogo da MC conjugado a uma proteína, que se encontra imobilizado nas paredes dos poços do *kit*, competem por um número limitado de locais de ligação aos anticorpos anti-MC/Nod presente na solução. A placa é posteriormente lavada e um segundo anticorpo-HRP (solução de conjugado) é adicionado. Depois de nova lavagem, é acrescentada uma solução com substrato cromogénico específico, a tetrametilbenzidina (TMB), que irá reagir com a peroxidase produzindo cor. Como o número de locais de ligação a anticorpos é igual em todos os poços, e cada poço recebe o mesmo número de moléculas de conjugado, uma amostra que contenha uma baixa concentração de MC resulta numa elevada taxa de ligação de anticorpos a moléculas de conjugado, resultando numa solução azul escura. Inversamente, uma alta concentração de MC na amostra permite uma menor ligação de moléculas conjugadas aos anticorpos, obtendo-se uma solução azul clara.

Os padrões, o controlo positivo e as amostras foram aplicadas em duplicado nos poços da microplaca de 96 poço fornecida com o *kit* e efetuando-se o procedimento de acordo com as instruções do fabricante e que se encontram na tabela seguinte:

Tabela 9 - Reagentes adicionados ao padrão, controlo positivo e amostras na realização de ELISA

Solução Adicionada	Quantidade de Solução adicionada (µL)
Solução de Anticorpo*	50
Agitar 30 s e incubar à temperatura ambiente 90 min	
Lavar com 250 µL de tampão de lavagem (3x) e agitar	
Solução de Conjugado**	100
Agitar 30 s e incubar à temperatura ambiente 30 min	
Lavar com 250 µL de tampão de lavagem (3x) e agitar	
Solução de Substrato***	100
Agitar 30 s e incubar à temperatura ambiente e abrigo da luz 30 min	
Solução Stop	50

* Composição da Solução de Anticorpo: anticorpo IgG anti-microcistina

** Composição da Solução de Conjugado: anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase

*** Composição da Solução de Substrato: TMB (3,3,5,5 – tetrametilbenzidina)

A Abs a 450 nm foi determinada num leitor de placas (Biotek Synergy) com *software*

Gen5 1.06. Com base nas ABS das seis soluções padrão de MC (0,0 0,15 0,40 1,0 2,0 e 5,0 µg/L) presentes no kit foi construída uma curva de calibração e determinada a concentração de toxina (µg/L) presente no controlo positivo. Uma vez verificado que o valor da concentração da MC no controlo positivo se encontrava dentro do intervalo esperado ($0,75 \pm 0,185$ µg/L) a equação obtida foi aceite e usada na determinação da concentração de MC presente em cada amostra. Sempre que algum valor de amostra se encontrou acima de 5 µg/L, ou seja, fora da curva de calibração, realizaram-se diluições da amostra (com solução de diluição fornecida no *kit*) e o procedimento experimental foi repetido. Valores inferiores a 0,10 µg/L foram considerados abaixo do LOD. Os efeitos de matriz foram corrigidos subtraindo-se o valor das amostras controlo às amostras expostas à toxina.

2.5.5. Detecção e Quantificação da MC-LR por LC-MS

Para quantificação da MC-LR presente nas amostras das raízes e do solo, procedeu-se à injeção das mesmas num Cromatógrafo de Fase Líquida Finnigan Surveyor, acoplado a um detetor de Espectrometria de Massa MS LCQ Fleet™ de armadilha iónica (*ion trap*), equipado com fonte de ionização eletrónica (ESI) (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). O programa utilizado para aquisição e processamento de dados foi o Xcalibur™ versão 2 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

Todas as condições experimentais foram otimizadas, a fim de garantir a melhor razão sinal-ruído, ou seja, garantir uma maior sensibilidade. Foi utilizado azoto como gás nebulizador (80) e como gás auxiliar (20), ambos de unidades arbitrárias. O potencial aplicado ao capilar foi de 22 kV e a temperatura do capilar metálico foi de 350°C. A voltagem *spray* foi de 5,5 kV e 120 V para as lentes tubulares. O hélio foi utilizado como gás de dissociação de colisão induzida a uma pressão de 3 bar. A separação foi efetuada numa coluna C₁₈ Hypersil GOLD (100 x 4,6 mm I.D, 5 µm, Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA) mantida a 25°C.

Na análise das amostras de cenoura o método de eluição foi gradiente e os solventes utilizados foram MeOH e água acidificados com 0,1% de ácido fórmico (AF) (Tabela 10). No caso da análise das amostras do solo o método de eluição foi igualmente gradiente e os solventes utilizados foram acetonitrilo (ACN) e água acidificados com 0,1% de AF (Tabela 11).

Tabela 10 - Gradiente de eluição utilizado no método LC-MS para quantificação da MC-LR na cenoura

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	H ₂ O + 0,1% AF(%)	MeOH + 0,1% AF (%)
0	0,8	45	55
12		10	90
12,5		0	100
15		0	100
15,01		45	55
25		45	55

Tabela 11 - Gradiente de eluição utilizado no método LC-MS para quantificação da MC-LR no solo

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	H ₂ O + 0,1% AF(%)	ACN + 0,1% AF (%)
0	0,7	70	30
5		70	30
22		1	99
25		1	99
26		70	30
30		70	30

O volume de injeção foi de 20 µL em modo de *loop* parcial. As amostras foram injetadas em modo de polaridade positiva, em *Full scan* (270-1500 m/z), para uma energia de colisão (EC) de 35 eV. Os padrões e as amostras foram injetados em duplicado e em cada conjunto de 10 amostras foram introduzidos brancos e 2 padrões de concentração diferente. A solução padrão de MC-LR foi adquirida na DHI LAB Products (Hørsholm, Dinamarca, lote nº MCLR-110), com uma concentração de 11,026 µg/mL. No caso das amostras de cenoura o sistema foi calibrado usando 6 diluições da solução padrão de MC-LR (0,55 a 11,1 µg/mL) em MeOH 50%. Em função das condições utilizadas, o tempo de retenção do padrão de MC-LR foi 6,07 ± 0,09 min (CV % 1,43). O LOD do aparelho foi de 6,48 µg /L. No caso das amostras do solo o sistema foi calibrado usando 7 diluições da solução padrão de MC-LR (0,0085 a 1,8 µg/mL) em ACN 50%. (Figura 7). Em função das condições utilizadas, o tempo de retenção do padrão de MC-LR foi 10,77 ± 0,19 min (CV % = 1,80). O LOD e LOQ do aparelho foram respectivamente de 5,7 µg /L e 8,5 µg /L.

As amostras foram analisadas usando a razão massa/carga (*m/z*) das transições 995> 599. O íon precursor (*m/z* 995) e os fragmentos iônicos de referência da MC-LR, com valores *m/z* de 375, 553, 599, 866 e 977, foram monitorizados no modo MS/MS, de forma a confirmar a presença da toxina nos tecidos da planta e no solo.

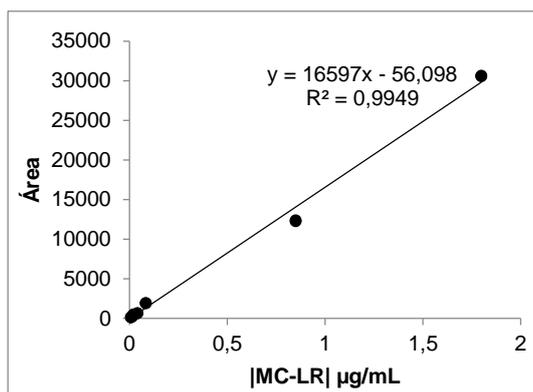


Figura 7 - Reta padrão utilizada no cálculo da |MC-LR| no solo por LC-MS

2.5.6. Cálculo do Fator de Bioconcentração (FBC)

O fator de bioconcentração (FBC) da toxina nos tecidos da planta foi calculado utilizando a seguinte equação (Karjalainen *et al.*, 2003):

$$FBC = [MC - LR]_{recuperada\ dos\ tecidos\ da\ cenoura} / [MC - LR]_{administrada\ ao\ solo}$$

2.6. Quantificação de Minerais na Raiz de *D. carota* (cenoura)

2.6.1. Preparação das Soluções e das Amostras para Análise

2.6.1.1. Preparação das Soluções

Todo o material usado na preparação das amostras foi descontaminado com HNO_3 (10% v/v) e lavado 3 vezes com água ultrapura. Na preparação das soluções foram utilizados reagentes de grau analítico HNO_3 (65% w/w, TraceSELECT® Ultra, Fluka, L'Isle d'Abeau Chesnes, França) e H_2O_2 (30% v/v, TraceSELECT® Fluka, Seelze, Alemanha) assim como água ultrapura (18 MΩ cm, a 25°C) obtida através de um sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos). As soluções de calibração foram obtidas por diluição rigorosa da solução padrão-mãe, utilizando-se para tal micropipetas e balões volumétricos de volume adequado ao propósito em causa.

Foi usado material de referência certificado BCR 679 (Repolho branco, fornecido pelo EC Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Bélgica) de forma a verificar a precisão e exatidão dos procedimentos analíticos realizados.

2.6.1.2. Preparação das Amostras

Depois de recolhidas, as raízes foram lavadas com água desionizada, de forma a remover contaminações de solo, e congeladas a -80°C . Posteriormente, procedeu-se à sua liofilização (Lyoquest) por um período de uma semana. Depois de liofilizadas, as amostras foram trituradas e homogeneizadas com auxílio de um homogeneizador de lâminas (Grindomix GM 200, Retsch, Haan, Alemanha).

Pesaram-se cerca de 0,2 g de amostra liofilizada em vasos de politetrafluoretileno (PTFE) e adicionaram-se 3 mL de HNO_3 (65%, w/w) e 1 mL de H_2O_2 (30%, v/v), que foram levados ao micro-ondas de digestão (MLS 1200 *Mega high performance microwave digestion unit*, Milestone, Sorisole, Itália), equipado com um rotor HPR-1000/10 S, e submetidos ao programa de digestão cujas condições se encontram descritas na Tabela 12.

Tabela 12 - Condições do programa de digestão utilizado para preparação das amostras para quantificação de minerais

Etapa	Duração (min)	Potência (W)
1	1	250
2	2	0
3	5	250
4	5	400
5	5	600

No final da digestão, as amostras foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, perfazendo-se o volume com adição de água ultrapura. Este procedimento foi realizado para as 21 amostras, bem como para o material de referência certificado. Em cada digestão, realizou-se ainda um branco (branco do procedimento de digestão), que consistiu na repetição do procedimento de digestão, na ausência de material biológico.

2.6.2. Determinação do Conteúdo de Minerais

Todos os procedimentos para a determinação de minerais nas raízes de *D. carota* (cenoura), descritos de forma sucinta nos pontos seguintes, foram previamente otimizados no laboratório de Bromatologia e Hidrologia, Departamento de Química do REQUIMTE, Faculdade de Farmácia, da Universidade do Porto. Todos os cálculos de concentração foram realizados em função do peso seco da cenoura.

2.6.2.1. Análise por Espectrometria de Massa com Fonte Indutiva de Plasma (ICP-MS)

O sistema de ICP-MS usado foi da marca VG Elemental, modelo PlasmaQuad 3 (Winsford, UK). Para a introdução da amostra usou-se uma bomba peristáltica Minipuls 3 (Gilson, Villiers le Bel, França) e como fonte de plasma foi utilizado argônio com 99,9% pureza (Alphagaz 2™).

As condições utilizadas na análise por ICP-MS foram as descritas na tabela seguinte:

Tabela 13 - Condições instrumentais do equipamento de ICP-MS utilizado na quantificação de Mn, Fe, Cu, Zn, Mo

Caudal do Árgon (L/min)	13 (plasma)
	0,7 (auxiliar)
	0,8 (nebulizador)
Potência de radiofrequência (W)	1350
Tempo de integração (ms)	200
Modo de detecção:	<i>Pulse Counting</i>

Os isótopos elementares (razão m/z) ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{65}Cu , ^{66}Zn , e ^{95}Mo foram monitorizados para determinação analítica. Os isótopos ^{45}Sc , ^{89}Y , ^{115}In , ^{159}Tb e ^{209}Bi foram usados como padrões internos. Para esta análise foram utilizadas soluções multi-elemento 10 $\mu\text{g/mL}$ fornecidas pela AccuStandard® (New Haven, CT, Estados Unidos). O aparelho foi ajustado para a máxima sensibilidade e estabilidade, sempre que se justificava, usando ^{115}In como isótopo alvo. Os limites de detecção foram estabelecidos como sendo a concentração correspondente a 3 desvios-padrão de 10 integrações repetidas do branco (HNO_3 2% v/v) e encontram-se representados na tabela seguinte.

Tabela 14- Limites de detecção e de quantificação do ICP-MS

	Ferro (Fe)	Manganésio (Mn)	Cobre (Cu)	Molibdênio (Mo)	Zinco (Zn)
LOD ($\mu\text{g/L}$)	30,7	0,045	0,003	0,0002	0,002
LOQ ($\mu\text{g/L}$)	102,3	0,151	0,011	0,0008	0,006

Tanto o controle do equipamento de ICP-MS, como a aquisição de dados foram efetuados utilizando o PlasmaLab Software (Thermo Electron). As retas de calibração utilizadas para o cálculo da concentração para os diferentes elementos estão representadas nas figuras seguintes (Figura 8 a 12).

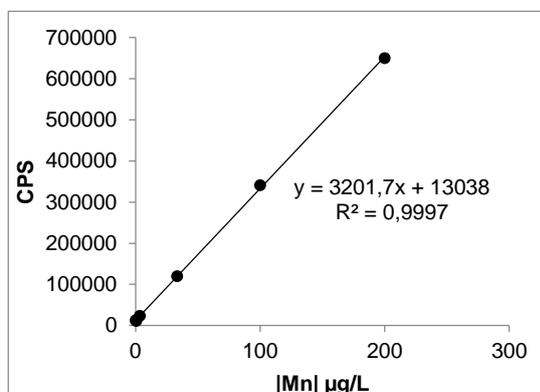


Figura 8 – Reta padrão utilizada no cálculo da [Mn] na raiz de *D. carota* através de ICP-MS

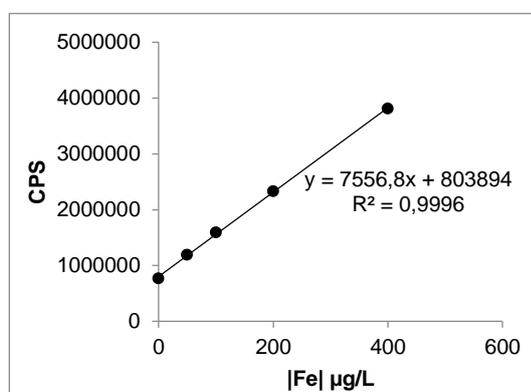


Figura 9 – Reta padrão utilizada no cálculo da [Fe] na raiz de *D. carota* através de ICP-MS

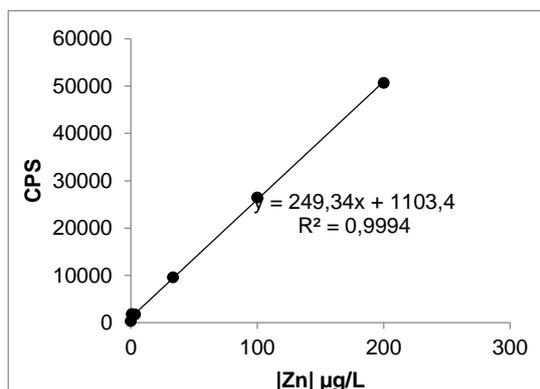


Figura 10 – Reta padrão utilizada no cálculo da [Zn] na raiz de *D. carota* através de ICP-MS

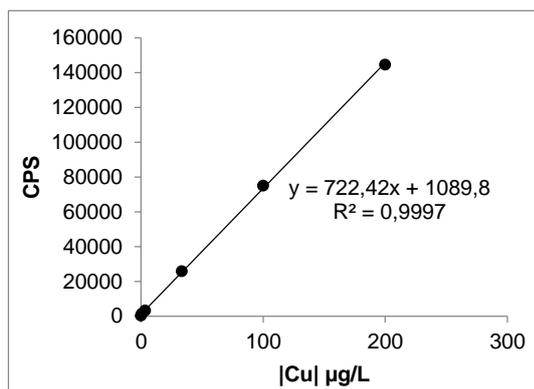


Figura 11 – Reta padrão utilizada no cálculo da [Cu] na raiz de *D. carota* através de ICP-MS

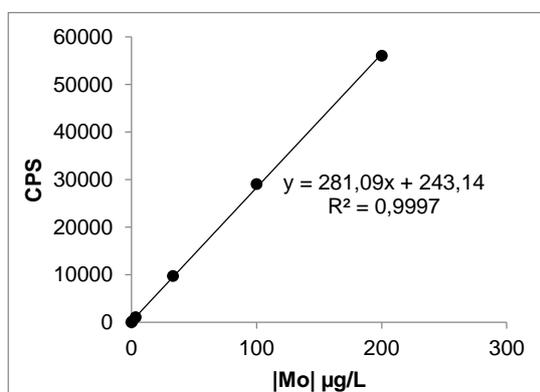


Figura 12 – Reta padrão utilizada no cálculo da [Mo] na raiz de *D. carota* através de ICP-MS

2.6.2.2. Análise por Espectrofotometria de Absorção Atômica com Atomização em Chama (EAA/Chama).

A determinação da concentração de cálcio (Ca), magnésio (Mg), sódio (Na) e potássio (K) foi realizada recorrendo ao espectrómetro de absorção atômica da marca PerkinElmer® modelo 3100 (Überlingen, Alemanha) com chama ar-acetileno. Como fonte de radiação utilizaram-se lâmpadas de cátodo oco da marca PerkinElmer® (Überlingen, Alemanha).

As amostras foram diluídas com água ultrapura, de forma a serem detetadas pelo aparelho. Os comprimentos de onda, e as gamas de linearidade utilizadas encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15 - Parâmetros utilizados na quantificação dos elementos Ca, Mg, Na e K por EAA/Chama

	Cálcio (Ca)	Magnésio (Mg)	Sódio (Na)	Potássio (K)
Comprimento de onda (nm)	422	285,2	589	766
Gama de Linearidade (mg/L)	1 / 5	0,1 / 0,5	0,4 / 2	0,4 / 2
LOD (mg/L)	0,013214	0,00114	0,00585	0,0163
LOQ (mg/L)	0,044047	0,0038	0,0195	0,05433

Às amostras (cenoura, referência e brancos) destinadas à determinação de Ca foi adicionado uma solução de 10% de La, para controlar as interferências químicas.

Os padrões de calibração multi-elemento foram preparados a partir de 1000 mg/L de soluções-padrão de um único elemento de Ca, Mg, K e Na (Sigma, St. Louis MO, Estados Unidos). As retas de calibração utilizadas para o cálculo da concentração dos elementos foram as representadas nos gráficos seguintes (Figura 13 a 16).

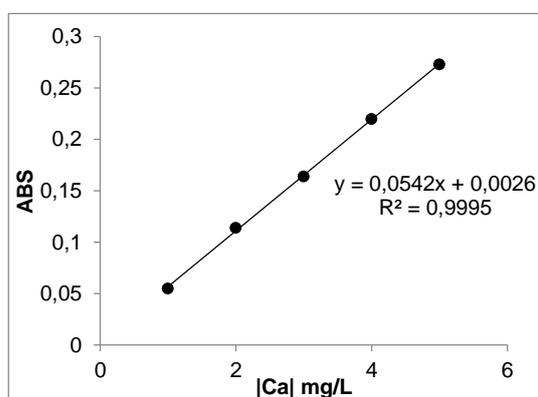


Figura 13 – Reta padrão utilizada no cálculo da [Ca] na raiz de *D. carota* através de EAA/Chama

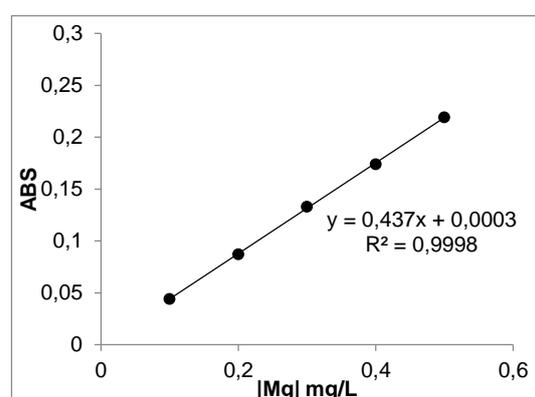


Figura 14 – Reta padrão utilizada no cálculo da [Mg] na raiz de *D. carota* através de EAA/Chama

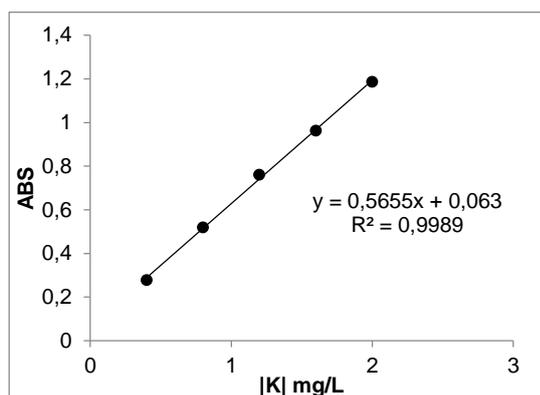


Figura 15 – Reta padrão utilizada no cálculo da |K| na raiz de *D. carota* através de EAA/Chama

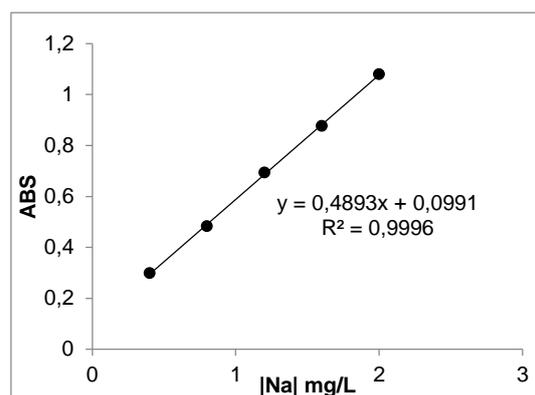


Figura 16 – Reta padrão utilizada no cálculo da |Na| na raiz de *D. carota* através de EAA/Chama

2.6.2.3. Determinação do Teor de Fósforo por Espectrofotometria

A determinação do teor de fósforo (P) das amostras foi efetuada através de espectrofotometria UV-Visível, realizada num espectrofotómetro UV-1800 marca Shimadzu (Tóquio, Japão). Os padrões de calibração foram preparados em balões volumétricos de 25 mL a partir de uma solução padrão de fósforo de 1000 mg/L. O pH dos mesmos foi ajustado através da adição de 4M NaOH e de 0,25M H₂SO₄, tendo sido utilizado como indicador de pH o p-nitrofenol. Posteriormente, adicionaram-se 4 mL de solução de Murphy-Riley (composição na Tabela 16) diluída para 100 mL e preparada diariamente, fez-se o volume de 25 mL com água ultrapura, agitou-se a solução e deixou-se em repouso durante 15 min para desenvolvimento de cor. A reta de calibração utilizada para o cálculo da concentração de fósforo nas amostras encontra-se representada na Figura 17. O LOD e o LOQ foram, respetivamente, 0,020 mg/mL e 0,065 mg/mL.

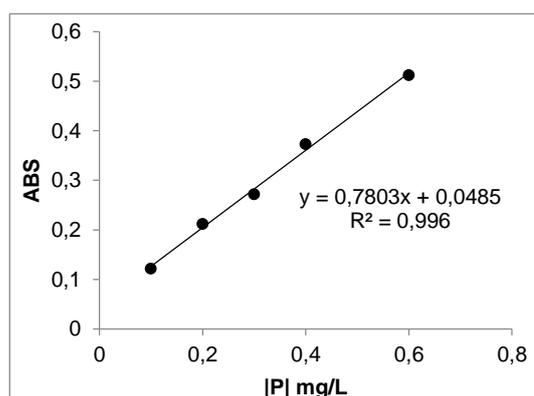


Figura 17 - Reta padrão utilizada no cálculo da |P| na raiz de *D. carota* através de espectrofotometria

As amostras foram preparadas da mesma forma que os padrões de calibração, tendo apenas a adição de solução padrão de fósforo de 1000 mg/L sido substituída pela adição de amostra, amostra de referência e branco digerido.

Todas as amostras e padrões foram lidas a 880 nm.

Tabela 16 - Composição da solução de Murphy-Riley

Solução	Volume (mL)
2,5M H ₂ SO ₄	50
A*	15
B**	10
C***	5

* Composição Solução A: 4g de molibdato de amónia em 100 mL água ultrapura

** Composição Solução B: 5,28g de ácido ascórbico em 100 mL água ultrapura

*** Composição Solução C: 0,291g de tartarato de antimônio e potássio em 100 mL de água ultrapura

2.7. Extração, Quantificação e Detecção de Ácido Ascórbico na Raiz de *D. carota* (cenoura)

2.7.1. Extração de Ácido Ascórbico

A extração da vitamina foi realizada com base no processo descrito por Ismail & Sook Fun (2003), com ligeiras alterações. Homogeneizou-se cerca de 10 g da amostra em 20 mL de solução de extração contendo ácido metafosfórico (0,3M) e ácido acético (1,4M), em banho de gelo e tubos de 50 mL tapados com folha de alumínio. De seguida, a mistura foi agitada a 100 rpm durante 15 minutos, num agitador orbital, a temperatura ambiente. Procedeu-se imediatamente à centrifugação das amostras (4600 rpm, 10 min, 4°C) e recolheu-se o sobrenadante, para tubos de vidro tapados com folha de alumínio, posteriormente utilizado para quantificação por HPLC.

