

**UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE
MESTRADO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE**

FERNANDA ENGEL

**RISCO ECOTOXICOLÓGICO E USO DO SORBATO DE POTÁSSIO EM
CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS**

JOINVILLE/SC

2014

FERNANDA ENGEL

**RISCO ECOTOXICOLÓGICO E USO DO SORBATO DE POTÁSSIO EM
CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente.
Orientador:
Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger.

JOINVILLE/SC

2014

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

E48r

Engel, Fernanda

Risco ecotoxicológico e uso do sorbato de potássio em cultura de tecidos vegetais / Fernanda Engel ; orientadora Dr. Gilmar Sidnei Erzinger – Joinville: UNIVILLE, 2014.

102 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Biotecnologia – Contaminação microbiana. Toxicologia. I. Erzinger, Gilmar Sidnei. (orient.). II. Título.

CDD 660.6

Termo de Aprovação

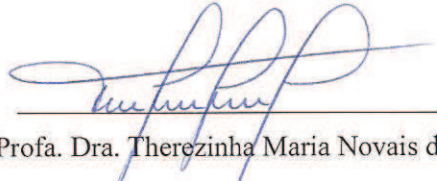
“Avaliação do Risco Ecotoxicológico e Controle Antimicrobiano em Cultura de Tecidos Vegetais do Sorbato de Potássio”

por

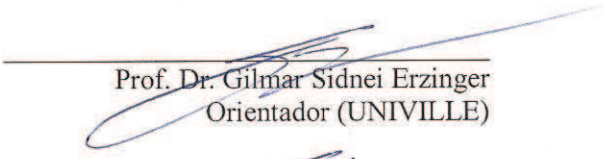
Fernanda Engel

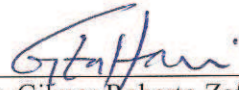
Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente.


Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
Orientador (UNIVILLE)


Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
Orientador (UNIVILLE)


Prof. Dr. Gilmar Roberto Zaffari
(UNIVALI)


Profa. Dra. Karin Esemann de Quadros
(UNIVILLE)

Joinville, 28 de fevereiro de 2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo incentivo e força.

Agradeço ao Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger, pelo aceite da orientação, e auxiliar nas etapas do projeto.

Agradeço imensamente a todos os professores do curso, pelas belíssimas aulas e aprendizado adquirido.

Agradeço em especial a Prof^a. Dra. Regina Maria Miranda Gern, pelo intenso apoio, amizade e bons aprendizados.

Agradeço também ao Alexandre Drefahl, pela ajuda, grande apoio e compreensão durante todo o projeto.

Agradeço ao Marco Eduardo Hoppe pela compreensão e incentivo.

Agradeço imensamente às amigas de curso e coração Andréia e Milena, pela amizade, parceria e boas risadas.

Aos meus amigos queridos pelos momentos juntos.

RESUMO

A biotecnologia com enfoque na cultura *in vitro* de tecidos vegetais proporciona a produção de um elevado número de plantas, que são uniformes, possuem alta qualidade e são livres de doença. Apesar de inúmeras vantagens para o mercado econômico, é possível verificar que ainda há alguns problemas que carecem de solução. Sem dúvida, as contaminações microbianas constituem, muito possivelmente, o principal problema encontrado na cultura de tecidos vegetais, provocando perdas de material vegetal em diferentes fases de cultivo. Com isso, objetivou-se testar o uso do conservante alimentar sorbato de potássio na formulação de meios de cultivo utilizados na cultura *in vitro*. O trabalho foi dividido em etapas: definição da concentração efetiva média (CE₅₀) deste conservante em *Daphnia magna* e *Euglena gracilis* através de ensaios de toxicidade aguda; realização de ensaio de toxicidade crônica com *D. magna* e *E. gracilis*; e verificação da interação de diferentes concentrações deste conservante em plantas cultivadas *in vitro* de *Ananas comosus*. A concentração efetiva média (CE₅₀) deste conservante para *D. magna* foi de 1,6 g/L e para *E. gracilis* foi de 5.63 g/L, tendo esse organismo, a partir desta concentração, alguns parâmetros estimulados como velocidade, mobilidade, orientação gravitacional e sensibilização no alinhamento. Os testes com o fluorímetro de pulso modulado (PAM) evidenciou que, quanto maior a concentração de sorbato de potássio, menor é a eficiência fotossintética de *E. gracilis*. A partir dos resultados de toxicidade aguda com *D. magna* fez-se o ensaio crônico (21 dias), a fim de se verificar outras alterações. A análise de variância (ANOVA) mostrou significância em relação ao controle para os dois parâmetros analisados: longevidade e fecundidade. Para os dados de longevidade o teste de Dunnett mostrou que a concentração de 1,25 g/L afetou este parâmetro, tendo ao final do teste três organismos-teste vivos. Para os dados de fecundidade houve significância nas concentrações de 1,25 e 0,625 g/L, sem nenhuma reprodução dos organismos. O teste crônico de toxicidade com *E. gracilis* mostrou-se inconclusivo, sendo a mobilidade ascendente o único parâmetro que teve resultados satisfatórios. O teste mostrou que concentrações acima de 0,280 g/L causaram letalidade em 50% das células. Para as plantas cultivadas *in vitro* utilizou-se quatro concentrações, sendo 0,3125, 0,1525, 0,0781 e 0,0390 g/L. Nas duas primeiras concentrações houve oxidação dos explantes, sendo que nas demais não houve oxidação e seu desenvolvimento ocorreu de maneira normal quando comparado com o controle. Para as contaminações, a ANOVA revelou um *p* de 0,85, sugerindo que a contaminação ocorreu devido a algum fator desconhecido. A partir de então, os frascos foram observados no microscópio com aumento de 40x, revelando a presença de ácaros no interior do frasco, os quais podem ter causado a contaminação, sendo atribuído na análise estatística como o fator desconhecido. O trabalho sugere novos testes em plantas, em local controlado, evitando desta forma a interferência destes agentes externos.

Palavras chave: Biotecnologia - Contaminação Microbiana - Testes toxicológicos - *Daphnia magna* - *Euglena gracilis* - Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

The biotechnology with focus on *in vitro* culture of plant tissues provides the production of a high number of plants, which are uniform, have high quality and are free of diseases. Despite numerous advantages for the economic market, it's possible to check that there are still some problems that need solution. Surely, the microbial contaminations are quite possibly the main problem found in the plant tissue culture, causing losses of plant material at various stages of cultivation. Therewith, the project aimed to test the use of food preservative potassium sorbate in the formulation of culture media used for *in vitro* culture. The project was divided into stages: definition of the mean effective concentration (EC₅₀) of this preservative in *Euglena gracilis* and *Daphnia magna* through acute toxicity tests; conducting chronic toxicity test with *D. magna* and *E. gracilis*, and verification of the interaction of different concentrations of the preservative on *in vitro* cultured plants of *Ananas comosus*. The mean effective concentration (EC₅₀) of this preservative for *D. magna* was 1.6 g/l and *E. gracilis* was 5.63 g/l, and this organism from this concentration stimulated some parameters such as speed, mobility, gravitational orientation and awareness in alignment. The tests with the pulse-modulated fluorometer (PAM) showed that the higher the concentration of potassium sorbate is, the lower the photosynthetic efficiency of *E. gracilis*. From the results of acute toxicity to *D. magna* became chronic experiment (21 days) in order to verify if other changes. Analysis of variance (ANOVA) showed significant compared to the control for the two analyzed parameters: longevity and fecundity. For data longevity Dunnett's test showed that the concentration of 1.25 g/l affected this parameter, having in the end of the test three organisms alive. For data fertility was significant at concentrations of 1.250 and 0.625 g/l, with no reproduction of organisms. The chronic toxicity test with *E. gracilis* proved inconclusive, and the upward mobility was the only parameter that satisfactory results. The test showed that concentrations above 0.280 g/l letalitate caused in 50% of cells. For plants grown *in vitro*, were used four concentrations: 0.3125, 0.1525, 0.0781 and 0.0390 g/l. In the first two concentrations was oxidation of explants, and in others concentrations there was no oxidation and the growth occurred in a normal manner when compared with the control. For contamination, ANOVA revealed a p of 0.85, suggesting that contamination occurred due to some unknown factor. Thereafter, the flasks were observed under a microscope with 40x magnification, revealing the presence of mites in the bottle, which may have caused the contamination, being assigned in the statistical analysis as the unknown factor. The project suggests new tests on plants, in controlled location, avoiding the interference of these external agents.

Keywords: Biotechnology - Microbial contamination - Toxicological tests - *Daphnia magna* - *Euglena gracillis* - *in vitro* culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Contaminações encontradas em cultivos vegetais de diferentes espécies. A: Contaminação bacteriana em <i>Eucalyptus</i> . B: Contaminação bacteriana em <i>Ananas comosus</i> . C: Contaminação microbiana em <i>Anthurium</i> . D: Contaminação fúngica em <i>Ananas comosus</i> . E: Contaminação fúngica em <i>Acacia</i> . F: Contaminação fúngica em <i>Anthurium</i>	20
Figura 2: Grânulos do conservante alimentar sorbato de potássio.	31
Figura 3: Organismo-teste <i>Daphnia magna</i>	38
Figura 4: Organismo-teste <i>Euglena gracilis</i>	40
Figura 5: Esquema do teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	46
Figura 6: Soluções-teste de sorbato de potássio para um teste agudo com <i>Daphnia magna</i>	46
Figura 7: Tubos de ensaios em duplicata, contendo o organismo <i>Daphnia magna</i> incubado em diferentes concentrações de sorbato de potássio.	47
Figura 8: Esquema do teste de toxicidade crônica com <i>Daphnia magna</i>	49
Figura 9: Bancada de teste de toxicidade crônica contendo o organismo <i>Daphnia magna</i> com diferentes concentrações de sorbato de potássio	49
Figura 10: Esquema do funcionamento do equipamento ECOTOX. Fonte: ERZINGER <i>et al.</i> (2011). 1-4: microscópio; 5: reservatório para água; 6: reservatório para solução teste; 7: reservatório para <i>Euglena gracilis</i> ; 8-10: bombas que sugam o líquido; 11: cubeta de vidro; 12: placa de computador que faz a bomba funcionar; 13: monitor de computador para visualização.	53
Figura 11: Esquema do funcionamento do equipamento PAM	55
Figura 12: Imagem do equipamento PAM.	56
Figura 13: Teste de toxicidade crônica com <i>Euglena gracilis</i> . À esquerda observa-se o frasco contendo a cultura mãe contendo as algas, e à direita as algas em suas respectivas concentrações em g/L de sorbato de potássio.	57
Figura 14: Frascos contendo <i>Ananas comosus</i> incubados em diferentes concentrações em g/L de sorbato de potássio.	59
Figura 15: Frascos contendo <i>Ananas comosus</i> repicados após 20 dias de teste, nas concentrações de 0,0781 e 0,0390 g/L de sorbato de potássio	60
Figura 16: Frascos contendo <i>Ananas comosus</i> repicados após 40 dias de teste, nas concentrações de 0,0781 e 0,0390 g/L de sorbato de potássio.	60

Figura 17: Esquema da metodologia utilizando sorbato de potássio em <i>Ananas comosus</i> cultivado <i>in vitro</i> .	61
Figura 18: % de organismos vivos de <i>Daphnia magna</i> durante o teste de toxicidade aguda em diferentes concentrações de sorbato de potássio em (g/L).	63
Figura 19: Inibição média (%) da triplicata da velocidade; orientação gravitacional; mobilidade e alinhamento em presença de diferentes concentrações de sorbato de potássio em teste de toxicidade aguda obtido com <i>Euglena gracilis</i> . As linhas em vermelho são a determinação da CE ₅₀ para as quatro variáveis fisiológicas.	65
Figura 20: Inibição do movimento ascendente da alga <i>Euglena gracilis</i> durante teste de toxicidade aguda em diferentes concentrações de sorbato de potássio em g/L	66
Figura 21: Relação entre a variação do movimento ascendente de <i>Euglena gracilis</i> em relação oposta das médias (%) (mobilidade, orientação gravitacional, alinhamento e velocidade) em função das diferentes concentrações de sorbato de potássio em teste de toxicidade aguda.	68
Figura 22: Rendimento quântico fotossintético com o aumento da intensidade da luz actínica após exposição imediata de <i>Euglena gracilis</i> em diferentes concentrações de sorbato de potássio em g/L	71
Figura 23: Efeito do sorbato de potássio sobre a taxa de transporte de elétrons (rETR) no fotossistema II com o aumento da intensidade da luz actínica, após exposição imediata de <i>Euglena gracilis</i> com aumento da intensidade da luz	72
Figura 24: Rendimento fotossintético efetivo de PS II em <i>Euglena gracillis</i> tratada com aumento da intensidade da luz	73
Figura 25: Inibição (%) do movimento ascendente da alga <i>Euglena gracilis</i> durante teste em presença de diferentes concentrações de sorbato de potássio em teste de toxicidade crônica com sorbato de potássio	75
Figura 26: Número de sobreviventes de <i>Daphnia magna</i> no teste de toxicidade crônica ao sorbato de potássio após 21 dias	76
Figura 27: Fecundidade média de <i>Daphnia magna</i> no teste de toxicidade crônica ao final de 21 dias ao sorbato de potássio	77
Figura 28: Longevidade média de <i>Daphnia magna</i> e sua primeira morte ao final de 21 dias de teste (teste crônico)	80
Figura 29: Morte de explantes de <i>Ananas comosus</i> na concentração de 0,3125 g/L de sorbato de potássio, após oito dias de cultivo	82

Figura 30: Morte de explantes de *Ananas comosus* na concentração de 0,1525 g/L de sorbato de potássio, após oito dias de cultivo..... 82

Figura 31: Contaminação fúngica dos frascos de cultura de *Ananas comosus* em meio MS ao final de 60 dias de experimento. Frasco A: meio de cultura adicionado de 0,078 g/L de sorbato de potássio; B: explante que retornou para o meio sem sorbato de potássio da concentração de 0,078 g/L de sorbato de potássio; C: meio de cultura adicionado de 0,039 g/L de sorbato de potássio; D: explante que retornou para o meio sem sorbato de potássio da concentração de 0,039 g/L de sorbato de potássio..... 83

Figura 32: Contaminações fúngicas observadas nos frascos de cultivo *in vitro* contendo *Ananas comosus*, durante o período de teste.. 84

Figura 33: Ácaros presentes no interior dos frascos de cultivo que foram encontrados durante todo período de teste (60 dias). Comprimento médio de 0,5 milímetros..... 86

Figura 34: Plantas de *Ananas comosus* na fase de multiplicação em meio de cultura MS em diferentes concentrações de sorbato de potássio em g/L 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios em % da inibição (+) ou ativação (-) de diferentes parâmetros fisiológicos obtidos em triplicata de testes agudos com a alga *Euglena gracilis*. 64

Tabela 2: Resultados médios das inibições percentuais e CE₅₀ da concentração de sorbato de potássio em teste agudo realizados em triplicata com a alga *Euglena gracilis*..... 65

Tabela 3: Rendimento quântico fotossintético da alga *Euglena gracilis* cultivada na presença de diferentes concentrações de sorbato de potássio em g/L 70

Tabela 4: Número médio de filhotes por dia (média) de *Daphnia magna* expostos a diferentes concentrações (%) de sorbato de potássio. (n=10). 77

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVO GERAL:.....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1. BIOTECNOLOGIA.....	15
3.2. BIOTECNOLOGIA VEGETAL – MICROPROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i>	16
3.3. CONTAMINAÇÕES NO PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO	19
3.4. TIPO DE CONTAMINANTES	22
3.4.1. Bactérias	22
3.4.2. Fungos	23
3.4.3. Leveduras.....	23
3.4.4. Vírus	24
3.4.5. Cuidados no laboratório	24
3.5. PRODUTOS UTILIZADOS NA DESINFESTAÇÃO INICIAL DOS EXPLANTES E ADICIONADOS AO MEIO DE CULTURA.....	25
3.5.1. Álcool.....	25
3.5.2. Hipoclorito	25
3.5.3. Água oxigenada	26
3.5.4. Formaldeído	26
3.5.5. Fungicidas	26
3.5.6. Antibióticos	27
3.6. CONSERVANTE ALIMENTAR.....	28
3.6.1 Ácido benzóico e seus sais	29
3.6.2. Ácido sórbico e seus derivados.....	30
3.7. ECOTOXICOLOGIA.....	33
3.8. SELEÇÃO DO ORGANISMO TESTE PARA OS ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE.....	37
3.8.1. <i>Daphnia magna</i>	37
3.8.1.2. <i>Euglena gracilis</i>	39
3.9. BIOMONITORAMENTO EM TEMPO REAL.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. 1ª ETAPA: METODOLOGIA COM O MICROCRUSTÁCEO <i>Daphnia magna</i>	44
4.1.1. Metodologia do teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	45

4.1.2. Metodologia do teste de toxicidade crônica com <i>Daphnia magna</i>	48
4.2. 2ª ETAPA: METODOLOGIA COM A ALGA <i>Euglena gracilis</i>	51
4.2.1. Metodologia do teste de toxicidade aguda com <i>Euglena gracilis</i>	51
4.2.2. Medição de parâmetros de eficiência fotossintética usando o equipamento PAM.....	54
4.2.3. Metodologia do teste de toxicidade crônica com <i>Euglena gracilis</i>	57
4.3. 3ª ETAPA: AVALIAÇÃO DO USO DO SORBATO DE POTÁSSIO EM PLANTAS CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	57
4.3.1. Princípio do método	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AMBIENTAL.....	62
5.3. PLANTAS DE ANANAS COMOSUS CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> COM SORBATO DE POTÁSSIO.....	80
5.3.1. Sobrevivência dos explantes cultivados <i>in vitro</i> com sorbato de potássio.....	80
5.3.2. Contaminação das culturas cultivadas <i>in vitro</i> de <i>Ananas comosus</i> com sorbato de potássio.....	82
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
7. REFERÊNCIAS.....	89

INTRODUÇÃO

A biotecnologia é a ciência que trata da aplicação de organismos e células, utilizando-as em processos ou sistemas industriais para a obtenção de bens e serviços. Inclui técnicas que são aplicadas tanto na utilização de células humanas em processos, quanto na agricultura, mais precisamente na cultura *in vitro* de tecidos vegetais (GRATTAPAGLIA *et al.*, 1990).

O domínio da cultura *in vitro* teve importância decisiva, uma vez que, com ela foi possível desenvolver e aperfeiçoar todas as técnicas conhecidas atualmente. Considerando ainda as dificuldades dos métodos naturais de propagação e da incapacidade de atender a demanda de mudas no mercado, nas últimas décadas, a biotecnologia por meio de técnicas de cultura de tecidos *in vitro* consistiu em uma ferramenta valiosa na propagação e conservação de muitas espécies (WITHERS, WILLIAMS, 1998). Dentre essas técnicas, a micropropagação é a de maior impacto na agricultura, já que propicia a produção de um elevado número de plantas uniformes em um curto espaço de tempo, de alta qualidade e livres de doença, características essenciais para a aplicação comercial (SANTOS *et al.*, 2007). Também assegura produção uniforme das plantas geradas, uma vez que plantas micropropagadas em laboratório são geneticamente iguais (CARRER *et al.*, 2001). Silva (2003) ressalta ainda que a regeneração de plantas *in vitro* é um pré-requisito para a utilização de técnicas biológicas mais avançadas como é o caso da transgenia.

Apesar de a técnica possuir mecanismos interessantes para o mercado econômico, ainda se percebem alguns problemas que carecem de solução. Dentre eles, destacam-se principalmente as contaminações microbianas, que constituem muito possivelmente o principal problema encontrado hoje na cultura de tecidos vegetais, e que ocasionam a perda do material vegetal nas diferentes fases de cultivo. Este problema afeta os laboratórios de micropropagação comercial, podendo resultar no completo insucesso do processo de produção (CASSELLS, 2001).

Um constante declínio do número de laboratórios de micropropagação comercial tem sido observado a partir da década de 1990, que pode ser causado pela falta da habilidade em reduzir as perdas por contaminação à

níveis satisfatórios que permitam tanto um rendimento de produção preditivo, como a obtenção de plantas micropropagadas de qualidade (LEIFERT *et al.*, 1990).

A grande maioria dos microrganismos contaminantes na cultura *in vitro* de tecidos de plantas não promove a morte dos explantes estabelecidos diretamente por causarem doenças nas plantas, mas sim, por geralmente competirem com as plantas pelos nutrientes do meio de cultura, e também por excretarem substâncias geralmente tóxicas no meio, o que acaba matando o explante ali presente (CASSELLS, 1991).

Embora o entendimento sobre a identidade, fontes e epidemiologia dos diferentes contaminantes microbianos tenha avançado nos últimos anos, a detecção de contaminantes bacterianos latentes e a eliminação da contaminação de culturas estabelecidas *in vitro* permanecem à espera de desenvolvimento de melhores estratégias (HERMAN, 1990).

Apesar de seguidos os procedimentos padrões de desinfestação, a contaminação frequentemente origina-se da introdução de explantes contaminados com microrganismos endofíticos ou resistentes ao processo. Estes incluem fungos, leveduras, bactérias e vírus. As contaminações também podem surgir por erros no processo, como autoclavagem do material, e até mesmo a habilidade do operador, que ocorrem em menor frequência (HERMAN, 1990; CASSELLS, 1991, 1997, 2000).

Apesar da imensa relevância do tema, poucos são os profissionais que se dedicam à pesquisa nesta área. De fato, o insucesso em reduzir as perdas por contaminação a níveis aceitáveis tem sido a principal causa da queda constante da produção de plantas micropropagadas pelos laboratórios de micropropagação comercial (CASSELLS, 1991).

Nos últimos anos se evidenciou o interesse por novos produtos de amplo espectro de ação, visando não apenas o controle da contaminação, mas também aos efeitos benéficos da utilização destes compostos no crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* (WATT *et al.*, 1996; ODA *et al.*, 2003; COLOMBO *et al.*, 2004; NAGY *et al.*, 2005).

Intensos estudos devem ser realizados, encontrando uma solução para acabar ou então minimizar o grande impacto das contaminações observadas na cultura de tecidos vegetais. Tendo em vista esta

preocupação, este trabalho teve como objetivo testar o uso do conservante alimentar sorbato de potássio na formulação de meios de cultivo na cultura *in vitro* de tecidos vegetais.

O sorbato de potássio já é extensivamente usado em diversos alimentos industrializados para conter microrganismos deteriorantes, como fungos, bactérias e leveduras (BRASIL, 2011). Com a crescente demanda por alimentos de conveniência e o longo tempo de prateleira, o uso de conservantes torna-se indispensável para que se consiga garantir o abastecimento de alimentos quimicamente estáveis e seguros (SOFOS, 1995).

Neste sentido, testou-se a utilização do sorbato de potássio como componente de meio de cultura e para tanto, diversos testes foram feitos para que se obtenha uma concentração ideal, que garanta a eliminação total dos contaminantes, mas que não cause danos aos explantes. Testes com o microcrustáceo *Daphnia magna* Straus e a alga *Euglena gracilis* Klebs foram feitos a fim de se conhecer a toxicidade deste conservante para então determinar doses seguras para o meio ambiente, uma vez que este conservante pode ser lançado aos corpos d'água e provocar alterações significativas em organismos aquáticos.