2.7.2. Quantificação e Detecção de Ácido Ascórbico por HPLC-PDA

O extrato de cenoura foi analisado por HPLC-PDA, de forma a detetar e quantificar a vitamina C, Ácido Ascórbico, na matriz, de acordo com a metodologia descrita por Ismail e Shook Fun (2003).

Para a quantificação utilizou-se padrão de ácido ascórbico (Supelco, Bellefonte, PA, USA, Lote nº LC01471V), 1000 mg e pureza de 99,4 %.

O sistema de cromatografia e a coluna de separação utilizados foram os descritos na secção 2.2, contudo a temperatura de manutenção da coluna foi alterada para 25°C.

Todos os solventes utilizados foram filtrados (Pall GH Polypro 47 mm, 0,2µm, Pall Corporation) e desgaseificados em banho de ultrasons (Sonorex™ Super RK 100H).

A fase móvel foi constituída por:

- MeOH + TFA 0,1% (v/v)
- Água ultrapura + TFA 0,1% (v/v)

A separação cromatográfica foi feita com um fluxo de 0,8 mL/min, em modo isocrático, sendo o eluente MeOH 1%.

O tempo de retenção do pico de ácido ascórbico foi de $4,03 \pm 0,04$ min (CV % 0,97). O comprimento de onda característico do ácido ascórbico é de 250 nm, quantificado pelo método de padrão externo. O sistema foi calibrado usando 9 diluições do padrão de ácido ascórbico (0,5 a 30 $\mu\text{g/mL}$) em solvente de extração (ver secção 2.7.1.) (Figura 18). Cada concentração do padrão e cada amostra foram injetadas em duplicado (10 μL). Os LOD=0,13 $\mu\text{g/mL}$ e LOQ=0,25 $\mu\text{g/mL}$ do ácido ascórbico foram calculados através do sinal-ruído de 3 e 10, respetivamente.

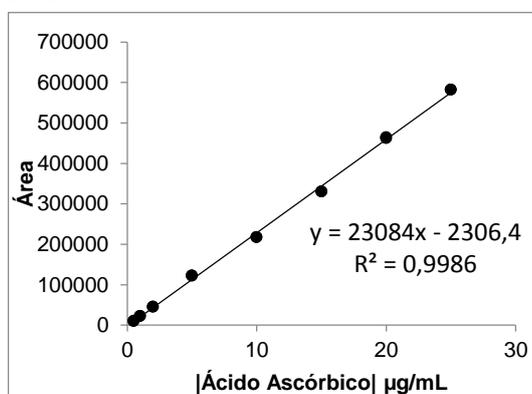


Figura 18 - Reta padrão utilizada no cálculo da [Ácido Ascórbico] na raiz de *D. carota* através de HPLC

2.8. Extração, Quantificação e Detecção de β -Caroteno na Raiz de *D. carota* (cenoura)

2.8.1. Extração de β -Caroteno

A extração de β -Caroteno foi realizada com base no procedimento descrito por Ahamad *et al.* (2007), com pequenas modificações. Homogeneizou-se 10 g da amostra (cenoura) em 70 mL de acetona contendo BHT 0,1%, com auxílio de um homogeneizador de lâminas. De seguida, a mistura foi filtrada num funil de Büchner, lavando-se o resíduo duas vezes com 40 mL da mesma solução até o mesmo adquirir uma tonalidade amarela, tendo sido posteriormente descartado. Adicionaram-se 20 g de sulfato de sódio anidro ao filtrado, posteriormente removido através de uma segunda filtração, tendo o volume do extrato sido reduzido, cerca de 7 vezes, com auxílio do rotavapor (R-210, BÜCHI, Flawil, Suíça), equipado com controlador de vácuo (V-850, BÜCHI, Flawil, Suíça), bomba de

vácuo (V-700, BÜCHI, Flawil, Suíça), banho de calor (B-491, BÜCHI, Flawil, Suíça) e sistema refrigerador (minichiller, Huber, Offenburg, Alemanha). Transferiu-se o concentrado para um balão volumétrico de 50 mL perfazendo-se o restante volume com acetona 80% que continha BHT 0,1%. A solução foi posteriormente usada para quantificação do β -Caroteno por HPLC.

2.8.2. Quantificação de β -Caroteno por HPLC-PDA

O extrato de β -Caroteno foi analisado por HPLC-PDA de forma a detetar e quantificar o precursor da vitamina A, β -caroteno, de acordo com a metodologia descrita por Ismail e Shook Fun (2003) e por Ahamad *et al.* (2007) com algumas modificações.

Para a quantificação utilizou-se padrão de β -caroteno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Lote nº SLBB9126V), 5 mg e pureza de 95%.

O sistema de cromatografia e a coluna de separação utilizados foram os descritos na secção 2.2, contudo a temperatura de manutenção da coluna foi alterada para 30 °C.

Todos os solventes utilizados foram filtrados (Pall GH Polypro 47 mm, 0,2 μ m, Pall Corporation) e desgaseificados em banho de ultrasons (Sonorex™ Super RK 100H).

A fase móvel foi constituída por:

- MeOH + TFA 0,1% (v/v)
- Hexano + TFA 0,1% (v/v)

A separação cromatográfica foi feita com um fluxo de 0,8 mL/min, usando um gradiente de eluição cujo programa se encontra na tabela seguinte:

Tabela 17 - Gradiente de eluição do HPLC para análise de β -caroteno

Tempo (min)	Canal A MeOH (%)	Canal B Hexano (%)
0	85	15
5	85	15
15	70	30
16	85	15
20	85	15

O tempo de retenção do pico de β -caroteno foi de 11,19 \pm 0,11 min (CV % 0,98). O comprimento de onda caraterístico do β -caroteno é de 450nm, o qual foi quantificado pelo método de padrão externo. O sistema foi calibrado usando 8 diluições do padrão de β -caroteno (2 a 25 μ g/mL) em hexano (Figura 19). Cada concentração do padrão e cada

amostra foram injetadas em duplicado (20 μL). Os LOD=3 $\mu\text{g/ml}$ e LOQ=4 $\mu\text{g/mL}$ do β -caroteno foram calculados através do sinal-ruído de 3 e 10, respetivamente.

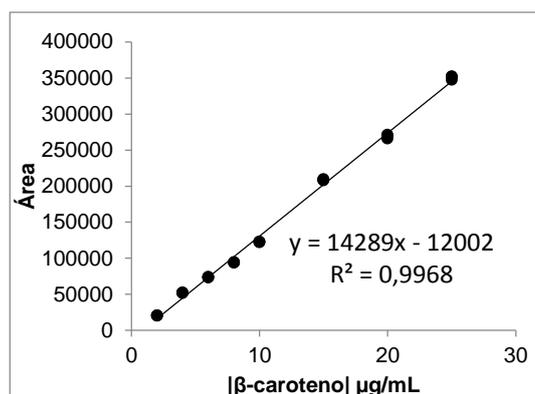


Figura 19 - Reta padrão utilizada no cálculo da [β -caroteno] na raiz de *D. carota* através de HPLC

2.9. Análise Estatística

Todos os ensaios foram efetuados em triplicado ($n=3$). Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk de forma a verificar se as variáveis seguiam uma distribuição normal ($p>0,05$). Através do teste de Levene, verificou-se a igualdade de variâncias nas amostras (homogeneidade de variâncias) ($p>0,05$). Quando as variáveis seguiam uma distribuição normal e estavam homogeneamente distribuídas, os dados foram sujeitos a uma análise de variância paramétrica *One-Way ANOVA* e representados pela média \pm desvio padrão. As diferenças nos valores das médias entre grupos foram avaliadas pelo teste Tukey e foram consideradas estatisticamente significativas a um $p < 0,05$ (Zar, 1999). Quando as variáveis não apresentaram uma distribuição normal ou se verificou existir heterogeneidade de variâncias, mesmo após transformação dos dados, optou-se por uma análise não paramétrica *Kruskal-Wallis one-way analysis*, sendo que nos casos em que se verificou significância estatística ($p<0,05$), procedeu-se à comparação entre grupos pelo teste Mann-Whitney U com correção de Dunn-Bonferroni.

Todas as análises foram implementadas no programa IBM SPSS Statistics versão 22).

3. RESULTADOS

3.1. Quantificação da MC-LR no Extrato Bruto de *M. aeruginosa* por HPLC-PDA

O extrato bruto de *M. aeruginosa* foi quantificado por HPLC-PDA (exemplo de um dos extratos quantificados na Figura 20) de forma a determinar a concentração nominal de MC-LR para preparação das soluções de rega utilizadas nos ensaios de exposição. A concentração nominal média de MC-LR no extrato bruto de *M. aeruginosa* obtida nas várias quantificações foi de $24,4 \pm 2,33 \mu\text{g/mL}$ para o primeiro ensaio, $26,2 \pm 2,45 \mu\text{g/mL}$ para o segundo e $67,5 \pm 1,13 \mu\text{g/mL}$ para o terceiro.

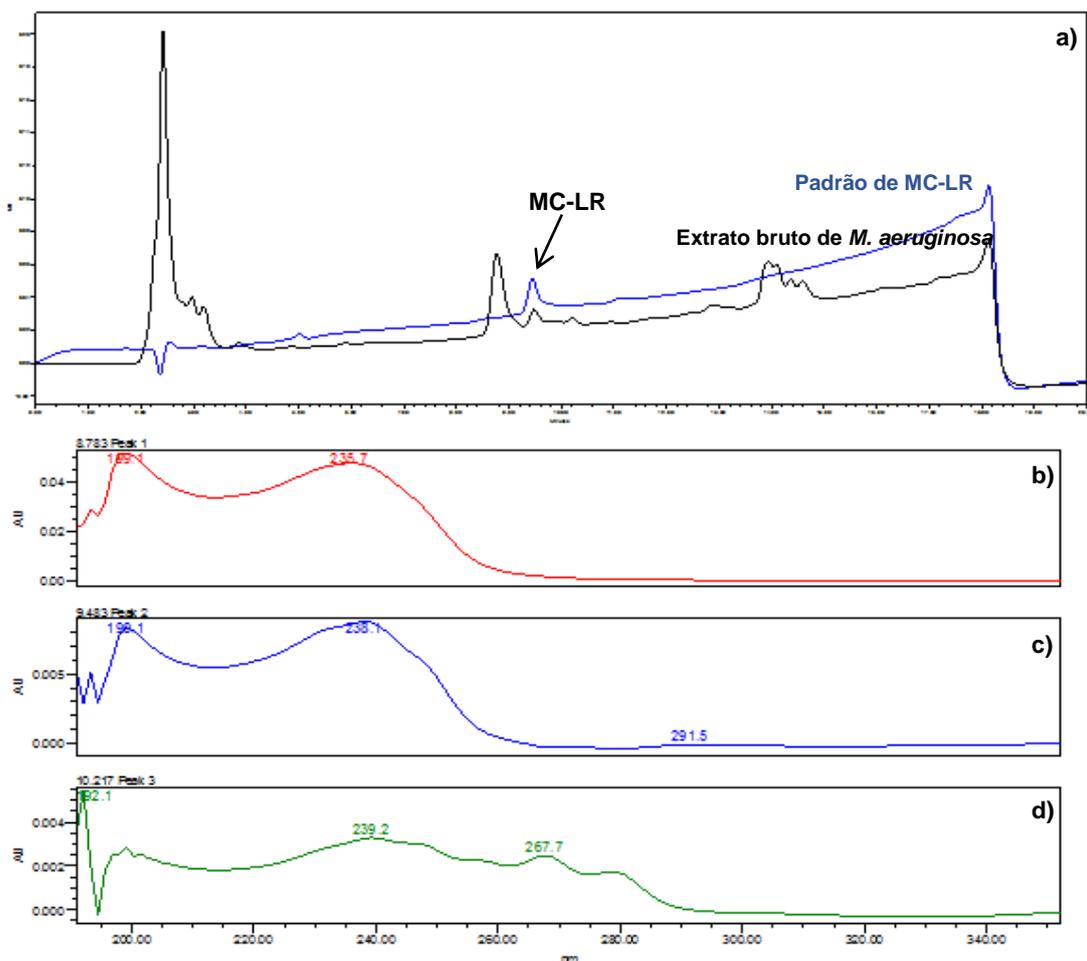


Figura 20 - a) Cromatograma de um padrão de MC-LR (4,8 $\mu\text{g/mL}$) e de um extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. Espectros de absorção relativos ao pico da MC-LR (c) bem como aos picos de tempo de retenção próximos da mesma (b e d) obtidos por HPLC

3.2. Análise do Estado Morfofisiológico das Plantas

3.2.1. Avaliação do Estado Inicial das Plantas

Foram medidos vários parâmetros fisiológicos e conteúdo de minerais ao tempo 0 de forma a permitir um registo da evolução dos mesmos nas plantas desde a fase inicial até à exposição à toxina (ensaios 1 e 2). Os resultados encontram-se nas tabelas seguintes:

Tabela 18 - Parâmetros fisiológicos das plantas no início do ensaio 1 (dia 0)

Parâmetro Morfofisiológico	
Peso Fresco Folha	1,76 ± 0,12 g
Peso Fresco da Raiz	0,94 ± 0,02 g
Peso Seco da Folha	0,25 ± 0,03 g
Peso Seco da Raiz	0,09 ± 0,02 g
Fluorescência	821,56 ± 3,54

* Valores representados em função da média ± desvio padrão.

Tabela 19 - Concentração basal dos diferentes micronutrientes minerais nas plantas no início do ensaio 2 (dia 0)

Mineral	(µg/g)*
Ferro (Fe)	2,96 ± 1,01
Manganésio (Mn)	11,54 ± 1,16
Cobre (Cu)	2,04 ± 0,12
Zinco (Zn)	4,47 ± 0,69
Molibdénio (Mo)	455,62 ± 25,74

* Valores representados em função da média ± desvio padrão.

Tabela 20 - Concentração basal dos diferentes macronutrientes minerais nas plantas no início do ensaio 2 (dia 0)

Mineral	(µg/g)*
Cálcio (Ca)	2096,94 ± 63,92
Magnésio (Mg)	1112,11 ± 26,86
Sódio (Na)	5969,53 ± 568,28
Potássio (K)	18,01 ± 0,46
Fósforo (P)	1062,36 ± 20,41

* Valores representados em função da média ± desvio padrão.

3.2.2. Peso Fresco

Através da ANOVA verificou-se não existir diferenças significativas relativamente ao P.F entre os três grupos experimentais ($p= 0,563$ e $p= 0,609$ para raízes e folhas, respetivamente) ao fim de 14 dias de crescimento e exposição das plantas à toxina. No entanto, após uma exposição mais prolongada (28 dias) verificou-se uma variação significativa do P.F das raízes ($p= 0,008$) ao contrário das folhas ($p = 0,183$). Uma análise pelo teste de Tukey permitiu verificar que as diferenças ocorreram entre o grupo controlo e grupo exposto a $50 \mu\text{g/L}$ MC-LR ($p = 0,020$) e entre os grupos tratamento ($p = 0,010$) (Figura 21a e b).

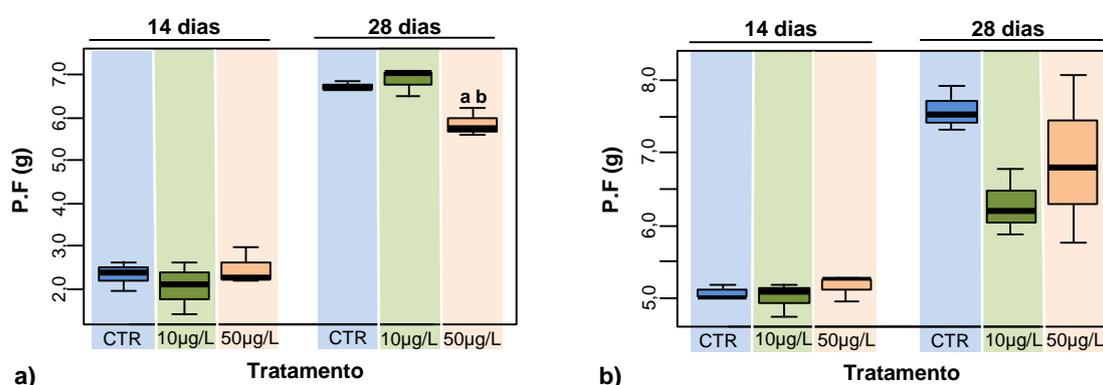


Figura 21 - Peso fresco (P.F) médio das raízes **a)** e folhas **b)** de *D. carota* após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. As diferenças significativas entre o controlo e os diferentes tratamentos são indicados por **a** ($p < 0,05$) e as diferenças entre os dois tratamentos são indicadas por **b** ($p < 0,05$). Grupo controlo (CTR); grupos tratamento ($10 \mu\text{g/L}$ e $50 \mu\text{g/L}$ MC-LR)

3.2.3. Peso Seco

A ANOVA calculada revelou que o peso seco (P.S) das raízes não apresentou diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais ao fim de 14 ($p=0,141$) e 28 ($p=0,877$) dias de crescimento das plantas. As diferenças no P.S das folhas também não se revelaram significativas ao longo do ensaio ($p=0,932$ e $p=0,938$ ao fim de 14 e 28 dias, respetivamente) (Figura 22a e b).

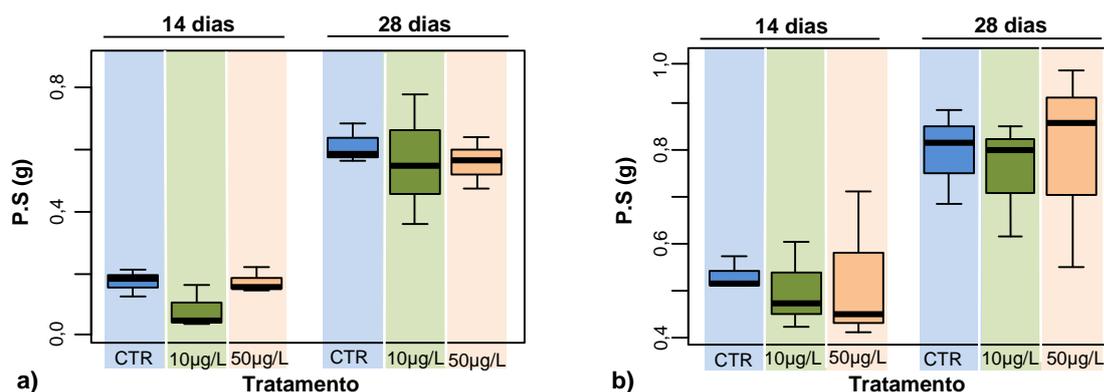


Figura 22 - Peso seco (P.S) médio das raízes **a)** e folhas **b)** de *D. carota* após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. Grupo controle (CTR); grupos tratamento (10 µg/L e 50 µg/L MC-LR)

3.2.4. Capacidade Fotossintética

Por intermédio do teste Kruskal Wallis verificou-se que uma exposição das plantas ao extrato bruto contendo MC-LR induziu um aumento significativo da eficiência máxima do fotossistema II (F_v / F_m) das plantas ao fim de 14 ($p=0,001$) e 28 ($p=0,002$) dias de crescimento. Pelo teste Mann Whitney U com correção de Dunn-Bonferroni verificou-se que as diferenças ocorreram para ambos os grupos tratamento em relação ao grupo controle ($p=0,001$ e $p=0,031$ para os tratamentos com 10 e 50 µg/L MC-LR, respetivamente) ao fim de 14 dias de crescimento e exposição ao extrato tóxico. Após 28 dias de crescimento persistiu a diferença na eficiência máxima do fotossistema II entre o grupo exposto a 10 µg /L MC-LR e o grupo controle ($p = 0,001$) (Figura 23). Em ambos os tempos estudados foram as plantas expostas a extrato bruto contendo 10 µg/L de MC-LR as que apresentaram maior razão F_v / F_m , seguidas das plantas expostas a extrato bruto contendo 50 µg/L de

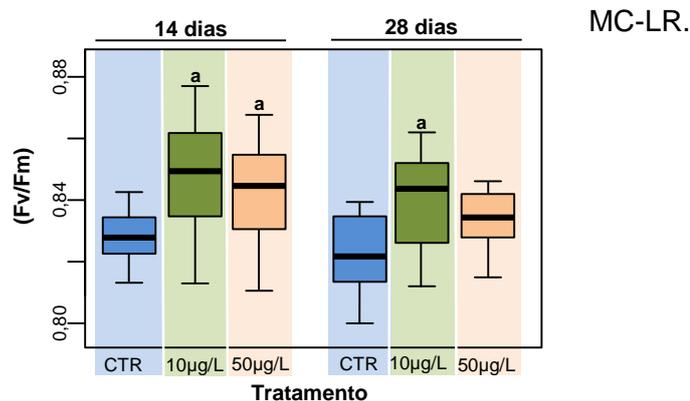


Figura 23 - Eficiência máxima média do fotossistema II (F_v / F_m) em folhas de *D. carota* após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. As diferenças significativas entre o controle e os diferentes tratamentos são indicadas por **a** ($p < 0,05$) e as diferenças entre os dois tratamentos são indicadas por **b** ($p < 0,05$). Grupo controle (CTR); grupos tratamento (10 µg/L e 50 µg/L MC-LR)

3.3. Quantificação da MC-LR na Raiz de *D. carota* (cenoura)

3.3.1 MicroCystest

A acumulação de MC-LR nas cenouras para as concentrações de exposição utilizadas (10 e 50 µg MC-LR/L) foi inferior ao limite de deteção do método, ao fim de 14 e de 28 dias de exposição ao extrato tóxico, pelo que a sua quantificação não foi possível (Tabela 21).

Tabela 21 – Quantificação de MC-LR na cenoura após 14 e 28 dias de exposição ao extrato de *M. aeruginosa* contendo 10 e 50 µg MC-LR/L. LOD = 0,18 µg/L.

	Controlo	10 µg/L	50 µg/L
Concentração após 14 dias (µg/L)	<LOD	<LOD	<LOD
Concentração após 28 dias (µg/L)	<LOD	<LOD	<LOD

3.3.2 ELISA

Através da quantificação por ELISA verificou-se que após 28 dias de exposição (8 regas) a extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 50 µg MC-LR/L, foi possível quantificar a toxina, no valor de $5,23 \pm 0,47$ ng MCs/g de cenoura (P.F), o equivalente a 0,32% do total de toxina administrada ao longo do ensaio (1635,43 ng MC-LR /g P.F cenoura).

O FBC calculado foi de 0,043.

3.3.3 LC-MS

A quantificação de MC-LR livre nos tecidos das plantas foi efetuada por LC-MS. Através da análise do cromatograma TIC (cromatograma iónico total) do padrão (Figura 24) foi possível determinar o tempo de retenção da MC-LR ($6,07 \pm 0,09$ min) bem como o ião precursor (m/z 995) e os fragmentos iónicos de referência identificativos da MC-LR (m/z 375, 553, 599, 866 e 977), presentes no espectro apresentado na mesma figura. Em nenhuma das amostras das raízes das plantas expostas a extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 10 e 50 µg MC-LR/L (exemplo na Figura 26) foi encontrada a molécula com o tempo de retenção do padrão de MC-LR. Nos espectros de massa obtidos não foram detetados os fragmentos iónicos de referência identificativos da MC-LR referidos anteriormente, o que mostra que a MC-LR não foi acumulada nas plantas expostas ao extrato bruto de *M. aeruginosa*, ou está presente na cenoura mas em concentrações abaixo

do LOD do método (6,48 µg/L). As semelhanças dos perfis cromatográficos das amostras expostas e não expostas ao extrato bruto reforçam a hipótese de que as moléculas detetadas pelo método são constituintes da matriz da cenoura e não têm relação com a exposição ao extrato tóxico (Figura 25 e 26).

Após dopagem de uma matriz controlo com uma concentração de MC-LR conhecida (0,55 µg/mL) verificou-se, através da análise do cromatograma TIC um pico sinal com o mesmo tempo de retenção da MC-LR padrão bem como o ião precursor (m/z 995) e pelo menos dois dos fragmentos iónicos de referência identificativos da MC-LR (m/z 375, 599) após análise do espectro de massa. Esta dopagem das amostras demonstrou que o método utilizado é adequado para este tipo de matriz vegetal pois não houve qualquer supressão de sinal (Figura 27).