Ao final observou-se a interação das plantas na presença do conservante sorbato de potássio, sendo possível verificar se este possui ação antimicrobiana contra contaminantes encontrados na cultura *in vitro* de tecidos vegetais, e se pode vir a ser acrescentado nos meios de cultivo utilizados para a propagação das plantas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

- Avaliar a ação do conservante alimentar sorbato de potássio no controle do crescimento de bactérias e fungos na cultura de tecidos vegetais e avaliar seu impacto toxicológico no ambiente.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Definir a concentração efetiva média (CE₅₀) do conservante sorbato de potássio em testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia magna* e a alga *Euglena gracilis*.

- Realizar ensaios de toxicidade crônica com o microcrustáceo *Daphnia magna* e a alga *Euglena gracilis*, verificando outras possíveis alterações.

- Testar e verificar a interação e efeitos em diversas concentrações deste conservante em plantas de *Ananas comosus* L. Merrill cultivadas *in vitro*.

- Avaliar a eficiência de doses de sorbato de potássio no controle antimicrobiano em cultura de tecidos de plantas *in vitro*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. BIOTECNOLOGIA

É de conhecimento que o planeta irá enfrentar muito em breve problemas em relação ao crescimento populacional. Estudos revelam que a população pode atingir 9 bilhões de habitantes até o ano de 2.050 (GRATTAPAGLIA *et al.*, 1990). Juntamente com as questões de sustentabilidade e aquecimento global, há um grande desafio em aumentar a oferta de alimentos.

Uma das alternativas frente a este problema diz respeito à biotecnologia, que nas últimas décadas, trouxe marcantes oportunidades tecnológicas na agricultura, com relevante desenvolvimento na obtenção de novas variedades de plantas e na melhoria da qualidade de diversos alimentos. Esta tecnologia está baseada em uma ciência que trata de aplicações de organismos e células, utilizando-as em processos ou em sistemas industriais para obter bens e serviços (GRATTAPAGLIA *et al.*, 1990).

É inegável o avanço da biotecnologia nas últimas décadas e, à medida que se intensifica seu uso e aplicações nas mais diversas áreas, a impressão que se tem é que, a cada problema surgido, a pesquisa científica se encarrega de achar soluções, anos antes muitas vezes inimagináveis (GRATTAPAGLIA *et al.*, 1990).

Segundo Carrer *et al.* (2010), a biotecnologia não é uma tecnologia recente, uma vez que sua origem pode ter ocorrido há mais de 6 mil anos, a partir dos relatos de que microrganismos eram usados em processos fermentativos para produção de cerveja e pão.

Na área vegetal, a biotecnologia avança a passos largos, e há muito deixou de ser novidade. Embora para algumas áreas como a engenharia genética seja um tema recente, há pelo menos um século pesquisadores desenvolvem e aperfeiçoam técnicas de manipulação vegetal *in vitro* e, mais recentemente, a propagação clonal em larga escala (LEIFERT *et al.*, 2003).

3.2. BIOTECNOLOGIA VEGETAL – MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO*

A micropropagação, propagação vegetativa ou multiplicação *in vitro* consiste na produção de clones de uma planta, a partir de uma célula ou de um pequeno pedaço de tecido vegetal chamado explante, que pode ser um fragmento de folha, raiz, caule ou de qualquer tecido que responda às condições de indução do meio de cultura, com vistas à regeneração vegetal *in vitro* (TORRES *et al.*, 2000). Essa regeneração é fundamentada na capacidade de proliferação das células vegetais organizarem-se em tecidos e, eventualmente, em plantas completas (MANTELL *et al.*, 1994).

A micropropagação utiliza técnicas de laboratório e se baseia no princípio da chamada totipotência celular, e considera que as células vegetais manifestam em momentos diferentes e sob estímulos apropriados a potencialidade de iniciar um novo indivíduo multicelular (TORRES *et al.*, 2000). Teoricamente, considera-se que todas as células vegetais são capazes de expressar sua totipotência. O objetivo é obter uma nova planta idêntica à original, ou seja, realizar uma clonagem vegetal que é definida como uma propagação assexuada de células ou organismos de modo a obter um novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico àquele do ancestral comum (TORRES *et al.*, 2000).

Nesse sentido, espera-se que a exposição desses tecidos a um ambiente *in vitro* estimule reações diversificadas nos diferentes tipos celulares, fazendo com que somente algumas células respondam às condições de cultura *in vitro*, levando à regeneração de um novo indivíduo (MANTELL *et al.*, 1994). Essa habilidade que uma célula ou um grupo de células tem ao responder a um estímulo indutivo visando a um processo de desenvolvimento é denominada competência (TORRES *et al.*, 2000).

A micropropagação permite a produção de mudas durante todos os meses do ano e em larga escala de espécies que são comercialmente importantes. Os estágios de desenvolvimento da propagação *in vitro* são constituídos de fases que incluem a seleção do explante, obtenção de culturas livres de contaminantes, a multiplicação dos propágulos vegetativos,

o enraizamento e a aclimação na condição *ex vitro* das plantas obtidas *in vitro* (GEORGE, *et al.*, 2008). Esta técnica tem grande importância na agricultura, com especial enfoque na produção de mudas de plantas.

Para se realizar uma cultura *in vitro* são necessários alguns passos importantes antes da inoculação do explante. Inicialmente é realizada a desinfecção do material vegetal utilizando agentes químicos para remover os microrganismos dos tecidos sem danificá-los (PIERIK, 1987).

Para a produção de plantas pela micropropagação basta obter um pequeno pedaço da planta mãe, o explante, um conjunto de células colocado em um meio de cultura adequado ao seu crescimento. Este começa então a crescer, formando uma massa de células indiferenciadas denominada de tecido caloso. O processo de obtenção de uma planta também pode ocorrer sem a passagem pela fase de calo (NAGY *et al.*, 2005).

De maneira geral, o aparato e os procedimentos utilizados na micropropagação são válidos para qualquer espécie, sendo apenas necessários determinados ajustes em função da especificidade do material a ser trabalhado (MURASHIGE, 1974). Com isso é possível determinar se sua aplicação será economicamente viável ou não, em função principalmente da taxa de multiplicação do material e do valor final de comercialização da muda produzida.

Existem três fatores que afetam a regeneração da planta *in vitro*: o genótipo (qual espécie cultivar ou variedade que está sendo utilizada), a fonte de explante (folha, raiz, caule, meristema) e a condição da cultura (meio de cultura, luz, temperatura). O sucesso da cultura depende da decisão correta no estabelecimento de todos esses fatores. Na realidade, muito ainda precisa ser conhecido sobre os mecanismos de hormônios vegetais e sobre os processos que controlam o desenvolvimento das plantas. A melhor via para o desenvolvimento de sistemas de regeneração *in vitro* continua sendo aquela baseada em testes que incluem esses três fatores. O objetivo desses testes é obter uma combinação ótima dos fatores para que o processo seja bem sucedido (CALDAS *et al.*, 1998).

A escolha do genótipo a ser utilizado na cultura vai depender dos objetivos experimentais. Variedades de uma mesma espécie respondem de maneira diferente às condições de cultivo. No entanto, alguns autores

consideram que toda espécie e toda cultivar são capazes de responder às condições de cultura *in vitro* desde que seja utilizada uma combinação correta dos demais fatores que afetam a regeneração *in vitro* (MANTELL *et al.*, 1994).

A fonte do explante também é um fator importante no sucesso da regeneração *in vitro*, pois a capacidade de regeneração depende da maturidade, do estado fisiológico e do tecido a ser utilizado. Por exemplo, uma folha em senescência está em processo degenerativo não sendo, portanto, uma boa fonte de explante. De um modo geral os tecidos jovens e em crescimento são utilizados como fonte de explante (MANTEL *et al.*, 1994).

As condições de cultura como a composição do meio são decisivas para o sucesso da regeneração *in vitro*. Este é constituído de sais minerais, nitrogênio reduzido, uma fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento. A combinação adequada entre estes componentes, associada às demais condições da cultura como luz e temperatura são a base da tecnologia da cultura de tecidos vegetais (MANTELL *et al.*, 1994).

Deve-se ressaltar que quando o explante já está estabelecido *in vitro*, o que pode vir a ser modificado são apenas os meios de cultivo, e estes irão modular diretamente o desenvolvimento, já que contêm hormônios, e estes exercem diferentes funções quando em contato com o explante no momento correto. Os hormônios são uma classe de compostos químicos endógenos facilmente transportados para as células responsivas, onde estão diretamente envolvidos com o controle da atividade gênica, na transcrição e na tradução de um grande número de processos. Para o completo desenvolvimento de uma planta estão envolvidos vários hormônios (LEIFERT *et al.*, 2001).

Durante a micropropagação é comum ocorrerem perdas significativas devido à contaminação por microrganismos presentes na superfície dos explantes ou, de origem endógena, principalmente por fungos e bactérias. A ocorrência de contaminações é mais frequente quando se realiza a micropropagação de espécies lenhosas, ou quando a assepsia é difícil de ser executada devido às características do explante, ou por este estar localizado em regiões da planta matriz próximas do solo (GEORGE, 1993).

É importante destacar que as contaminações em parte também se originam do próprio manipulador que está manuseando o material vegetal. Este problema pode ser minimizado com o treinamento dos operadores (GEORGE, 1993).

3.3. CONTAMINAÇÕES NO PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO

O termo contaminação é rotineiramente utilizado em trabalhos de micropropagação de plantas em laboratório para designar a presença de microrganismos em células, tecidos e órgãos ou em uma coleção de plantas. Independentemente do tipo de associação em que estes microrganismos possam estar envolvidos, o descarte dos frascos que apresentam alguma colônia visível a olho nu é um procedimento rotineiro (LEIFERT, 2001). Tal procedimento parte do princípio de que em geral, estes microrganismos na fase de micropropagação são passíveis de patogenicidade, adotando-se o princípio da erradicação parcial ou total da cultura. No entanto, como é de conhecimento, a grande maioria dos microrganismos contaminantes da cultura de tecidos de plantas não promove a morte dos explantes estabelecidos *in vitro* diretamente por causarem doenças nas plantas. Segundo George (1993), os organismos competem com o crescimento dos explantes pelos nutrientes do meio de cultura, além de produzirem substâncias tóxicas como o ácido láctico e acético, cianeto e antibióticos que conseqüentemente inibem o seu desenvolvimento (BACKER e SCHIPPERS, 1987; STANIER *et al.*, 1987; KLOPPER *et al.*, 1989; LEIFERT *et al.*, 1991; YEPES e ALDWINCKLE, 1994). A Figura 1 apresenta alguns tipos de contaminações encontrados em cultivos vegetais *in vitro*.

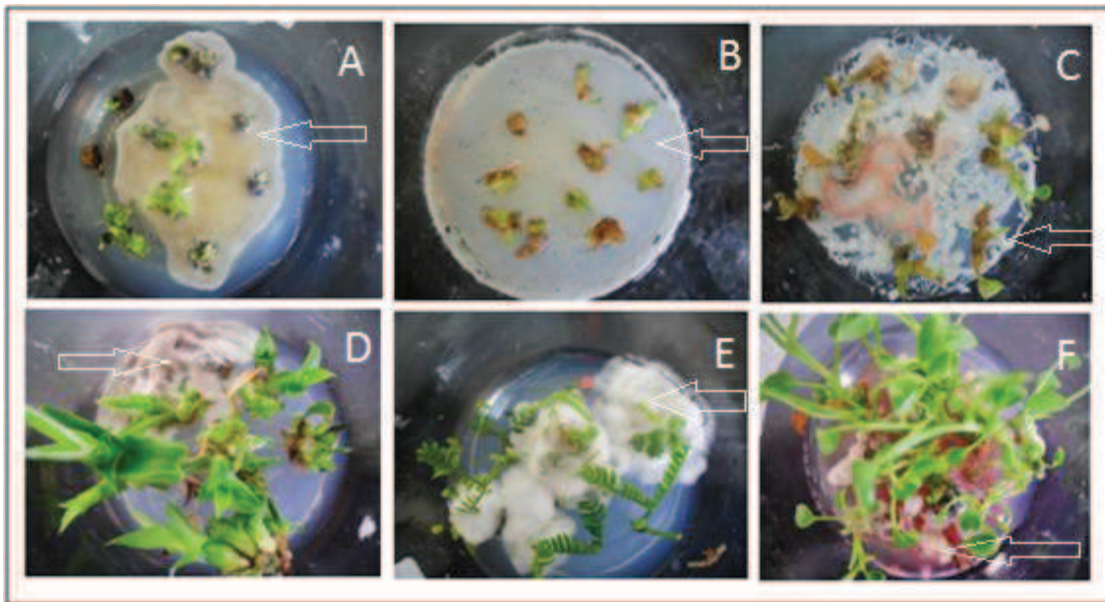


Figura 1: Contaminações encontradas em cultivos vegetais de diferentes espécies. **A:** Contaminação bacteriana em *Eucalyptus*. **B:** Contaminação bacteriana em *Ananas comosus*. **C:** Contaminação microbiana em *Anthurium*. **D:** Contaminação fúngica em *Ananas comosus*. **E:** Contaminação fúngica em *Acacia*. **F:** Contaminação fúngica em *Anthurium*. Fonte: arquivo pessoal.

De fato, é possível que todos os vegetais apresentem microrganismos em seus tecidos. Entretanto, apesar de ainda se saber muito pouco sobre a relação de microrganismos endofíticos com as plantas, para a cultura de tecidos este tipo de contaminante é considerado o mais problemático, uma vez que pode não se desenvolver no período inicial do cultivo, permanecendo latente nos tecidos das plantas. Este tipo de contaminação pode se desenvolver somente após um período de tempo, quando as condições do meio de cultura ou do ambiente tornam-se favoráveis para o seu desenvolvimento (PEREIRA *et al.*, 2003).

A contaminação frequentemente origina-se da introdução de explantes contaminados com microrganismos endofíticos ou microrganismos resistentes ao processo de desinfecção. Esses incluem fungos, leveduras, bactérias, vírus e viróides, os quais podem tornar-se patogênicos (CASSELLS, 1991, 1997, 2000a).

A contaminação é o principal problema que afeta os laboratórios de micropropagação comercial, e tem sido estimada na média de 10%, podendo resultar no completo insucesso do processo de produção (CASSELLS, 1997). Estas injúrias podem causar grandes prejuízos, deixando o explante

inviável para o subcultivo ou levando à morte do material *in vitro*. Esses problemas são maiores quando a contaminação só é detectada durante os subcultivos, causando diminuição da produtividade (CASSELLS, 1991). Por este motivo é muito importante que se tenha protocolos eficientes de assepsia para diversas espécies.

Perdas por contaminação de até 2% por subcultivo são usualmente admitidas como o nível máximo necessário para garantir o sucesso da produção. O manejo de contaminantes na cultura *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais depende inicialmente do uso de plantas estoques livres de patógenos e da combinação de métodos de desinfestação e/ou cultura de meristemas para o estabelecimento de culturas livres de patógenos e contaminantes (CASSELLS, 2000a).

A identificação dos contaminantes mais comuns nos laboratórios é uma tarefa relativamente simples de ser realizada. A maioria dos fungos e leveduras contaminantes pode ser facilmente visualizada pelo exame macroscópico dos tecidos vegetais infestados (DANBY *et al.*, 1994). Também é possível separar as leveduras das bactérias por meio da avaliação macroscópica.

As contaminações já possuem origens conhecidas. Bactérias gram-negativas, como *Pseudomonas*, *Erwinia* e *Agrobacterium* spp., são usualmente encontradas quando o procedimento de desinfecção inicial é ineficiente (LEIFERT e CASSELLS, 1991). Já a presença de espécies gram-positivas indica ineficiente esterilização do meio (*Bacillus* spp.) ou inadequado treinamento dos operadores em técnicas de assepsia (*Staphylococcus* spp.).

Fungos e leveduras podem ser introduzidos com o explante e/ou durante os estágios *in vitro* (DANBY *et al.*, 1994 citados por LEIFERT e CASSELLS, 1991), ou ainda quando a sala de crescimento encontra-se infestada por ácaros e/ou tripes.

Em princípio, existem quatro fontes de contaminação: a fonte do explante, o meio nutritivo, o ambiente e o operador. O mais importante destes é a fonte do explante que deve ser desinfestada antes da inoculação *in vitro*, a fim de eliminar microrganismos exógenos (GEORGE, 1993). Há também o problema do agente desinfestante, que pode ser inativo, ou dos

microrganismos, que podem ser protegidos dentro dos tecidos vegetais usados como explantes (CASSELLS, 1997). Fungos e leveduras podem ser facilmente detectados quando sobrevivem ao processo de desinfecção, uma vez que crescem rapidamente no meio de cultura de tecidos vegetais. Por outro lado, as bactérias e vírus podem não produzir crescimento visível no meio de cultura. No entanto, a propagação do material com essa infecção latente pode causar perdas severas nos estágios posteriores da cultura de tecidos ou durante o período de aclimação das plantas. Cabe ressaltar que as contaminações tendem a ser clusterizadas em vez de ao acaso, e quando uma contaminação é detectada em uma prateleira, as prateleiras ao redor também devem ser inspecionadas para determinar a extensão da contaminação (CASSELLS, 1991).

3.4. TIPO DE CONTAMINANTES

A lista de microrganismos descritos como contaminantes em plantas de cultura de tecidos incluem bactérias, fungos, leveduras, vírus, ácaros, tripes e formigas.

3.4.1. Bactérias

As bactérias constituem o mais comum e problemático tipo de contaminação por microrganismos em cultura de tecidos, uma vez que podem ser sistêmicas e sua detecção muitas vezes é difícil. Estes organismos podem interferir no crescimento *in vitro* e conduzir a cultura de plantas à morte. As culturas contaminadas por bactérias apresentam o meio com aspecto turvo (GEORGE, 1993). Tais organismos podem não ser rapidamente identificados, uma vez que podem necessitar de condições de adaptação *in vitro*, ou podem não estar aptos a multiplicar-se até a cultura ser transferida para meio favorável ao seu crescimento. A contaminação pode não se mostrar no meio utilizado para proliferação e alongamento de

brotos, mas pode aparecer no meio de enraizamento (BOXUX e TERZI, 1987).

Diversos gêneros de bactérias podem ser encontrados na cultura de células, tais como *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterim*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Oerskovia*, *Mycobacterium*, *Rhizobium*, *Staphylococcus*, dentre outros (BOXUX e TERZI, 1987).

3.4.2. Fungos

Os fungos são organismos eucarióticos aclorofilados que geralmente se reproduzem sexuada ou assexuadamente por esporos, cujas estruturas somáticas são normalmente filamentosas e ramificadas, e as células são circundadas por parede celular de quitina (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Em virtude da intensa colonização dos fungos *in vitro*, estas contaminações são facilmente visualizadas.

As espécies de fungos estão associadas com plantas, mas os especialmente notificados como contaminantes em cultura de tecidos incluem espécies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Candida*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Chyptococcus*, *Fusarium*, *Microsprium*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, dentre outros. De acordo com Hörner *et al.* (2000) os fungos causam danos maiores do que as bactérias, pois impedem o desenvolvimento dos explantes e matam-nos, enquanto as bactérias raramente o fazem.

3.4.3. Leveduras

Leveduras são fungos não filamentosos que habitam a superfície externa de plantas, e o odor característico ocasionado pela abertura do frasco contendo a cultura é um indício de sua presença. As leveduras dos gêneros *Candida* e *Rhodotorula* podem criar um ambiente totalmente desfavorável para o crescimento de plântulas. Sua contaminação resulta na

morte dos explantes dentro de um a três subcultivos após a sua introdução *in vitro* (LEIFERT, 1990).

3.4.4. Vírus

Há uma variável concentração de vírus nas células de plantas intactas. Muitas viroses não são transmitidas por sementes, e os órgãos reprodutivos não são infectados. Em particular, brotos apicais e meristemas de raízes são passíveis de contaminação muito baixa ou podem não apresentar vírus.

Mesmo quando explantes estão contaminados durante a excisão, a infecção pode desaparecer em algumas ou todas as células dos tecidos no início do cultivo. O motivo disso ainda não está bem claro, mas de acordo com George (1993) esse fato pode ocorrer em virtude de algumas hipóteses: associação da injúria celular causada por excisão do explante e crescimento do meristema; multiplicação rápida do explante, com o volume celular aumentando de maneira rápida fazendo com que a replicação do vírus não acompanhe o crescimento do vegetal; componentes do meio de cultivo que podem inibir a replicação de vírus, por conta de certos aminoácidos e substâncias reguladoras, particularmente auxinas e citocininas têm sido mencionadas como responsáveis.

Há também outros contaminantes que podem estar presentes no cultivo *in vitro* de tecidos vegetais. Contaminantes externos como ácaros (BLAKE, 1988) e tripes (REUSTLE *et al.*, 1988) também podem provocar o insucesso das culturas, e também merecem o devido cuidado. Porém, estes contaminantes podem ser eliminados com boas práticas de laboratório, efetuando-se periodicamente a desinfecção das salas de crescimento.

3.4.5. Cuidados no laboratório

De um modo geral, após as contaminações estarem estabelecidas *in vitro* e atingirem grande parte do material vegetal, as perdas podem ser muito elevadas, em alguns casos onerando excessivamente o custo de

produção. Cuidados básicos como uma adequada esterilização dos equipamentos, dos meios de cultura e do material vegetal inicial, associadas a um ambiente asséptico e de prevenção daqueles que manipulam o material, são indispensáveis para a diminuição do problema da contaminação (LONG *et al.*, 1988; PEREIRA *et al.*, 2003). No entanto, esses cuidados básicos nem sempre são suficientes para evitar os problemas de contaminação, sendo necessárias outras medidas de controle dos contaminantes, normalmente o uso de substâncias antimicrobianas (TEIXEIRA *et al.*, 2005a).

3.5. PRODUTOS UTILIZADOS NA DESINFESTAÇÃO INICIAL DOS EXPLANTES E ADICIONADOS AO MEIO DE CULTURA

3.5.1. Álcool

Entre os mais efetivos e largamente utilizados agentes químicos contra contaminantes bacterianos está o álcool que age desnaturando proteínas e incrementando a permeabilidade da membrana (INGRAM e BUTKE, 1983; INGRAM, 1990). Segundo Pelczar *et al.* (1996), a atividade antimicrobiana dos alcoóis deve-se principalmente à sua capacidade de desnaturar proteínas. Além disso, parte de sua eficiência como desinfectante de superfícies pode ser atribuída à ação detergente de limpeza, que auxilia na remoção mecânica de microrganismos. A duração do pré-tratamento varia de acordo com o tipo de tecido ou órgão a ser desinfestado, com a concentração da solução, e o tempo de exposição, manipulados de maneira inversamente proporcional (PASQUAL, 2001b).

3.5.2. Hipoclorito

O hipoclorito é utilizado para esterilização de superfícies, frutas, hortaliças, entre outros. Sua utilização em larga escala deve-se ao seu vasto espectro de atividade biocida contra bactérias, fungos e vírus, além do fato de ser um produto relativamente barato (EMMANUEL *et al.*, 2004). Este

produto causa alterações biossintéticas no metabolismo celular e a destruição de fosfolipídeos, formando cloraminas que interferem no metabolismo celular.

3.5.3. Água oxigenada

A ação da água oxigenada se deve ao ataque da membrana lipídica, DNA e outros componentes das células, pelos radicais livres tóxicos que o peróxido produz. Alguns microrganismos aeróbicos são capazes de produzir catalase ou superóxido dismutase, transformando assim o peróxido em oxigênio e água. Entretanto, para evitar este efeito, o peróxido de hidrogênio utilizado é de concentração maior e possui estabilizantes (AMONEX DO BRASIL, 2004).

3.5.4. Formaldeído

O formaldeído é um gás que se mostra estável somente em altas concentrações e em temperaturas elevadas. É muito tóxico e seus vapores são intensamente irritantes às mucosas. Também apresenta perigo quando em contato com a pele, além de ser corrosivo.

Segundo Fior (2004) Possui ação lenta, e em concentração de 5% necessita de 6 a 12 horas para agir como bactericida e a 8% necessita de 18 horas para agir como fungicida. Ainda de acordo com o mesmo autor este agente pode ser empregado no cultivo *in vitro*, porém a exposição de tecidos vegetais por tempo prolongado provoca altas taxas de oxidação.

3.5.5. Fungicidas

A incorporação de fungicidas nos meios de cultura vem sendo utilizada, apresentando efeitos positivos na multiplicação de plantas cultivadas tanto *in vitro* como *in vivo* (COLOMBO *et al.*, 2004).

Apesar de proibido no Brasil, o Benomyl não só previne contaminações fúngicas (SAENGER, 1970; BECKER, 1971; EDWIN, 1973)

como também possui algumas propriedades reguladoras de crescimento de plantas (SAENGER, 1970; SCHRUF, 1970; BECKER, 1971; SCHREIBER, HOCK, 1975). No entanto, Oda *et al.* (2003) avaliaram o efeito tóxico de substâncias e germicidas sobre o crescimento vegetativo e enraizamento de uma espécie de orquídea, e observaram que a adição do fungicida azoxystrobin em todas as concentrações avaliadas, assim como também a introdução de alta dose de benomyl (0,8 g/L) apresentaram efeitos letais para as plantas.

Um fungicida, para ser usado nas diferentes fases do cultivo *in vitro*, deve satisfazer alguns requisitos, como ser tóxico ao fungo alvo e não ao explante em uso, mesmo em concentrações altas; ser estável e de fácil obtenção; oferecer menor risco ao operador; ter boa solubilidade; não ser afetado pelo pH e pelo meio de cultivo; possuir amplo espectro de ação; ser passível de combinação; apresentar chances reduzidas de resistência e ser de baixo custo (SANTANA *et al.*, 2003).

3.5.6. Antibióticos

Os antibióticos são compostos produzidos por microrganismos que inibem outros microrganismos em baixas concentrações, exibindo alto grau de especificidade. Atuam de diversas maneiras, como na inibição da síntese de peptidoglicano da parede celular bacteriana, e na lesão da membrana citoplasmática e interferência na síntese de ácido nucléico e proteínas (TOLEDO e ROCA, 2001)

Um antibiótico ideal deve apresentar características bastante peculiares, como a estabilidade frente às variações de pH, ser sistêmico, não apresentar efeitos colaterais (afetar a germinação ou a síntese de clorofila), ser solúvel em água e não ser afetado por íons, ânions ou cátions (TOLEDO, 2001).

Os antibióticos afetam processos dentro do microrganismo, e como a nível molecular estes processos são parecidos com os da célula vegetal, deve-se ficar em alerta para problemas de fitotoxicidade, os quais também são decorrência da concentração usada (AMABILE-CUEVAS, 2003).

Nos últimos anos, o interesse por novos produtos e de amplo espectro de ação tem sido evidente, visando não apenas ao controle da contaminação, mas também aos efeitos benéficos da utilização desses compostos no crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* (WATT *et al.*, 1996; ODA *et al.*, 2003; COLOMBO *et al.*, 2004; NAGY *et al.*, 2005).

Muitas são as substâncias que podem ser usadas e testadas para se tentar eliminar as contaminações dos explantes. Porém, muitas são desconhecidas até o momento, ou possuem seu mecanismo praticamente desconhecido. Por este motivo, deve-se dar mais atenção e dedicar maiores estudos aos agentes inibidores, uma vez que estes estão diretamente relacionados com o sucesso do estabelecimento inicial *in vitro*.

Cabe ressaltar que, quando não há a possibilidade de se eliminar um contaminante que está presente *in vitro*, seja pela falta de técnicas/agentes ou pela profundidade em que o contaminante se encontra, busca-se a convivência com estes microrganismos, de forma a viabilizar a produção comercial ou a pesquisa com material vegetal (COLOMBO *et al.*, 2004).

Para que isso seja possível, é necessária a contenção do desenvolvimento dos contaminantes em níveis suficientes até que a cultura alvo seja desenvolvida. Para tal fim, diversos novos produtos podem ser testados, como por exemplo, os conservantes alimentares.

3.6. CONSERVANTE ALIMENTAR

A legislação brasileira define os conservantes como "substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas", sendo os mais utilizados os benzoatos e os sorbatos (BRASIL, 1999). A escolha de um conservante para uma aplicação específica é baseada nos seguintes fatores: propriedades físicas e químicas (solubilidade, pKa, reatividade, toxicidade), tipos de microrganismo de interesse e tipo e propriedades do produto a ser conservado. A combinação de mais de um conservante também pode ser utilizada para o aumento da eficiência em um determinado produto (SOFOS, 1995).

Os conservantes têm um papel importante no abastecimento de alimentos quimicamente estáveis e seguros. A crescente demanda para alimentos de conveniência, aliada ao longo tempo de prateleira exigido pelas cadeias de distribuição, torna imperativo o uso de conservantes em alimentos processados.

Muitos conservantes são efetivos em baixo pH: ácido benzóico (pH < 4,0), propiônico (pH < 5,0) e sórbico (pH < 6,5), além de sulfetos (pH < 4,5). Os parabenos (ácidos-ésteres benzóicos) são mais efetivos em condições de pH neutro. Os ácidos acéticos, benzóico, láctico e sórbico são fracos, comumente utilizados na conservação de alimentos. Utiliza-se geralmente uma concentração de 500 ppm de ácido benzóico para a conservação de bebidas com base de sucos de frutas (FORSYTHE, 2002).

A atividade ótima de inibição dos conservantes ocorre em condições de baixo pH, uma vez que esta variável favorece o estado associado e não carregado da molécula que é livremente permeável através da membrana plasmática (lipofílica), e assim é capaz de penetrar na célula. A molécula então se dissociará logo que entrar na célula, resultando na liberação de prótons e ânions, que não são capazes de atravessar a membrana plasmática. Dessa forma a molécula do conservante difunde-se na célula até que o equilíbrio seja alcançado. Isso resulta, portanto, em um acúmulo de cargas no interior da célula (BOOTH e KROLL, 1989).

Organismos resistentes a conservantes incluem uma grande variedade de espécies de leveduras do gênero *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (PITT e HOCKING, 1985).

Os conservantes mais frequentemente utilizados são os ácidos benzóico e sórbico, e seus sais de sódio, cálcio e potássio (SOFOS, 1995; PITT e HOCKING, 1985).

3.6.1 Ácido benzóico e seus sais

O ácido benzóico não apresenta boa solubilidade em água (0,27% a 18°C) e a maioria das leveduras e mofos podem ser controlados com 0,05 -

0,1% de ácido não dissociado. Seus sais são inibidores das enzimas digestivas pepsina e tripsina.

Os sais de cálcio, potássio e sódio são utilizados para inibir o desenvolvimento microbiano nos alimentos. Os benzoatos são eficazes na faixa de pH 2,5 - 4,0 e perdem boa parte de sua eficiência em pH > 4,5. São bastante eficientes no controle de fungos e leveduras e são muito utilizados em alimentos ácidos, drinques de frutas, cidras, bebidas carbonatadas e pickles. Também são usados em margarinas, molhos para salada, molho de soja e geleias.

Cabe lembrar que o pH na cultura de tecidos é considerado um fator crítico no meio de cultura (MURSASHIGE, 1974), influenciando na disponibilidade de nutrientes, de fitorreguladores e no grau de solidificação do ágar (SOFOS, 1995). Usualmente, é ajustado em uma faixa que varia de 5,0 a 6,5 (PIERIK, 1987). Diante deste fato, de uma forma geral, os benzoatos não são bons candidatos para serem usados no cultivo *in vitro*.

3.6.2. Ácido sórbico e seus derivados

O ácido sórbico é um ácido graxo insaturado, presente na forma natural em alguns vegetais, mas fabricado para uso como aditivo alimentar por síntese química, sendo que foi isolado pela primeira vez em 1859. Após inúmeras pesquisas, desde 1955, tanto o ácido quanto sua forma solúvel de sal de potássio foram considerados como seguros e inócuos. O sorbato de potássio é sólido (Figura 2), de coloração branca e possui um ponto de fusão de 270 °C, sendo sua temperatura de decomposição acima deste valor (SOFOS, 1995).



Figura 2: Grânulos do conservante alimentar sorbato de potássio.

Fonte: <http://portuguese.alibaba.com/product-gs/grnular-potassium-sorbate-495278270.html>

O ácido sórbico e seus sais são fornecidos ao mercado de forma altamente refinada, em pó ou granulado na cor branca. A forma ácida possui maior poder antimicrobiano e os seus sais propiciam uma maior solubilidade, possuindo uma grande versatilidade quanto ao largo espectro de microrganismos cujo crescimento é inibido (BRASIL, 1999).

Em geral, o ácido sórbico ou o sorbato de potássio são eficazes na maioria dos alimentos em concentrações entre 0,05 e 0,3% (BRASIL, 1999). Maiores níveis de sorbato são necessários quando o teor em umidade é alto, a temperatura ambiente é quente ou a exposição à contaminação é frequente. Níveis baixos são suficientes quando o pH é baixo. A solubilidade em água do ácido sórbico é de 0,18%, enquanto que do sorbato de potássio é de 58,2%.

Sua ação antifúngica tem sido atribuída à inibição de enzimas (SOFOS, 1995). Este pode acumular-se na membrana citoplasmática, interferindo assim no transporte de substrato e fosforilação oxidativa (FREESE *et al.*, 1973). Os sorbatos possuem atividade contra leveduras e bolores, sendo menos eficientes contra bactérias. Podem também inibir a germinação de esporos, o desenvolvimento e a divisão de células vegetativas (SOFOS, 1995).

A concentração mínima de ácido sórbico, assim como de ácido benzóico necessária para a inibição de microrganismos varia dependendo de fatores como tipo de substrato, pH do meio e microrganismo a ser inibido. As faixas mínimas de concentração variam de 10 a 1000 ppm (bactérias), 25 a 400 ppm (leveduras) e 10 a 1000 ppm (fungos) (SOFOS, 1995).

Avaliando a influência do ácido sórbico no desenvolvimento de algumas culturas, Sofos (1958) estudou 66 espécies de fungos filamentosos, 32 de leveduras e 6 de bactérias lácticas, sendo o pH o principal fator de controle da eficácia deste conservante como um inibidor do desenvolvimento microbiano. Todos os microrganismos estudados cresceram a uma concentração de 0,1% de ácido sórbico em pH 7,0; em pH de 4,5 na mesma concentração houve a inibição de leveduras e fungos filamentosos e, a um pH de 3,5, as bactérias também foram inibidas.

A ausência de efeitos tóxicos para o organismo humano do sorbato de potássio se deve ao fato de que este não se acumula no organismo. Ele se combina com a glicina e transforma-se em ácido hipúrico, que é facilmente excretado por via renal (SOFOS, 1995).

No setor dos alimentos processados, os principais campos de aplicação são os cremes e margarinas, molhos e maioneses, queijos, produtos de pesca, produtos cárneos e embutidos diversos, conservas, produtos derivados de frutas, produtos de panificação e confeitaria e produtos de baixa caloria (pela maior quantidade de água que eles costumam conter, há uma tendência natural em decompor-se mais facilmente).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) traz algumas resoluções do uso do conservante alimentar ácido sórbico e seu sal sorbato de potássio em diferentes alimentos e bebidas, e em diferentes concentrações.

Para produtos de frutas e geleias, tanto o ácido sórbico quanto o sorbato de potássio podem ser adicionados na concentração de 0,1 g/100g. Já para bebidas não alcoólicas gaseificadas o limite permitido de ácido sórbico é de 0,03 g/100g, e para bebidas não gaseificadas o limite do sorbato de potássio é de 0,08 g/100g.

Diante da busca por novos produtos que combatam os organismos causadores de contaminações, o sorbato de potássio pode vir a ser um aditivo a ser incrementado nos meios de cultivo, os quais são utilizados no desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro*. Para tanto, tal conservante deve passar por uma série de testes, que incluem ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos, bem como o contato efetivo deste conservante na formulação de meios de cultivo com plantas cultivadas *in vitro* de *Ananas comosus*.

3.7. ECOTOXICOLOGIA

De acordo com Scope (1978) a ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos tóxicos de agentes químicos e físicos nos organismos vivos, particularmente sobre as populações e comunidades dentro de ecossistemas definidos. Já para Bertoletti (1990) a ecotoxicologia é o estudo do comportamento e as transformações de agentes químicos no ambiente, assim como seus efeitos e respostas sobre a biota.

Inserida na ecotoxicologia, há a ecotoxicologia aquática, que tem como objetivo avaliar o efeito de substâncias químicas tóxicas sobre organismos representativos do ecossistema aquático (RAND, 1995). Os efeitos tóxicos podem se manifestar em diferentes níveis de organização, desde estruturas celulares até indivíduos, populações e comunidades (ADAMS *et al.*, 2003). É bastante utilizada porque os ecossistemas aquáticos constituem os principais receptáculos de contaminantes, sejam eles lançados diretamente nos corpos d'água por meio das descargas de efluentes, emitidos no ar ou depositados nos solos (GOLDSTEIN, 1988; KENDALL *et al.*, 2001).

A toxicidade é definida como sendo os resultados nocivos à saúde, provenientes do sistema composto por substâncias químicas e substâncias próprias do organismo, que se evidenciam sobre os organismos vivos (GOLDSTEIN, 1988). Na toxicidade o objetivo de análise é o organismo, onde é determinado o efeito causado por uma substância química ou uma

mistura, levando em consideração o tempo de exposição e a concentração (ZAGATTO *et al.*, 1988).

A partir de 1975 foram desenvolvidos e adaptados vários métodos de ensaios de toxicidade aguda e crônica, de curta duração, utilizando alguns grupos e espécies de organismos, dentre os quais se destacam as algas (ABNT, 1992; CETESB, 1993), microcrustáceos (ABNT, 1993; CETESB, 1994), e peixes (CETESB, 1994; ABNT, 2004) de águas continentais e marinhas.

Os testes de toxicidade detectam a capacidade inerente de um agente tóxico ou uma mistura em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos, permitindo avaliar em que medida as substâncias são nocivas, como e onde se manifestam os efeitos. Os testes são realizados com organismos indicadores que, devido às suas características de pequeno limite de tolerância ecológica a determinadas substâncias químicas, apresentam alguma alteração, que pode ser fisiológica, morfológica ou comportamental, quando expostos a determinados poluentes. As exposições são feitas em diferentes concentrações por um período determinado de tempo (RAND *et al.*, 1985).

Os testes são ensaios laboratoriais realizados sob condições experimentais específicos e controlados e, por este motivo não permitem a extrapolação para a escala ambiental, e tampouco a uma resposta absoluta sobre o risco que uma determinada amostra apresente para a população humana. Extrapolar para os seres humanos os resultados de toxicidade obtidos para os organismos em laboratório é muito difícil, e até mesmo correlacionar os resultados de toxicidade entre organismos de diferentes espécies (RIBO, 1997). Apesar disso, os testes de toxicidade realizados sob condições controladas e padronizadas vêm servindo como fonte de informações para avaliar os efeitos ecológicos dos contaminantes tóxicos (RONCO *et al.*, 2004).

Os testes de toxicidade podem ser agudos ou crônicos (SORENSEN *et al.*, 1995). O teste de toxicidade agudo avalia uma resposta rápida e severa dos organismos a um estímulo que se manifesta, geralmente, em um intervalo de 0 a 96 horas (RAND e PETROCELLI, 1995). Normalmente, o que ocorre é a letalidade ou alguma outra manifestação do organismo que a

anteceda, como o estado de imobilidade em alguns microcrustáceos. Para avaliação dos agentes tóxicos, usa-se geralmente a concentração efetiva média (CE₅₀), ou seja, a concentração que causa mortalidade ou imobilidade a 50% dos organismos testados.

De forma geral, os testes agudos são baratos, confiáveis e simples de desenvolver, porém, existem algumas limitações a serem observadas. Não há como avaliar de que maneira a mortalidade aumentará após a exposição, uma vez que estes testes são de curta duração (0-96h). Em certos casos, após uma exposição a curto ou médio prazo, o efeito adverso só aparece depois de um período de latência e os curtos períodos de exposição empregados nos testes agudos podem não abranger este período. Diante disso, torna-se necessário prolongar consideravelmente a exposição de organismos aos agentes testados, para que assim seja possível a detecção de uma alteração mais precisa na população de organismos que está sendo estudada. Para tanto, os testes crônicos são os indicados (TRUHAUT, 1977).

Um teste de toxicidade crônico compreende um método usado para determinar a concentração de uma substância que produza um efeito adverso em um organismo teste após um período maior de exposição (TRUHAUT, 1977). Avaliam a ação de determinada substância pela resposta a um estímulo, geralmente de 1/10 do seu ciclo vital até a totalidade da vida do organismo (RAND e PETROCELLI, 1985).

Os ensaios de toxicidade crônica mais difundidos mundialmente são os que utilizam *Daphnia* sp, com duração de 21 dias, e com *Ceriodaphnia* sp, de 7 dias de duração. Esse último tem sido mais utilizado para avaliação de toxicidade crônica de amostras ambientais (água e efluentes líquidos), enquanto o teste com *Daphnia* é mais utilizado para a avaliação da toxicidade de novas formulações químicas (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006).

Estes testes apresentam uma série de normas e procedimentos padronizados que devem ser seguidos para que as respostas sejam consideradas válidas. Estas normas podem ser tanto nacionais, regulamentadas pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), quanto internacionais, definidas pela ISO (Internacional Organization for Standardization). Desta forma têm-se as séries de diluição, o controle negativo e o controle positivo.

O primeiro é utilizado para medir em que concentração o material a ser testado apresenta efeitos ou não sobre determinada população, fornecendo informações sobre a relação dose/efeito, permitindo assim uma estimativa da proximidade dos limites de tolerância. O segundo trata de uma população igual a que se está testando, porém sem a adição do contaminante, uma vez que este auxilia para determinar até que ponto os efeitos podem ter ocorrido por qualquer outro motivo. Já no terceiro, inicialmente é usado um agente tóxico de efeito conhecido, para assegurar que os organismos respondam apropriadamente. Em seguida os testes são iniciados com o agente que se deseja testar (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006).

A sensibilidade do organismo ao agente a ser testado pode ocorrer em nível bioquímico, fisiológico, morfológico, comportamental, dentre outros. A sensibilidade depende não somente do fator a ser monitorado, mas também do nível nutricional, idade do organismo, sexo, fase de desenvolvimento, características genéticas, além de fatores ambientais como luminosidade e temperatura (RAND *et al.*, 1985).

A alteração no comportamento é um alerta para o tipo de dano ou estresse causado por uma substância e este estresse causará a redução ou aumento do metabolismo. Segundo Olla *et al.* (1980) quando um animal é exposto a uma perturbação, a primeira resposta de defesa é comportamental, na maioria das vezes, um comportamento de fuga, desenvolvido para diminuir a probabilidade de morte ou economia do gasto metabólico para manter a homeostasia fisiológica.

Cabe ressaltar que antes de se iniciar os testes de toxicidade com os organismos, deve-se realizar um teste de sensibilidade, que serve como uma calibração dos organismos. Neste é usada uma substância de referência quimicamente estável em solução, para a qual os organismos-teste, sob as condições laboratoriais normais, reajam sempre dentro da mesma faixa da sua concentração. O dicromato de potássio é a substância de referência mais utilizada. Porém, seu uso deve ser considerado muito crítico, uma vez que é altamente tóxico por inalação, possui potencial cancerígeno e mutagênico e é classificado como perigoso para o meio ambiente. A CE_{50} dos organismos para esta substância deve estar entre 0,6 e 1,7 mg/L (ISO 6341).

Ao término de um teste de toxicidade são obtidos diferentes níveis de um efeito tóxico, os quais estão em função das diferentes diluições do agente químico empregadas no experimento. É preciso dispor de métodos estatísticos para determinar um único valor que represente o conjunto dos dados gerados. Desta forma, é possível avaliar a resposta da população estudada a partir das concentrações, as quais 10%, 50%, 90% ou qualquer outra porcentagem da população reage a um determinado efeito.

Várias espécies vêm sendo empregadas internacionalmente em testes de toxicidade, gerando subsídios importantes para uma melhor avaliação e caracterização dos efeitos agudos e crônicos de diversos agentes tóxicos e em corpos receptores. Dentre os organismos utilizados é possível citar grupos como as microalgas, microcrustáceos, poliquetas, peixes e bactérias, representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos.

3.8. SELEÇÃO DO ORGANISMO TESTE PARA OS ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE

O organismo-teste é selecionado seguindo alguns critérios, como disponibilidade e abundância deste organismo no ambiente, facilidade de cultivo em laboratório e conhecimento da biologia da espécie. São espécies indicadoras, preferencialmente espécies sensíveis e locais (BOHRER, 1995). Rand (1995) ratifica o critério de facilidade de manutenção e cultivo em laboratório e acrescenta a necessidade de representatividade do organismo em relação a um determinado grupo de importância ecológica. Dentre as espécies que atendem tais critérios, que é amplamente utilizada internacionalmente e cuja metodologia de cultivo e teste é normatizada em vários países, encontra-se o microcrustáceo *Daphnia magna*.

3.8.1. *Daphnia magna*

Segundo Ruppert e Barnes (1996), *D. magna* (Figura 3) é classificada taxonomicamente no filo Arthropoda, subfilo Crustacea, classe Branchiopoda, ordem Diplostraca, subordem Cladocera, família Daphnidae e é comumente chamada de pulga d'água.



Figura 3: Organismo-teste *Daphnia magna*.

Fonte: <http://www.pondscape.be/picpondlife.html>

É um microcrustáceo planctônico de água doce com tamanho médio de 5 a 6 milímetros (KNIE e LOPES, 2004). Em condições ambientais favoráveis reproduz-se assexuadamente por partenogênese. As fêmeas produzem células diplóides que originam fêmeas com o mesmo genótipo, resultando portando, numa população de *Daphnia* composta inteiramente por fêmeas (USEPA, 1984).

Os ovos diplóides partenogenéticos são produzidos em cachos e incubados em uma câmara incubatória dorsal localizada por baixo da carapaça. O desenvolvimento é direto e os jovens são liberados da câmara por meio de uma flexão ventral do pós-abdômen da fêmea (RUPPERT e BARNES, 1996).

Quatro períodos podem ser reconhecidos no ciclo de vida de dafíneas: ovo, juvenil, adolescente e adulto. Em geral seu ciclo aumenta com o decréscimo da temperatura em função da diminuição da atividade metabólica. A 20 °C a média do ciclo de vida de *D. magna* é de 56 dias (RAND, 1995).

Dafinídeos, especialmente *D. magna*, tem sido utilizados por muitos anos em ensaios padronizados de toxicidade (OECD, 1984), devido a sua grande sensibilidade, fácil manipulação e alta taxa reprodutiva (VILARROEL *et al.*, 2003). Finkler (2002) cita que *D. magna* é utilizada em testes de toxicidade desde a década de 40 e nos últimos 20 anos tem sido utilizada em testes de toxicidade aguda e crônica.