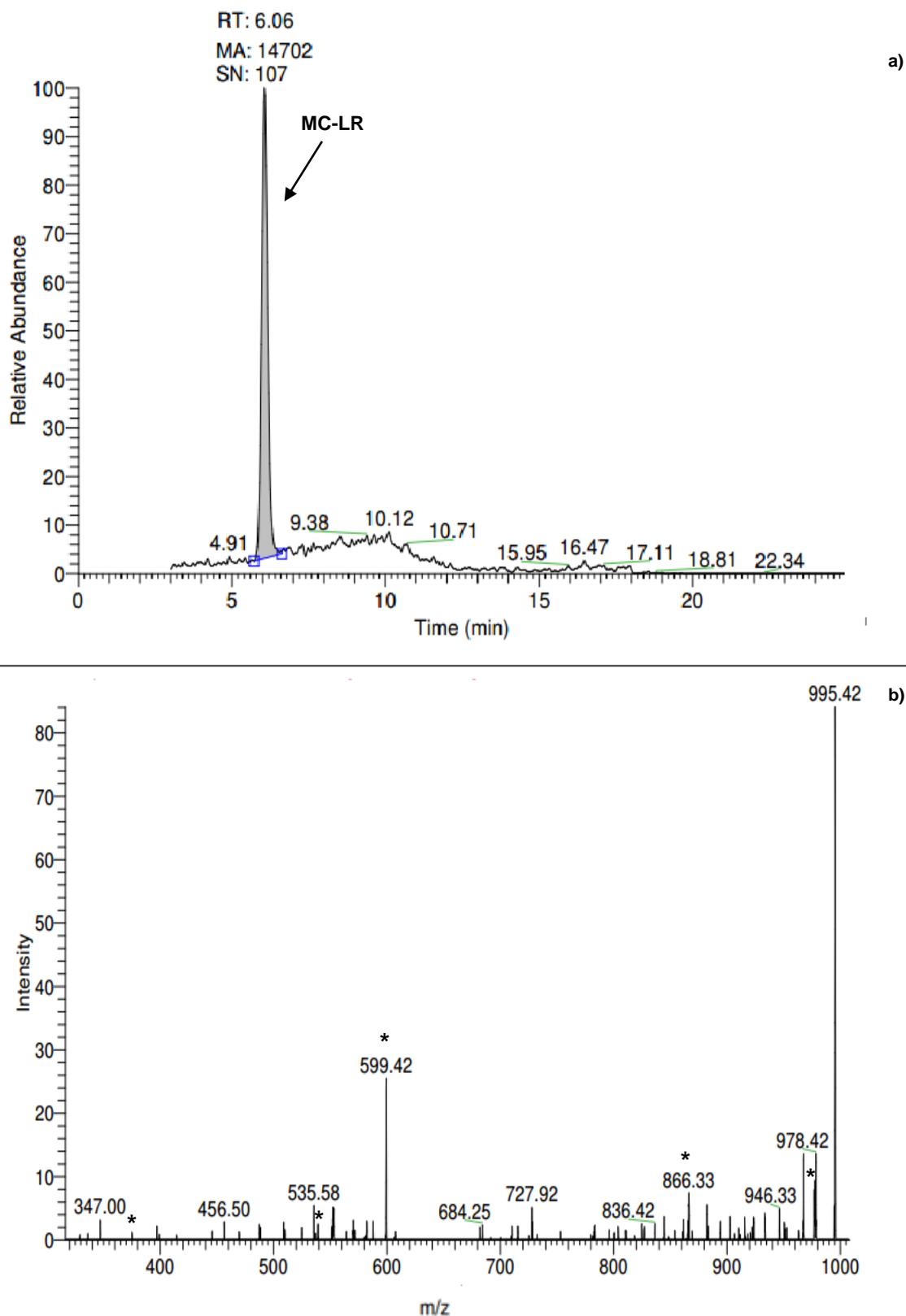


Figura 24 - a) Cromatograma TIC de um padrão de MC-LR (1,1 $\mu\text{g/mL}$) e b) espectro de massa correspondente ao tempo de retenção (6,06 min) com MeOH como eluente. Os fragmentos iônicos de referência da MC-LR estão assinalados com *

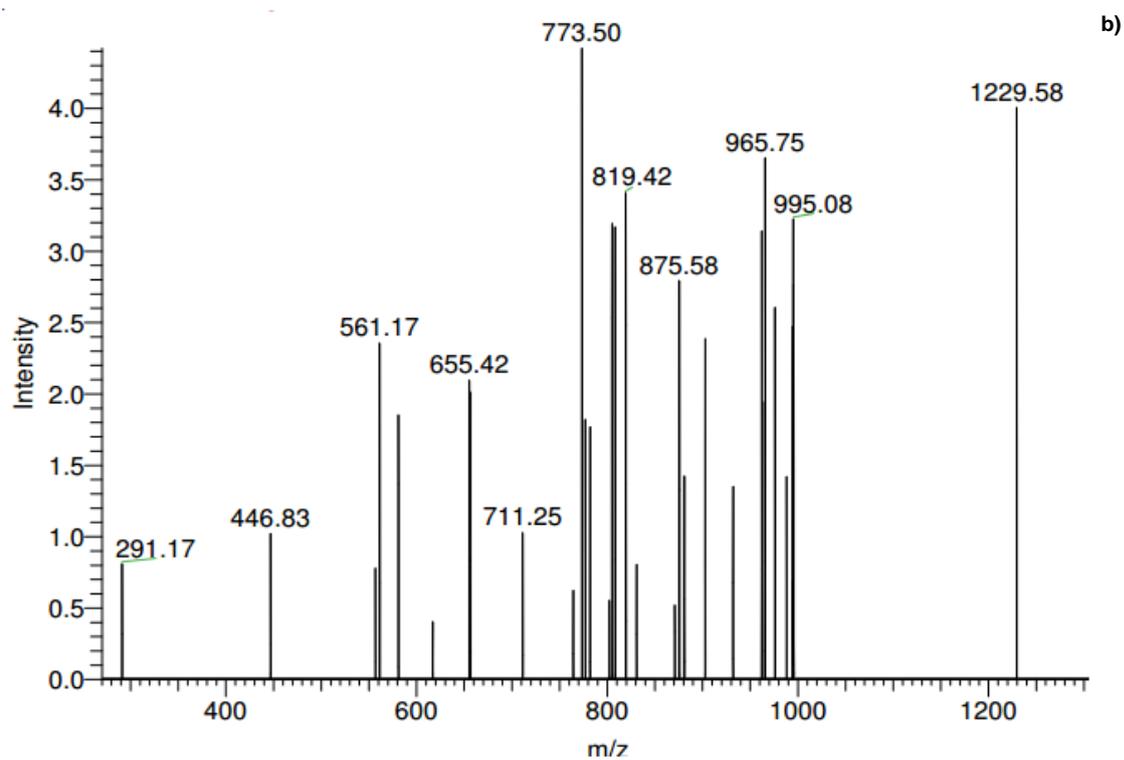
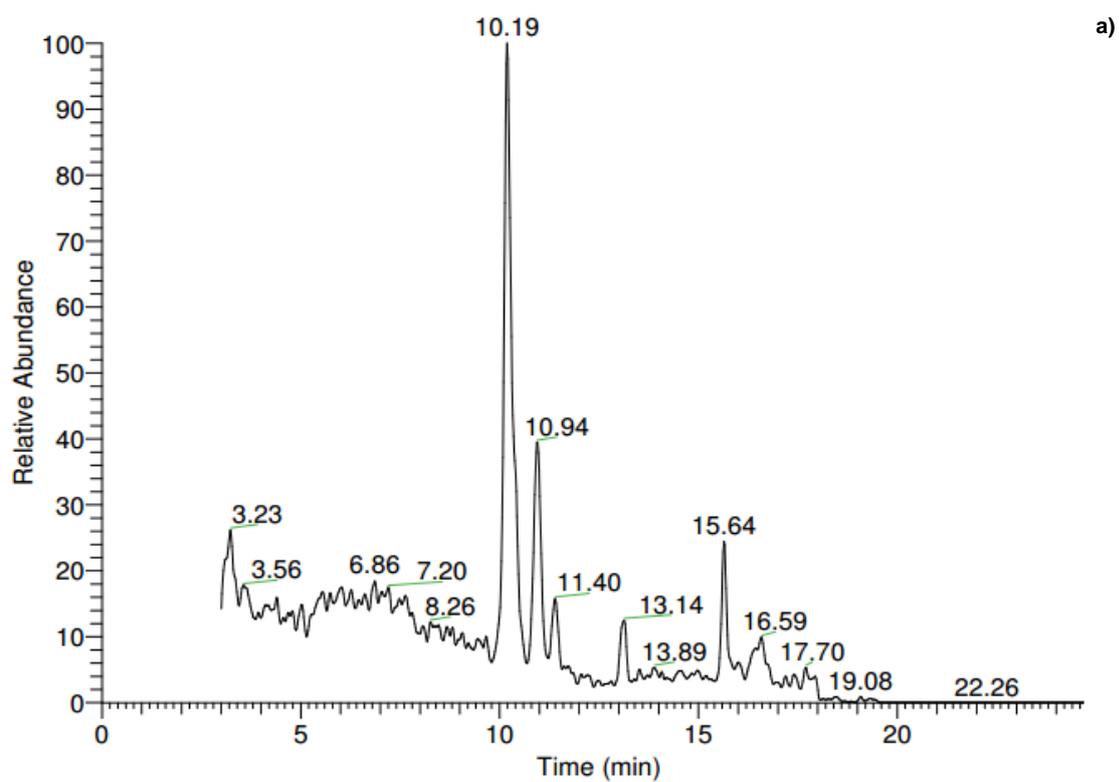


Figura 25 – a) Cromatograma TIC de uma amostra das raízes das plantas controle e b) espectro de massa correspondente ao tempo de retenção da MC-LR com MeOH como eluente

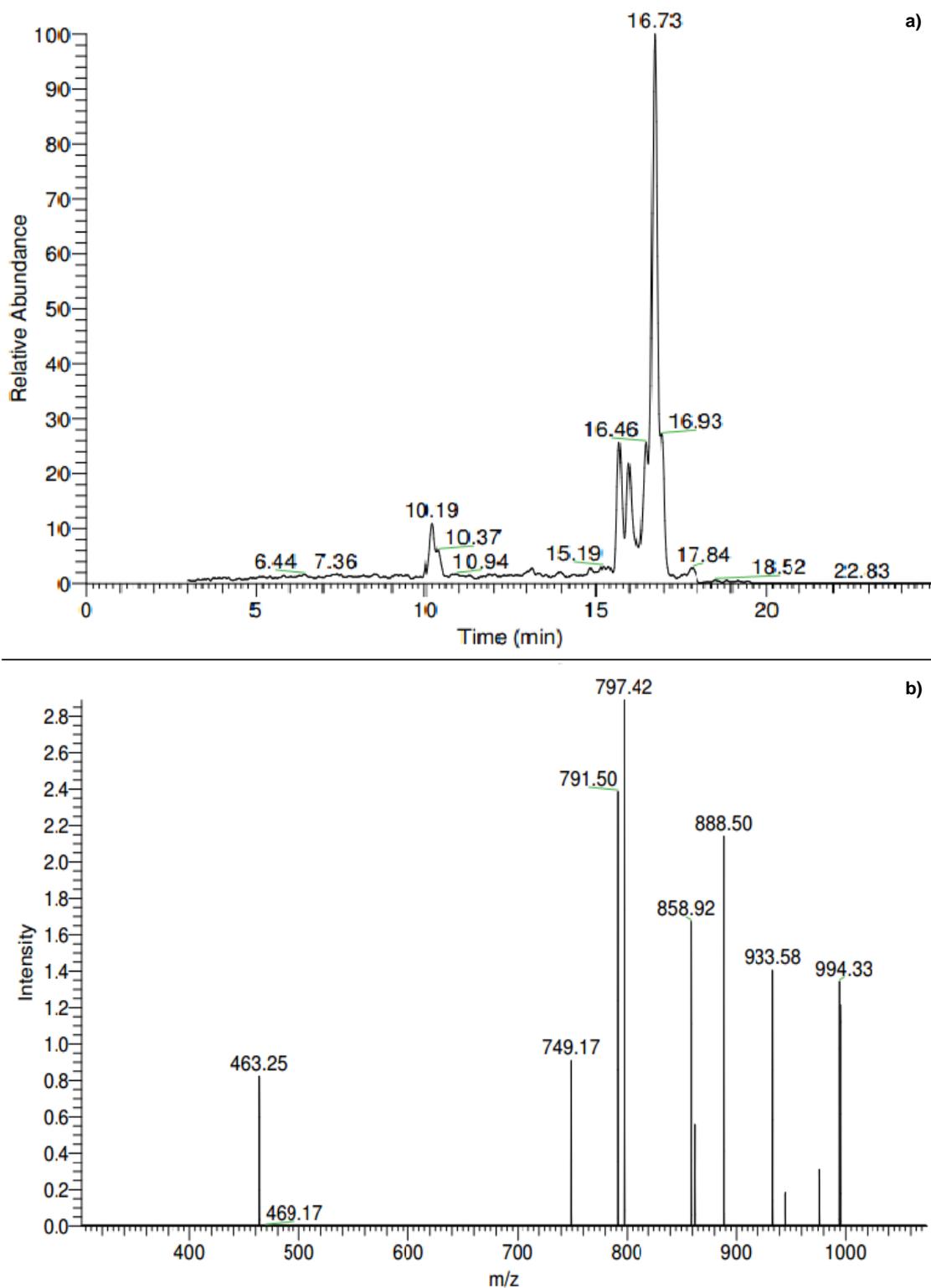


Figura 26 – a) Cromatograma TIC de uma amostra das raízes das plantas expostas ao extrato de *M. aeruginosa* contendo 50 µg/L de MC-LR e b) espectro de massa correspondente ao tempo de retenção da MC-LR com MeOH como eluente

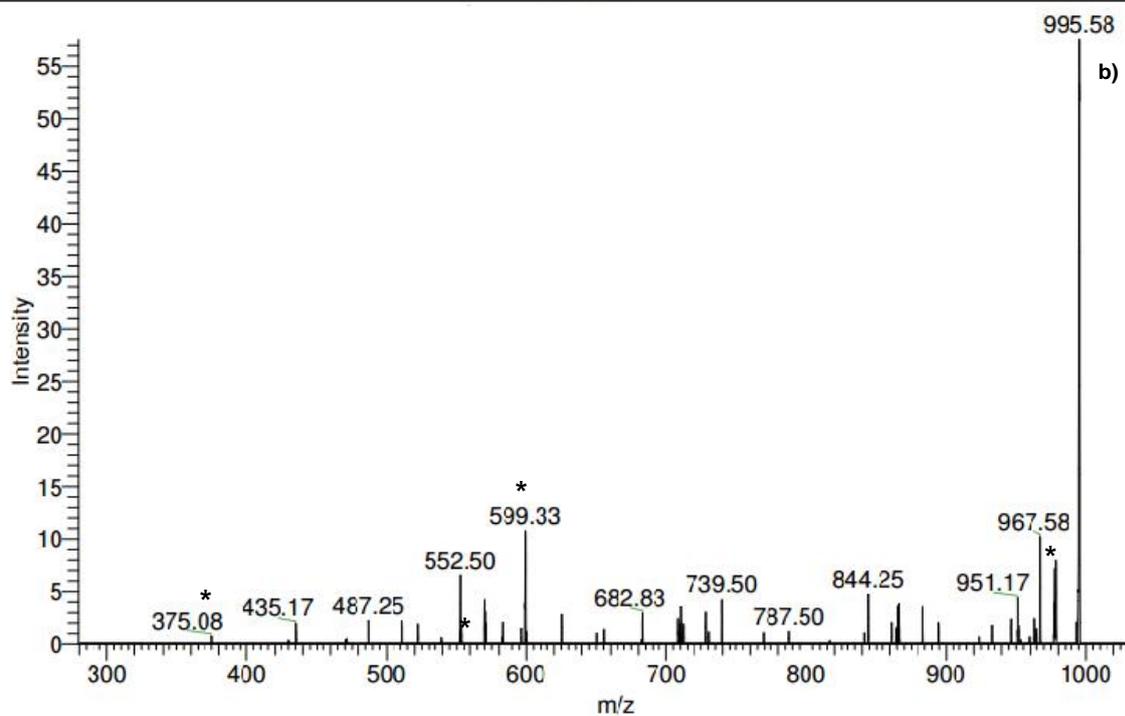
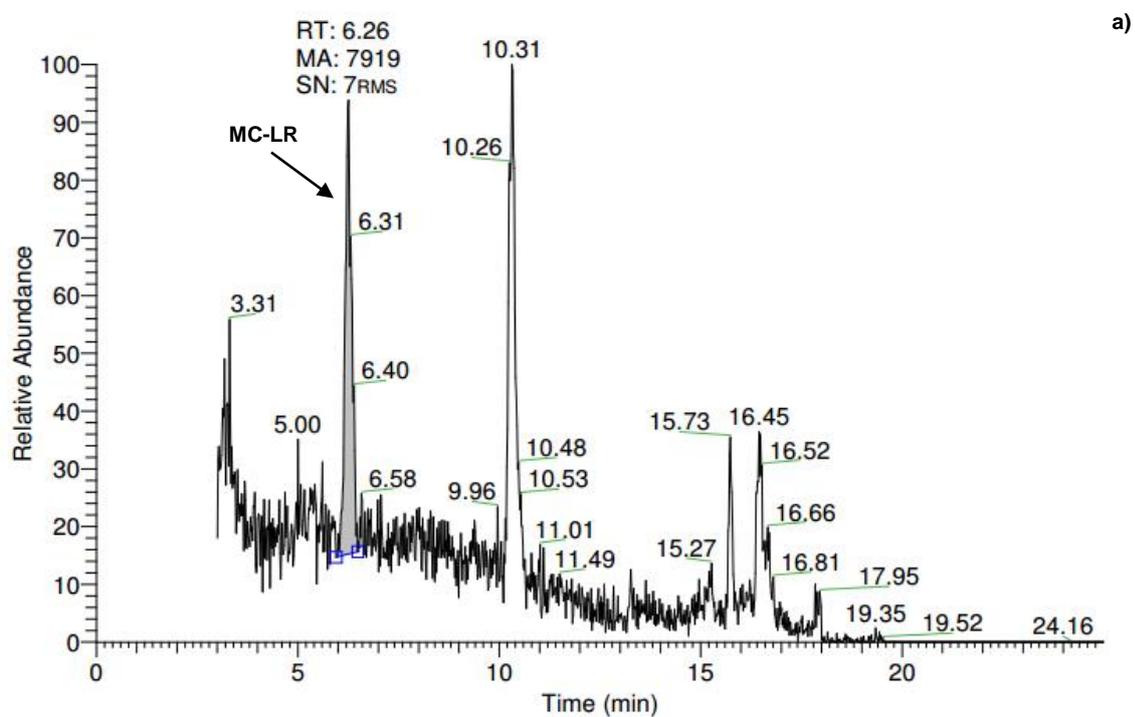


Figura 27 - Cromatograma TIC de uma amostra das raízes das plantas controle dopada com MC-LR padrão (0,55 µg/mL) e **b)** espectro de massa correspondente ao tempo de retenção da MC-LR com MeOH como eluente. Os fragmentos iônicos de referência da MC-LR estão assinalados com *

Adicionalmente, depois de se apurar que a detecção e quantificação da MC nas amostras do solo melhorou trocando o eluente MeOH por ACN (LOD=5,7 µg/L), tentou-se novamente quantificar as amostras de cenoura para se verificar se deste modo se conseguiria detetar MC-LR nas raízes da planta. Contudo, mais uma vez, não foi possível quantificar a MC-LR livre na cenoura (Figura 28).

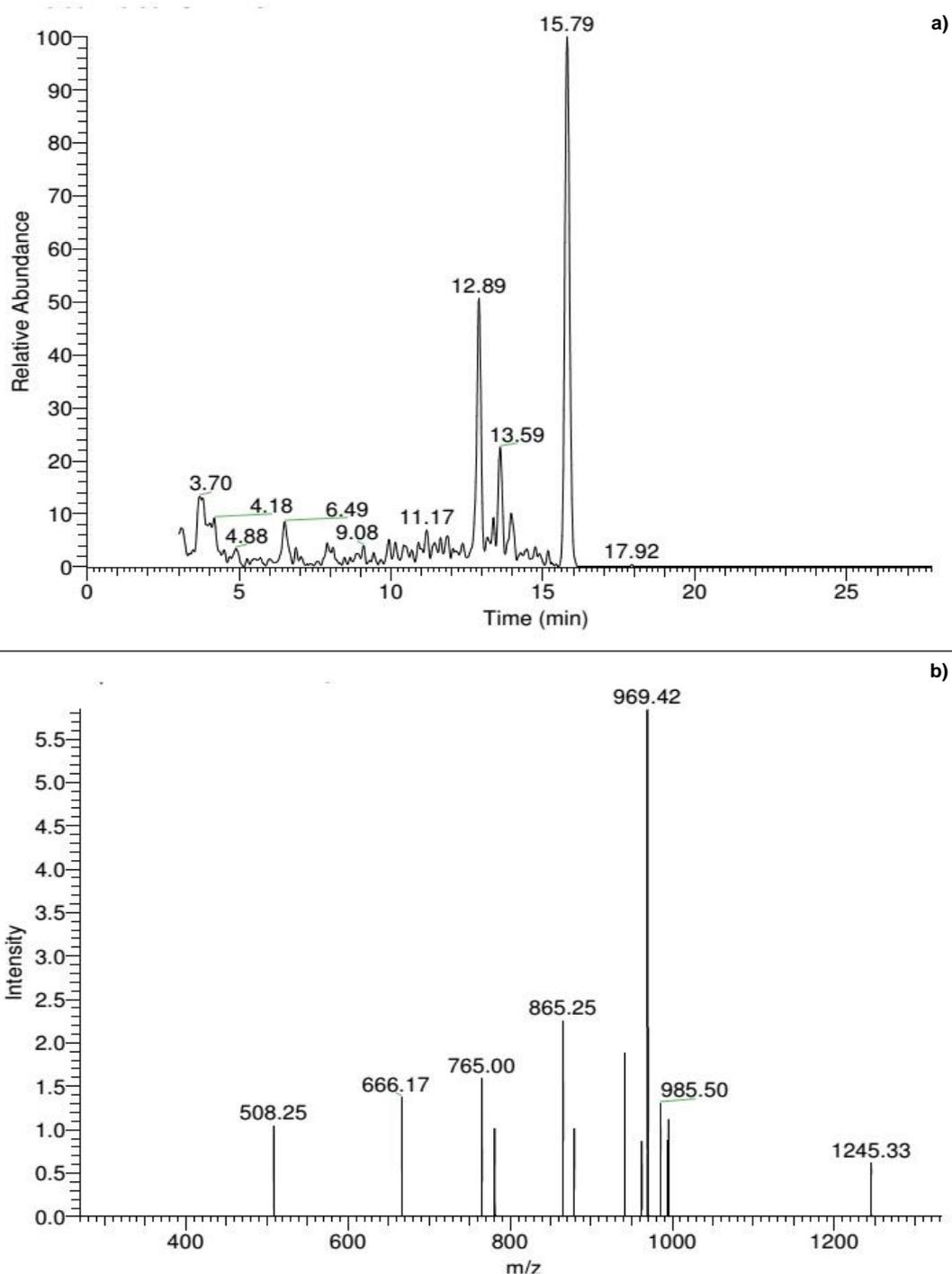


Figura 28 - a) Cromatograma TIC de uma amostra das raízes das plantas expostas a extrato de *M. aeruginosa* contendo 50 µg/L de MC-LR e **b)** espectro de massa correspondente ao tempo de retenção da MC-LR com ACN como eluente

3.4. Quantificação da MC-LR no Solo

3.4.1 MicroCystest

Através do método de atividade da fosfatase verificou-se que após 28 dias de contaminação (8 regas) do solo com extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 50 µg MC-LR/L, a concentração de toxina estimada no solo foi de $41,77 \pm 7,70$ ng MC-LR/g P.F solo, equivalendo a 19,58% do total de toxina administrada (213,33 ng /g P.F de solo).

3.4.2 ELISA

Através do método ELISA estimou-se a concentração de MC-LR no solo no valor de $171,47 \pm 6,76$ ng MC-LR/g P.F solo, para o solo contaminado durante 28 dias com o extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 50 µg MC-LR/L. Tendo em conta esta concentração, a percentagem de recuperação da toxina no solo foi de 80,38% do total de toxina administrada (213,33 ng /g P.F de solo).

3.4.3 LC-MS

Através de LC-MS quantificou-se a MC-LR livre no solo (Figura 29 a 31). A análise do cromatograma TIC do padrão (Figura 29) mostrou que o tempo de retenção da MC-LR é de aproximadamente $10,77 \pm 0,19$ min. Através da comparação desse cromatograma TIC com o do solo contaminado com extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 50 µg MC-LR/L (exemplo na Figura 31) verificou-se a existência do pico sinal com o tempo de retenção do padrão. De facto, quando se efetuou a análise do espectro de massa verificou-se a presença do ião precursor (m/z 995) e de pelo menos dois dos fragmentos iónicos de referência da MC-LR (m/z 599, 866 e 977) sendo por isso possível confirmar a presença da toxina livre no solo que recebeu o extrato bruto de *M. aeruginosa*. Quando se procedeu à quantificação do pico obtido no cromatograma TIC obteve-se uma concentração de $112,44 \pm 32,60$ ng MC-LR/g P.F solo que corresponde a cerca de 52,71% da toxina administrada (213,33 ng /g P.F de solo).