A sua escolha como organismo teste fundamentam-se principalmente nos seguintes critérios: os descendentes são geneticamente idênticos, o que assegura certa uniformidade nos ensaios; o manuseio é simples, por conta do tamanho relativamente grande da espécie, em comparação com outros microcrustáceos; a espécie reage a uma ampla gama de agentes nocivos; o ciclo de vida e de reprodução é suficientemente curto, o que também permite utilizá-lo em testes crônicos; e é internacionalmente reconhecido como organismo teste, e vem sendo utilizado há décadas em laboratórios ecotoxicológicos (TRUHAUT, 1977).

3.8.1.2. *Euglena gracilis*

Euglena é um gênero de alga unicelular da divisão Euglenozoa e da classe Euglenophyceae e do Reino Protista (REIVERS, 2006; ROY *et al.*, 2007) (Figura 5). Encontrada em ambientes dulcícolas, marinhos ou de águas salobras. Não possui parede celular, reproduz-se assexuadamente e é um protista mixotrofo, ou seja, possui hábito autotrófico, produzindo açúcares através da fotossíntese, ou heterotrófico, consumindo partículas alimentares por fagocitose (ROY *et al.*, 2007).

O uso de algas como indicador biológico é importante, uma vez que, como produtores primários encontram-se na base da cadeia alimentar, e qualquer alteração na dinâmica de suas comunidades pode afetar os níveis tróficos superiores do ecossistema. Dentre as vantagens em se utilizar algas em testes de toxicidade, pode-se destacar sua grande sensibilidade às alterações ocorridas no meio ambiente e o seu ciclo de vida relativamente curto, o que possibilita a observação de efeitos tóxicos em várias gerações.

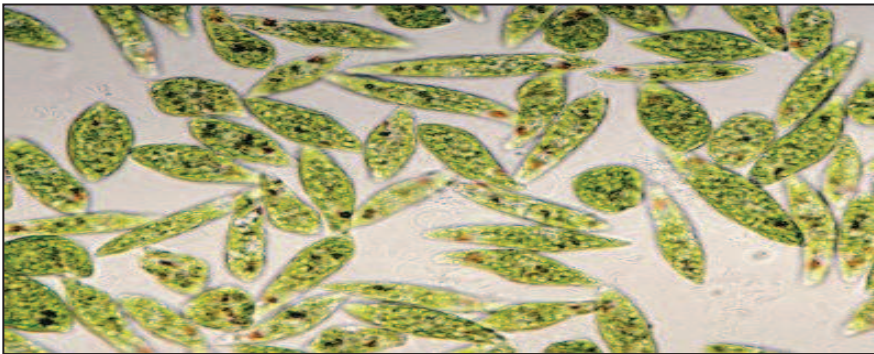


Figura 4: Organismo-teste *Euglena gracilis*.

Fonte: http://www.allposters.pt/-sp/Living-Protozoa-Euglena-Gracilis-Showing-Flagella-Stigma-and-Chloroplast-posters_i6014354_.htm

Representantes deste gênero possuem dois flagelos com funções distintas, sendo que o longo é utilizado para orientação e movimentação. Para observar o ambiente e procurar a melhor posição para a fotossíntese, a célula possui um estigma, uma organela primitiva localizada na base do flagelo que filtra a luz solar em função de detecção de estruturas fotossensíveis (REVIERS, 2006).

Esta microalga orienta-se através de gradientes químicos, luminosidade e gravidade, buscando sempre uma região ótima para crescimento e reprodução. O movimento de orientação é feito por gravitaxia, ou seja, quando a gravitaxia é negativa significa que as células movimentam-se na superfície da coluna d'água, e quando é positiva, esta orientação segue para o fundo (ARONSSON e ECKELUND, 2005).

Mostra orientação sob gravidade exclusivamente negativa, o que significa que as células se movem para a superfície da coluna d'água, especialmente na ausência de estímulo luminoso (HADER; VOGEL, 1990).

Devido a sua natureza altamente sensível, as microalgas podem ser possíveis indicadoras de deterioração precoce de condições ambientais, especialmente em ambientes aquáticos (McCORMICK, 1994).

Em ambiente propenso ao seu desenvolvimento essas algas possuem comportamento típico sem grandes alterações. Por sua vez, quando se

encontram em ambientes contaminados por alguma substância nociva, um ou mais parâmetros anteriormente citados podem se modificar.

3.9. BIOMONITORAMENTO EM TEMPO REAL

Uma alternativa ao uso de testes de toxicidade com respostas como mortalidade, crescimento e reprodução para avaliar o impacto ambiental, é utilizar alterações comportamentais ou fisiológicas através de sistemas de biomonitoramento automático em tempo real (TRUHAUT, 1977).

O biomonitoramento automático em tempo real faz uso de organismos aquáticos para fornecer um aviso adiantado da presença de substâncias tóxicas na água, tendo em vista que seus resultados são obtidos através de análises comportamentais. Este conceito tem sido aplicado no monitoramento de efluentes industriais, para detectar processos de tratamento incompleto em estações de tratamento de efluentes, no auxílio a agravos ambientais devido a derramamento tóxico, ou no monitoramento de fontes de água potável utilizadas para abastecimento público de água (HÄDER, 1985).

Apresentam uma alternativa eficiente para avaliação toxicológica, pois são capazes de detectar alterações comportamentais induzidas por concentrações que não causam mortalidade, mas que possam ter implicações ecológicas para as populações aquáticas. Este é um método não invasivo, prático, bastante sensível, apropriado para pesquisas ecotoxicológicas e para uma gama de aplicações, tendo a vantagem de ter sensibilidade elevada comparável com outros testes. Possui a capacidade de monitorar de forma automática sem causar perturbação ao organismo-teste, e estes respondem com mudanças comportamentais dentro de curtos períodos de tempo (HÄDER, 1985).

O comportamento é uma resposta toxicológica que reflete o efeito de todos os níveis do organismo e representa a interação de processos fisiológicos com estímulos ambientais (GRUE *et al.*, 2002). Desta forma, o comportamento tem sido explorado em vários sistemas biosensores para a detecção de alterações ambientais através da análise de imagem em tempo

real (CHAROY *et al.*, 1995; DODSON *et al.*, 1995; SORENSEN *et al.*, 1995; TAHEDL e HÄDER, 1999; TAHEDL e HÄDER, 2001).

Estes sistemas de advertência utilizados têm as seguintes características básicas (BBE, 2004): os organismos são mantidos em laboratório ou em campo sob circunstâncias controladas e expostos em uma base frequente ou contínua do fluxo ao que está sendo avaliado; parâmetros fisiológicos ou comportamentais do organismo são monitorados por dispositivos que armazenam e comparam a uma faixa de comportamento normal do biosensor, passando a responder às circunstâncias anormais indicadas pelo organismo; e por fim, a função do organismo biosensor é primeiramente detectar mudanças na toxicidade em curto prazo da fonte a qual ele está sendo exposto. O monitoramento em tempo real pode ser realizado utilizando o aparelho conhecido como NG – Tox (new generation ecotox).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi dividida em três etapas de processo para melhor organização da pesquisa. A primeira etapa consistiu em realizar ensaios toxicológicos agudos e crônicos com o microcrustáceo *Daphnia magna* utilizando o conservante alimentar sorbato de potássio, para então se obter a CE₅₀ (concentração efetiva que causa efeito em 50% da população testada).

A segunda etapa também consistiu em ensaios toxicológicos agudos e crônicos, porém, desta vez com a alga *Euglena gracilis*. O procedimento serviu para comparar os valores obtidos do teste realizado com *D. magna*, e verificar possíveis alterações de comportamento frente a diferentes parâmetros analisados.

Por fim, a terceira etapa foi realizada usando as concentrações abaixo da CE₅₀ (Concentração Efetiva Mediana) previamente obtida no teste de toxicidade aguda com *D. magna*, utilizando-as na formulação de meios de cultivo usados na cultura de tecidos vegetais, a fim de se verificar o efeito da adição deste conservante no controle antimicrobiano e no desenvolvimento das plântulas cultivadas *in vitro*.

4.1. 1ª ETAPA: METODOLOGIA COM O MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna*

A metodologia de cultivo do organismo-teste *D. magna* seguiu as normas da NBR 12.713 (ABNT, 2009b). Este método objetivou a manutenção de organismos-teste em laboratório sob condições em que fosse possível realizar ensaios de toxicidade com o conservante alimentar sorbato de potássio.

D. magna foi cultivada em água reconstituída com pH variando de 7,0 a 8,0 e com dureza variando de 175 a 225 mg.L⁻¹ de CaCO₃ (NBR 12.713, 2009b). Depois de preparada, a água foi aerada para completa solubilização dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH durante pelo menos 12 horas antes de sua utilização.

Os organismos foram mantidos em lotes de até 50 adultos em um recipiente com capacidade para dois litros, com uma luminosidade difusa (fotoperíodo de 16h de luz) e uma temperatura de 18° a 22 °C. A água reconstituída do cultivo foi renovada duas vezes por semana, tendo o cuidado da temperatura não variar mais do que 2°C. Para o manuseio dos organismos utilizou-se uma pipeta de plástico com volume de 3 mL, com a extremidade cortada para não danificar os organismos.

Utilizou-se a alga verde *Desmodesmus subspicatus* Chodat e Hegewald, A. Schmidt para a alimentação dos organismos, sendo fornecida a quantia de aproximadamente 10⁶ células.mL⁻¹ por organismo adulto. Esta alimentação foi feita diariamente, ou com um intervalo de no máximo dois dias consecutivos.

Manteve-se uma cultura da alga em estoque que serviu como inóculo, e esta foi mantida a uma temperatura de 4° a 10°C por no máximo um mês, para obtenção de células viáveis para a semeadura. Para o cultivo da alga utilizou-se o meio LC-Oligo, cujas soluções para preparo foram estocadas em temperatura de 4°C a 10°C, por no máximo seis meses. Após o preparo do meio de cultura, este foi agitado por uma hora e esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C.

A inoculação das algas foi realizada em meio asséptico, de modo que se obtivesse aproximadamente 10⁷ células.mL⁻¹ em um período de

aproximadamente 7 dias. Estas culturas foram mantidas entre 20°C a 30°C, sob iluminação constante e aeração. Após atingir crescimento adequado, as culturas foram centrifugadas a fim de se retirar o excesso do meio de cultura algáceo. O sobrenadante foi descartado e a alga ressuspensa com a água reconstituída utilizada para o cultivo de *D. magna* (Meio Natural). Tal procedimento foi realizado para evitar a introdução de nutrientes presentes no meio de cultura das algas que podem ser tóxicos aos organismos-teste.

Antes de se iniciar os testes com *D. magna*, realizou-se um teste de toxicidade/sensibilidade aguda com a substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), (4,0 a 0,125 mg/L). Considerou-se aptos para utilização dos testes os neonatos produzidos em lotes de cultivo que apresentaram CE50 48h entre 0,6 e 1,7 mg.L⁻¹ de dicromato de potássio (ABNT, 2009b, NBR 12.713).

4.1.1. Metodologia do teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

A metodologia de teste agudo com *D. magna* também seguiu o descrito na NBR 12.713 (ABNT, 2009b). Os testes foram conduzidos no laboratório de Meio Ambiente da UNIVILLE.

O conservante alimentar sorbato de potássio foi testado baseando-se na exposição de neonatos de *D. magna*, de duas a 26 horas de idade, em diluições do conservante, por um período de 48 horas.

Inicialmente, preparou-se uma solução mãe de 1,0 litro a 1% do conservante em um balão volumétrico, colocando-se 10,2 g do conservante, uma vez que sua pureza era da ordem de 98%. Foram feitas 10 concentrações partindo de 1%. Ao final obtiveram-se as seguintes concentrações (%): 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312; 0,0156; 0,0078; 0,0039 e 0,0019, que correspondem respectivamente a 10; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1525; 0,0781; 0,0390 e 0,0195 g/L.

Utilizou-se 10 organismos por controle, sendo que foram colocados 5 organismos por tubo de ensaio. O volume final do tubo de ensaio foi de 10

mL, sendo o teste realizado em duplicata. Ao final obteve-se 44 tubos de ensaio. O esquema pode ser observado na Figura 5.

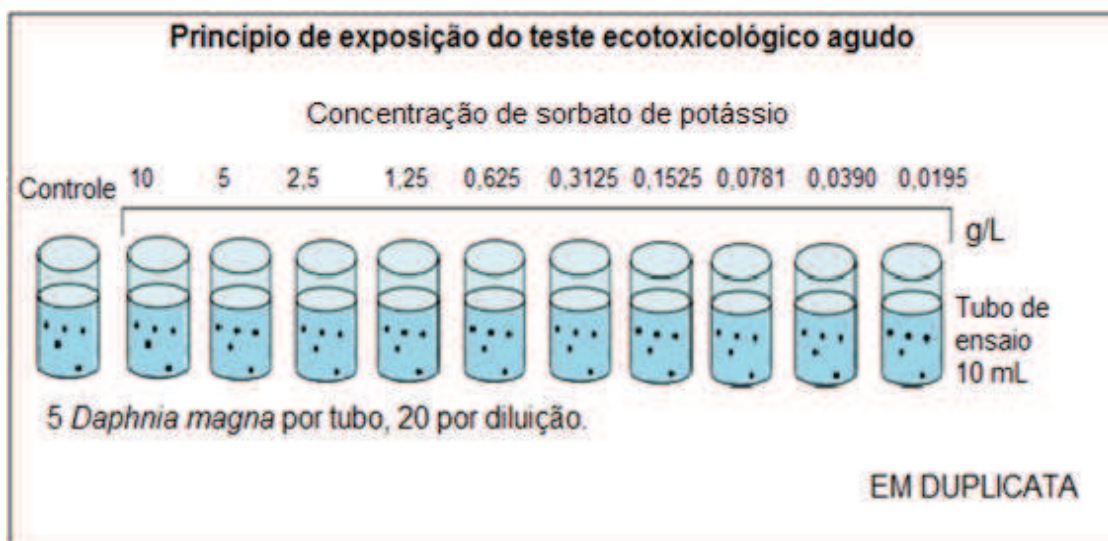


Figura 5: Esquema do teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*. Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 6 mostra a bancada de laboratório com a preparação de um teste de toxicidade aguda e a preparação das diluições. A Figura 7 mostra os tubos de ensaio em duplicata já com os organismos inseridos.



Figura 6: Soluções-teste de sorbato de potássio para um teste agudo com *Daphnia magna*. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 7: Tubos de ensaios em duplicata, contendo o organismo *Daphnia magna* incubado em diferentes concentrações de sorbato de potássio. Fonte: Arquivo pessoal.

Os organismos-teste foram adicionados aos tubos de ensaio, fazendo-se a distribuição a partir do controle e sempre da menor para a maior concentração do agente tóxico. Os frascos foram cobertos com filme de PVC e levados para a germinadora de teste (geladeira com temperatura e luminosidade controladas). Durante o período do teste os organismos foram mantidos de 18° a 22°C, sem alimentação e com iluminação de 12 horas de luz, com intensidade luminosa entre 500 e 1000 Lux.

Após o término do teste (48 horas) observou-se o número de indivíduos imóveis por concentração e, a partir destes dados calculou-se a porcentagem de imobilidade por concentração. Este resultado foi expresso em Concentração Efetiva Inicial – CE₅₀ 48h, que corresponde à concentração da amostra no início do ensaio, que causa um efeito agudo a 50% dos organismos expostos por 48 horas às condições de teste.

4.1.2. Metodologia do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*

Para a realização dos testes crônicos foram utilizados organismos jovens de *D. magna* com duas a 26 horas de idade, obtidos a partir da quarta postura de fêmeas cultivadas. O teste crônico é baseado na exposição dos organismos jovens a várias diluições da amostra por um período de 21 dias.

O ensaio foi realizado com o sorbato de potássio a 1% em 6 concentrações (g/L) (1,25 0,625, 0,3125, 0,1525, 0,0781 e 0,0390), sendo descartadas as 3 primeiras onde ocorreu mortalidade do microcrustáceo no teste agudo, estando portanto, estas concentrações abaixo da CE_{50} 48h. Foi também desconsiderada a última concentração (0,0195), pois os valores de diluições eram bem próximos, e por este motivo optou-se por retirar tal concentração. Também foi realizado o controle negativo, contendo apenas o Meio Natural.

As diluições foram preparadas com precisão volumétrica da mesma maneira que foram preparadas no teste agudo, porém, neste teste, como era necessária a troca regular das diluições, optou-se por fazer estas diluições em garrafas de um litro que foram armazenadas em geladeira, e quando estas chegavam ao fim, novas diluições eram preparadas e estocadas. O prazo de estocagem destas diluições foi de 14 dias, e após este período, foram descartadas. Utilizou-se Meio Natural como diluente nas devidas proporções de amostra e água reconstituída.

Para cada diluição fez-se 10 réplicas, sendo um organismo jovem de *D. magna* por copo descartável de 80 mL. Cada copo recebeu uma alíquota de 25 mL da solução-teste e estes foram cobertos com filme de PVC para evitar a evaporação e contaminação do teste com possíveis resíduos suspensos no ar. O esquema pode ser observado na Figura 8.

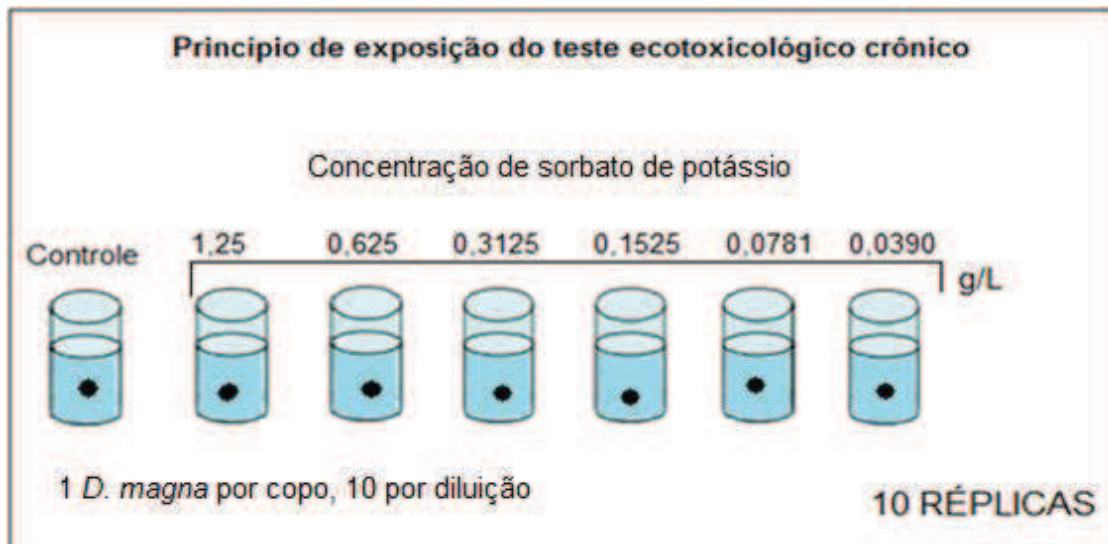


Figura 8: Esquema do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*. Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 9 mostra os copos plásticos onde, no lado esquerdo da foto estão todas as diluições e suas respectivas réplicas, e no lado direito, o controle negativo e suas réplicas.

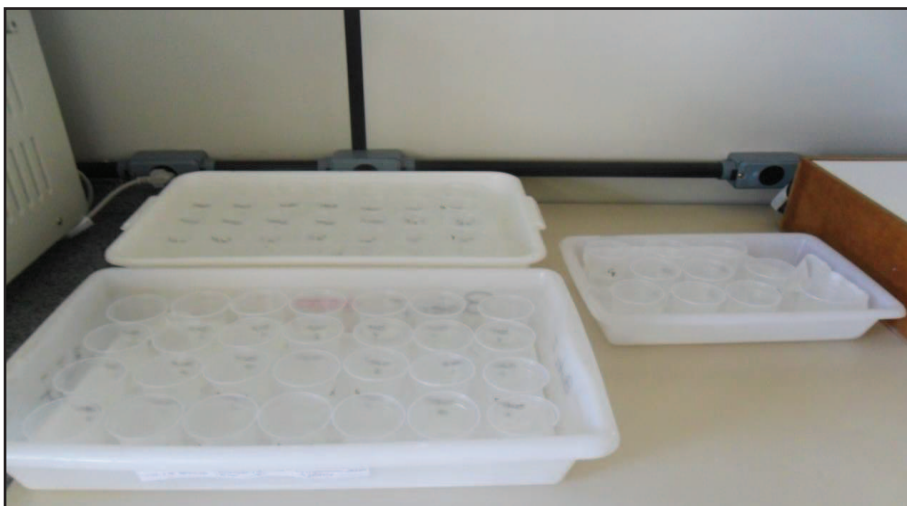


Figura 9: Bancada de teste de toxicidade crônica contendo o organismo *Daphnia magna* com diferentes concentrações de sorbato de potássio. Fonte: Arquivo pessoal.

O organismo foi exposto à solução-teste em diferentes concentrações, sendo transferido de forma a evitar a alteração na concentração final da mesma. Utilizou-se uma pipeta pasteur de 3 mL com a extremidade cortada, a fim de não causar dano ou estresse aos indivíduos. Teve-se o cuidado de

liberar o organismo próximo a superfície da solução para evitar a entrada de ar sob sua carapaça e consequente flutuação.

Os testes foram mantidos nas mesmas condições do teste agudo. Os organismos receberam diariamente alimentação, sendo fornecido como alimento a alga *Desmodesmus subspicatus*, em concentrações próximas a 10^7 células.mL⁻¹.

Os organismos foram acompanhados diariamente durante o teste sendo que as leituras foram realizadas três vezes por semana, em dias intercalados. Nestes momentos observava-se a sobrevivência, o número de jovens gerados por fêmea, e qualquer outra alteração pertinente.

Na leitura também se substituía a solução-teste antiga. Em cada troca da solução-teste retirava-se o organismo adulto e os jovens do copo plástico. Os organismos adultos eram temporariamente colocados em um recipiente livre de contaminação, contendo apenas Meio Natural, e os organismos jovens eram contabilizados e descartados. Após a contagem eram recolocados no recipiente com nova alíquota.

Os parâmetros analisados para o teste crônico foram a longevidade e a fecundidade. O primeiro foi obtido pelo acompanhamento da sobrevivência dos organismos até o final do teste (21 dias). Já o segundo foi avaliado pela contagem dos neonatos gerados pelas fêmeas no período de 21 dias.

Para a utilização dos organismos-teste no ensaio crônico, o mesmo teste de sensibilidade usado para o teste agudo foi utilizado. Este foi feito também com a substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), a uma concentração que variou de 0,125 a 4 mg/L. Também foram considerados aptos para a utilização nos testes os neonatos produzidos em lotes de cultivo que apresentaram CE_{50} 48h entre 0,6 e 1,7 mg.L⁻¹ de dicromato de potássio (NBR 12.713). Ao final os materiais foram lavados e higienizados conforme normas da NBR 12.713 (ABNT, 2003a).

4.2. 2ª ETAPA: METODOLOGIA COM A ALGA *Euglena gracilis*

As algas do gênero *Euglena* utilizadas no teste toxicológico agudo e crônico, foram obtidas da coleção da Universidade de Gottingan - Alemanha. Utilizaram-se cepas mantidas em meio mineral e orgânico, preparado conforme descrição feita por Checcuci *et al.* (1976). A manutenção da cultura ocorreu em exposição à luz 20 W, com um fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 20°C. Todos os testes foram feitos a partir de uma única cultura com o intuito de manter as características e evitar desvios.

Os experimentos comportamentais com a alga na presença do conservante alimentar sorbato de potássio foram realizados utilizando a ferramenta de biomonitoramento em tempo real, o NG-TOX. Esta ferramenta monitorou através da análise de imagens, o comportamento das algas, utilizando diferentes parâmetros.

4.2.1. Metodologia do teste de toxicidade aguda com *Euglena gracilis*

Para o teste agudo foram preparadas as mesmas soluções utilizadas no teste agudo com o microcrustáceo *D. magna*. Cada concentração de sorbato de potássio foi diluída em 50 mL de água. O teste agudo foi realizado após 1h de contato com o agente a ser testado, a fim de se verificar uma reação imediata.

O aparelho NG-TOX foi primeiramente calibrado. Em seguida lavou-se o sistema com água e suspensão de células. Na sequência, em cada uma das 3 mangueiras existentes no aparelho foi colocado um erlenmeyer com seu líquido correspondente (água destilada, suspensão contendo as algas e solução com agente a ser testado).

Procederam-se os testes iniciando-se pelo controle. Os testes foram feitos em triplicata começando sempre da menor concentração. Para a análise, as algas permaneceram inicialmente em contato somente com água destilada. Em seguida as algas foram expostas ao sorbato de potássio nas diferentes concentrações. Os parâmetros analisados durante os testes pelo programa foram: velocidade média de subida (up); orientação (r-value);

motilidade (motile); compactação (compactness) e velocidade (speed) (MILLÁN DE KUHN, *et al.*, 2006).

O parâmetro motilidade expressa a quantidade de células que se deslocam a uma velocidade igual, ou a mais rápida do que a velocidade mínima fixada no programa. A velocidade de subida expressa a quantidade de células que se movem em direção a parte superior da cubeta (luz).

A orientação em relação à gravidade é um parâmetro estatístico que varia de 0, quando as células se movem aleatoriamente para 1, quando todas as células se movem em um único sentido. A compactação da célula descreve a forma da célula e tem o menor valor que corresponde a um quando o contorno do objeto é um círculo, e aumenta a medida que a célula aumenta de comprimento.

O aparelho NG - Tox (ERZINGER *et al.*, 2011) realiza um teste biológico automático que utiliza como organismo teste *Euglena gracilis*. Este aparelho foi desenvolvido e homologado pela Ecobabitonga Tecnologia Ltda. (ERZINGER *et al.*, 2011).

Consiste de um equipamento que possui em sua face frontal conexões para quatro tubos de silicone com a outra extremidade oriunda de reservatórios. Em cada reservatório estão: as células em suspensão, o fluído de limpeza (água destilada), a amostra da solução-teste e os resíduos descartáveis. Três bombas acionadas por motores de passo peristáltico transportam as células, o fluído e a amostra, até uma cubeta de vidro de 22 mm de diâmetro e 0,2 mm de espessura.

Os organismos-teste, em contato com o fluído são homogeneizados e enviados para uma cubeta de observação conectada a um microscópio, que captura as imagens das células em movimento (Figura 10). As imagens são gravadas por uma câmera CCD (Charged Coupled Device) e digitalizadas por uma placa conectada a um computador, onde são apresentadas em um monitor.

A partir de um único vetor de movimento medido, calcula-se uma série de parâmetros de movimento, como a quantidade e o comportamento gravitacional das células, mobilidade, precisão da orientação, alinhamento, ângulo da distribuição principal, área, fator de forma, velocidade, velocidade

máxima de subida, velocidade máxima de descida e fototaxia (TAHEDL e HÄDER, 1999, 2001).

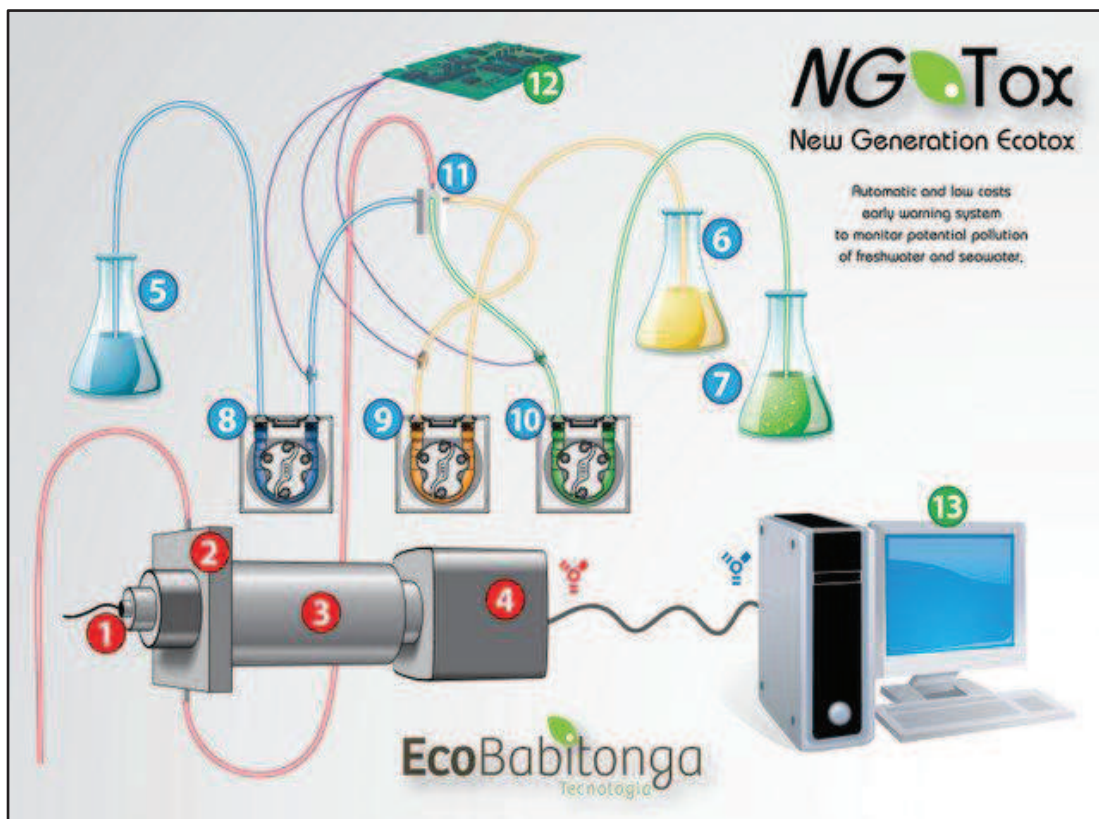


Figura 10: Esquema do funcionamento do equipamento ECOTOX. Fonte: ERZINGER *et al.* (2011). 1-4: microscópio; 5: reservatório para água; 6: reservatório para solução teste; 7: reservatório para *Euglena gracilis*; 8-10: bombas que sugam o líquido; 11: cubeta de vidro; 12: placa de computador que faz a bomba funcionar; 13: monitor de computador para visualização.

Antes de se iniciarem os testes com a substância de interesse, um primeiro controle de medição (água e suspensão celular) é realizado. São tiradas fotos e os parâmetros são analisados e mostrados na tela do computador em gráficos de cor verde. Depois disso, a cubeta é lavada e uma alíquota da suspensão celular é misturada com a amostra a ser analisada e bombeada para a cubeta. Os parâmetros são calculados novamente sendo comparados com os resultados anteriores, exibindo gráficos de cor vermelha.

A fim de se monitorar continuamente um ecossistema ou um fluxo de água residual, este instrumento pode ser programado para repetir as medições em intervalos de tempo pré-definidos e fornecer os resultados. Se

as substâncias presentes na amostra forem tóxicas, um ou mais parâmetros de motilidade podem ser afetados, e quando os resultados a partir da amostra do teste desviarem significativamente da amostra controle, um alarme é acionado.

Portanto, esse sistema é baseado em mudanças no comportamento de movimento de uma única célula induzida por tóxicos. Este sistema compara mobilidade, velocidade, orientação e forma das células dos organismos teste em uma suspensão controle com o comportamento dos mesmos organismos após a adição da amostra teste. Estas medições são feitas automaticamente usando um sistema analisador de imagem em tempo real provido de uma câmera de alta resolução.

4.2.2. Medição de parâmetros de eficiência fotossintética usando o equipamento PAM.

Parâmetros de fotossíntese foram medidos através de um fluorímetro de amplitude de pulso modulada (PAM 2000), Walz Effeltrich, Alemanha. O princípio de medição deste aparelho é baseado em mudanças no nível de fluorescência da clorofila, após a aplicação de pulsos de luz saturada.

O software do sistema possui configurações diferentes para medir vários parâmetros de fluorescência. No presente estudo, a taxa de transporte de elétrons relativa e rendimento quântico foram medidos usando a configuração da curva de luz, que envolveu a determinação da fluorescência em diferentes intensidades de luz actínica (0; 86; 236; 466; 966; 1.461; 2.177 e 3.199 $\text{mmol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), enquanto o rendimento quântico do fotossistema II (F_o (fluorescência inicial) / F_m (fluorescência máxima)) foi medido pelo método de saturação de pulso único. O rendimento de fotossíntese bem como de t\u00eampera (fotoqu\u00edmico e n\u00e3o fotoqu\u00edmico) foram ent\u00e3o calculados.

As culturas testadas foram adaptadas no escuro por uma hora, sendo que em seguida foram retirados cerca de 5 mL e transferidos para a cubeta do equipamento. Foi ent\u00e3o submetida \u00e0 emiss\u00e3o dos pulsos de luz saturante para avalia\u00e7\u00e3o da atividade fotossint\u00e9tica (Figura 11). A figura mostra que

foram emitidos 10 pulsos em intervalos de 1:20 segundos. A variação da fluorescência emitida ($F_m - F_o$) sobre a fluorescência máxima determinou a eficiência fotossintética a cada pulso emitido. Variações de F_o (fluorescência inicial) e F_m (fluorescência máxima) nos pulsos subsequentes determinaram a dissipação q_N e NPQ.

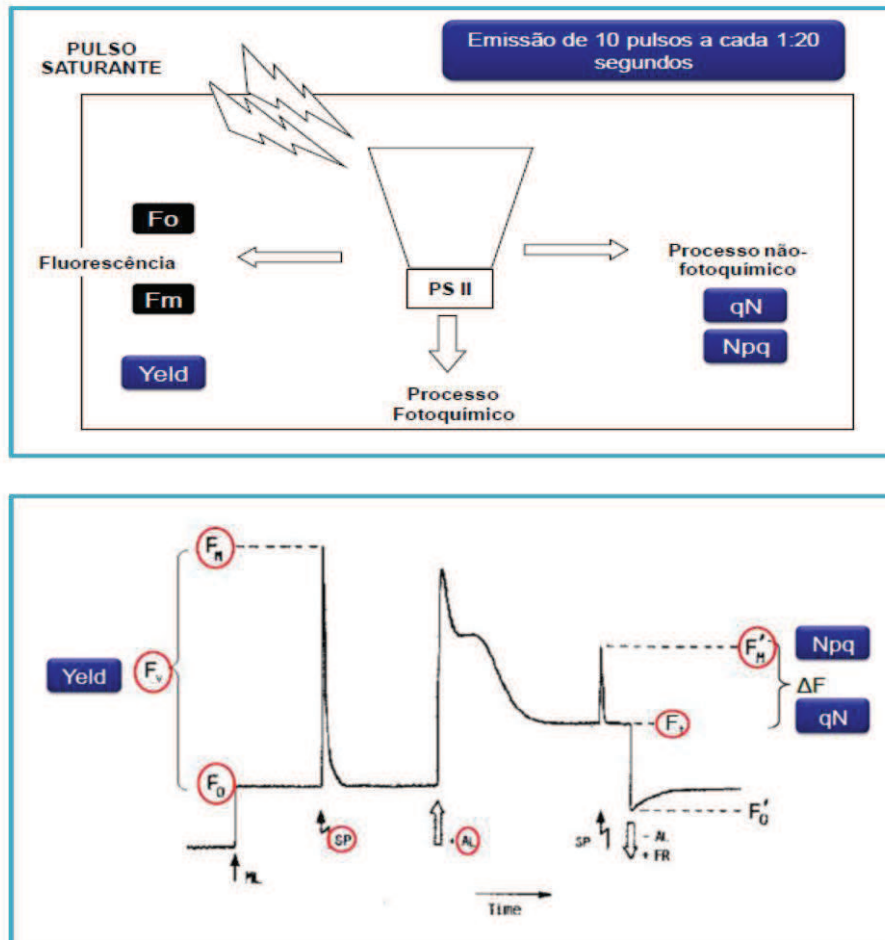


Figura 11: Esquema do funcionamento do equipamento PAM. Fonte: Arquivo pessoal.

A emissão de um pulso de luz saturante permitiu detectar a fluorescência máxima - F_m , indicando redução completa do receptor de elétrons no fotossistema II. As algas *E. gracilis* foram expostas a intensidade da iluminação crescente (gerado por uma lâmpada halógena interna) em 10 passos de 0 a $3111 \text{ molm}^{-2}/\text{s}^{-1}$. Após 20 segundos de cada etapa de iluminação, um pulso saturante foi aplicado e o rendimento fotossintético e a

ETR (taxa de transporte de elétrons) foram medidos automaticamente (Figura 12).

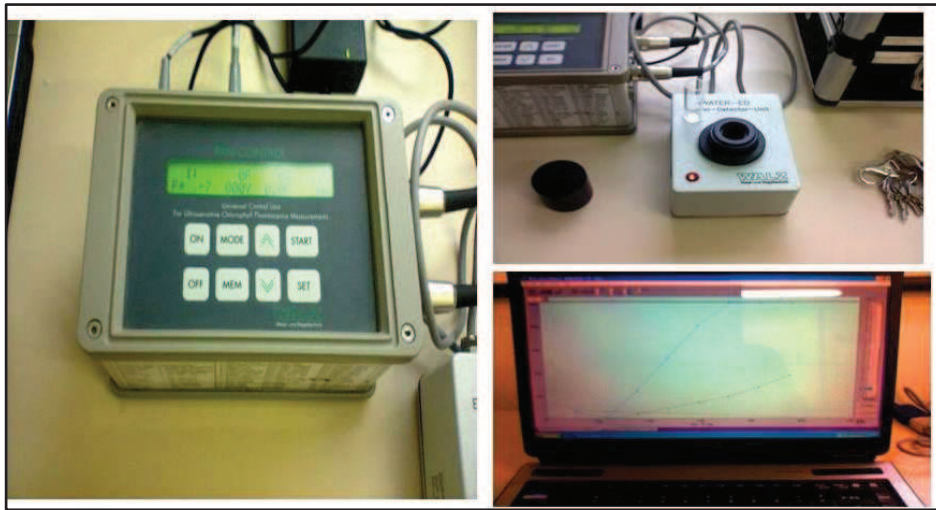


Figura 12: Imagem do equipamento PAM. Fonte: Arquivo pessoal.

Em seguida, os dados foram plotados contra o PAR incidente (radiação fotossinteticamente ativa em $\text{molm}^{-2}/\text{s}$).

Desta forma, analisou-se a interferência que o sorbato de potássio promoveu na: eficiência fotossintética (YIELD) (medido pela diferença entre os valores de F_m e F_o); extinção não-fotoquímica (q_N); e extinção não-fotoquímica da fluorescência sem necessidade de fluorescência mínima (NPQ). Todos os testes foram realizados sempre no mesmo horário, respeitando-se o tempo de exposição à luz das algas na incubadora, onde se encontravam armazenadas.

O rendimento e as dissipações são alterados em resposta a qualquer estresse ambiental, como irradiâncias baixas ou elevadas, alta temperatura, poluentes orgânicos e inorgânicos (BOLHAR-NORDENKAMPF e OQUIST, 1993).

4.2.3. Metodologia do teste de toxicidade crônica com *Euglena gracilis*

Utilizou-se as mesmas concentrações utilizadas no teste de toxicidade crônica com *D. magna*, excluindo-se a última diluição. Prepararam-se as soluções contendo 50 mL no total. As leituras foram feitas em triplicata e, após um período de incubação de sete dias com o sorbato de potássio em uma incubadora com fotoperíodo de 12 horas e à 12°C, as algas foram submetidas às leituras, da mesma forma como procedeu-se no teste agudo (Figura 13).



Figura 13: Teste de toxicidade crônica com *Euglena gracilis*. À esquerda observa-se o frasco contendo a cultura mãe contendo as algas, e à direita as algas em suas respectivas concentrações em g/L de sorbato de potássio. Fonte: Arquivo pessoal.

4.3. 3ª ETAPA: AVALIAÇÃO DO USO DO SORBATO DE POTÁSSIO EM PLANTAS CULTIVADAS *IN VITRO*.

Nesta etapa utilizou-se apenas quatro concentrações distintas do sorbato de potássio (0,3125, 0,1525, 0,0781 e 0,0390 g/L), devido ao resultado do teste de ecotoxicidade agudo e crônico obtido com o microcrustáceo *D. magna*.

Os testes foram realizados com *Ananas comosus*, uma espécie de abacaxi comestível obtida de um laboratório localizado em Santa Catarina. O abacaxi foi modificado geneticamente para resistência ao fungo da fusariose, uma doença devastadora do abacaxizeiro (SPIRONELLO *et al.*, 1997a), causado pelo fungo *Fusarium subglutinans* (SANTOS *et al.*, 2002). A modificação foi realizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

A escolha desta espécie se deu pela sua abundância no laboratório de estudo, fácil manuseio e rápida multiplicação, juntamente com o alto valor econômico que a espécie possui, sendo cultivado em todo o mundo (NADKARNI, 1991).

O meio utilizado para o crescimento do abacaxi foi o meio semisólido MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), que contém em sua composição macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, sacarose e outros componentes, acrescido de 3,0 ml/L de BAP (6-benzilaminopurina), hormônio vegetal de crescimento da classe das citocininas. Após o preparo do meio, verteu-se cerca de 20 mL em frascos de vidro, e estes foram esterilizados em autoclave a 121°C, por 20 minutos.

4.3.1. Princípio do método

Os experimentos foram realizados em triplicata. Além das quatro concentrações fez-se também o controle negativo, apenas com o meio semisólido MS, sem adição de sorbato de potássio (Figura 14).

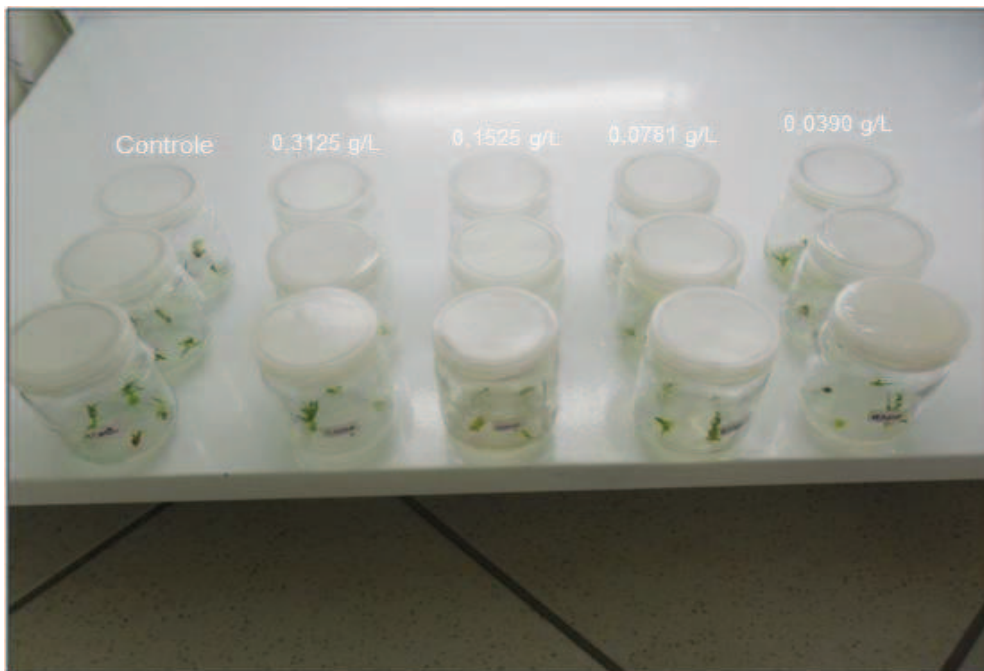


Figura 14: Frascos contendo *Ananas comosus* incubados em diferentes concentrações em g/L de sorbato de potássio. Fonte: Arquivo pessoal.

Para o experimento utilizou-se um frasco sem contaminação de *Ananas comosus*. Fez-se a fragmentação do tecido vegetal em câmara de fluxo laminar de modo que, em cada frasco fosse colocado quatro explantes, totalizando, portanto, um total de 60 explantes contabilizados já com o controle.

A cada 20 dias os frascos foram abertos e nova repicagem foi iniciada. De cada triplicata foram feitos mais três frascos, totalizando nove frascos por concentração. Adicionalmente de cada frasco da triplicata contendo sorbato de potássio retirou-se um único explante, e este foi passado para um frasco contendo apenas o meio MS, sem a adição de sorbato de potássio. Esta parte do procedimento serviu pra verificar se havia alguma contaminação que se manifestaria sem a presença do conservante.

Ao final, realizou-se um total de três repiques (Figura 15 e 16), com intervalo de 20 dias cada, totalizando um total de 60 dias de experimento, sendo que em todos os dias os frascos foram observados e qualquer alteração foi devidamente registrada. A metodologia pode ser melhor visualizada na Figura 17.

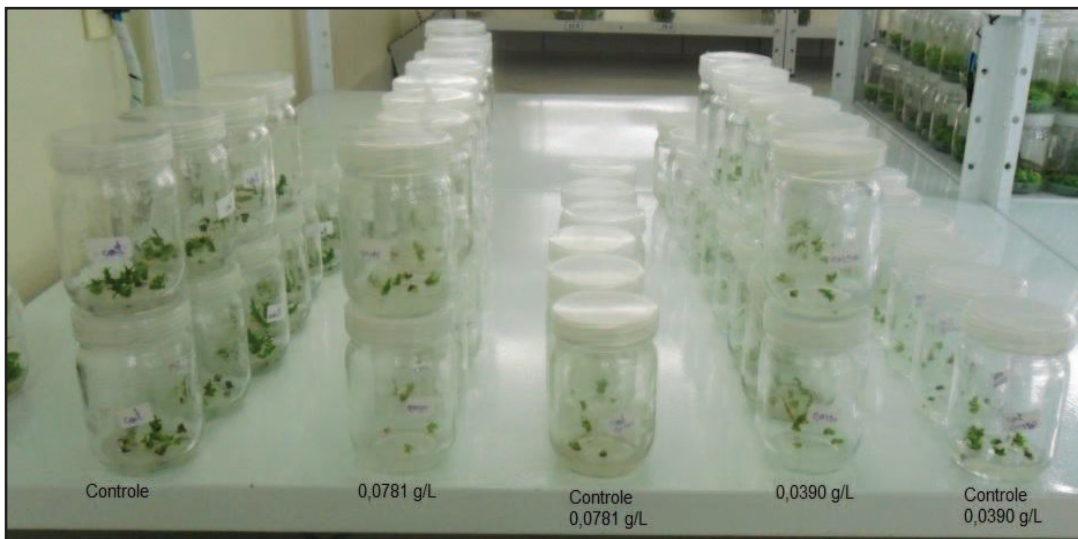


Figura 15: Frascos contendo *Ananas comosus* repicados após 20 dias de teste, nas concentrações de 0,0781 e 0,0390 g/L de sorbato de potássio. Fonte: Arquivo pessoal.