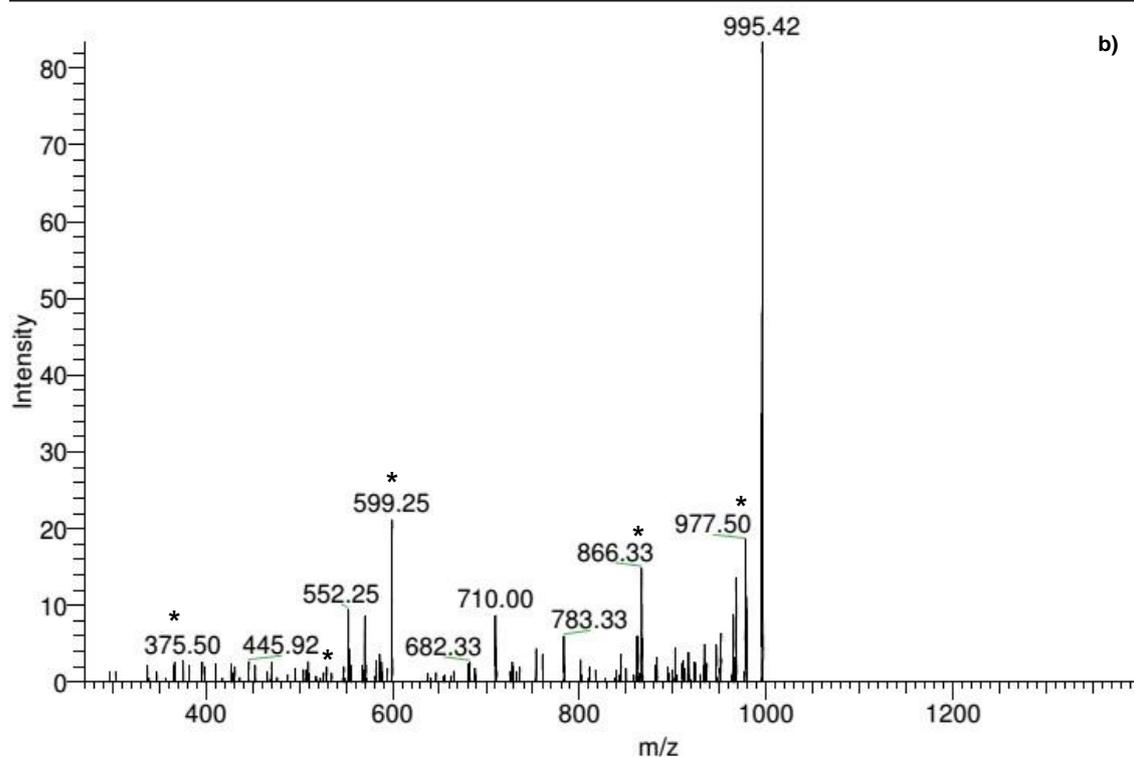
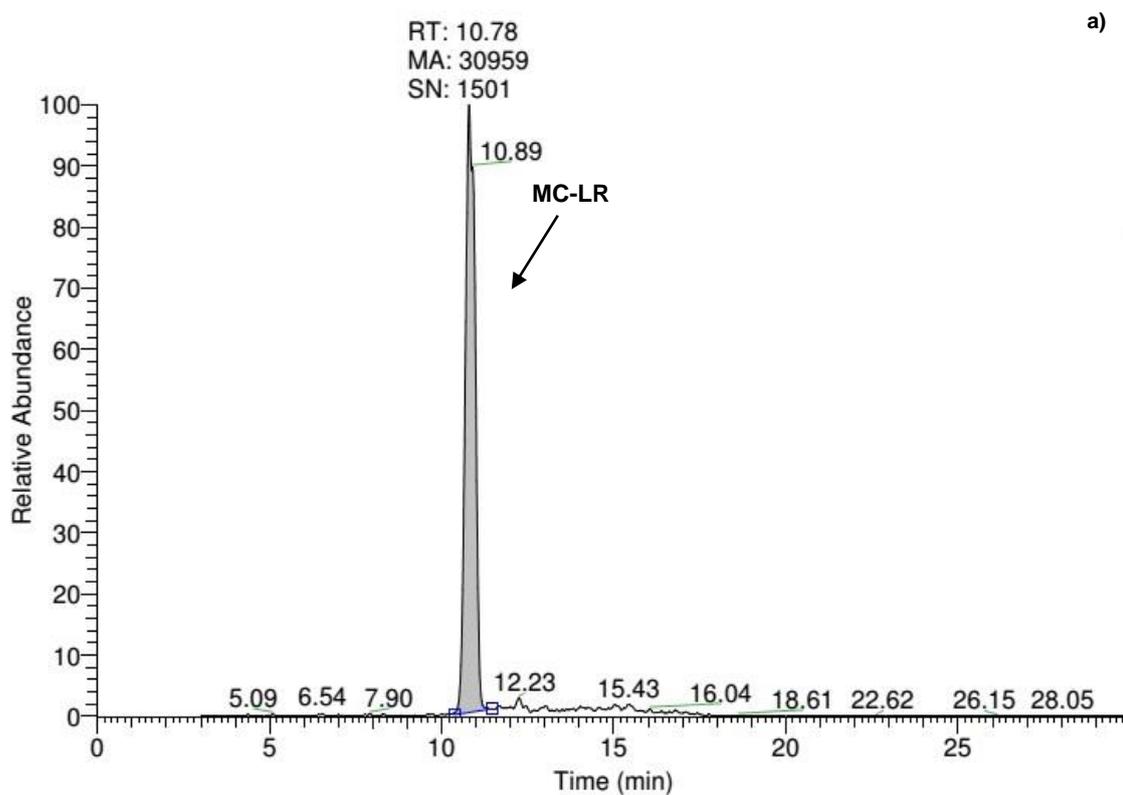


Figura 29 - a) Cromatograma TIC de um padrão de MC-LR (1,8 µg/mL) e **b)** espectro de massa correspondente ao tempo de retenção (10,78 min). Os fragmentos iônicos de referência da MC-LR estão assinalados com *

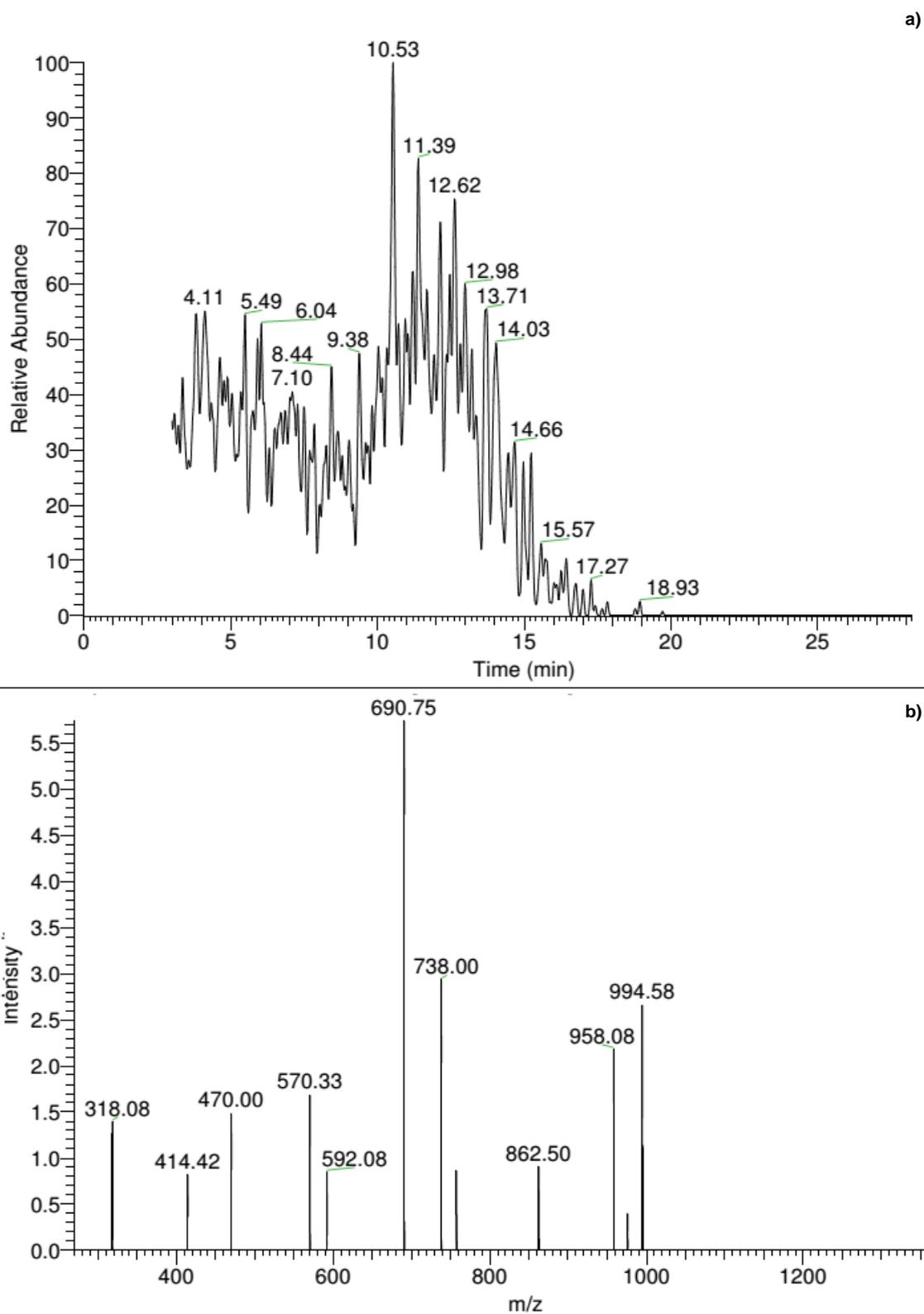


Figura 30 – a) Cromatograma TIC do solo controle e **b)** espectro de massa correspondente ao tempo de retenção da MC-LR

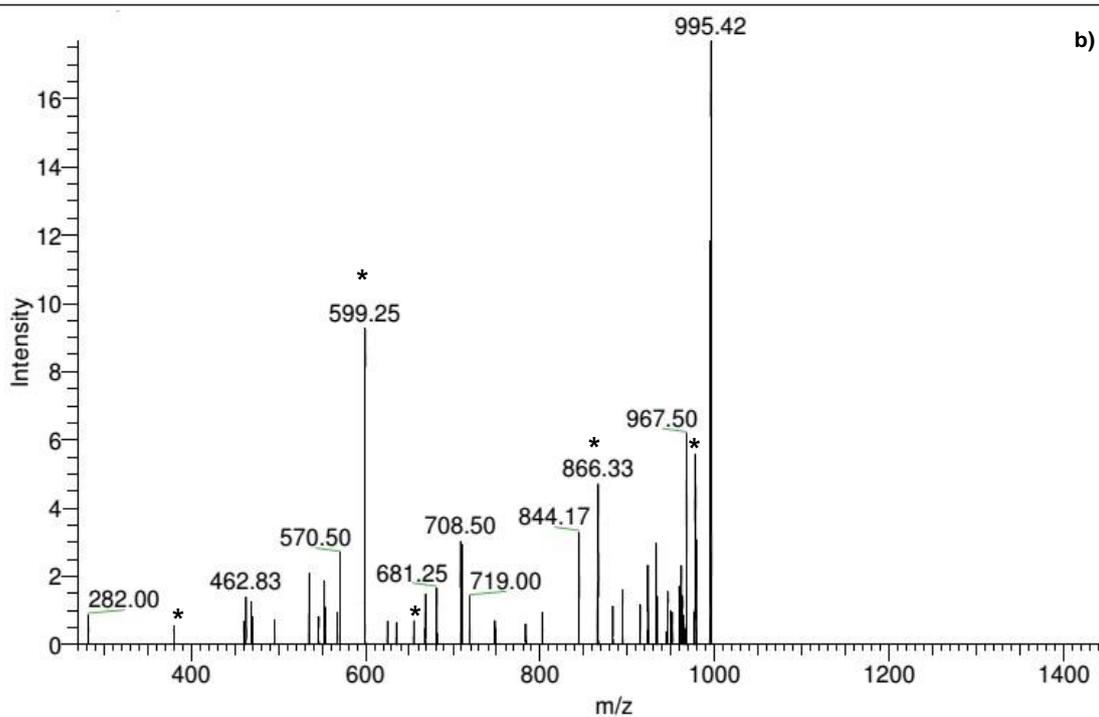
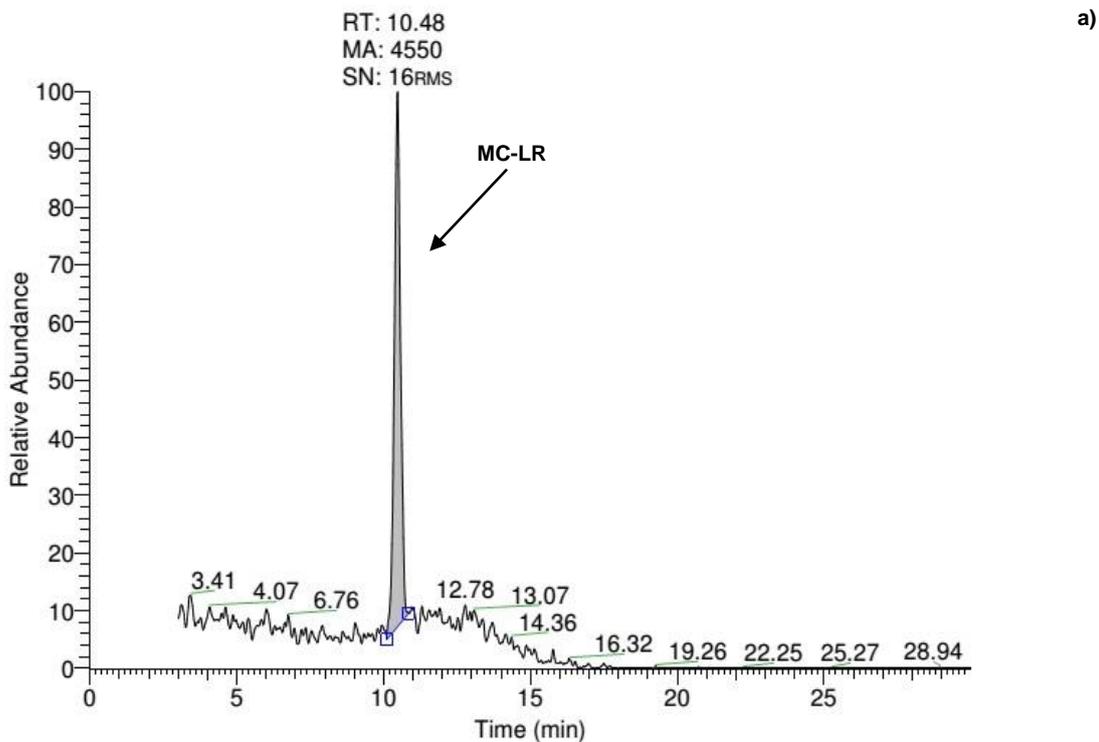


Figura 31 - a) Cromatograma TIC do solo contaminado com extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 50 µg MC-LR/L e **b)** espectro de massa correspondente ao tempo de retenção da MC-LR. Os fragmentos iônicos de referência da MC-LR estão assinalados com *

3.5. Quantificação de Minerais na Raiz de *D. carota* (cenoura)

3.5.1. ICPS-MS

Após análise estatística dos dados obtidos por ICPS-MS verificou-se haver diferenças significativas ao longo do ensaio ($p=0,000$ e $p=0,005$ para 14 e 28 dias, respetivamente) para a concentração de Fe. Após 14 dias de crescimento verificaram-se diferenças significativas apenas entre o grupo controlo e o grupo exposto a $50 \mu\text{g/L}$ de MC-LR ($p=0,004$). No entanto, no final do ensaio observaram-se diferenças tanto entre o grupo controlo e o grupo exposto a $50 \mu\text{g/L}$ MC-LR ($p=0,000$) como entre os dois grupos tratamento ($10 \mu\text{g/L}$ e $50 \mu\text{g/L}$ MC-LR, $p=0,000$). O grupo exposto a $50 \mu\text{g/L}$ MC-LR foi aquele que apresentou maior concentração do mineral ($6,77 \pm 0,99 \mu\text{g/g P.S}$ para $t=14$ e $38,83 \pm 2,39 \mu\text{g/g P.S}$ para $t=28$) enquanto o grupo controlo aquele que apresentou a menor concentração ($2,66 \pm 0,65 \mu\text{g/g P.S}$ ao fim de 14 dias e $20,66 \pm 0,70 \mu\text{g/g P.S}$ ao fim de 28 dias) (Figura 32).

No caso da concentração de Mn a ANOVA também demonstrou diferenças significativas nos dois intervalos de tempo de crescimento ($p=0,000$ e $p=0,001$). O teste de Tukey revelou que as diferenças se verificaram entre o grupo controlo e os grupos tratamento ($p=0,000$ entre CTR e $10 \mu\text{g/L}$ MC-LR e $p=0,000$ entre CTR e $50 \mu\text{g/L}$ MC-LR) ao fim de 14 dias de crescimento das plantas e entre todos os grupos experimentais ao fim de 28 dias de crescimento (CTR e $10 \mu\text{g/L}$ MC-LR, $p=0,006$; CTR e $50 \mu\text{g/L}$ MC-LR, $p=0,000$, $10 \mu\text{g/L}$ e $50 \mu\text{g/L}$, $p=0,044$). Aos 14 dias de crescimento as plantas expostas ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo $10 \mu\text{g/L}$ de MC-LR apresentaram a maior concentração de Mn ($36,81 \pm 1,61 \mu\text{g/g P.S}$), no entanto, ao fim de 28 dias foram as plantas expostas à concentração de $50 \mu\text{g/L}$ MC-LR que apresentaram a concentração mais elevada de Mn ($60,62 \pm 1,41 \mu\text{g/g P.S}$). O grupo controlo foi aquele que apresentou menor concentração deste elemento ($22,73 \pm 1,10 \mu\text{g/g P.S}$ para $t=14$ e $47,05 \pm 1,92 \mu\text{g/g P.S}$ para $t=28$) (Figura 33).

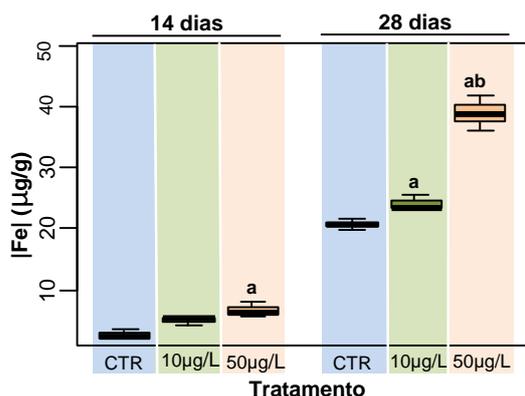


Figura 32 - Concentração de Fe (μg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. As diferenças significativas entre o controlo e os diferentes tratamentos são indicados por **a** ($p < 0,05$) e as diferenças entre os dois tratamentos são indicadas por **b** ($p < 0,05$). Grupo controlo (CTR); grupos tratamento (10 $\mu\text{g/L}$ e 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR)

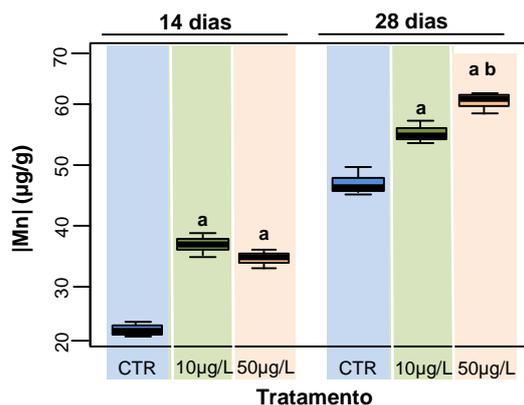


Figura 33 - Concentração de Mn (μg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. As diferenças significativas entre o controlo e os diferentes tratamentos são indicados por **a** ($p < 0,05$) e as diferenças entre os dois tratamentos são indicadas por **b** ($p < 0,05$). Grupo controlo (CTR); grupos tratamento (10 $\mu\text{g/L}$ e 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR)

A concentração de Cu variou durante o ensaio (ANOVA, $p=0,002$ para 14 dias de crescimento e $p=0,000$ para 28 dias de crescimento). Ao fim de 14 dias as diferenças ocorreram entre o grupo controlo e os dois grupos tratamento ($p=0,003$ entre controlo e 10 $\mu\text{g/L}$ MC-LR e $p=0,007$ entre controlo e 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR), sendo o grupo controlo aquele em que a concentração de Cu foi mais elevada ($2,27 \pm 0,05 \mu\text{g/g P.S}$). No final do ensaio as diferenças foram ainda mais notórias e para além de ocorrerem entre o grupo controlo em relação aos dois tratamentos ($p= 0,000$, $p=0,000$) ocorreram também entre os dois grupos tratamento ($p=0,000$). No entanto, aos 28 dias, foi o grupo exposto a 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR que apresentou a concentração mais elevada do mineral ($7,20 \pm 0,04 \mu\text{g/g P.S}$) enquanto o grupo controlo apresentou a menor concentração ($4,48 \pm 0,07 \mu\text{g/g P.S}$) (Figura 34).

No caso do Zn, verificaram-se diferenças na concentração do mineral em ambos os tempos de crescimento monitorizados ($p=0,029$ e $p=0,002$, para 14 e 28 dias, respetivamente). Após 14 dias apenas se verificaram diferenças de concentração entre o grupo controlo e o grupo exposto a 10 $\mu\text{g/L}$ MC-LR ($p=0,024$). Ao fim de 28 dias as diferenças ocorreram entre o grupo controlo e o grupo exposto a 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR ($p=0,002$) e entre os dois grupos tratamento ($p=0,004$). Tal como no caso do Cu, aos 14 dias as plantas do grupo controlo apresentaram a concentração de Zn mais elevada ($17,55 \pm 0,96 \mu\text{g/g P.S}$), enquanto aos 28 dias foi o grupo exposto a 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR que apresentou a maior concentração do elemento ($34,22 \pm 0,70 \mu\text{g/g P.S}$). Também como observado com o Cu, para o Zn o grupo que apresentou menor concentração do mineral foi o exposto a 10 $\mu\text{g/L}$ MC-LR aos 14 dias ($12,44 \pm 0,79 \mu\text{g/g P.S}$), sendo que aos 28 dias a concentração

neste grupo igualou o controlo ($27,74 \pm 1,47 \mu\text{g/g}$ P.S após exposição a $10 \mu\text{g}$ MC-LR/L e $26,59 \pm 1,33 \mu\text{g/g}$ P.S no grupo controlo) (Figura 35).

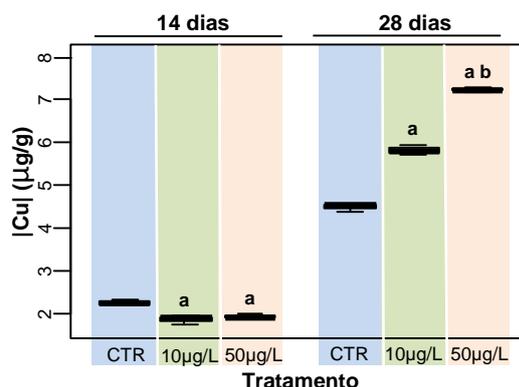


Figura 34 - Concentração de Cu (μg) por (g) de peso seco de cenoura pós 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. As diferenças significativas entre o controlo e os diferentes tratamentos são indicados por **a** ($p < 0,05$) e as diferenças entre os dois tratamentos são indicadas por **b** ($p < 0,05$). Grupo controlo (CTR); grupos tratamento ($10 \mu\text{g/L}$ e $50 \mu\text{g/L}$ MC-LR)

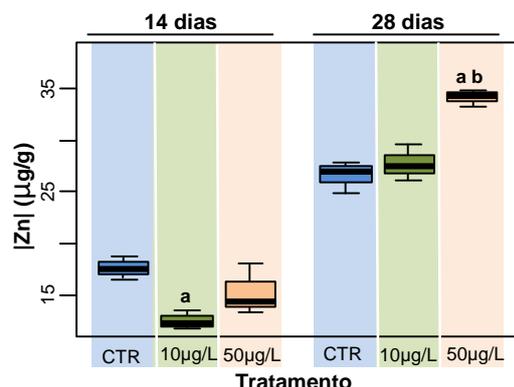


Figura 35 - Concentração de Zn (μg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. As diferenças significativas entre o controlo e os diferentes tratamentos são indicados por **a** ($p < 0,05$) e as diferenças entre os dois tratamentos são indicadas por **b** ($p < 0,05$). Grupo controlo (CTR); grupos tratamento ($10 \mu\text{g/L}$ e $50 \mu\text{g/L}$ MC-LR)

A concentração de Mo também variou ao longo do ensaio (ANOVA, $p=0,001$ e $p=0,006$). Ao fim de 14 dias de crescimento as diferenças ocorreram entre o grupo controlo e os grupos tratamento ($p=0,001$ entre controlo e $10 \mu\text{g/L}$ MC-LR; $p=0,006$ entre controlo e $50 \mu\text{g/L}$ MC-LR). No fim do ensaio as diferenças apenas se verificaram entre o controlo e o grupo exposto a $10 \mu\text{g/L}$ MC-LR ($p=0,006$) e entre os dois grupos tratamento ($p=0,035$). A maior concentração de Mo foi registada no controlo ($260,88 \pm 27,51 \mu\text{g/g}$ P.S para $t=14$ dias e $220,24 \pm 35,55 \mu\text{g/g}$ P.S para $t=28$ dias) e a menor no grupo exposto a $10 \mu\text{g/L}$ MC-LR ($96,06 \pm 20,57 \mu\text{g/g}$ P.S após 14 dias e $88,70 \pm 6,77 \mu\text{g/g}$ P.S após 28 dias) (Figura 36).