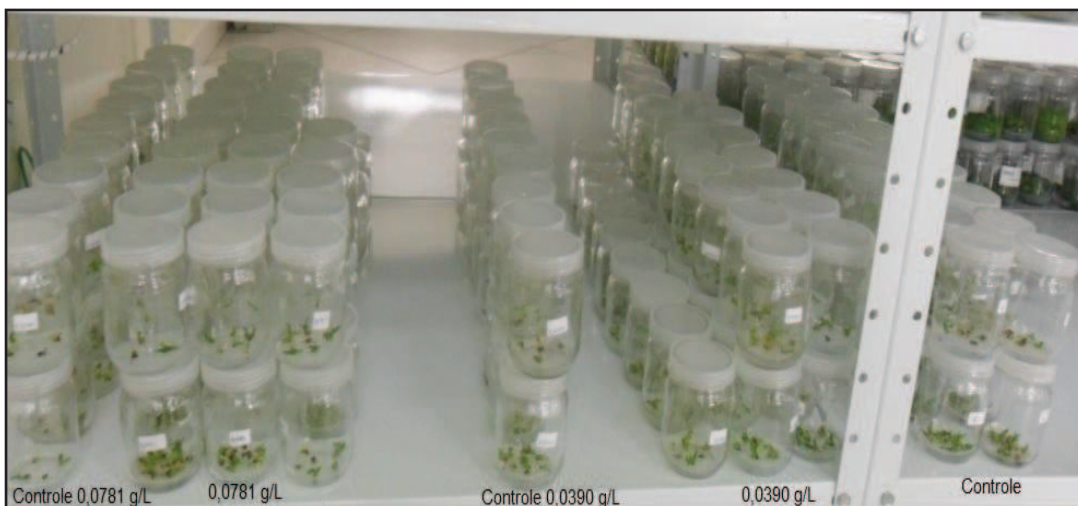


Figura 16: Frascos contendo *Ananas comosus* repicados após 40 dias de teste, nas concentrações de 0,0781 e 0,0390 g/L de sorbato de potássio. Fonte: Arquivo pessoal.

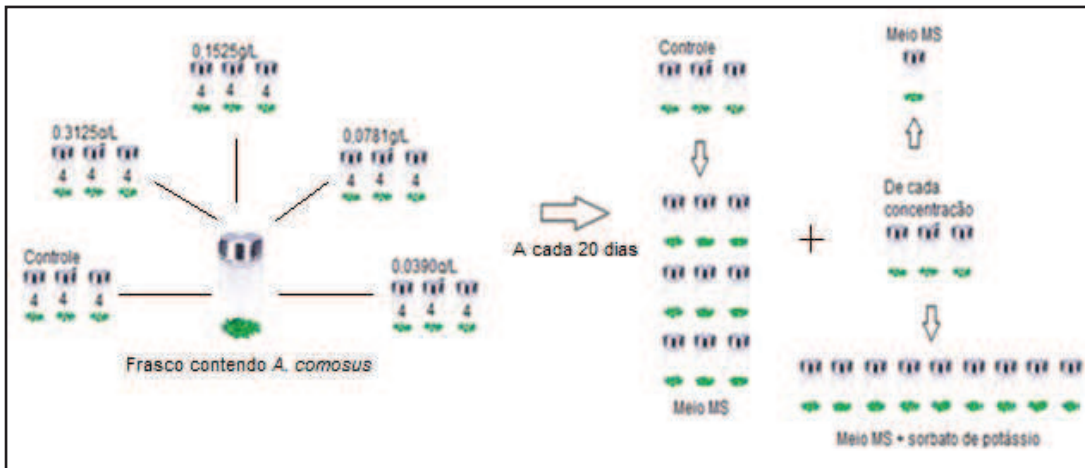


Figura 17: Esquema da metodologia utilizando sorbato de potássio em *Ananas comosus* cultivado *in vitro*. Fonte: Arquivo pessoal.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AMBIENTAL

Para a determinação toxicológica ambiental do sorbato de potássio de forma aguda, foi realizado o experimento empregando o microcrustáceo de água doce *D. magna* e a microalga *E. gracilis*.

Não foi encontrado na literatura e nem nas normas ambientais do Brasil e do Estado de Santa Catarina nenhuma regra que trate especificamente do descarte do sorbato de potássio no meio ambiente. Admitindo então que estes descartes serão feitos em esgoto doméstico, este trabalho utilizou como referência a legislação preconizada pela FATMA (Fundação do Meio Ambiente) em Santa Catarina para esgotos domésticos e/ou hospitalares, em conformidade com o disposto na Portaria 017/02, relativo ao padrão de qualidade, que estabelece que o fator de diluição destas amostras para o microcrustáceo *D. magna* seja de 1 (uma parte da amostra e uma parte de água) (FATMA, 2002).

Com isso, calculou-se o risco ambiental (RQ), descrito por Goktepe *et al.* (2004) e aplicado por Fujimoto *et al.* (2012) e Machado *et al.* (2014). Tal cálculo foi realizado a partir da Concentração Ambiental Esperada (CAE), tendo um valor de 1, dividido pela CE_{50} , que foi obtida em testes de toxicidade aguda, a partir de cada concentração de sorbato de potássio.

No presente estudo foram utilizadas culturas de *D. magna*, e o valor obtido por meio de testes teve uma CE_{50} para *D. magna* de 1,6 g/L, gerando portanto um RQ de 0,689. De acordo com Goktepe *et al.* (2004), um valor de RQ entre 0,5 e 1,0 caracteriza efluentes que apresentam um alto risco para o meio ambiente.

Para o teste de toxicidade aguda realizado com o organismo *D. magna*, observou-se sua sobrevivência, verificando o número de organismos vivos em sua respectiva concentração. A partir destes resultados, construiu-se a Figura 18 com os resultados. No teste de toxicidade aguda de 48h, as concentrações de 2,5, 5,0 e 10,0 g/L apresentaram uma letalidade de 100% em ambas as duplicatas.

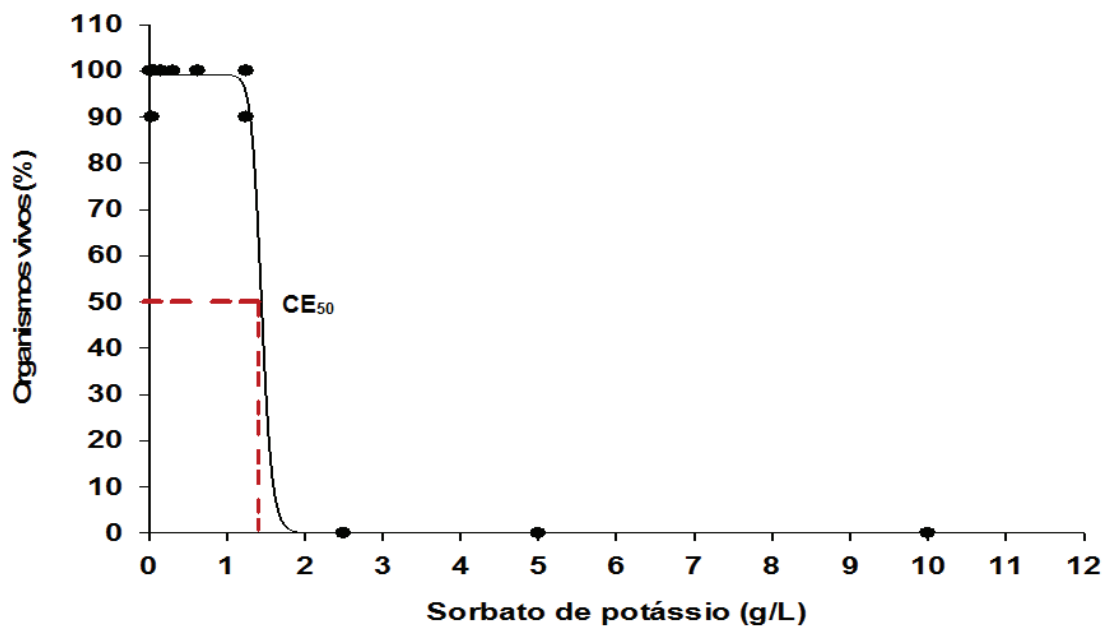


Figura 18: % de organismos vivos de *Daphnia magna* durante o teste de toxicidade aguda em diferentes concentrações de sorbato de potássio em (g/L).

Neste mesmo experimento foi observado que dois organismos morreram em duas concentrações distintas (1,25 e 0,0390635 g/L), sendo o p maior que 0,05 não sendo este dado significativo, comprovando ainda a qualidade do teste. Portanto, para *D. magna* a CE_{50} foi de 1,6 g/L, ou seja, concentrações de sorbato de potássio acima deste valor causarão uma toxicidade aguda nestes organismos, sendo que abaixo deste valor não se observará uma toxicidade aguda. O valor encontrado para este organismo neste trabalho (1,6 g/L) foi 53% superior ao descrito pela MERCK (2010). Uma das possíveis justificativas para esta maior sensibilidade nos resultados pode ser em razão das diferentes metodologias adotadas. O presente trabalho utilizou a norma NBR 12.713 de 2009 (ABNT, 2009b), enquanto que a Merck utilizou o método OECD TG 203 de 1982.

Já para o organismo *E. gracilis* não existe até o momento portaria, nem da FATMA, bem como do CONAMA, por ser ainda um método não homologado nacionalmente, embora seja reconhecido internacionalmente. Os resultados dos testes de toxicidade aguda para este organismo estão descritos na Tabela 1. Observou-se que em concentrações abaixo de $\geq 1,3$ g/L de sorbato de potássio as algas apresentaram uma gravitaxia positiva em

relação as células controle, sendo que o parâmetro da velocidade foi o mais estimulado (54%), seguido da mobilidade das algas (34,54%), orientação gravitacional (28,72%), tendo sua menor sensibilização no alinhamento (17,44%). A partir da concentração $\leq 1,3$ g/L de sorbato de potássio foi observado uma inversão de efeitos fisiológicos, na qual ficou caracterizada uma inibição conforme descrito na mesma tabela, sendo que nas concentrações mais elevadas observou-se uma gravitaxia negativa.

Tabela 1: Valores médios em % da inibição (+) ou ativação (-) de diferentes parâmetros fisiológicos obtidos em triplicata de testes agudos com a alga *Euglena gracilis*.

Sorbato de potássio (g/L)	Inibição média (%)				
	Mobilidade	Preciso gravitacional de orientação	Alinhamento	Velocidade μm (micrômetro)	Movimento ascendente $\mu\text{m/s}$ (micrômetro/s)
0,0195	-34,54	-28,72	-17,44	-54,01	0,00
dp*	4,34	1,76	5,36	6,76	0,00
0,0390	-22,27	-22,24	-14,39	-47,36	0,00
dp	1,15	1,52	1,79	1,20	0,00
0,0780	-21,33	-12,44	-13,38	-22,00	1,79
dp	3,16	6,75	1,74	2,68	1,95
0,1525	-7,67	0,34	-12,46	-17,79	1,28
dp	6,36	8,69	2,57	5,26	7,70
0,3125	-1,95	1,12	-9,10	-10,08	3,00
dp	4,26	1,40	2,39	6,04	3,98
0,6250	-1,61	5,82	-6,10	1,48	9,78
dp	0,95	3,20	2,00	2,66	2,18
1,2500	0,60	6,09	-3,64	11,12	11,34
dp	2,71	1,74	7,47	1,78	1,64
2,5000	1,63	8,11	2,23	11,80	-31,11
dp	2,08	1,14	1,54	2,59	6,59
5,0000	15,82	11,59	5,30	30,43	-32,45
dp	2,97	3,35	1,53	3,72	1,44
10,0000	25,17	26,66	10,98	47,93	-23,82
dp	7,85	3,90	1,63	4,38	2,80

* dp: refere-se ao desvio padrão calculado em cada parâmetro e em casa concentração em g/L de sorbato de potássio.

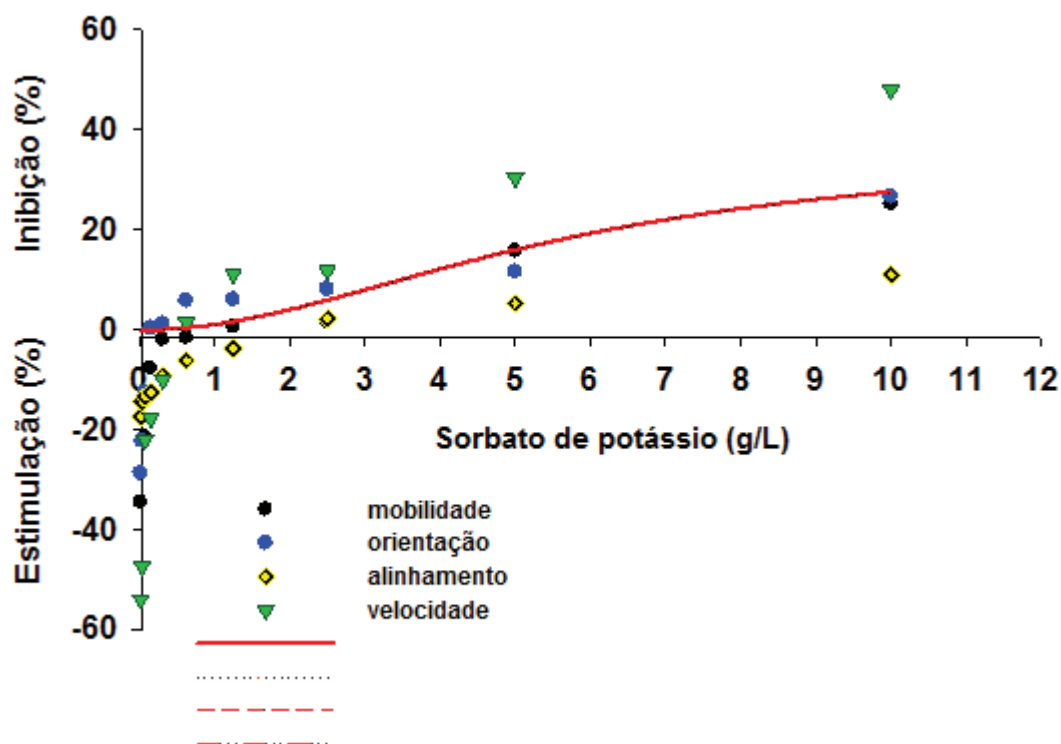


Figura 19: Inibição média (%) da triplicata da velocidade; orientação gravitacional; mobilidade e alinhamento em presença de diferentes concentrações de sorbato de potássio em teste de toxicidade aguda obtido com *Euglena gracilis*. As linhas em vermelho são a determinação da CE₅₀ para as quatro variáveis fisiológicas.

Tabela 2: Resultados médios das inibições percentuais e CE₅₀ da concentração de sorbato de potássio em teste agudo realizados em triplicata com a alga *Euglena gracilis*.

Inibição (%)	CE ₅₀ (g/L)	<i>P</i>
Motilidade	4,45 ± 0,06	<0.0001
Velocidade	8,58 ± 3,95	<0.0001
Preciso gravitacional de orientação	1,89 ± 7,30	<0.0001
Alinhamento	7,53 ± 4,68	<0.0001
Média	5,63 ± 4,68	

Os valores indicados são médias ± dp (desvio padrão) de três repetições. *P* é o one-way ANOVA com nível de significância $p < 0,05$ a 95% de confiança.

Um fato marcante nos experimentos realizados foi o efeito fisiológico contrário do movimento ascendente em relação aos demais parâmetros fisiológicos, que se apresentaram sensíveis ao sorbato de potássio. Na Figura 20 está representada a cinética do movimento ascendente da *E. gracilis*, frente a diversas concentrações de sorbato de potássio.

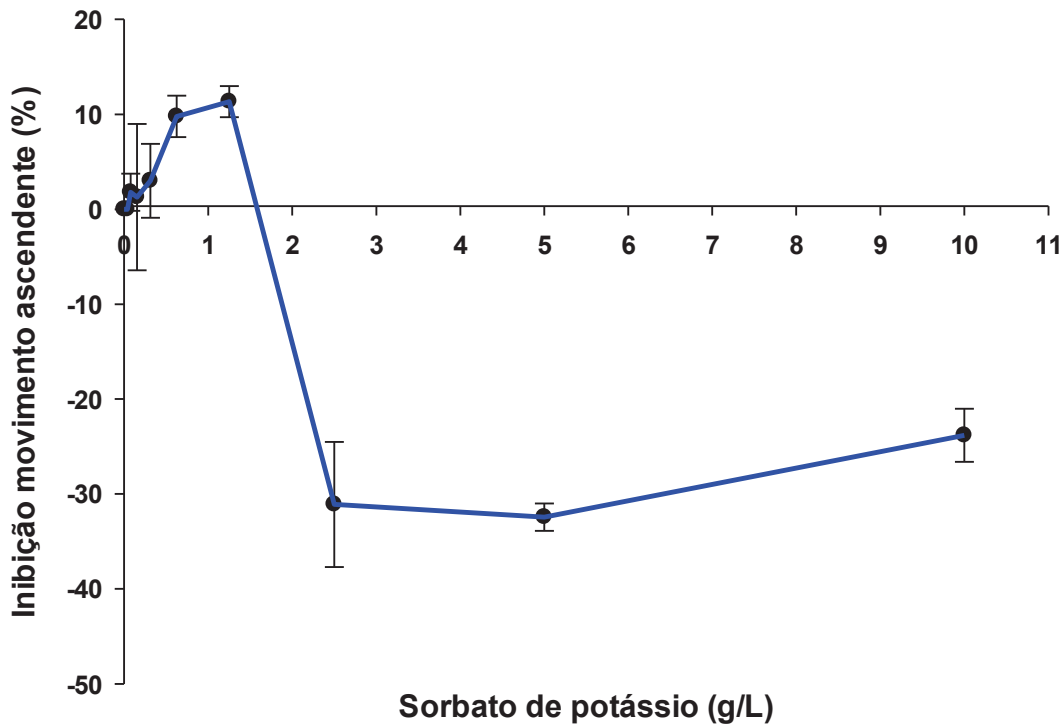


Figura 20: Inibição do movimento ascendente da alga *Euglena gracilis* durante teste de toxicidade aguda em diferentes concentrações de sorbato de potássio em g/L.

Segundo Richter *et al.* (2003c) o mecanismo de gravitaxia ainda não é completamente compreendido. Anteriormente, foi proposto que a gravitaxia é um fenômeno que é o único e baseado em um mecanismo físico passivo, como por exemplo, a flutuabilidade com base em uma assimetria frente-ré (BRINKMANN, 1968; ROBERTS, 1970). Culturas jovens mostram normalmente gravitaxia positiva (natação para baixo) e culturas mais velhas, demonstram uma gravitaxia negativa. Culturas sincronizadas mostram gravitaxias negativas pronunciadas durante o período de luz, e uma muito reduzida ou mesmo nenhuma gravitaxia no período de escuro. A gravitaxia

negativa, muitas vezes, se converte em gravitaxia positiva quando os organismos são expostos a estressores ambientais, como a radiação de luz alta ou aumento da salinidade (RICHTER *et al.*, 2002a, 2003a,c). Este fenômeno é provavelmente desencadeado por espécies reativas de oxigênio. A investigação ao longo dos últimos anos mostrou que a gravitaxia é mais provável, baseado em mecanismos fisiológicos complexos nos quais o cálcio, cAMP (TAHEDL *et al.*, 1998; STREB *et al.*, 2002; RICHTER *et al.*, 2001b, 2003b) e, possivelmente, o potencial de membrana estão envolvidos (RICHTER *et al.*, 2001a). Embora seja improvável que o empuxo passivo é exclusivamente responsável pelo alinhamento gravitático das células, que possivelmente contribui para a orientação gravitática.

Os dados mostraram que, a forma da célula parece desempenhar um papel importante no alinhamento gravitático (RICHTER *et al.*, 2002b). Por outro lado, também foi mostrado que as células que não mostram gravitaxia, alinham suas células ao longo do eixo paralelo ao vetor de aceleração dentro de um tempo relativamente curto. Estas observações indicaram que a forma da célula e a gravitaxia não estão necessariamente ligadas umas com as outras (RICHTER *et al.*, 2002b).

O sorbato de potássio vem sendo utilizado na indústria de cosméticos e alimentos e atua como antioxidante (AMAZON GROUP, 2010; MENEZES *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2013). Esta ação antioxidante pode justificar as variações positiva e negativa da gravitaxia, dependendo das concentrações utilizadas, conforme anteriormente descrita por vários autores (TAHEDL *et al.*, 1998; RICHTER *et al.*, 2001b, 2003b; STREB *et al.*, 2002). Na Figura 21 pode se observar que a alga *E. gracilis* utiliza o movimento ascendente para compensar a gravitaxia negativa, como foi demonstrado anteriormente.

Nelson e colaboradores, 2011 descrevem que quando uma planta é colocada em completa obscuridade ela não realiza fotossíntese. Aumentando-se a intensidade luminosa, a taxa da fotossíntese também aumenta. Todavia, a partir de um certo ponto, novos aumentos na intensidade de iluminação não são acompanhados por elevação na taxa da fotossíntese. A intensidade luminosa deixa de ser um fator limitante da fotossíntese quando todos os sistemas de pigmentos já estiverem sendo excitados e a planta não tem como captar essa quantidade adicional de luz.

Aumentando-se ainda mais a intensidade de exposição à luz, chega-se a um ponto a partir do qual a atividade fotossintética passa a ser inibida. Trata-se do ponto de inibição da fotossíntese pelo excesso de luz.

Em concentrações abaixo de $\approx 1,3$ g/L em função do aumento dos parâmetros de mobilidade, velocidade, orientação gravitacional e de seu alinhamento, as algas provavelmente utilizaram a inibição do movimento ascendente como forma de compensação. Já em altas concentrações, como o mesmo propósito, houve uma inversão deste fenômeno com o mesmo princípio.

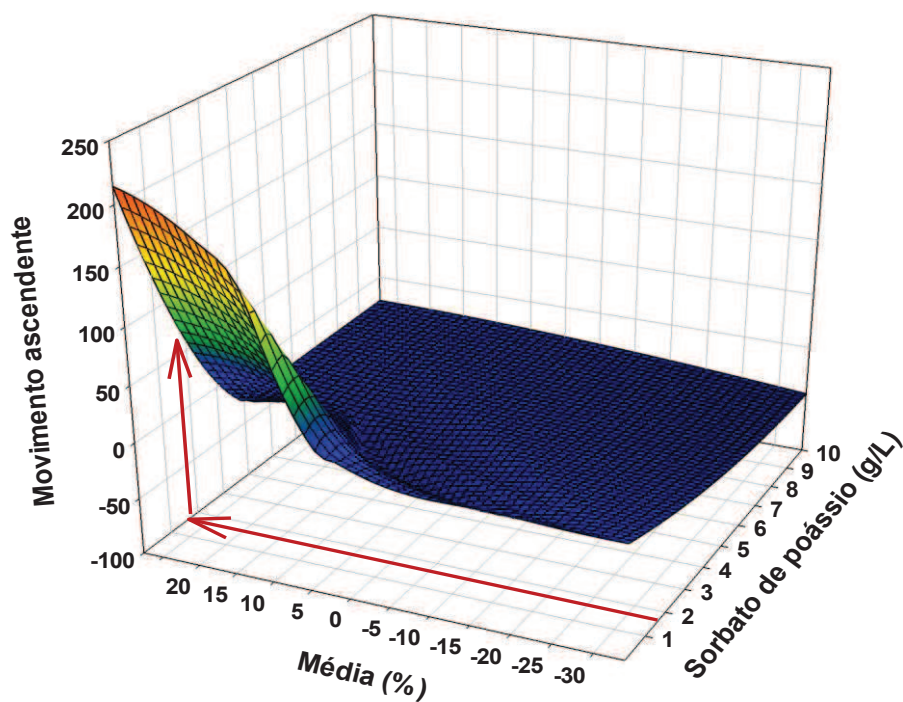


Figura 21: Relação entre a variação do movimento ascendente de *Euglena gracilis* em relação oposta das médias (%) (mobilidade, orientação gravitacional, alinhamento e velocidade) em função das diferentes concentrações de sorbato de potássio em teste de toxicidade aguda.

A média das eficiências durante todo o tratamento foi calculada a partir dos dados obtidos em cada série de emissão de luz actínica sob exposição imediata de diferentes concentrações de sorbato de potássio. Durante todo o período de tratamento, observou-se que houve alteração significativa entre as eficiências nas culturas de baixa concentração (0,039

g/L) em relação com a mais alta concentração (10,0 g/l) de sorbato de potássio (Tabela 3).

Comparando-se a eficiência fotossintética da cultura controle de *E. gracilis* através da determinação de seu rendimento quântico pelo PAM, ficou observado que em baixas concentrações este rendimento é estimulado e que em concentrações maiores que 5,0 g/L este rendimento se encontra diminuído.

Na Figura 22 pode-se observar uma diferença de 44% entre as concentrações de sorbato de potássio de 0,039 em relação à de 10,0 g/L. Este fato vem comprovar que quando esta comparação foi feita com o controle notou-se esta condição.

Quando a taxa fotossintética se estabiliza e a planta continua exposta a luz, ocorre a fotoinibição ou fotodano (dano causado pelo excesso de luz). Chega um momento do dia que a difusão de CO₂ na folha não aumenta mais, ou seja, a taxa fotossintética se estabiliza. Isto leva à conclusão de que a fotossíntese passa a ser limitada pela disponibilidade de gás carbônico. Entretanto, a fase clara da fotossíntese continua a ser realizada pela planta, os fótons continuam incidindo sobre as moléculas de clorofila, que ficam em estado excitado e acabam produzindo substâncias danosas como: superóxido e peróxido de hidrogênio. Se nem a fase escura e outras vias metabólicas conseguirem dar vazão ao NADPH (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) e ATP produzidos na fase clara gerando um acúmulo destas moléculas, ocorre uma desnaturação (perda de conformação espacial) das proteínas do complexo antena que fica desativado. Esses danos precisam ser reparados diariamente, para que no dia seguinte a planta possa vir realizar a fotossíntese com a mesma eficiência (MARENCO *et al.*, 2007).

Enquanto proteínas do núcleo e pigmentos dentro dos centros de reação do fotossistema I e II (PSI e a seguir PSII) são altamente conservadas em todos os eucariontes fotossintéticos conhecidos, existem muitas diferenças em nível de estrutura e função, que podem e afetam os parâmetros de fluorescência comumente usados.

É prudente observar que a maioria dos trabalhos de base teórica que forma a base do uso do equipamento PAM são com plantas superiores, que

podem representar uma partida significativa de variabilidades fisiológicas, também é susceptível de encontrar no trabalho com grupos de algas (incluindo os dinoflagelados) que se estendem a partir da linhagem de algas vermelhas (KROMKAMP e FORSTER, 2003).

O rendimento quântico fotossintético (Fo/Fm), que representa a energia dos fótons que chegam no fotossistema II (PSII), é o parâmetro mais comumente utilizado para uma rápida avaliação do estado de PSII em algas e plantas superiores. É de fácil medição e têm uma longa história de uso na biologia vegetal e nos fitoplânctons para a detecção de foto inibição. A alga *E. gracilis* sofre diferentes estresses a um grande número de produtos químicos e têm demonstrado uma perda significativa em Fo/Fm em comparação com a *E. gracilis* mantida em condições ideais de cultivo (HODA e HÄDER, 2010, AZIZULLAH *et al.*, 2011).

Tabela 3: Rendimento quântico fotossintético da alga *Euglena gracilis* cultivada na presença de diferentes concentrações de sorbato de potássio em g/L.

Sorbato de potássio (g/L)	Rendimento quântico fotossintético (Fo/Fm)	Desvio padrão	Valor (%)	P
Controle	0,275	0,00	100	
0,039	0,328	0,14	119	<0,05
0,078	0,288	0,11	105	<0,05
0,156	0,258	0,10	94	<0,05
0,313	0,253	0,09	92	<0,05
0,625	0,242	0,09	88	<0,05
1,250	0,261	0,09	95	<0,05
2,500	0,267	0,09	97	<0,05
5,000	0,278	0,09	101	<0,05
10,000	0,205	0,09	75	<0,05

p^* = ANOVA one-way, nível de significância $p < 0,05$ - 95% confiança.

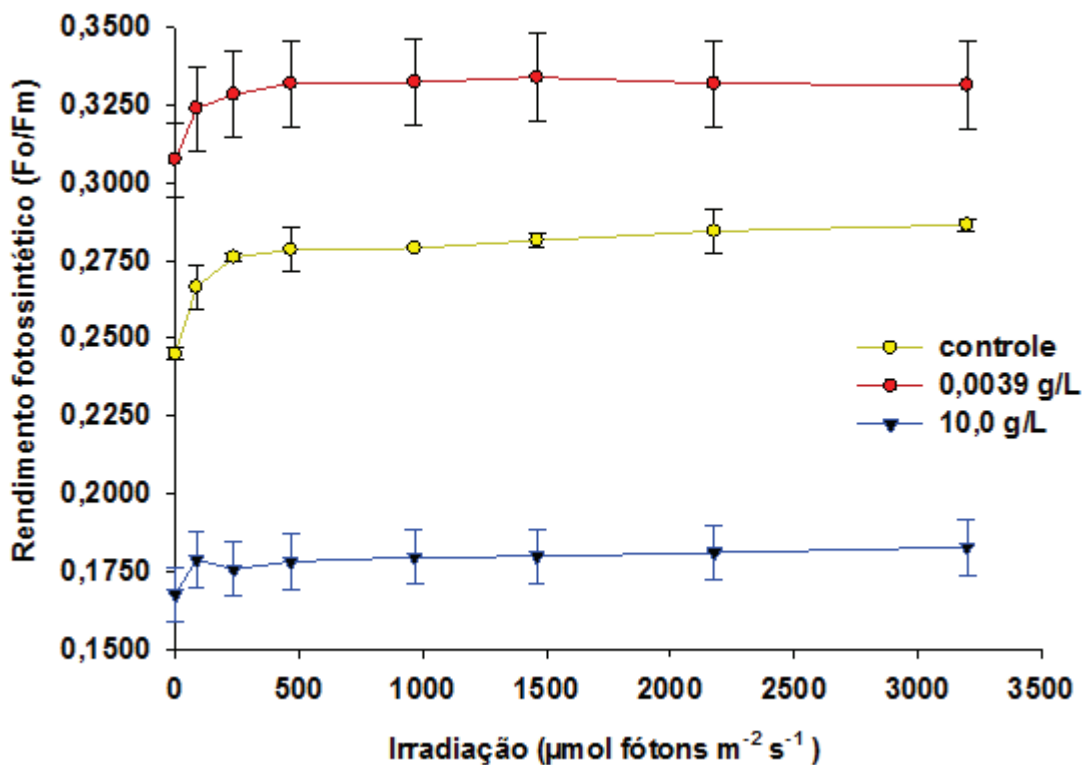


Figura 22: Rendimento quântico fotossintético com o aumento da intensidade da luz actínica após exposição imediata de *Euglena gracilis* em diferentes concentrações de sorbato de potássio em g/L.

O valor de rETR (taxa de transporte de elétrons) dá uma estimativa da atividade e adaptação do sistema fotossintético a uma série de diferentes intensidades de iluminação (RALPH e GADEMANN, 2005). A estimativa de transporte de elétrons no PSII é um indicador útil de qualquer dano ao aparato fotossintético, uma vez que, qualquer inibição em PSII vai resultar no bloqueio do transporte de elétrons no PSII (HODA e HÄDER, 2010).

Após a inibição do transporte de elétrons, PSII será foto-inibido devido à pressão de excitação. Isto resulta da utilização ineficaz e dissipação de energia de luz, causando o estresse oxidativo (HUANG *et al.*, 1997). Além disso, as curvas de luz proporcionam informações vitais sobre plantas à adaptação fisiológica a estímulos externos (RASCHER *et al.*, 2000, HODA e HÄDER, 2010). Os dados de rendimento fotossintético e rERT revelaram que, em baixas concentrações de sorbato de potássio há a indução destes parâmetros, sendo que em altas concentrações há uma redução significativa de ambos os parâmetros. Como este conservante atua como antioxidante

propõe-se interferência direta de metais pesados com a foto reação em PSII. Isto também pode ser o resultado de bloquear o receptor de elétrons em PSII pelo sorbato de potássio tal como com os metais pesados.

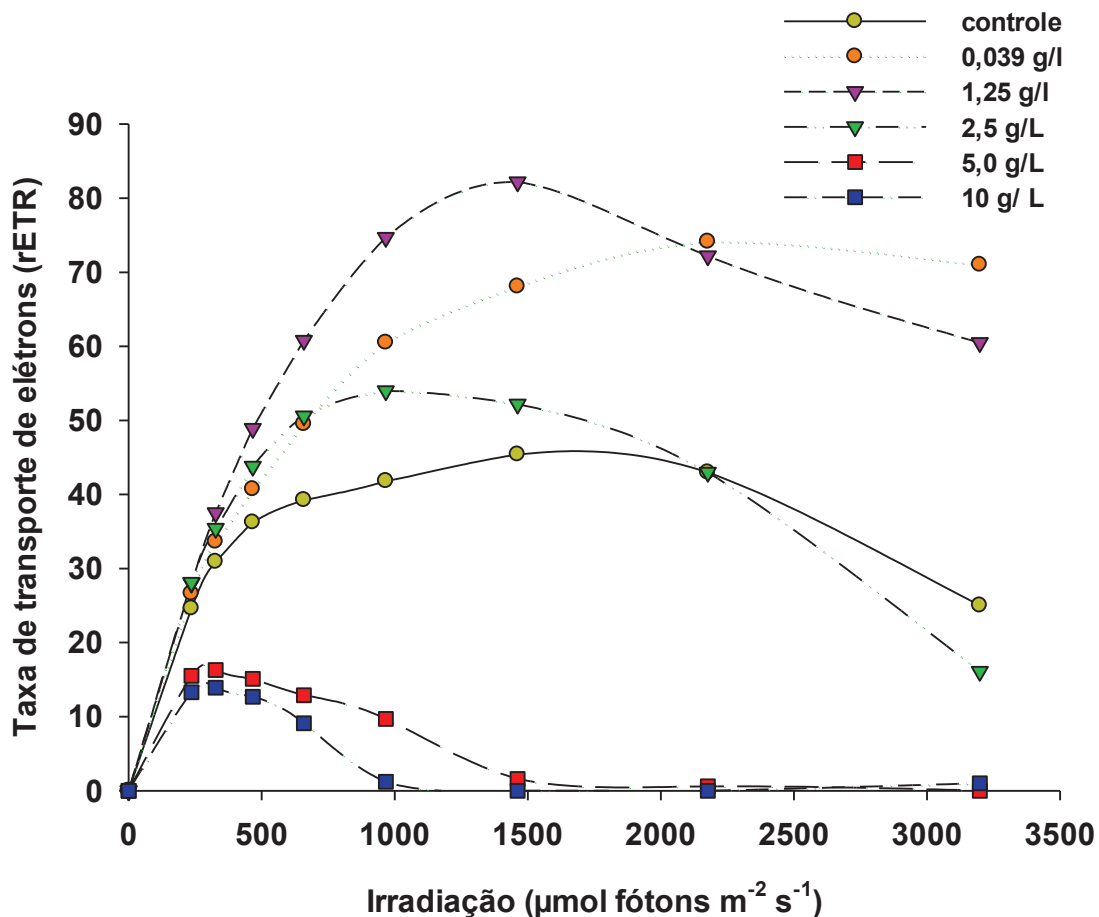


Figura 23: Efeito do sorbato de potássio sobre a taxa de transporte de elétrons (rETR) no fotossistema II com o aumento da intensidade da luz actínica, após exposição imediata de *Euglena gracilis* com aumento da intensidade da luz.

Os resultados obtidos para águas residuais, os parâmetros de fluorescência mostram que estes tiveram efeitos estimulantes sobre a fotossíntese em *E. gracilis*. Danilov e Ekelund (2001) também observaram que as amostras de esgoto tiveram um efeito positivo sobre a eficiência fotossintética da *Euglena*. Azizullah *et al.* (2011), também observaram este fenômeno em estudo sobre a sensibilidade de vários parâmetros em *Euglena gracilis* à exposição de curto prazo para efluentes industriais. Da mesma forma, Ekelund e Aronsson (2007) observaram que a solução de cinzas de madeira resultou num aumento rETR em *E. gracilis*. Os resultados a partir

das águas residuais e cinzas de madeira são comparáveis, no sentido de que ambos têm uma mistura de nutrientes disponíveis e várias substâncias biologicamente ativas. Estes efeitos estimulantes de águas residuais na fotossíntese podem ser devido a diferentes fatores. A primeira explicação pode ser de que os nutrientes presentes nas águas residuais estavam disponíveis para satisfazerem o requisito nutricional de *Euglena*, em comparação com o controle (diluída com água deionizada) o que resultou em maior fotossíntese. Em segundo lugar, o efeito positivo foi devido a um possível efeito estimulante de baixas doses de toxinas, como observado no crescimento e algumas outras atividades fisiológicas em algumas algas unicelulares (JENNINGS 1979; VOCKE *et al.*, 1980; STEBBING 1982; DANILOV e EKELUND 2001a).

A função de proteção de águas residuais contra a radiação forte também pode ser uma possível razão para a maior eficiência fotossintética em altas intensidades de luz (AZIZULLAH *et al.*, 2011).

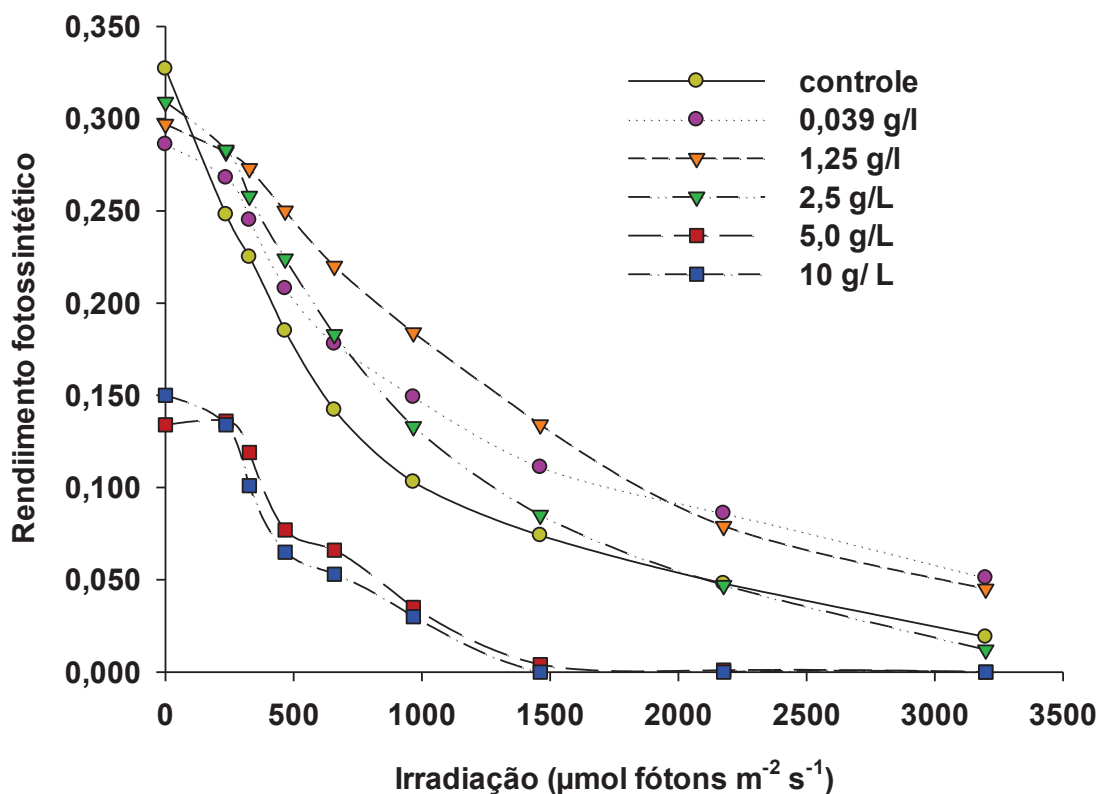


Figura 24: Rendimento fotossint\u00e9tico efetivo de PS II em *Euglena gracilllis* tratada com aumento da intensidade da luz.

Já para os experimentos de toxicidade crônica do sorbato de potássio com a alga *E. gracilis* na sua maioria não foram conclusivos. O único parâmetro que apresentou resultados satisfatórios foi a mobilidade ascendente. Este fenômeno pode ser explicado pela alta letalidade encontrada, o que inviabilizou a utilização do equipamento NG-Tox.

A avaliação da mobilidade ascendente demonstrou com exatidão de 97,78% ($r= 0,0978$, $p= 0,0001$) que concentrações acima de 0,280 g/L causaram uma letalidade de 50% das células. Nos experimentos de toxicidade aguda pode se observar que em concentrações acima de 5 g/L de sorbato de potássio a curva de estimulação possui uma tendência a diminuir (Figura 26). Este fato vem de encontro com os resultados do teste de toxicidade crônica. A inibição do movimento ascendente impede as células das algas de irem à superfície, impedindo desta maneira de realizarem fotossíntese, o que provavelmente foi a responsável pela letalidade observada neste teste.

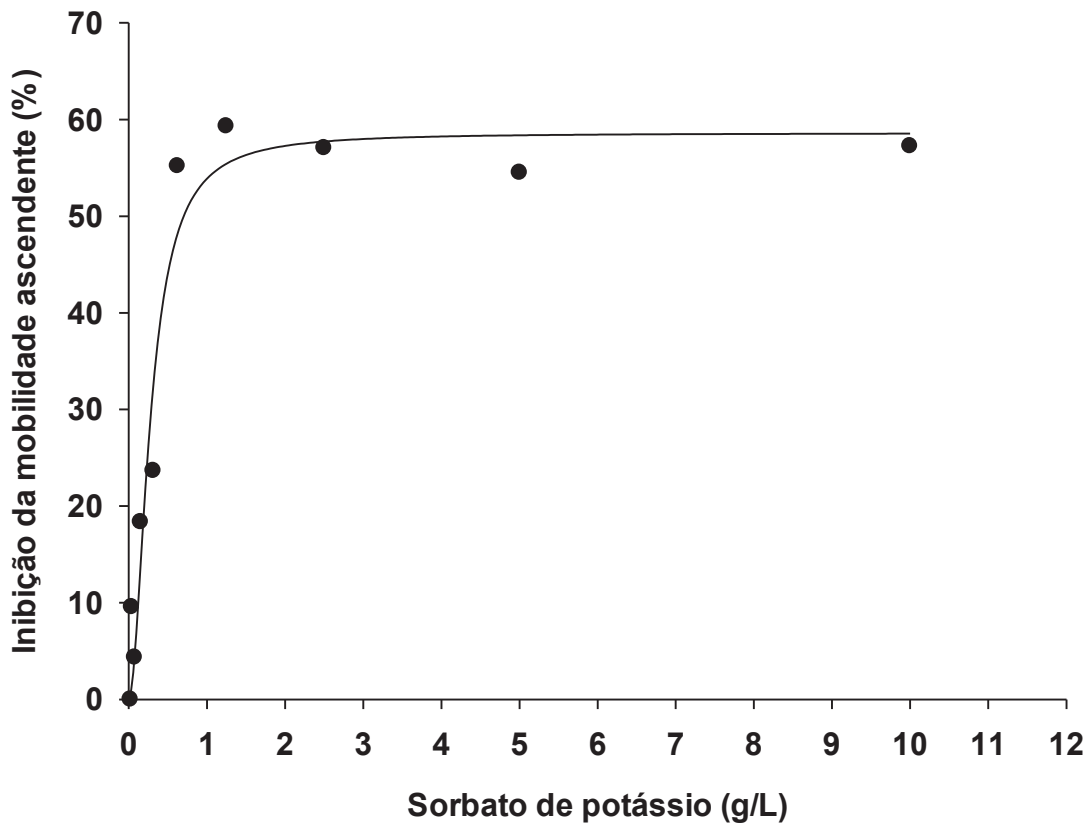


Figura 25: Inibição (%) do movimento ascendente da alga *Euglena gracilis* durante teste em presença de diferentes concentrações de sorbato de potássio em teste de toxicidade crônica com sorbato de potássio.

Para os experimentos com *D. magna* utilizou-se como base os resultados obtidos na revisão de Terra e Feiden (2003) e Terra *et al.* (2003), que para assegurar a validade do teste é necessário que o controle do mesmo apresente pelo menos 80% de sobrevivência de dáfnias adultas, ou seja, 80% dos organismos com longevidade de 21 dias. Para este critério o teste demonstrou-se válido uma vez que, no controle houve a morte de apenas um organismo tendo, portanto, uma sobrevivência de 90% (Figura 27).

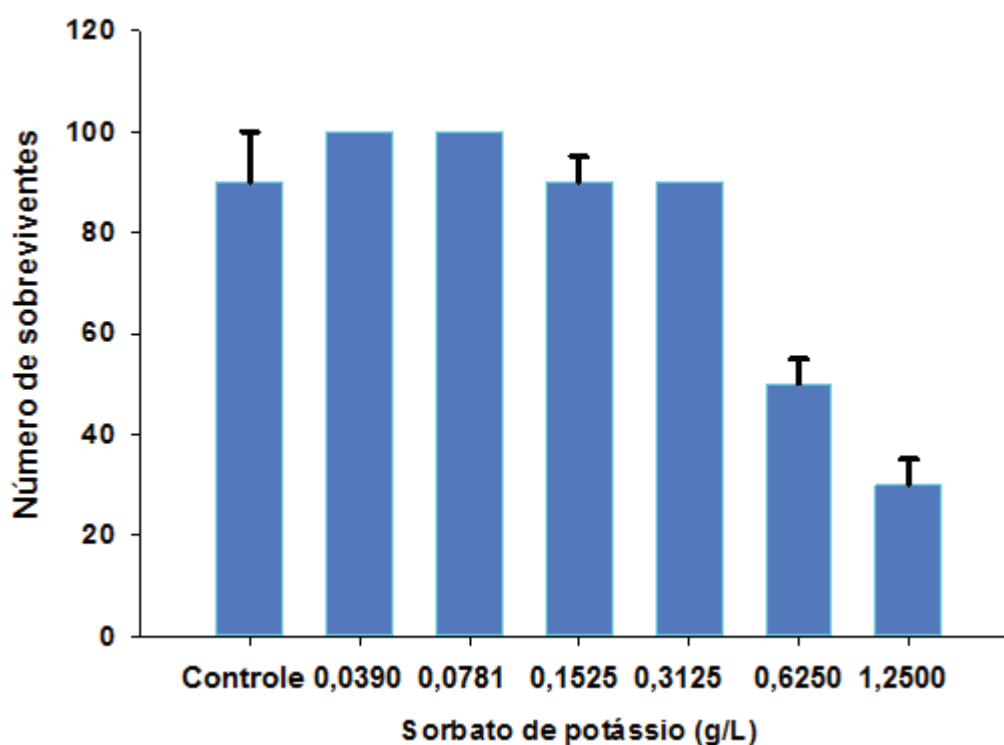


Figura 26: Número de sobreviventes de *Daphnia magna* no teste de toxicidade crônica ao sorbato de potássio após 21 dias.