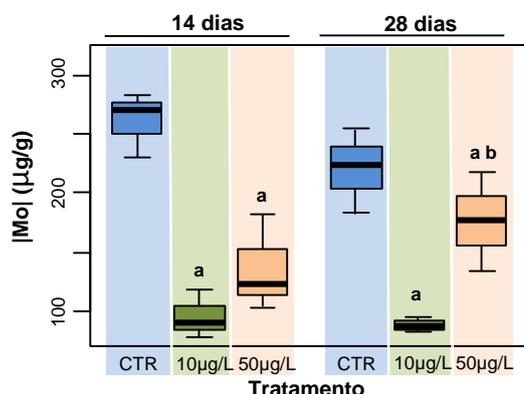


Figura 36 - Concentração de Mo (μg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. As diferenças significativas entre o controlo e os diferentes tratamentos são indicados por **a** ($p < 0,05$) e as diferenças entre os dois tratamentos são indicadas por **b** ($p < 0,05$). Grupo controlo (CTR); grupos tratamento ($10 \mu\text{g/L}$ e $50 \mu\text{g/L}$ MC-LR)

3.5.2. EEA/Chama

A técnica EEA/Chama permitiu a quantificação dos minerais Mg, Na, Ca, e K na cenoura.

Através da ANOVA verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do ensaio de exposição das plantas ao extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR para todos os minerais.

A concentração de Mg apresentou diferenças significativas para os dois tempos de crescimento monitorizados ($p = 0,000$ e $p = 0,005$ para 14 e 28 dias, respetivamente). Após 14 dias de crescimentos as diferenças ocorreram entre o grupo controlo e os dois tratamentos ($p = 0,001$ e $p = 0,001$) e ao fim de 28 dias entre o controlo e o grupo exposto a 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR ($p = 0,028$) bem como entre os dois grupos tratamento ($p = 0,004$). O grupo controlo aos 14 dias foi aquele que apresentou menor concentração do mineral ($1403,79 \pm 26,39 \mu\text{g/g P.S}$) e o grupo 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR o que apresentou maior concentração do mineral ($1556,55 \pm 27,32 \mu\text{g/g P.S}$). No final do ensaio foi o grupo exposto a 10 $\mu\text{g/L}$ MC-LR a apresentar menos Mg ($1581,18 \pm 7,06 \mu\text{g/g P.S}$) e novamente o grupo exposto a 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR a ter maior quantidade do mineral ($1879,54 \pm 38,08 \mu\text{g/g P.S}$) (Figura 37).

No que respeita ao Na, através da ANOVA verificou-se existirem diferenças ao fim de 14 ($p = 0,000$) e 28 dias de crescimento ($p = 0,002$). O teste de Tukey demonstrou que após 14 dias as diferenças existiram entre o grupo controlo e os grupos tratamento ($p = 0,000$ e $p = 0,000$) e que no final do ensaio as diferenças surgiram entre o grupo controlo e exposto a 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR ($p = 0,002$) e os dois grupos tratamento ($p = 0,004$). Apesar de no controlo a concentração do mineral ter aumentado ao fim de 14 dias de crescimento das plantas, verificou-se que no caso das plantas expostas ao extrato tóxico ocorreu uma diminuição da concentração de Na, quando comparado com a concentração basal do elemento determinada nas plantas no início do ensaio de exposição (tempo 0) (ver Tabela 20). Contudo, houve uma recuperação da concentração deste mineral nas plantas expostas ao extrato bruto no final do ensaio, tendo inclusivamente o grupo exposto a 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR sido aquele que apresentou maior concentração do elemento ($8671,16 \pm 55,44 \mu\text{g/g P.S}$) (Figura 38).

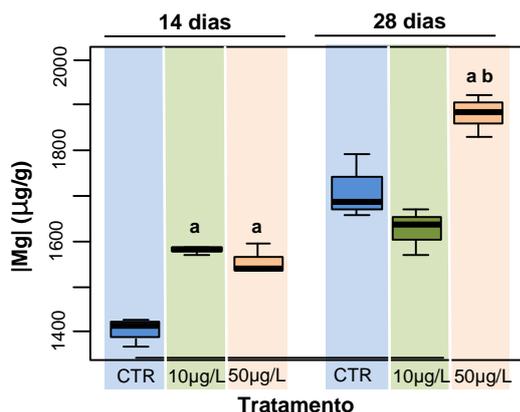


Figura 37 - Concentração de Mg (μg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. As diferenças significativas entre o controlo e os diferentes tratamentos são indicados por **a** ($p < 0,05$) e as diferenças entre os dois tratamentos são indicadas por **b** ($p < 0,05$). Grupo controlo (CTR); grupos

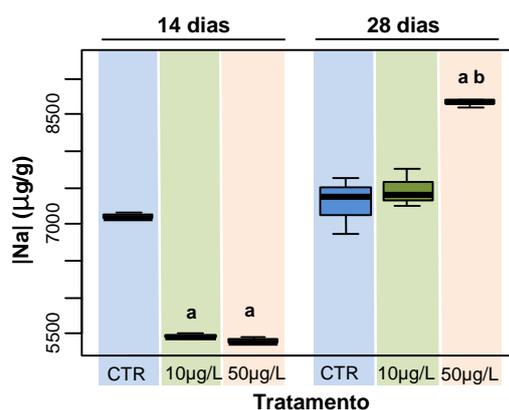


Figura 38 - Concentração de Na (μg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. As diferenças significativas entre o controlo e os diferentes tratamentos são indicados por **a** ($p < 0,05$) e as diferenças entre os dois tratamentos são indicadas por **b** ($p < 0,05$). Grupo controlo (CTR); grupos

Não se verificaram diferenças significativas para nenhum dos tempos de crescimento monitorizados ($p=0,128$ e $p=0,779$) entre os diferentes grupos experimentais, no que diz respeito à concentração de Ca. O grupo exposto a $10 \mu\text{g}$ MC-LR/L foi, ao tempo 14, o que apresentou uma maior concentração do elemento ($2971,58 \pm 133,24 \mu\text{g}/\text{kg}$ P.S). No entanto, no fim do ensaio a concentração deste mineral não sofreu alterações significativas nos diferentes grupos ($3060,74 \pm 102,73 \mu\text{g}/\text{g}$ P.S para controlo, $3130,52 \pm 104,62 \mu\text{g}/\text{g}$ P.S para tratamento $10 \mu\text{g}$ MC-LR/L e $3083,00 \pm 107,49 \mu\text{g}/\text{g}$ P.S para tratamento $50 \mu\text{g}$ MC-LR/L) (Figura 39).

No caso do K apesar de não se terem verificado diferenças estatisticamente significativas ($p=0,134$) ao fim de 14 dias de exposição à toxina, algumas diferenças na concentração deste elemento foram detetadas ao fim de 28 dias ($p=0,005$). Uma análise pelo teste de Tukey mostrou que as diferenças ocorreram entre o grupo controlo e o grupo exposto a $50 \mu\text{g}/\text{L}$ MC-LR ($p=0,016$) e entre os grupos de plantas expostas à toxina ($p=0,005$). Ao fim de 14 dias de exposição a maior concentração de K verificou-se no grupo de plantas expostas a $10 \mu\text{g}/\text{L}$ de MC-LR ($22,84 \pm 1,53 \mu\text{g}/\text{g}$ P.S) e a menor concentração no grupo exposto a $50 \mu\text{g}/\text{L}$ MC-LR ($19,66 \pm 1,35 \mu\text{g}/\text{g}$ P.S). No entanto, no final do ensaio a situação inverteu-se tendo sido o grupo exposto a $50 \mu\text{g}/\text{L}$ MC-LR a apresentar a maior concentração do mineral ($29,84 \pm 1,68 \mu\text{g}/\text{g}$ P.S) e o grupo exposto a $10 \mu\text{g}/\text{L}$ a menor concentração ($24,42 \pm 0,97 \mu\text{g}/\text{g}$ P.S) (Figura 40).

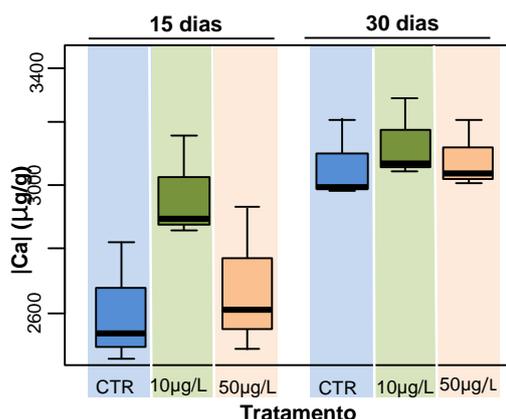


Figura 39 - Concentração de Ca (μg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. Grupo controle (CTR); grupos tratamento (10 $\mu\text{g/L}$ e 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR)

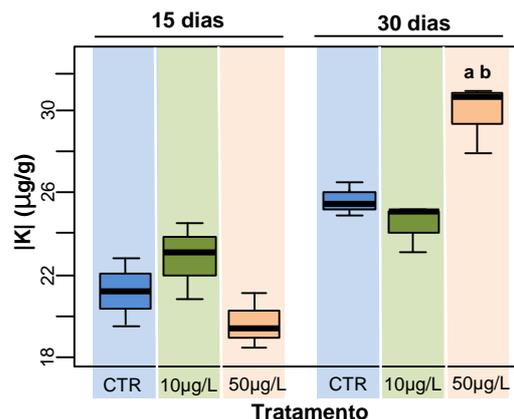


Figura 40 - Concentração de K (μg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. As diferenças significativas entre o controle e os diferentes tratamentos são indicados por **a** ($p < 0,05$) e as diferenças entre os dois tratamentos são indicadas por **b** ($p < 0,05$). Grupo controle (CTR); grupos tratamento (10 $\mu\text{g/L}$ e 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR)

3.5.3. Espectrofotometria

A análise da concentração de P através da ANOVA mostrou diferenças significativas nos dois tempos monitorizados ($p=0,001$ e $p=0,039$) para 14 e 28 dias respectivamente. As diferenças mostraram ser significativas entre o controle e os dois grupos tratamento ($p=0,001$ e $p=0,015$) aos 14 dias de crescimento das plantas e apenas entre o controle e o grupo exposto a extrato de *M. aeruginosa* contendo 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR ($p=0,039$) no final do ensaio. Ao tempo 14 a concentração mínima de P ocorreu no grupo controle ($1672,82 \pm 28,61 \mu\text{g/g P.S}$) e a máxima no grupo de plantas expostas à concentração mais baixa de toxina ($2048,57 \pm 96,03 \mu\text{g/g P.S}$), enquanto aos 28 dias a concentração máxima do mineral foi encontrada no grupo controle ($2786,28 \pm 36,50 \mu\text{g/g P.S}$) e a mínima no grupo exposto à concentração mais elevada de toxina ($2601,34 \pm 59,80 \mu\text{g/g P.S}$) (Figura 41).

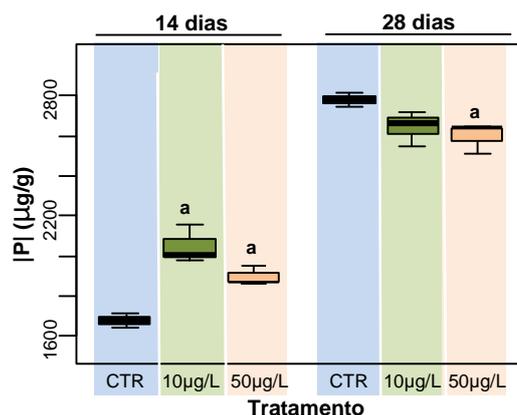


Figura 41 - Concentração de P (μg) por (g) de peso seco de cenoura após 14 e 28 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. As diferenças significativas entre o controle e os diferentes tratamentos são indicados por **a** ($p < 0,05$). Grupo controle (CTR); grupos tratamento (10 $\mu\text{g/L}$ e 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR)

3.6. Quantificação de Ácido Ascórbico na Raiz de *D. carota* (cenoura) por HPLC-PDA

O ácido ascórbico foi quantificado por HPLC-PDA, tendo por princípio a comparação do tempo de retenção da molécula e do espectro de absorvância, nas amostras e no padrão de ácido ascórbico. O cromatograma do padrão e do branco (Figura 41) bem como o do padrão e de uma das amostras (Figura 43) mostram que é possível quantificar o ácido ascórbico na matriz de cenoura.

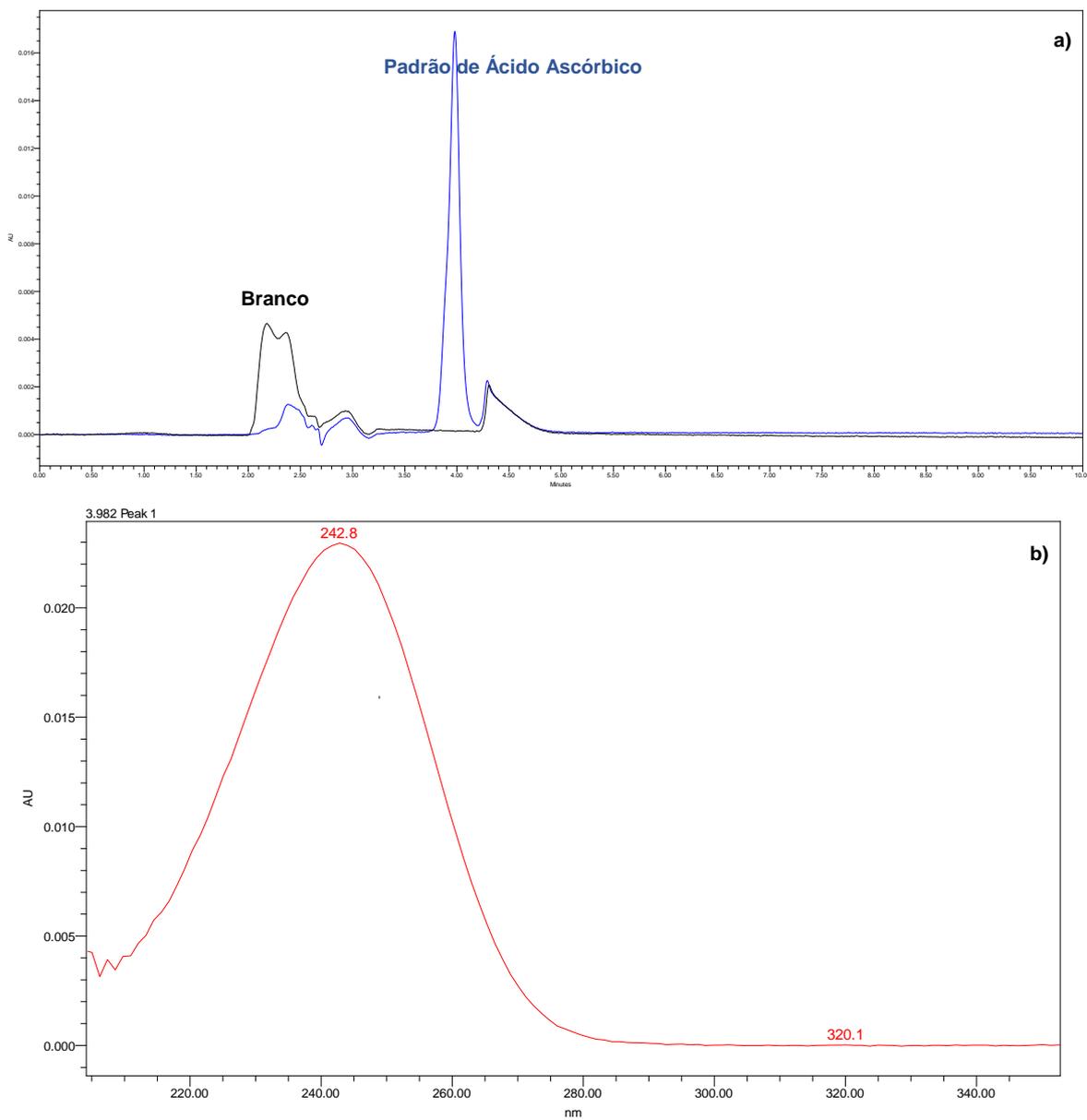


Figura 42 - a) Cromatograma do padrão de ácido ascórbico e branco; b) espectro de absorção do pico do ácido ascórbico

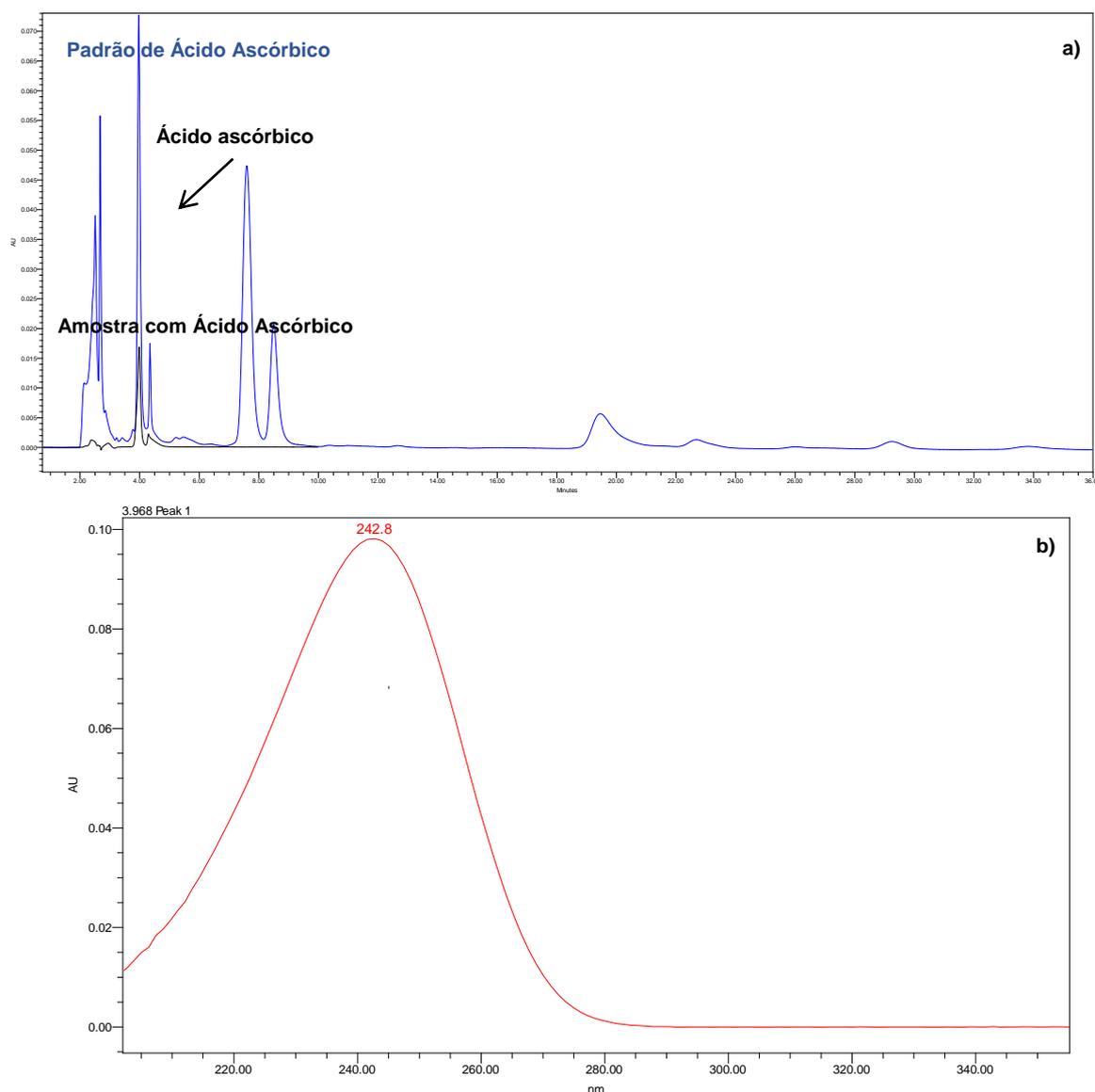


Figura 43 -a) Cromatograma de uma amostra de extrato de cenoura e padrão de ácido ascórbico; **b)** espectro de absorção do pico do ácido ascórbico na amostra

Após análise estatística dos dados obtidos por HPLC verificou-se, através da ANOVA, existirem diferenças significativas ao longo do ensaio ($p=0,000$, e $p=0,000$, para 21 e 32 dias, respetivamente) na concentração de ácido ascórbico. O teste de Tukey revelou que as diferenças se verificaram entre todos os grupos ao fim de 21 dias ($p=0,000$ entre CTR e 10 $\mu\text{g/L}$ MC-LR; $p=0,000$ entre CTR e 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR; $p=0,001$ entre 10 $\mu\text{g/L}$ MC-LR e 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR) e 32 dias de crescimento (CTR e 10 $\mu\text{g/L}$ MC-LR, $p=0,000$; CTR e 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR; $p=0,001$; 10 $\mu\text{g/L}$ e 50 $\mu\text{g/L}$, $p=0,044$). Em ambos os tempos foi o grupo controlo o que apresentou maior concentração de ácido ascórbico ($32,17 \pm 0,84 \mu\text{g/g P.F}$, $t=21$ e $32,55 \pm 1,05 \mu\text{g/g P.F}$, $t=32$) e o exposto a 10 $\mu\text{g/L}$ MC-LR a apresentar menor

concentração de ácido ascórbico ($2,02 \pm 0,40 \mu\text{g/g P.F}$, $t=21$ e $16,46 \pm 2,23 \mu\text{g/g P.F}$, $t=32$). Apesar de a concentração da vitamina se ter mantido constante durante todo o ensaio no controlo, nas plantas expostas ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR verificou-se uma grande variação entre os dois tempos de análise. Para os dois grupos tratamento verificou-se um aumento da concentração de ácido ascórbico ao fim de 32 dias comparativamente aos 21 dias (Figura 44).

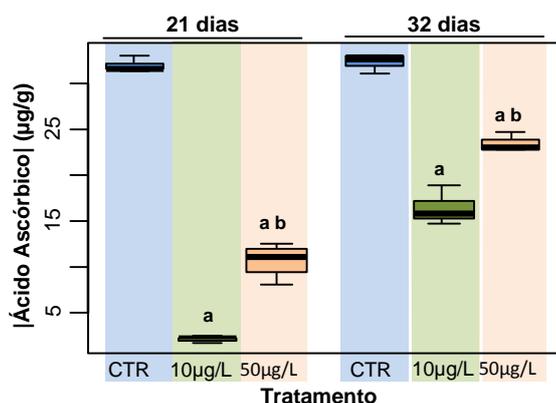


Figura 44 - Concentração de Ácido Ascórbico (μg) por (g) de peso fresco de cenoura após 21 e 32 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. As diferenças significativas entre o controlo e os diferentes tratamentos são indicados por **a** ($p < 0,05$) e as diferenças entre os dois tratamentos são indicadas por **b** ($p < 0,05$). Grupo controlo (CTR); grupos tratamento (10 $\mu\text{g/L}$ e 50 $\mu\text{g/L}$ MC-LR)

3.7. Quantificação de β -Caroteno na Raiz de *D. carota* (cenoura) por HPLC-PDA

A quantificação do β -caroteno na cenoura foi efetuada por HPLC-PDA. O pico a ser quantificado foi determinado através da comparação do tempo de retenção e do espectro de absorvância das amostras com padrão de β -caroteno. O cromatograma do padrão e do branco (Figura 45) bem como o do padrão e de uma das amostras (Figura 46) mostram que é possível determinar a quantidade de β -caroteno nesta matriz. O pico do tempo de retenção anterior ao do β -caroteno foi identificado como pertencendo ao α -caroteno por comparação com os cromatogramas obtidos por Siong e Lam (1992) para a mesma espécie.

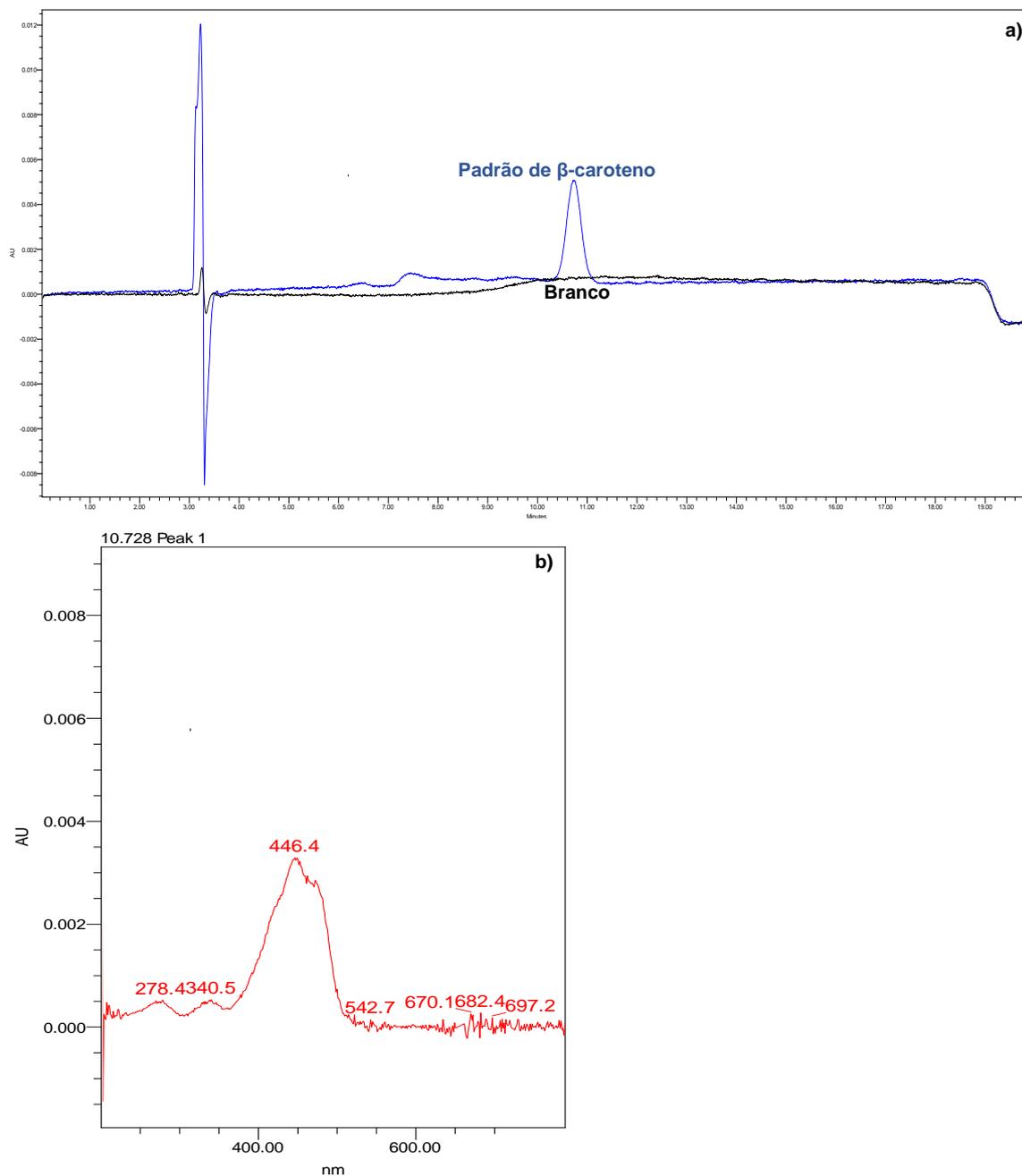


Figura 45 - a) Cromatograma do padrão de β -caroteno e branco; **b)** espectro de absorção do pico do β -caroteno

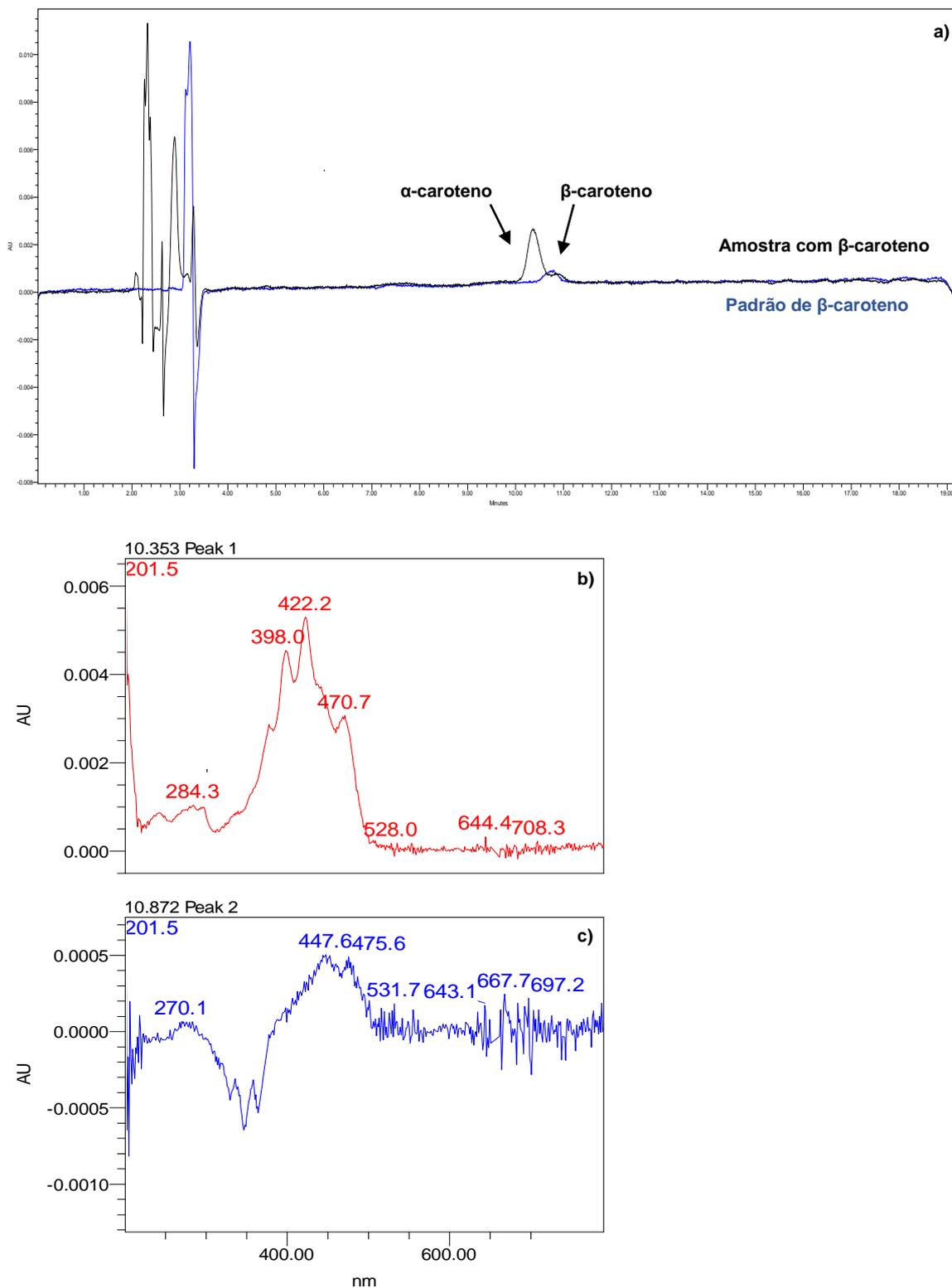


Figura 46 - a) Cromatograma de uma amostra do extrato de cenoura e padrão de β -caroteno; **b)** espectro de absorção do pico do β -caroteno na amostra; **c)** espectro de absorção do pico do α -caroteno na amostra identificado com base no descrito por Siong e Lam (1992)

Após análise estatística dos dados obtidos por HPLC verificou-se, através da ANOVA, não existirem diferenças significativas ao longo do ensaio ($p=0,290$, e $p=0,095$, para 21 e 32 dias, respetivamente) na concentração de β -caroteno.

Apesar de as diferenças não serem estatisticamente significativas, aos 21 dias foi o grupo controlo o que apresentou maior concentração de β -caroteno ($7,51 \pm 0,58 \mu\text{g/g}$ P.F) e aos 32 dias foi o grupo $10\mu\text{g/L}$ ($6,72 \pm 0,42 \mu\text{g/g}$ P.F). (Figura 47).

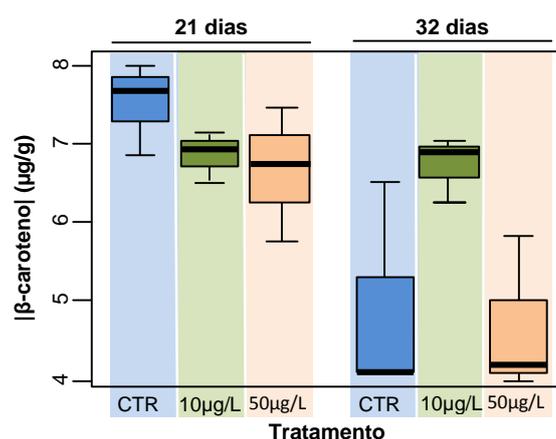


Figura 47 - Concentração de β -caroteno (μg) por (g) de peso fresco de cenoura após 21 e 32 dias de crescimento e exposição a diferentes concentrações de extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. Grupo controlo (CTR); grupos tratamento ($10 \mu\text{g/L}$ e $50 \mu\text{g/L}$ MC-LR)

4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. Efeitos Fisiológicos do Extrato Bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR em Folhas e Raízes de *D. carota*

4.1.1. Efeitos no Crescimento

A exposição de *D. carota* ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 10 µg/L de MC-LR não afetou o crescimento das raízes da planta. Contudo, a exposição ao extrato contendo 50 µg/L de MC-LR, apesar de não ter provocado alterações significativas nos primeiros 14 dias, afetou o peso fresco das raízes após 28 dias de exposição. Os resultados obtidos no presente trabalho parecem demonstrar que a concentração de toxina administrada e o tempo de exposição são fatores importantes na inibição do crescimento das raízes, e sugerem que uma exposição prolongada pode ter consequências negativas no desenvolvimento e na produtividade das culturas, corroborando os resultados descritos por Khalloufi *et al.* (2012) para *L. esculentum*. Estes resultados são também concordantes com Pflugmacher *et al.* (2007), que verificaram que a exposição de diferentes variedades de espinafre a extrato bruto não provocou alterações no crescimento durante duas semanas mas produziu efeito após seis semanas, altura em que todas as variedades apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controlo. No entanto, outros estudos sugerem que a exposição a MC-LR pode não produzir efeitos no crescimento das plantas. Järvenpää *et al.* (2007) reportaram que a exposição de *B. oleracea* e *S. alba* a concentrações de MC-LR entre 1 e 10 µg/L, durante 20 e 19 dias, respetivamente, não afetou o crescimento das raízes. Prieto *et al.* (2011) verificaram igualmente que uma exposição de 48 horas a extrato bruto contendo 50 µg/L de MC-LR não provocou alterações no peso fresco das raízes da planta *O. sativa*.

O presente trabalho é o primeiro a avaliar o efeito do extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR em raízes tuberosas, sendo necessário mais investigação para se compreender o efeito da toxina em outros cenários ambientais.

Apesar de vários trabalhos terem já reportado a inibição do crescimento das folhas de diversas espécies após exposição a MC-LR, neste trabalho a exposição ao extrato tóxico não afetou o crescimento da parte aérea das plantas durante todo o ensaio de

exposição. Os resultados deste trabalho estão de acordo com os obtidos por Prieto *et al.* (2011) e Azevedo *et al.* (2014) que mostraram que para concentrações na gama das utilizadas neste estudo (0,3 a 78 µg/L) não se verifica inibição do crescimento de *O. sativa*. As diferenças entre os resultados obtidos neste trabalho e em estudos anteriores (Chen *et al.*, 2004; Saqrane *et al.*, 2008, 2009, El Khalloufi *et al.*, 2011) devem-se provavelmente ao facto de terem sido utilizadas concentrações mais elevadas de MC, cerca de 10 a 1000 vezes superiores, que as utilizadas neste estudo. De facto, um trabalho de exposição de *O. sativa* a uma gama de concentrações mais abrangente demonstrou que a MC-LR entre 10 e 200 µg/L não afeta o crescimento da planta, mas em concentrações mais elevadas (500 a 4000 µg/L) induz a inibição do crescimento (Chen *et al.*, 2012a). No entanto, as concentrações utilizadas no presente estudo foram determinadas considerando a sua relevância ecológica.

De um modo geral, a exposição de *D. carota* ao extrato bruto contendo entre 10 a 50 µg/L não teve um efeito negativo evidente no crescimento, sendo a única exceção o efeito inibidor da concentração mais elevada no peso fresco das raízes. Saliencia-se o facto do peso seco não sofrer variação significativa. A maturação das plantas pode ser um dos fatores responsáveis pela ausência de efeitos significativos nestes parâmetros, como sugerido anteriormente por Järvenpää *et al.* (2007). De facto, as plantas expostas ao extrato bruto contendo MC-LR usadas neste trabalho tinham, no início do ensaio, cerca de 30 dias, semelhante às utilizadas pelos autores referidos (25 e 47 dias). Alguns trabalhos referem uma maior suscetibilidade das plantas durante a germinação e fases iniciais de desenvolvimento (Crush *et al.*, 2008; Saqrane *et al.*, 2008; Saqrane *et al.*, 2009).

4.1.2. Efeitos na Fotossíntese

Como mencionado anteriormente, a eficiência fotossintética das plantas foi determinada através de PAM. O valor ideal entre a razão F_v / F_m para a maioria das espécies de plantas é de cerca de 0,83. Valores significativamente inferiores a este poderão indicar que a planta sofreu algum tipo de *stress* (Maxwell e Johnson, 2000). Os valores de F_v / F_m obtidos no presente estudo encontravam-se entre 0,80 e 0,87, o que parece à primeira vista indicar que as plantas não foram submetidas a um nível elevado de *stress*. Ao contrário do que se esperava, as plantas expostas ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR apresentaram valores de F_v / F_m mais elevados que as do grupo controlo, sobretudo as do grupo exposto ao extrato contendo 10 µg/L que apresentaram valores significativamente maiores em ambos os tempos analisados. Assim, os resultados deste estudo indicam que a exposição crónica de *D. carota* a baixas concentrações de MC-LR não parece ser um fator de *stress* prejudicial a este processo,

levando inclusivamente a uma aparente estimulação da fotossíntese. Possivelmente a planta ativou/estimulou o processo fotossintético e outros mecanismos como forma de defesa. Contudo, estes resultados não estão de acordo com o que tem sido observado para outras espécies de plantas, onde se tem observado uma inibição do processo fotossintético pela MC-LR (Saqrane *et al.*, 2009; El Khalloufi *et al.*, 2012; Gutiérrez-Praena *et al.*, 2014). No entanto, em todos os casos mencionados, a concentração de MC-LR foi mais elevada que no presente estudo.

Até à data, este parece ser o primeiro trabalho a reportar uma aparente estimulação da fotossíntese pelo extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR. Estudos futuros devem ser desenvolvidos para uma melhor avaliação dos efeitos da toxina neste processo, além de que seria, também interessante conhecer como este parâmetro varia em outros cenários ambientais. Sabe-se que o conteúdo de minerais, presente nas plantas, pode afetar significativamente a fotossíntese, uma vez que os mesmos podem participar em vários passos, podendo ter um papel direto e/ou indireto neste processo. Assume-se que os minerais que têm um efeito indireto são aqueles que afetam a síntese de enzimas, pigmentos, ou cofatores, que participam nas principais reações da fotossíntese e por conseguinte, podem alterar a estrutura dos cloroplastos, afetar as reações e condições de transporte ou ainda a utilização de matérias-primas, intermediários ou produtos finais (Barker, 1979). A maioria destes minerais parecem ter pelo menos uma função específica: o potássio (K) está relacionado com a abertura e fecho dos estomas e o balanço entre fotossíntese e respiração, o magnésio (Mg) é um componente essencial das clorofilas, o ferro (Fe) atua como catalisador na formação das clorofilas, o manganésio (Mn) controla reações de oxirredução essenciais à fotossíntese e síntese de clorofila, o cobre (Cu) e o zinco (Zn) são apontados como tendo um papel indireto na produção de clorofilas, sendo o segundo elemento ainda importante no armazenamento do amido (Barker, 1979; Welch e Shuman, 1995; Grusak, 2001; Fageria *et al.*, 2002; Fageria *et al.*, 2011).

A maioria das deficiências nutricionais têm sido apontadas como potenciais causadoras de decréscimo na fotossíntese líquida (Barker, 1979). Neste estudo, a concentração de todos os minerais citados como essenciais na fotossíntese (K, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn) foi, no geral, significativamente mais elevada nas raízes das plantas expostas ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR (ver secção 3.5.). Sabe-se que a translocação dos minerais entre os diferentes órgãos e tecidos das plantas pode ocorrer, sendo que os minerais absorvidos pelas raízes podem ser transportados através do xilema para a parte aérea da planta (Marschner *et al.*, 1996, Fageria *et al.*, 2002). Assim, a estimulação da fotossíntese nas plantas dos grupos tratamento poderá estar relacionada com o aumento da assimilação de minerais. Khalloufi *et al.* (2012) verificaram também uma maior concentração de alguns minerais (diretamente proporcional à quantidade de MC-LR)

em *L. esculentum* após exposição a extrato bruto contendo MC. Contudo, os autores verificaram um decréscimo da razão F_v / F_m entre as plantas expostas e o grupo controle. No entanto, para além de diferentes espécies terem diferentes respostas, os autores utilizaram concentrações de MC mais elevadas que as administradas neste estudo (1120 e 2240 $\mu\text{g/L}$) e, neste caso, o aumento de nutrientes pode não ter sido suficiente para compensar os efeitos da toxina. Por outro lado, os autores apenas avaliaram a concentração de Na, Ca e K, desconhecendo-se assim o que acontece com os minerais que podem ter uma ação mais evidente na fotossíntese (Mg, Fe, Mn, Cu, Zn). Para além disso, apesar da importância dos minerais na fotossíntese, a sua presença em excesso pode ser tóxica podendo provocar danos. O excesso de Fe e Mn foi já descrito como prejudicial à fotossíntese e ao aparelho fotossintético, causando uma fotoinibição (Mukhopadhyay e Sharma, 1991; Kampfenkel *et al.*, 1995). No presente trabalho, apesar da razão F_v / F_m ter sido aumentada em ambos os grupos expostos em relação ao controle, quando se compararam os dois grupos expostos a extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR (diferenças estatisticamente não significativas) observou-se um decréscimo após exposição ao extrato contendo a concentração mais elevada de MC-LR (50 $\mu\text{g/L}$). Quando se analisou a concentração de Fe e Mn verificou-se também que estes minerais sofreram um aumento no grupo exposto a 50 $\mu\text{g/L}$. Em geral, no que aos minerais importantes à fotossíntese diz respeito (Mg, Fe, Mn, Cu, Zn), o aumento da concentração de MC-LR no extrato de *M. aeruginosa* administrado às plantas teve uma relação direta na concentração de nutrientes da cenoura, aumentando-os. Estes resultados sugerem, que o aumento de minerais causado pelo extrato parece ter sido benéfico (em alguma medida) para a fotossíntese quando continha concentrações mais baixas de MC-LR (10 $\mu\text{g/L}$), a partir das quais um subsequente aumento da concentração de toxina pode perder essa capacidade e induzir unicamente toxicidade. Uma forma de tentar avaliar se realmente o maior *uptake* de minerais pode estar relacionado com a maior eficiência fotossintética de *D. carota* seria colocar as culturas em crescimento sob concentrações de minerais controladas (hidroponia), aumentando-se gradualmente a concentração de nutrientes e avaliando a resposta fotossintética das plantas em cada situação.

Poderá ainda ter interesse complementar a análise por PAM com outras técnicas como por exemplo a quantificação dos pigmentos fotossintéticos. Os resultados fornecidos por este tipo de abordagem foram já descritos como limitativos, uma vez que apenas fornecem informação sobre a área da folha onde a luz saturada incide (Oguchi *et al.*, 2011) sendo por isso necessária uma avaliação mais pormenorizada através de outros métodos que permitam verificar o grau de fotoinibição em todo o tecido.

4.2. Acumulação de MC-LR nas Raízes de *D. carota* e no Solo

A quantificação de MC nos tecidos da planta demonstrou resultados distintos entre os diferentes métodos utilizados. Enquanto o MicroCystest e o LC-MS não permitiram detetar toxina, o método ELISA detetou $5,23 \pm 0,47$ ng MC/g de cenoura (P.F). Estas diferenças podem dever-se ao facto destes três métodos se basearem em diferentes princípios de quantificação da toxina.

MicroCystest e ELISA são dois métodos bioquímicos. O primeiro baseia-se na capacidade que as MCs têm de inibir as PP1 e 2A. A reação de inibição é utilizada como forma de calcular a concentração de toxina (Msagati *et al.*, 2006). Ao analisar matrizes biológicas, como as vegetais, podem ocorrer interferências com compostos desconhecidos, interferências estas que são necessárias ter em consideração para uma quantificação correta da concentração da toxina (Merel *et al.*, 2013). O segundo método tem como base o reconhecimento da MC, Nod, e suas variantes, por anticorpos específicos que têm como alvo o aminoácido ADDA (Ouahid, 2008). O método não é seletivo uma vez que não quantifica apenas MC livre mas todos os metabolitos que contenham este aminoácido como por exemplo produtos conjugados ou de destoxificação (Crush *et al.*, 2008). Num estudo realizado *in-vitro* por Pflugmacher *et al.* (2001), com *Phragmites australis*, os autores verificaram que é provável que conjugados de cisteína-MC e glutathiona-MC sejam produzidos durante o processo de destoxificação da planta. Por outro lado, os anticorpos são inespecíficos no que respeita a deteção das diferentes variantes estruturais da MC-LR, sendo por isso um método ideal para quantificar MCs totais, mas não apenas a variante MC-LR (Rapala *et al.*, 2002; Sangolkar *et al.*, 2006, Merel *et al.*, 2013). De facto, ambos os métodos não permitem informação sobre as diferentes variantes de MC presentes (Masango *et al.*, 2008). Neste trabalho as plantas foram expostas ao extrato bruto de *M. aeruginosa* onde apesar da principal variante da toxina presente ser a MC-LR (95%) poderiam estar presentes outras variantes da molécula. Mais ainda, ambos os *kits* estão otimizados para matrizes ambientais podendo as matrizes vegetais, como a utilizada neste estudo, serem fonte de interferência. De facto, por ELISA obteve-se um valor positivo em plantas controlo, tendo-se subtraído esse valor ao detetado nas plantas expostas, como forma de correção do método. Esta correção tinha já sido proposta por Peuthert *et al.*, (2007) que também detetaram falsos positivos nas plantas controlo. Järvenpää *et al.* (2007) detetaram igualmente resultados positivos nas plantas controlo, no entanto os autores não referiram qual o tipo de procedimento que utilizaram para corrigir esta interferência.

Devido à impossibilidade de distinguir entre diferentes variantes de MC pelos dois

métodos bioquímicos referidos anteriormente, foi ainda utilizada uma metodologia analítica, LC-MS de forma a quantificar a MC-LR livre. A utilização deste procedimento possibilita a deteção do ião precursor e de transições iónicas provenientes da fragmentação do mesmo (fragmentos iónicos de referência). Em relação aos outros métodos, este oferece a vantagem de monitorização apenas para as massas específicas de interesse, bem como a identificação por tempos de retenção específicos sendo muito mais seletivo que as metodologias bioquímicas. Contudo, apresenta um limite de deteção e quantificação superior o que pode impossibilitar a deteção e quantificação quando a toxina se encontra em baixas concentrações (Sangolkar *et al.*, 2006). De facto, neste trabalho a MC-LR livre nos tecidos da planta não foi detetada por LC-MS.

Uma vez que pelo método de LC-MS a concentração de MC-LR livre se encontrou abaixo do LOD (6,48 µg/L com MeOH e 5,70 µg/L com ACN como eluente), pode supor-se que o valor detetado por ELISA pode dever-se às seguintes situações: 1) ao seu LOD ser inferior (0,10 µg/L); 2) ao facto de MC-LR não se encontrar maioritariamente na sua forma livre mas sim conjugada, ou ter sofrido algum processo de destoxificação ou degradação que alterasse a sua conformação e estrutura química; e 3) devido à possibilidade de quantificação de outras variantes de MC que se poderiam encontrar no extrato de *M. aeruginosa* (estas variantes escapam à quantificação pelo método analítico (LC-MS)). No entanto, uma vez que o *kit* de inibição das PP1 e 2A que deteta as mesmas variantes e que tem um LOD semelhante ao do ELISA também não detetou MC, será mais razoável supor que a MC quantificada por ELISA será a MC não livre ou modificada. Järvenpää *et al.* (2007) tinham já, para *S. alba* e *B. Oleracea*, obtido valores diferentes após quantificação de MC-LR por LC-MS e por ELISA.

Neste trabalho apenas 10 mL do total do extrato de cenoura foram utilizados para concentrar e quantificar a toxina. Idealmente todo o sobrenadante recolhido deveria ter sido limpo (de forma a eliminar interferentes indesejados) e concentrado recorrendo, por exemplo, a colunas de extração em fase sólida (SPE) C₁₈ (Sanglkar *et al.*, 2006) de modo a aumentar a quantidade de MC presente para que a sua quantificação por LC-MS fosse possível.

Neste estudo, a concentração de MC detetada por ELISA foi de 5,23 ± 0,47 ng /g P.F cenoura. A deteção de toxina no tecido de várias plantas hortícolas por ELISA foi já reportada por vários autores (McElhiney *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Peuthert *et al.*, 2007; Crush *et al.*, 2008; Mohamed *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010b), contudo na maior parte dos casos a concentração de MC-LR administrada às plantas foi muito superior à analisada no presente estudo e, em geral, focaram sobretudo espécies não tuberosas. Järvenpää *et al.* (2007) conseguiram detetar, por esta metodologia, nas raízes de *S. alba* e *B. oleracea* entre 4,1 e 4,9 ng MCs/g de P.F. Contudo, apesar dos valores detetados serem

semelhantes aos obtidos neste trabalho é de salientar que, para além da concentração de MC ser mais baixa (exposição a extrato de *Anabaena* contendo 10 µg MCs/L (33% MC-LR), o tempo de exposição também foi ligeiramente mais curto (19 dias no caso de *S. alba* e durante 20 dias no caso de *B. oleracea*) o que pode dever-se a diferenças na morfologia e fisiologia das raízes de *S. alba* e *B. oleracea* (raízes aprumadas) e de *D. carota* (raiz tuberosa). A exposição de diversas espécies hortícolas a extrato bruto contendo 5 µg MC-LR/L, durante 24 horas, levou à deteção de maiores níveis de MCs nas raízes (13,1 a 127,0 ng/g) que os obtidos neste trabalho após quantificação por ELISA (5, 23 ± 0,47 ng/g) (Peuthert *et al.*, 2007). No entanto, apesar da concentração utilizada pelos autores ser menor que a usada neste trabalho, é de salientar que a exposição ocorreu em condições de hidroponia, estando as raízes das plantas diretamente expostas à toxina durante todo o período de tempo e podendo assim a absorção da MC pelas raízes ter sido facilitada. Para além disso, a morfologia das raízes de todas as espécies analisadas nesse estudo era diferente da de *D. carota*, o que pode também influenciar a absorção da toxina. O trabalho de Mohamed e Al Shehri (2009) é, de acordo com o que se apurou, o único que reporta a acumulação de MC em raízes tuberosas comestíveis. Neste trabalho a exposição de *R. sativus* com água contaminada com MC (0,3 -1,8 µg/L) proveniente de poços subterrâneos, levou à deteção de cerca de 360 ng/g P.F nas raízes da planta. Apesar de a concentração de toxina detetada nos tecidos das raízes de *R. sativus* ser cerca de 72 vezes mais elevada que a detetada no presente trabalho em *D. carota*, e da concentração de MC na água administrada a *R. sativus* ser mais baixa que a aplicada a *D. carota*, é de salientar que no estudo anterior não foi estimada a quantidade de MC total a que a planta foi exposta ao longo do ensaio (uma vez que não se sabe o número de regas efetuadas e o volume de água contaminada administrado às plantas durante o período de tempo que estiveram no campo agrícola), podendo ter sido mais elevada que a administrada a *D. carota* durante os 28 dias de exposição. De facto sabe-se que a acumulação da MC nos tecidos das plantas terrestres está dependente do tempo e da concentração de exposição (Crush *et al.*, 2008). Para além disso, torna-se novamente importante referir que a capacidade de acumulação de MC-LR nos tecidos das plantas difere de espécie para espécie (Chen *et al.*, 2004; Peuthert *et al.*, 2007; Crush *et al.*, 2008; Saqrane *et al.*, 2009).

Neste trabalho, o FBC calculado foi de 0,043. No entanto, é importante salientar que este fator foi calculado tendo em conta os resultados obtidos após quantificação por ELISA que para além da MC-LR livre, poderá estar a quantificar, por exemplo, produtos conjugados ou de destoxificação. Assume-se que a bioacumulação ocorre quando o FBC é superior a 1 isto é, a concentração nos tecidos da planta é superior à verificada no ambiente (Prieto *et al.*, 2011). Neste sentido podemos concluir que bioacumulação nas raízes de *D. carota* não ocorreu. Tal como referido na secção 1.6, a OMS estabeleceu que

o limite máximo de ingestão diária aceitável (IDA) de MC-LR em alimentos é de 0,04 µg/kg de massa corporal (WHO, 1999). Supondo que um indivíduo com peso de 60 kg consome, em média, 100 g de P.F de cenoura por dia e, tendo em conta a situação presente onde a concentração de MC total é de 5,23 ng/g de P.F de cenoura, a ingestão hipotética seria de 0,01 µg/kg de massa corporal, ou seja, inferior ao IDA. No entanto, é necessário considerar que no contexto ambiental as plantas podem estar em contacto com águas contaminadas por tempo superior ao avaliado neste estudo (28 dias), podendo a acumulação ocorrer em maior quantidade e, por isso, estes resultados não podem ser vistos como isentos de risco.

A biodisponibilidade da MC no solo tem sido pouco estudada. No presente trabalho tentou criar-se um cenário de exposição ecologicamente relevante, isto é, as plantas cresceram em condições de solo e foram expostas a um extrato celular de cianobactérias tóxicas. Este desenho experimental permitiu avaliar se o solo interfere na disponibilidade da toxina para a planta.

A toxina detetada no solo (PF) após contaminação do mesmo com extrato de *M. aeruginosa* contendo 50 µg/L MC-LR durante 28 dias foi de 41,77 ± 7,70 ng MC-LR/g quando a quantificação se realizou pelo MicroCystest, 171,47 ± 6,76 ng MC-LR/g P.F de solo, através da quantificação por ELISA e de 112,44 ± 32,60 ng MC-LR/g P.F de solo por LC-MS. Tal como no caso da quantificação da toxina nos tecidos das plantas também aqui se verificaram valores muito distintos entre os diferentes métodos utilizados. Novamente, a maior concentração de MC foi detetada por ELISA, provavelmente porque o método, para além da MC-LR livre (MC disponível para as plantas), detetou produtos provenientes da degradação da toxina. De facto, várias bactérias presentes no solo como *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp., *Rhodococcus* sp. e *Sphingomonas* sp., parecem ser capazes de degradar as MCs (Bourne *et al.*, 2001; Manage *et al.*, 2009). Contudo as diferenças entre o LC-MS e MicroCystest apenas podem ser justificadas com interferências de matriz que possam ter existido com o *kit*, e que podem levar à subestimação da concentração da toxina (Merel *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos demonstraram que o solo parece diminuir a concentração de toxina disponível para as plantas. Tendo em conta a concentração da toxina estimada por LC-MS, podemos afirmar que apenas 52,71% do total de toxina administrada esteve disponível para as plantas. Assim, tal como foi referido acima, apesar de em muitos trabalhos se terem detetado valores de toxina consideráveis nos tecidos das plantas (McElhiney *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Peuthert *et al.*, 2007; Crush *et al.*, 2008; Saqrane *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010b) é provável que este facto se deva a uma superior biodisponibilidade da toxina promovida pela cultura hidropónica. Assim sendo a não acumulação de MC nas raízes de *D. carota* pode ser explicada pela elevada adsorção e/ou degradação da toxina no solo.

Chen *et al.*, (2006b) tinham já reportado que as MCs são poluentes de elevada mobilidade no solo, referindo que essa mobilidade está sobretudo relacionada com o teor de argila do mesmo. Verificaram ainda que a MC pode persistir em solos agrícolas por períodos relativamente longos, com um tempo de semi-vida que pode variar entre 6 e 18 dias.

Apesar de o solo poder diminuir a disponibilidade da toxina para as culturas agrícolas, é importante salientar que uma vez que a MC atinja o solo poderá migrar das camadas superficiais do mesmo para as camadas mais profundas, aquando da ocorrência de precipitação, surgindo a possibilidade de lixiviação para fontes de água subterrânea (Chen *et al.*, 2006a).

No que se refere ao tempo de semi-vida e persistência da toxina no solo mais estudos são necessários para identificar os fatores que determinam estes dois parâmetros. Esta capacidade de persistência tem particular interesse uma vez que pode conduzir a uma elevada acumulação da toxina no solo, após ciclos consecutivos de rega e de novas culturas, fazendo com que além da irrigação a planta possa também estar a ser exposta à toxina já acumulada no solo aquando da sua plantação. Tendo este cenário em consideração, e num contexto ambiental onde as plantas podem estar em contacto com águas contaminadas por tempo superior ao avaliado neste trabalho (28 dias), o uso deste tipo de águas para irrigação de *D. carota* pode efetivamente resultar numa situação de risco para a segurança alimentar.

4.3. Efeitos do Extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR no Conteúdo de Minerais de *D. carota*

A aquisição de minerais por parte da planta, sobretudo dos micronutrientes, pode ser afetada por numerosos fatores tais como a constituição do solo, incluindo a composição microbiana, flora vegetal, fatores ambientais bem como a presença de contaminantes. Neste trabalho o conteúdo de minerais nas raízes foi alterado por exposição ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR, mostrando que esta mistura complexa de compostos químicos, onde se inclui a MC-LR, interfere com a assimilação de minerais pela planta. No entanto o processo que conduz a esta alteração é desconhecido.

Os minerais são fundamentais para garantir o crescimento e desenvolvimento bem-sucedido de tecidos, tanto vegetativos como reprodutivos, uma vez que servem como componentes estruturais de macromoléculas, como cofatores em reações enzimáticas, como solutos osmóticos necessários para manter o potencial de água adequado, ou como espécies ionizadas para fornecer equilíbrio de carga em compartimentos celulares (Grusak, 2001). Os minerais podem ser divididos em duas classes, com base nas quantidades

relativas necessárias para o crescimento das plantas: os macronutrientes minerais, requeridos pelas plantas em maiores quantidades, e os micronutrientes minerais, necessários em menores concentrações (Grusak, 2001). No presente trabalho, tanto a quantidade de macro como de micronutrientes minerais foi, em geral, mais elevada nas raízes das plantas expostas ao extrato contendo MC-LR. Lahrouni *et al.* (2013) sugeriram que o aumento da concentração de minerais pode derivar de uma ruptura da permeabilidade das membranas causada pela MC. Contudo, este efeito não deve ser atribuído exclusivamente à MC-LR, por existirem outros compostos no extrato com potencial atividade biológica. Embora o efeito da MC-LR na alteração da permeabilidade das membranas não seja de excluir, este deveria estar associado a outros efeitos tóxicos, que não foram observados no presente estudo. Assim, parece mais correto sugerir que o aumento de minerais pode estar relacionado com ação de compostos bioativos presentes no extrato cianobacteriano que poderão ter estimulado o transporte de minerais nas raízes. Outra explicação pode estar relacionada com um aumento da concentração destes elementos no solo fornecidos pelo extrato de *M. aeruginosa*. Estes fatores poderiam ter sido discriminados realizando o estudo com a toxina pura, em alternativa ao extrato, no entanto optou-se por uma situação que melhor mimetizasse o ambiente natural. Apesar do efeito do extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR na acumulação de macronutrientes minerais já ter sido descrito por vários autores para outras espécies (Saqrane *et al.*, 2009, Khalloufi *et al.*, 2012; Lahrouni *et al.*, 2013) este trabalho parece ser o primeiro a avaliar a acumulação de micronutrientes após exposição ao extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR.

Para garantir um adequado crescimento das plantas hortícolas é essencial que os nutrientes sejam assimilados em níveis apropriados. Uma deficiência de nutrientes poderá afetar o crescimento das plantas por efeitos diretos no metabolismo celular (ex. biossíntese de macromoléculas, funcionamento do sistema fotossintético, entre outros) (Grusak, 2001). Contudo, em excesso, e sobretudo no caso dos micronutrientes, podem ocorrer efeitos adversos, por vezes mais graves do que os causados pela sua deficiência (Mukhopadhyay e Sharma, 1991; Kampfinkel *et al.*, 1995; Fageria *et al.*, 2002). Saqrane *et al.* (2009) reportaram que o aumento da concentração de minerais foi diretamente proporcional à concentração de MC-LR presente no extrato usado para expor as plantas. No presente trabalho, parece também existir uma relação direta entre a concentração de MC-LR administrada e de minerais acumulados na raiz de planta. Esta relação torna-se mais evidente no caso dos micronutrientes. O aumento de minerais não teve consequências evidentes no crescimento da planta, no entanto convém ter em atenção que o excesso de minerais pode ser prejudicial, e favorecer a ação tóxica da MC-LR (efeito sinérgico).

4.4. Efeitos do Extrato Bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR no Conteúdo de Ácido Ascórbico de *D. carota*

A exposição de *D. carota* ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 10 e 50 µg/L de MC-LR afetou de forma significativa o conteúdo de ácido ascórbico das raízes. Uma vez que o ser humano não é capaz de sintetizar este composto, o consumo de alimentos ricos nesta vitamina torna-se importante pois desempenha um papel essencial na síntese de colagénio, um importante componente estrutural dos vasos sanguíneos, tendões, ligamentos e ossos (Vasudevan e Sreekumari, 2007). A carência de Vitamina C é responsável pelo escorbuto (Hodges *et al.*, 1969). É ainda importante na síntese de neurotransmissores como a noripenifrina e do aminoácido carnitina, ambos relacionados com a síntese de ácidos biliares (Burtis *et al.*, 2006; Martin, 2006). Em pequenas quantidades, protege dos danos causados pelos radicais livres e EROs, sobretudo pelo seu papel na redução da Vitamina E oxidada (Kuo, 2013). Desta forma, do ponto de vista nutritivo o uso de águas contaminadas com *M. aeruginosa* contendo MC-LR na irrigação desta cultura hortícola pode levantar problemas.

Nas plantas, o ácido ascórbico é conhecido como o maior antioxidante primário, agindo como substrato primário na via enzimática de destoxificação das EROs como H₂O₂ e diretamente na neutralização de radicais superóxido (O₂⁻), singletos de oxigénio (O⁻) e radicais hidroxilo (OH⁻). É também um poderoso antioxidante secundário, reduzindo a forma oxidada do α-tocoferol (Noctor e Foyer, 1998).

O conteúdo de ácido ascórbico está associado com a resistência a *stress* oxidativo e à longevidade das plantas. Mais ainda, os níveis de ácido ascórbico têm sido apontados como importantes na regulação da senescência, na defesa contra pragas e ainda no crescimento das plantas (Mazid *et al.*, 2011). Assim, para além do efeito negativo na qualidade nutritiva, o decréscimo do conteúdo de ácido ascórbico após exposição a extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR poderá ter um impacto negativo em vários aspetos do desenvolvimento das plantas, podendo inclusivamente levar a perdas económicas. De facto, um estudo com mutantes de *Arabidopsis* com deficiência na biossíntese de ácido ascórbico (*vtc1*) mostrou que as mesmas eram mais pequenas e mais sensíveis a fatores abióticos (Lee, 1991).

As MCs foram já apontadas como indutoras de *stress* oxidativo levando à produção de EROs (ver secção 1.3.5). Assume-se que as EROs produzidas por vários tipos de *stress* estão envolvidas na oxidação do ácido ascórbico e do ácido dehidroascórbico (forma oxidada do ácido ascórbico), levando a uma redução do conteúdo de ácido ascórbico (Fridovich e Handler, 1961). Keutgen e Pawelzic (2007), ao estudarem o *stress* abiótico (NaCl) em *Fragaria*, colocaram a hipótese de que quando a taxa de oxidação do ácido

ascórbico excede a capacidade de reciclagem, pode ocorrer um declínio da concentração do ascorbato. Assim não é de excluir uma resposta semelhante no caso de *D. carota*, o que explica a diminuição do ácido ascórbico após exposição a extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 10 e 50 µg MC-LR/L. Apesar do papel do ácido ascórbico na defesa das plantas contra contaminantes como os metais pesados ser já conhecido, nada se sabe acerca da sua função contra o *stress* causado por exposição a cianotoxinas. De facto, pelo que se apurou, este é o primeiro trabalho a investigar o impacto da MC no conteúdo de ácido ascórbico. Os resultados obtidos levantam questões pertinentes sobre o desenvolvimento das plantas, *stress* fisiológico e valor nutricional das cenouras.

Destaca-se ainda a necessidade de otimização dos métodos de extração/quantificação do ácido ascórbico, uma vez que os resultados dos parâmetros de validação (resultados não apresentados), como a precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e exatidão (recuperação das dopagens) apresentaram coeficientes de variação muito elevados (coeficientes de variação na ordem dos 12% quando os valores esperados seriam na ordem dos 5%). Contudo as leituras entre as diferentes réplicas dos diferentes tratamentos não apresentaram desvios padrão muito elevados o que leva a considerar os resultados como consistentes.

4.5. Efeitos do Extrato Bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR no Conteúdo de β-Caroteno de *D. carota*

A exposição de *D. carota* ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo 10 e 50 µg/L de MC-LR não afetou de forma significativa o conteúdo de β-caroteno das raízes. Uma vez que o β-caroteno (Provitamina A) é um precursor da vitamina A (Bauernfeind, 1972), e que o organismo humano não é capaz de sintetizar esta vitamina, o consumo de alimentos ricos em β-caroteno torna-se essencial (Novotny *et al.*, 1995; Strube e OveDragsted, 1999).

Apesar de nas condições de exposição testadas o conteúdo de β-caroteno na cenoura não ter sido afetado, não é possível concluir que a toxina não altera o conteúdo de β-caroteno nesta cultura, sendo necessário mais investigação em diferentes cenários ambientais e de exposição à toxina. De facto, este é o primeiro trabalho que foca os efeitos do extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR no conteúdo de β-caroteno. Contudo, outros fatores abióticos que provocam *stress*, como aumento da concentração de NaCl, carência de água ou radiação UV (Fathi e Asem, 2013; Ratnakar e Rai, 2013), foram já apontados como causadores da alteração nos seus níveis em algumas espécies de plantas. No entanto, enquanto algumas destas condições conduziram a um aumento dos níveis de β-caroteno outras a conduziram a uma diminuição (Ayala-Astorga e Alcaraz-Melendez, 2010; Fathi e Asem, 2013; Ratnakar e Rai, 2013). Os níveis de β-caroteno

podem não variar de forma diretamente proporcional à intensidade do *stress* imposto à planta. *Stress* moderado pode estimular a síntese do β -caroteno, associado a um mecanismo de proteção, enquanto um *stress* severo provoca uma inibição da sua síntese (Wang e Frei, 2011). Deste modo, será importante explorar o efeito de concentrações de MC-LR ligeiramente mais elevadas que as usadas neste trabalho, de forma a poder avaliar-se a resposta da planta, no que a este parâmetro diz respeito.

Tal como no caso do ácido ascórbico, será necessária a otimização dos métodos de extração/quantificação do β -caroteno, uma vez que os resultados dos parâmetros de validação (resultados não apresentados), como a precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e exatidão (recuperação das dopagens) apresentaram coeficientes de variação muito elevados (coeficientes de variação na ordem dos 12% quando os valores esperados seriam na ordem dos 5%) tornando o método menos sensível. Neste caso foram observados grandes desvios nos valores de β -caroteno entre réplicas, (sobretudo nos tratamentos controlo e 50 $\mu\text{g/L}$ do tempo 32 dias) que influenciaram a análise estatística dos mesmos.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos devemos concluir que o extrato bruto de *M. aeruginosa*, com concentrações de MC-LR entre 10 e 50 µg/L, não tem um efeito negativo evidente no crescimento de *D. carota*. No entanto a observação de que após 28 dias as raízes expostas ao extrato com a concentração de toxina mais elevada apresentaram menor biomassa que as do grupo controle, pode querer indicar que exposições mais prolongadas podem levar a efeitos mais severos no crescimento.

Concluiu-se ainda que a exposição de *D. carota* ao extrato bruto de *M. aeruginosa* com estas concentrações de MC-LR não parece afetar processos bioquímicos vitais como a fotossíntese, levando inclusive a uma estimulação do processo fotossintético.

Os resultados da quantificação da toxina apontam para a ausência, ou para a presença da mesma em concentrações muito baixas nas raízes de *D. carota*. Estes resultados levantam a hipótese de que não ocorre bioacumulação da toxina nas cenouras e que em condições ambientais semelhantes, esta toxina não representa um risco para a saúde dos consumidores. Este processo deve ser, no entanto, analisado com maior detalhe em diferentes condições ambientais. Devido a algumas interferências da matriz de cenoura, os métodos analíticos para extração e quantificação de MC-LR precisam de ser futuramente otimizados.

Os resultados deste trabalho demonstram que o solo reduz a toxina disponível para as plantas. No entanto, é importante salientar que os trabalhos sobre o destino de cianotoxinas como a MC nos ecossistemas terrestres são escassos e que mais informação sobre o tema é precisa, sobretudo no que se refere ao tempo de semi-vida e persistência da toxina.

Foi também possível concluir que a exposição das plantas afeta processos metabólicos como a acumulação de minerais e a síntese de vitaminas. Os métodos analíticos para extração e quantificação de ácido ascórbico e β-caroteno precisam de ser otimizados. Apesar do conteúdo de β-caroteno não ter sido afetado, o oposto se verificou no que ao conteúdo de minerais e de ácido ascórbico diz respeito. Apesar do conteúdo de minerais ter sido, em geral, mais elevado nas plantas sujeitas a tratamento que nas plantas controle, esta situação pode levantar questões de toxicidade para a planta, se a

ácido ascórbico, os resultados apontam para um decréscimo desta vitamina essencial na alimentação humana. É ainda de salientar a ausência de variações no conteúdo de β -caroteno contudo, este resultado requer confirmação após otimização do método de extração e quantificação.

Os resultados obtidos demonstram uma clara alteração na qualidade nutricional da cenoura após exposição ao extrato bruto de *M. aeruginosa* contendo MC-LR

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para tornar os métodos de quantificação da toxina mais sensíveis e precisos em matrizes biológicas complexas como os extratos de cenoura, por forma a produzir dados de acumulação de maior confiança, é importante que futuramente todo o sobrenadante recolhido, após extração da toxina dos tecidos da planta, seja limpo (de forma a eliminar interferentes indesejados) e concentrado, recorrendo por exemplo, a colunas de extração em fase sólida (SPE) C₁₈ de modo a que se aumente a quantidade de MC presente para que a sua quantificação seja possível por LC-MS. Este passo pode ainda ser importante para eliminar os falsos positivos que se observaram por ELISA. Será ainda necessário otimizar os métodos de quantificação e extração da MC-LR com dopagens para que possíveis interferências de matriz sejam eliminadas, ou pelo menos tidas em consideração.

Será ainda relevante repetir o ensaio de contaminação do solo coo extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR mas, desta vez, fazendo-se a extração da toxina presente no solo com água em vez de MeOH, uma vez que no contexto ambiental será este o solvente que melhor mimetizará o que realmente acontece, de modo a estimar qual a percentagem de toxina recuperada e disponível para as plantas neste caso. É igualmente necessário compreender melhor os mecanismos de degradação da toxina, para se tentar perceber se a irrigação continuada com água contaminada com MC-LR pode levar à sua acumulação, atingindo concentrações consideradas de risco para as culturas e segurança alimentar. Até que estes mecanismos estejam totalmente compreendidos, será ainda importante regular o uso de cianobactérias provenientes de florescências como biofertilizantes. Será igualmente importante criar planos de monitorização das águas utilizadas na agricultura e contaminação dos solos, para esta toxina específica.

No que diz respeito à caracterização do estado fisiológico da planta e em particular da capacidade fotossintética, será também importante complementar os dados obtidos com o PAM com outras técnicas, como por exemplo a quantificação dos pigmentos fotossintéticos, que permitam verificar o grau de fotoinibição em todo o tecido e não apenas nos locais das folhas medidos pelo PAM. Caso se confirme a estimulação da fotossíntese pelo extrato contendo MC-LR, será importante tentar perceber os mecanismos responsáveis por esta resposta, e se essa estimulação pode estar relacionada com a maior assimilação de minerais que se observou nas plantas expostas.

Apesar de até um certo ponto o aumento de nutrientes minerais poder ser benéfico para as plantas, quantidades de nutrientes aumentadas podem levar a problemas de toxicidade. Assim, futuramente será necessário avaliar bem este parâmetro em culturas agrícolas expostas a cianobactérias e cianotoxinas e tentar verificar se uma exposição mais alargada de *D. carota* (durante o tempo de crescimento que em geral estas culturas têm em campos de produção) bem como de outras plantas hortícolas poderá levantar problemas associados com perdas económicas.

Por outro lado, será importante perceber o estado fisiológico da planta no que ao *stress* diz respeito, através da análise de marcadores adequados. Através da análise do conteúdo de ácido ascórbico pode supor-se que a diminuição observada está relacionada com as condições de *stress* a que a planta esteve exposta. No entanto, como este é o primeiro trabalho a quantificar a vitamina após exposição ao extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR, será importante perceber os mecanismos de resposta da planta. Devido à elevada importância que o ácido ascórbico tem na alimentação do Homem, será também importante estender a quantificação do mesmo a outras plantas hortícolas, consideradas como fontes essenciais da vitamina. Será ainda necessária a otimização dos métodos de extração/quantificação, uma vez que os resultados dos parâmetros de validação, como a precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e exatidão (recuperação das dopagens) apresentaram coeficientes de variação muito elevados. De facto, este pode ter sido o motivo para não se observarem diferenças estatisticamente significativas no conteúdo de β -caroteno e, por isso, a sua quantificação após a otimização dos métodos deve ser repetida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboal, M. & Puig, M.A. (2005). Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. *Toxicon*, 45(4): 509–518.
- Ahamad, M.N., Saleemullah, M., Shah, H.U., Khalil, I.A., Saljoqi, A.U.R. (2007). Determination of beta content in fresh vegetables using high performance liquid chromatography. *Sarhad Journal of Agriculture*, 23(3): 767-770.
- Apel, K. & Hirt, H. (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373-99.
- Apeldoorn, M.E., Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(1): 7-60.
- Ayala-Astorga, G.I. & Alcaraz-Melendez, L. (2010). Salinity effects on protein content, lipid peroxidation, pigments and proline in *Paulownia imperialis* (Siebold and Zuccarini) and *Paulownia fortunei* (Seemann and Hemsley) grown in vitro. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(5): 01-15.
- Azevedo, C. C., Azevedo, J., Osório, H., Vasconcelos, V., Campos, A. (2014) Early physiological and biochemical responses of rice seedlings to low concentration of microcystin-LR. *Ecotoxicology*, 23(2): 107-121.
- Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Pflugmacher, S. (2005). Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. *Harmful Algae*, 4: 139–150.
- Barker, A.V. (1979). Nutritional factors in photosynthesis of higher plants. *Journal of Plant Nutrition*, 1(3): 309-342.
- Bauernfeind, J.C. (1972). Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *Agricultural Food Chemistry*, 20 (3): 456–473.
- Bischoff, K. (2001). The toxicology of microcystin-LR: occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment. *Veterinary and Human Toxicology*, 43: 294-297.
- Bourne, D.G., Riddles, P., Jones, G.J., Smith, W., Blakeley, R.L. (2001). Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Environmental Toxicology*, 16: 523–534.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (2006). Vitamins and trace elements. In: Tietz textbook of Clinical chemistry and Molecular diagnostics, 4th Edn., Saunders-Elsevier, pp: 1106-1107.

- Cadenas, E. (1995). Mechanisms of Oxygen Activation and Reactive Oxygen Species Detoxification. In: Ahmad, S. (Ed.), *Oxidative stress and antioxidant defences in biology*, Chapman & Hall, pp 1-61.
- Carmichael, W.W., Beasley, V.R., Bunner, D.L., Eloff, J.N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K-I, Krishnamurthy, T., Yu, M-J., Moore, R.E., Rinehart, K., Runnegar, M., Skulberg, O.M., Watanabe, M. (1988). Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, 26: 971-973.
- Carrasco, D., Moreno, E., Sanchis, D., Wörmer, L., Paniagua, T., Del Cueto, A., Quesada, A. (2006). Cyanobacterial abundance and microcystin occurrence in Mediterranean water reservoirs in Central Spain: microcystins in the Madrid area. *European Journal of Phycology*, 41: 281–291.
- Chen, J., Song, L., Dai, J., Gan, N., Zhili, L. (2004). 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*, 43: 393-400.
- Chen, Y. M., Lee, T. H., Lee, S. J., Huang, H. B., Huang, R. H., Chou, H.N. (2006a). Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins. *Toxicon*, 47: 742-764.
- Chen, W., Song, L., Gan, N., Li, L. (2006b). Sorption, degradation and mobility of microcystins in Chinese agriculture soils: risk assessment for groundwater protection. *Environmental Pollution*, 144: 752–758.
- Chen, J., Dai, J., Zhang, H., Wang, C., Zhou, G., Han, Z., Liu, Z. (2010). Bioaccumulation of microcystin and its oxidative stress in the apple (*Malus pumila*). *Ecotoxicology*, 19: 796–803.
- Chen, J., Han, F. X., Wang, F., Zhang, H. Q., Shi, Z. Q. (2012a). Accumulation and phytotoxicity of microcystin-LR in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76: 193–199.
- Chen, J., Zhong, Y. M., Zhang, H. Q., Shi, Z. Q. (2012b). Nitrate reductase-rependent nitric oxide production is involved in microcystin-LR induced oxidative stress in *Brassica rapa*. *Water, air & soil pollution*, 223(7): 4141-4152.
- Chen, J., Zhang, H. Q., Hu, L. B., Shi, Z. Q. (2013). Microcystin-LR-induced phytotoxicity in rice crown root is associated with the cross-talk between auxin and nitric oxide. *Chemosphere*, 93: 283-293.
- Chorus, I., Falconer, I.R., Slas, H.J., Bartam, J. (2000). Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 3: 323-34.
- Chorus I (2001). Cyanotoxins. Occurrence, causes and consequences. Ingrid Chorus (Ed.) Springer, 1st Edn, Germany, pp: 1-102.
- Codd, G. A., Metcalf, J. S., Beattie, K. A. (1999). Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon*, 37: 1181–1185.
- Codd, G. A. (2000). Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*, 16(1): 51–60.

- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S. (2005). Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3): 264-272.
- Corbel, S., Mougin, C., Bouaïcha, N. (2014). Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere*, 96: 1-15.
- Crush, J. R., Briggs, L. R., Sprosen, J. M., Nichols, S. N. (2008). Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. *Environmental Toxicology*, 23: 246–252.
- Dawson, R.M. (1998). The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 36 (7): 953-962.
- Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto. Diário da República, 1ª série – Nº 164. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.
- Dietrich, D.R. & Hoeger, S. (2005). Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3): 273-289.
- Ding, W.X. & Ong, C.N. (2003). Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiology Letters*, 10880: 1-7.
- El Herry, S., Fathalli, A., Rejeb, A.J.B., Bouaïcha, N. (2008). Seasonal occurrence and toxicity of *Microcystis* spp. and *Oscillatoria tenuis* in the *Lebna Dam, Tunisia*. *Water Research*, 42: 1263–1273.
- El Khalloufi, F., Oufdou, K., Lahrouni, M., El Ghazali, I., Saqrane, S., Vasconcelos, V., Oudra, B. (2011). Allelopathic effects of cyanobacteria extracts containing microcystins on *Medicago sativa-Rhizobia* symbiosis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 431–438.
- El Khalloufi, F., El Ghazali, I., Saqrane, S., Oufdou, K., Vasconcelos, V., Oudra, B. (2012). Phytotoxic effects of a natural bloom extract containing microcystins on *Lycopersicon esculentum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79: 199–205.
- El Khalloufi, F., Oufdou, K., Lahrouni, M., Faghire, M., Peix, A., Ramírez-Bahema, M., Vasconcelos, V., Oudra, B. (2013). Physiological and antioxidant responses of *Medicago sativa-rhizobia* symbiosis to cyanobacterial toxins (Microcystins) exposure. *Toxicon*, 76: 167-177.
- Fageria, N.K., Baligar, V.C., Clark, R.B. (2002). Micronutrients in crop production. In Donald L. Sparks. *Advances in Agronomy*, Vol. 77, Burlington: Academic Press, pp. 185–268.
- Fageria, N.K & Moreira, A. (2011). The Role of Mineral Nutrition on Root Growth of Crop Plants. In Donald L. Sparks. *Advances in Agronomy*, Vol. 110, Burlington: Academic Press, pp. 251-331.
- Fastner, J., Neumann, U., Wirsing, B., Weckesser, J., Wiedner, C., Nixdorf, B., Chorus, I., (1999). Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. *Environmental Toxicology*, 14: 13–22.
- Fathi, M. & Asem, A. (2013). Investigating the impact of NaCl salinity on growth, β -carotene and chlorophyll a in the content life of halophytes of algae *Chlorella* sp. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation Bioflux*, 6(3): 241-245.

- Figueiredo, D.R., Azeiteiro, U.M., Esteves, S.M., Gonçalves, F.J.M., Pereira, J.M. (2004). Microcystin-producing blooms – a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59: 151-163.
- Fischer, W.L., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B. (2005). Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 257-263.
- Fridovich, I. & Handler, P. (1961). Detection of free radicals generated during enzymic oxidation by the initiation of sulphite oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 236: 1836–1840.
- Garbers, C., DeLong, A., Deruére, J., Bernasconi, P., Söll, D. (1996). A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 15(9): 2115-2124.
- Gehring, M.M., Kewada, V., Coates, N., Downing, T. G. (2003). The use of *Lepidium sativum* in a plant bioassay system for the detection of microcystin-LR. *Toxicon*, 41: 871–876.
- Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R., Andrinolo, D. (2011). An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Marine Drugs*, 9: 2164–2175.
- Graham, J.M. & Wilcox, L.W. (2000). Cyanobacteria. In: Graham, J.M., Wilcox, L.W. (Eds.) *Algae*, Prentice-Hall, N.Y., pp.97-131.
- Grusak, M. A. (2001). Plant Macro - and Micronutrient Minerals. *Encyclopedia of Life Sciences*, pp: 1-5.
- Gupta, U. C. & Gupta, S.C. (2014). Sources and Deficiency Diseases of Mineral Nutrients in Human Health and Nutrition: A Review. *Pedosphere*, 24(1): 13–38.
- Gurbuz, F., Metcalf, J.S., Karahan, A.G., Codd, G.A. (2009). Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey. *Science of the Total Environment*, 407: 4038–4046.
- Gutiérrez-Praena, D., Campos, A., Azevedo, J., Neves, J., Freitas, M., Guzmán-Guillén, R., Cameán, A. M., Renaut, J., Vasconcelos, V. (2014). Exposure of *Lycopersicon esculentum* to microcystin-LR: effects in the leaf proteome and toxin translocation from water to leaves and fruits. *Toxins*, 6(6): 1837-1854.
- Hitzfeld, B.C., Höger, S.J., Dietrich, D.R. (2000). Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment and human risk assessment. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 108(S1): 113-122.
- Hodges, R.E., Baker, E.M., Hood, J., Sauberlich, H.E., March, S.C. (1969). Experimental scurvy in man. *American Journal of Clinical Nutrition*, 22: 535–48.
- IARC. (2010). Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 94, 327–412. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/suppl7.pdf>
- Ibelings, B.W. & Chorus I. (2007). Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution*, 150(1): 177-192.

- Ismail, A. & Sook Fun, C. (2003). Determination of vitamin C, β -carotene and riboflavin contents in five green vegetables organically and conventionally grown. *Malaysian Journal of Nutrition*, 9(1): 31-39.
- Järvenpää, S., Lundberg-Niinistö, C. L., Spoof, L., Sjövall, O., Tyystjärvi, E., Meriluoto, J. (2007). Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon*, 49, 865–874.
- Kampfenkel, K., Montagu, M.V., Inzé, D. (1995). Effects of Iron Excess on *Nicotiana glumbagnifolia* Plants' Implications to Oxidative Stress. *Plant Physiology*, 107: 725-735.
- Karjalainen, M., Reinikainen, M., Lindvall, F., Spoof, L., Meriluoto, J.A.O. (2003). Uptake and accumulation of dissolved, radiolabeled nodularin in Baltic Sea zooplankton. *Environmental Toxicology*, 18: 52-60.
- Keutgen, A.J. & Pawelzic, E. (2007). Modifications of strawberry fruit antioxidant pools and fruit quality under NaCl Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4066–4072.
- Kittler, K., Schreiner, M., Krumbein, A., Manzei, S., Koch, M., Rohn, S., Maul, R. (2012). Uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in *Brassica* vegetables. *Food Chemistry*, 133(3): 875–879.
- Kótai, J. (1972). Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. *Norwegian Institute for Water Research*, B-11/69.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I., Fitzgeralds, J. (1999). Human health aspects. In Chorus I, Bartam J (Eds). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*, WHO, Geneve, Pp.: 113-160,
- Kuo, S-M. (2013). The multifaceted biological roles of vitamin C. *Journal of Human Nutrition & Food Sciences*, 3(5): 231. doi: 10.4172/2155-9600.1000231
- Kurki-Helasma, K. & Meriluoto, J. (1998). Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Toxicon*, 36 (12): 1921–1926.
- Lahrouni, M., Oufdou, K., Fanghire, M., Peix, A., El Khalloufi, F., Vasconcelos, V., Oudra, B. (2012). Cyanobacterial extracts containing microcystins affect the growth, nodulation process and nitrogen uptake of faba bean (*Vicia faba* L., Fabaceae). *Ecotoxicology*, 21: 681-687.
- Lahrouni, M., Oufdou, K., El Khalloufi, F., Baz, M., Lafuente, A., Dary, M., Pajuelo, E., Oudra, B. (2013). Physiological and biochemical defense reactions of *Vicia faba* L.-*Rhizobium* symbiosis face to chronic exposure to cyanobacterial bloom extract containing microcystins. *Environmental Science and Pollution Research International*, 20(8): 5405-5415.
- Lee, E.H. (1991). Plant resistance mechanisms to air pollutants: rhythms in ascorbic acid production during growth under ozone stress. *Chronobiology International*, 8: 93–102.
- Liu, Y., Chen, W., Li, D., Huang, Z., Shen, Y., Liu, Y. (2011). Cyanobacteria-/cyanotoxin contaminations and eutrophication status before Wuxi drinking water crisis in Lake Taihu, China. *Journal of environmental sciences (China)*, 23(4): 575–581.

- Lomax, T. L., Muday, G. K., Rubery, P. H. (1995). Auxin transport. In PJ Davies, (Ed), *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd Edn., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp.: 509-530.
- Luan, S. (1998). Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. *Trends in Plant Science*, 3: 271-275.
- Luciano, J.Q., Isabel, O.S., Robert, S.F., Afonso, M.R., Olga, M.B. (2009). Comparative study on antioxidant properties of carrot juice stabilized by high intensity pulsed electric field or heat treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89: 2636-2642.
- MacKintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, G.A., 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *Febs Lett.*, 264: 187–192.
- MacKintosh, R.W., Dalby, K.N., Campbell, D.G., Cohen, P.T.W., Cohen, P., Mackintosh, C. (1995). The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *Febs Lett.*, 371: 236-240.
- Manage, P.M., Edwards, C., Singh, B.K., Lawton, L.A. (2009). Isolation and identification of novel microcystin-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 6924-6928.
- Mankiewicz, J., Tarczynska, M., Walter, Z., Zalewski, M. (2003). Natural toxins from cyanobacteria. *Acta Biologica Cracoviensia*, 45(2): 9-20.
- Marschner, H., Kirkby, E.A., Cakmak, I. (1996). Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of Experimental Botany*, 47(Special Issue): 1255-1263.
- MartinCook, A. (2006). Vitamins and trace elements. In *Clinical chemistry and metabolic medicine*, 7th Edn., Rib BackPower, pp: 229-230.
- Masango, M., Myburgh, J., Botha, C., Labuschagne, L., Naicker, D. (2008). A comparison of in vivo and in vitro assays to assess the toxicity of algal blooms. *Water Research*, 42: 3241-3248.
- Máthé, C., M-Hamvas, M., Vasas, G. (2013). Microcystin-LR and Cylindrospermopsin Induced Alterations in Chromatin Organization of Plant Cells. *Marine Drugs*, 11: 3689-3717.
- Maxwell, K. & Johnson, N. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659-668.
- Mazid, M., Khan, T.A., Khan, Z.H., Quddusi, S., Mohammad, F. (2011). Occurrence, biosynthesis and potentialities of ascorbic acid in plants. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 1(2): 167-184.
- McElhiney, J., Lawton, L.A., Leifert, C. (2001). Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon*, 39: 1411-1420.
- Meier-Abt, F., Hammann-Hänni, A., Stieger, B., Ballatori, N., Boyer, J. L. (2007). The organic anion transport polypeptide 1d1 (Oatp1d1) mediates hepatocellular uptake of

- phalloidin and microcystin into skate liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218(3): 274-279.
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., Thomas, O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*, 59: 303-327.
- M-Hamvas, M., Máthé, C., Molnár, E., Vasas, G., Grigorszky, I., Borbely, G. (2003). Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L seedlings. *Aquatic Toxicology*, 62: 1-9.
- Miller, M. J. & Fallowfield, H. J. (2001). Degradation of cyanobacterial hepatotoxins in batch experiments. *Water Science and Technology*, 43: 229-232.
- Mohamed, Z. & Al Shehri, A. M. (2009). Microcystins in groundwater wells and their accumulation in vegetable plants irrigated with contaminated waters in Saudi Arabia. *Journal of Hazardous Materials*, 172(1): 310-315.
- Msagati, T.A.M., Siame, B.A., Shushu, D.D. (2006). Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology*, 78: 382-397.
- Mukhopadhyay M. & Sharma, A. (1991). Manganese in cell metabolism of higher plants. *Botanical Review*, 57: 117-149.
- Mur, L.R., Skulberg, O.M., Utkilen, H. (1999). Cianobacteria in the environment. In: I. Chorus, J.Bartram (Eds.) Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management, E & FN Spon, London, pp.15-40.
- Nasri, H., El Herry, S., Bouaïcha, N. (2008). First reported case of turtle deaths during a toxic *Microcystis* spp. bloom in Lake Oubeira. Algeria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 535-544.
- Nicolle, C., Simon, G., Rock, E., Amouroux, P., Rémésy, C. (2004). Genetic variability influences carotenoid, vitamin, phenolic, and mineral content in white, yellow, purple, orange and dark orange carrot cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(4): 523-529.
- Noctor, G. & Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and glutathione. Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249-279.
- Novotny, J.A., Dueker, S.R., Zech, L.A., Clifford, A.J. (1995). "Compartmental analysis of the dynamics of β -carotene metabolism in an adult volunteer". *Journal of Lipid Research*, 36 (8): 1825-1838.
- OECD. (2005). Emerging risks to water supplies: Best practice for improved management and preparedness to protect public health.
- Oguchi, R., Douwstra, P., Fujita, T., Chow, W.S., Terashima, I. (2011). Intra-leaf gradients of photoinhibition induced by different color lights: implications for the dual mechanisms of photoinhibition and for the application of conventional chlorophyll fluorometers. *New Phytologist*, 191: 146-159.

- O'Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A., Gobler, C.J. (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, 14: 313-334.
- Ouahid, Y. (2008). Short and long-term evolution of cyanobacteria biomass and its microcystin content in the drinking-water supply Pinilla. Identification and characterization of microcystin producing and non-producing *Microcystis* strains. PhD thesis. Madrid: Universidade Autónoma de Madrid - Faculdade de Ciências.
- Oudra, B., Loudiki, M., Sbiyyaa, B., Martins, R., Vasconcelos, V., Namikoshi, N. (2001). Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake-reservoir (Morocco). *Toxicon*, 39: 1375-1381.
- Pereira, S., Saker, M., Vale, M., Vasconcelos, V. (2009). Comparison of sensitivity of grasses (*Lolium perenne* L. and *Festuca rubra* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to water contaminated with microcystins. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83: 81-84.
- Peuthert, A., Chakrabarti, S., Pflugmacher, S. (2007). 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*, 22: 436-442.
- Peuthert, A. & Pflugmacher, S. (2010). Influence of the cyanotoxin microcystin-LR on tocopherol in Alfafa seedlings (*Medicago sativa*). *Toxicon*, 56: 411-417.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Beattie, K.A., Krause, E., Steinberg, C.E.W., Codd, G.A. (2001). Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (Cav) Trin. Ex Steud. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 846-852.
- Pflugmacher, S., Jung, K., Lundvall, L., Neumann, S., Peuthert, A. (2006). Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(9): 2381-2387.
- Pflugmacher, S. (2007). Reduction in germination rate and elevation of peroxidase activity in *Zea mays* seedlings due to exposure to different microcystin analogues and toxic cell free cyanobacterial crude extract. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 81: 45 - 48.
- Pflugmacher, S., Aulhorn, M., Grimm, B. (2007a). Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants. *New Phytologist*, 175: 482-489.
- Pflugmacher, S., Hofmann, J., Hübner, B. (2007b). Effects on growth and physiological parameters in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in soil and irrigated with cyanobacterial toxin contaminated water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(12): 2710-2716.
- Pichardo, S. & Pflugmacher, S. (2011). Study of the antioxidant response of several bean variants to irrigation with water containing MC-LR and cyanobacterial crude extract. *Environmental Toxicology*, 26(3): 300-306.

- Pratas, J., Favas, P., Paulo, C., Rodrigues, N., Prasad, M.N.V. (2012). Uranium accumulation by aquatic plants from uranium-contaminated water in central Portugal. *International Journal of Phytoremediation*, 14: 221-234.
- Prakash, S., Lawton, L.A., Edwards, C. (2009). Stability of toxigenic *Microcystis* blooms. *Harmful Algae*, 8: 377-384.
- Prieto, A., Campos, A., Cameán, A., Vasconcelos, V. (2011). Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 1973-1980.
- Ramanan, S., Tang, J., Velayudhan, A. (2000). Isolation and preparative purification of microcystin variants. *Journal of Chromatography A*, 883(1-2): 103-112.
- Rapala J, Erkomaa K, Kukkonen J, Sivonen K, Lahti K. (2002). Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography–UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay - Comparison of methods. *Analytica Chimica Acta*, 466: 213-231.
- Ratnakar, A. and Rai, A. (2013) Effect of NaCl salinity on β -Carotene, thiamine, riboflavin and ascorbic acid contents in the leaves of *Amaranthus Polygamous* L. var. Pusa Kirti. *Octa Journal of Environmental Research*, 1(3): 211-216
- Romero-Oliva, C- S., Contardo-Jara, V., Block, T., Pflugmacher, S. (2014). Accumulation of microcystin congeners in different aquatic plants and crops-a case study from lake Amatitlán, Guatemala. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 102: 121-128.
- Sangolkar, L.N., Maske, S.S., Chakrabarti, T. (2006). Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Water Research*, 40(19): 3485-3496.
- Saqrane, S., Ghazali, I.E., Oudra, B., Bouarab, L., Vasconcelos, V. (2008). Effect of cyanobacteria producing microcystins on seed germination and seedling growth of several agricultural plants. *Journal of Environmental Science and Health Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 43: 443-451.
- Saqrane, S., Ouahid, Y., El Ghazali, I., Oudra, B., Bouarab, L., del Campo, F.F. (2009). 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*, 53: 786-796.
- Sheen, J. (1993). Protein phosphatase activity is required for light-inducible gene expression in maize. *The EMBO Journal*, 12: 3497-350.
- Siegl, G., MacKintosh, C., Stitt, M. (1990). Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves: evidence from the effects of okadaic acid and microcystin. *FEBS Letters*, 270: 198-202.
- Simon, P.W. (2000). Domestication, historical development, and modern breeding of carrot. *Plant Breeding Reviews*. 19:157-190.
- Singh, D.P., Beloy, J., McInerney, J.K., Day, L. (2012). Impact of boron, calcium and genetic factors on vitamin C, carotenoids, phenolic acids, anthocyanins and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*). *Food Chemistry*, 132: 1161-1170.

- Smith, R.D. & Walker, J.C. (1996). Plant protein phosphatases. *Annual Review of Plant Biology*, 47: 101-125
- Smith, V. H. Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 100 (1-3): 179-196.
- Siong, T.E & Lam, L.C. (1992). Analysis of Carotenoids in Vegetables by HPLC. *ASEAN Food Journal*, 7(2): 91-99.
- Spoof, L., Vestervik, P., Lindholm, T., Meriluoto, J. (2003). Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1020: 105-119.
- Strube, M. & Ove Dragsted, L. (1999). Naturally Occurring Antitumorogens. IV. Carotenoids Except β -Carotene. Copenhagen: Nordic Council of Ministers. p. 48.
- Takeda, S., Mano, S., Ohto, M., Nakamura, K., (1994). Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A block the sugar-inducible gene expression in plants. *Plant Physiology*, 106: 567-574.
- Tegeder, M. & Rentsch, D. (2010). Uptake and partitioning of amino acids and peptides. *Molecular Plant*, 3: 997-1011.
- Tobias, I.B. & Wilson, J.E. (1997). Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules. *Plant Physiology*, 113: 493-502.
- Toroser, D. & Huber, S. C. (2000). Carbon and nitrogen metabolism and reversible protein phosphorylation. *Advances in Botanical Research*, 32: 435-458
- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M.F., Park, H.D., Chen, G.C., Chen, G., Yu, S.Z. (1996). Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxins, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17: 1317-1321.
- Vasconcelos, V.M, Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Namikoshi, M. (1996). Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in portuguese freshwaters. *Water Research*, 30(10): 2377-2384.
- Vasconcelos, V. (2001). Cyanobacteria toxins: diversity and ecological effects. *Limnetica*, 20: 45-48.
- Vasconcelos, V. (2006) Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help. *Limnetica*, 25(1-2): 425-432.
- Vasudevan, D.M. & Sreekumari, S. (2007). Water-soluble vitamins in textbook of biochemistry for medical students, 5th Edn., Jeepee brothers, India, pp: 309-312.
- Wang, Y. & Frei, M. (2011). Stressed food – The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 141: 271-286.
- Welch, R.M. & Shuman, L. (1995). Micronutrient Nutrition of Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(1): 49-82.

- Wiegand, C. & Pflugmacher, S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 201-218.
- WHO. (1999). Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. In: Chorus I, Bartram J (Eds). London and New York: World Health
- Wood, S.A., Briggs, L.R., Sprosen, J., Ruck, J.G., Wear, R.G., Holland, P.T., Bloxham, M. (2006). Changes in concentrations of microcystins in rainbow trout, freshwater mussels, and cyanobacteria in Lakes Rotoiti and Rotoehu. *Environmental Toxicology*, 21: 205-222.
- Yen, Y.H., Shih, C.H., Chang, C.H. (2007). Effect of adding ascorbic acid and glucose on the antioxidative properties during storage of dried carrot. *Food Chemistry*, 107: 265-272.
- Yu, S.Z. (1995). Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 10: 674-682.
- Zegura, B., Straser, A., Filipič, M. (2011). Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins – a review. *Mutation Research*, 727: 16-41.
- Zhou, L., Yu, H., Chen, K. (2002). Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomedical and Environmental Sciences*, 15: 166-171.



FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

Este trabalho foi financiado pela Universidade do Porto através do projeto IJUP2011_3 e pelos fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto PEst-C/MAR/LA0015/2013