Para os testes de toxicidade crônica utilizou-se seis concentrações previamente descritas na metodologia. A longevidade dos organismos-teste (*D. magna*) expostos a diferentes concentrações foi de 21 dias, e variou de acordo com a concentração de sorbato de potássio em que o organismo foi exposto. O parâmetro fecundidade foi avaliado a partir da contagem dos filhotes obtidos nos cultivos individuais, e a concentração que teve a maior média de filhotes por mãe foi a de 0,0390 g/L (Figura 28).

Nos teste de toxicidade crônica a concentração mais alta da amostra que não causou efeito estatisticamente significativo aos organismos quando comparado ao controle, em termos de fecundidade (CENO), nas condições de ensaio foi de 0,45 g/L de sorbato de potássio. E a menor concentração da amostra que causou efeito estatisticamente significativo aos organismos quando comparado ao controle, também em termos de fecundidade nas (CEO), nas condições de ensaio foi de 1,87 g/L (NBR 13.373, 2003).

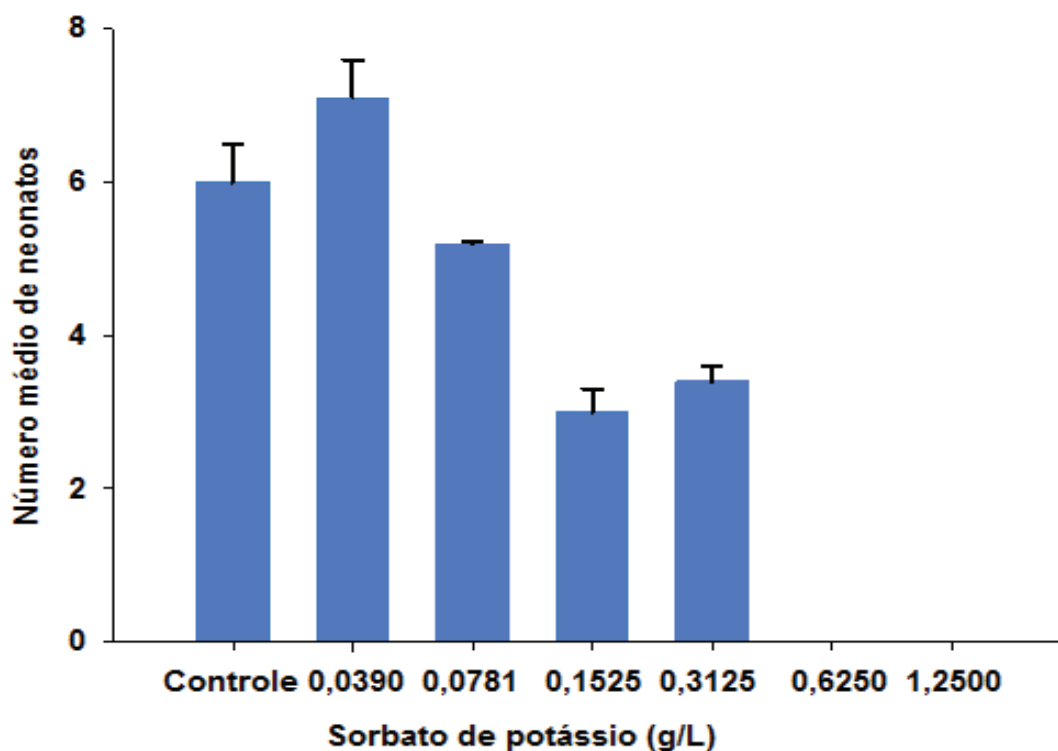


Figura 27: Fecundidade média de *Daphnia magna* no teste de toxicidade crônica ao final de 21 dias ao sorbato de potássio.

Tabela 4: Número médio de filhotes por dia (média) de *Daphnia magna* expostos a diferentes concentrações (%) de sorbato de potássio. (n=10).

Sorbato de potássio (g/L)	Número médios de filhotes por dia	p
Controle	6 ± 4,88	0,677
0,0390	7 ± 3,34	0,4332
0,0781	5,6 ± 6,62	0,1152
0,1525	3,6 ± 1,00	0,4652
0,3125	3,6 ± 0,0	<0,05
0,625	0,0 ± 0,0	<0,05
1,25	0,0 ± 0,0	<0,05

p* = ANOVA one-way, nível de significância p < 0,05 - 95% confiança

O teste de toxicidade crônica realizado nas concentrações de 0,625 e 1,25 g/L revelou um resultado interessante, onde nenhum dos organismos expostos a esta concentração se reproduziu. Rand (1995) descreve que a adolescência de dafnídeos caracteriza-se como o período em que os primeiros ovos são completamente desenvolvidos no ovário. São geralmente depositados na câmara incubatória minutos depois da muda, e os jovens são liberados na próxima muda. Desta forma pode-se aferir que, quando expostas a estas duas concentrações, as dafíneas não reproduzem-se devido a (i) problemas no desenvolvimento do ovário, (ii) são machos, ou (iii) têm problemas na muda das carapaças. Esta última alternativa (iii) pode ser verdadeira uma vez que estes organismos não mudaram de tamanho, e apresentaram uma carapaça bastante danificada, característica não encontrada no controle e nas demais diluições. Cabe ressaltar que a fecundidade observada nas concentrações mais baixas não deve encobrir o real efeito da amostra sobre os organismos-teste.

Embora não tenha variado significativamente em relação ao controle, pode haver uma estratégia de manutenção da população por parte dos organismos testados, uma vez que pode ocorrer uma produção maior de filhotes, que compense a perturbação ambiental sentida pelos progenitores.

Com os resultados obtidos no teste de toxicidade crônica, procedeu-se uma análise estatística para verificar as diferenças significativas ocorridas em relação ao controle, sendo a longevidade e a fecundidade os parâmetros analisados. Inicialmente fez-se uma análise de variância (ANOVA), a fim de verificar a existência de uma diferença significativa entre a comparação de médias oriundas dos diferentes tratamentos realizados, neste caso, as diferentes concentrações de sorbato de potássio em g/L. A ANOVA para os dados de longevidade teve um p com valor de 0,007494, o qual é menor que 0,05 para um teste com 95% de confiabilidade, indicando que há diferenças significativas para este parâmetro em relação ao controle. Em seguida, procedeu-se com o teste de Dunnett, para então verificar qual ou quais médias diferiram estatisticamente do controle. O teste mostrou que para os dados de longevidade a concentração de 1,25 g/L diferiu significativamente em relação ao controle. Este resultado implica em dizer que usar esta concentração (ou acima) afeta significativamente a longevidade de *D.*

magna. Nesta concentração, apenas 3 organismos-teste permaneceram vivos ao final do teste.

Já para os dados de fecundidade, a análise de variância (ANOVA) também mostrou significância entre os tratamentos, com um p no valor de 0,000230, o qual também é menor que 0,05 para um teste com 95% de confiabilidade. Da mesma forma, procedeu-se com o teste de Dunnett para verificar qual ou quais médias diferiram estatisticamente do controle. O teste mostra que para os dados de fecundidade, as concentrações de 1,25 e 0,625 g/L, diferiram significativamente em relação ao controle. O resultado mostra que utilizar estas concentrações (ou acima) afetará significativamente a fecundidade/reprodução de *D. magna*. As demais concentrações não diferiram significativamente em relação ao controle.

Por fim, é possível verificar na Figura 29 a longevidade das dafíneas juntamente com a sua primeira morte, dada em dias. É possível verificar que nas duas concentrações em que houve diferença significativa em relação ao controle (0,625 e 1,25 g/L) a primeira morte do organismo ocorreu respectivamente com oito dias de teste, com cinco fêmeas vivas ao final dos 21 dias, e a segunda morte do organismo ocorreu com três dias de teste, com três fêmeas vivas ao final dos 21 dias.

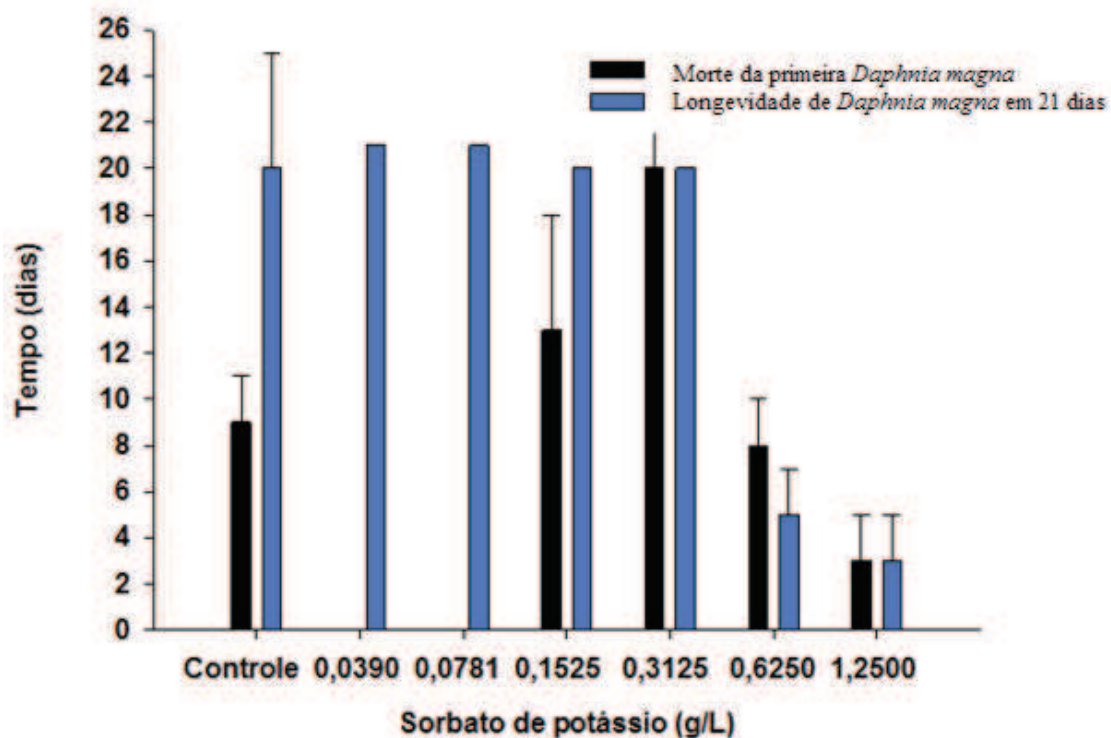


Figura 28: Longevidade média de *Daphnia magna* e sua primeira morte ao final de 21 dias de teste (teste crônico).

5.3. PLANTAS DE ANANAS COMOSUS CULTIVADAS *IN VITRO* COM SORBATO DE POTÁSSIO

5.3.1. Sobrevivência dos explantes cultivados *in vitro* com sorbato de potássio.

Foi possível verificar que no teste em que os explantes foram cultivados nos meios contendo 0,3125 e 0,1525 g/L de sorbato de potássio houve oxidação e posterior morte do tecido ao longo da primeira semana de teste (Figura 30 e 31). De acordo com o Salehi e Khosh-Khui (1977) em um estudo feito com antibióticos é comum que as concentrações sejam elevadas quando adicionados ao meio nutritivo juntamente com o explante para combater os contaminantes, e que a fitotoxicidade dessas substâncias é um fator limitante dessas concentrações. Alguns antibióticos como a tetraciclina tem uso restrito na cultura de tecidos, devido ao alto grau de fitotoxicidade,

causando clorose das folhas em virtude da destruição dos cloroplastos (POLLOCK *et al.*, 1983).

Uma das alternativas para se evitar o efeito tóxico dos antibióticos é reduzir ao máximo o tempo de tratamento (contato) dos explantes com o agente antimicrobiano. No entanto, esta técnica muitas vezes causa efeitos apenas bacteriostáticos, constituindo desse modo uma ação paliativa frente ao principal objetivo que é a eliminação por completo do organismo contaminante.

Segundo Ferreira e Ranal (1999), outros agentes desinfectantes como o hipoclorito de sódio também apresentaram efeitos negativos em plantas cultivadas *in vitro* quando submetidas a altas concentrações. Borges e colaboradores (2005) observaram que o hipoclorito pode provocar alterações em nível cromossômico, o que resulta na redução do índice de divisão celular em sementes de algumas espécies.

No entanto, estes estudos apesar de terem sido feitos com diversas substâncias, a fim de se eliminar as contaminações indesejadas na cultura *in vitro* e tecidos vegetais, ainda não foi encontrado nenhuma informação na literatura relacionando o conservante sorbato de potássio com o cultivo *in vitro* de explantes. Estes estudos mostram que a maioria dos compostos utilizados para eliminar as contaminações indesejadas podem trazer danos aos explantes se não utilizados na concentração ou no tempo ideal, ocasionando dessa forma a morte dos tecidos. Foi possível verificar que nas concentrações mais elevadas do presente teste (0,3125 e 0,1525 g/L) também observou-se a oxidação, motivo este desconhecido, mas que pode estar relacionado com as causas dos estudos citados.



Figura 29: Morte de explantes de *Ananas comosus* na concentração de 0,3125 g/L de sorbato de potássio, após oito dias de cultivo. Fonte: Arquivo pessoal.

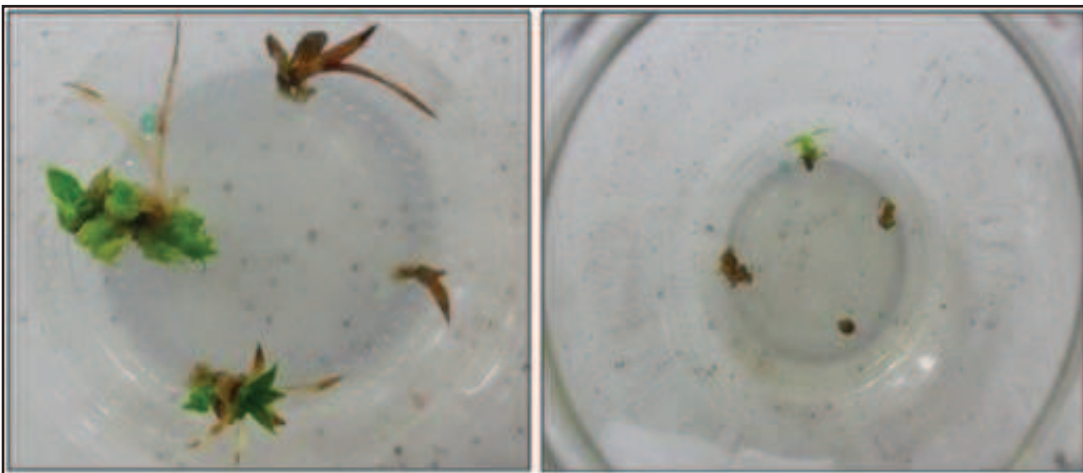


Figura 30: Morte de explantes de *Ananas comosus* na concentração de 0,1525 g/L de sorbato de potássio, após oito dias de cultivo. Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.2. Contaminação das culturas cultivadas *in vitro* de *Ananas comosus* com sorbato de potássio.

Durante o período de teste foi possível verificar que algumas culturas contaminaram. Ao final do período de 60 dias de teste contabilizou-se estes frascos e os dados foram colocados em um gráfico (Figura 32).

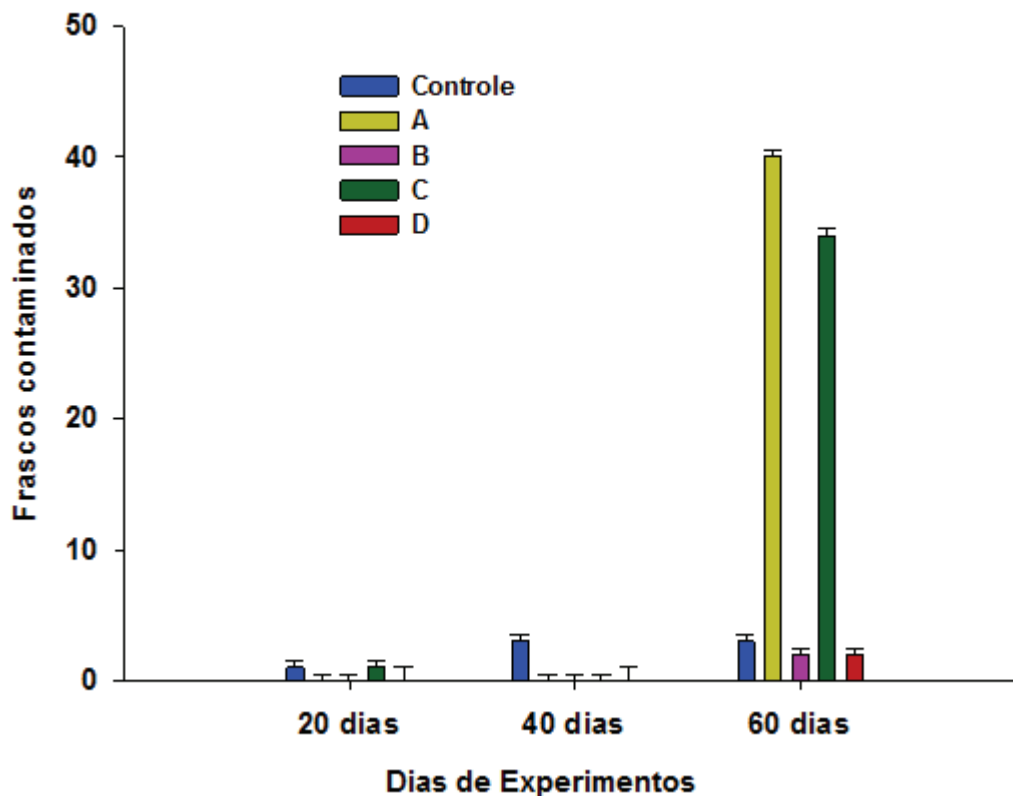


Figura 31: Contaminação fúngica dos frascos de cultura de *Ananas comosus* em meio MS ao final de 60 dias de experimento. Frasco A: meio de cultura adicionado de 0,078 g/L de sorbato de potássio; B: explante que retornou para o meio sem sorbato de potássio da concentração de 0,078 g/L de sorbato de potássio; C: meio de cultura adicionado de 0,039 g/L de sorbato de potássio; D: explante que retornou para o meio sem sorbato de potássio da concentração de 0,039 g/L de sorbato de potássio.

Durante o período de teste, não houve a contaminação dos explantes originada por bactéria ou levedura, apenas de origem fúngica (Figura 33). Devido a não localização de pesquisas nesta área e com o resultado obtido nesta pesquisa, sugere-se que o conservante sorbato de potássio pode ter inibido o crescimento desses microrganismos.

Cabe ressaltar que o sorbato de potássio pode ainda estar apenas inibindo o crescimento deste tipo de contaminante, o qual ainda não encontrou condições adequadas para se desenvolver (BOXUX e TERZI, 1987), porém quando os explantes retornaram para um meio sem a adição de sorbato de potássio, a fim de se verificar uma possível contaminação

ainda em estado de latência, nenhuma contaminação desta origem foi observada.

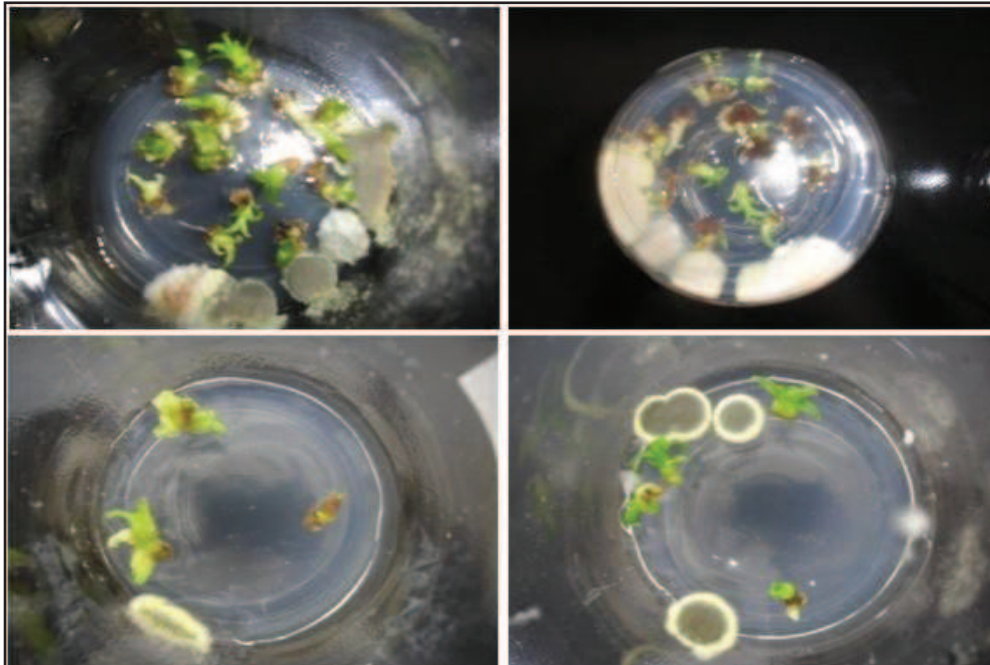


Figura 32: Contaminações fúngicas observadas nos frascos de cultivo *in vitro* contendo *Ananas comosus*, durante o período de teste. Fonte: Arquivo pessoal.

Com os resultados obtidos, realizou-se uma análise estatística para verificar as diferenças significativas ocorridas na contaminação fúngica em relação ao controle.

A ANOVA teve um p com valor de 0,85, o qual é maior que 0,05 para um teste com 95% de confiabilidade. Tal acontecimento sugere que há 85% de chances de que a variação encontrada nas contaminações fúngicas seja meramente decorrida do acaso, e não em função das concentrações de sorbato de potássio testadas. Tal diferença não pode ser atribuída aos tratamentos, mas sim, a algum outro fator desconhecido. Não foi possível realizar um teste de médias (Turkey ou Dunnet), uma vez que, os dados não foram suficientes ou significativos.

Foi possível verificar que as contaminações de origem fúngica ocorreram na borda do frasco, como mostrado na figura anterior, e não sobre o explante vegetal de *A. comosus*. Este tipo de contaminação pode sugerir

algum tipo de contaminação externa proveniente de ácaros ou outros agentes externos.

Normalmente estes organismos causam pequeno dano pra a vida das plantas, entretanto, levam esporos de fungos e bactérias em seus corpos, entrando na cultura de tecidos, sendo fonte de múltiplas contaminações. Os ácaros podem ainda serem transferidos frasco a frasco durante os subcultivos do material de propagação. As infestações por ácaros têm causado perda total de material vegetal em vários laboratórios (LEIFERT *et al.*, 1991).

Os frascos contaminados foram melhor observados em um microscópio, com lente de aumento de 40 vezes, onde foi possível visualizar a presença de ácaros (Figura 34). O conservante sorbato de potássio não se mostrou eficiente em combater este agente externo. Foi possível constatar também que durante os dias de experimento os explantes mantiveram-se saudáveis e com uma taxa de multiplicação aparentemente normal (Figura 35), quando comparado a um frasco sem o conservante sorbato de potássio (controle). Para resultados mais concretos, sugere-se que todo o teste seja refeito, desta vez, em um local livre de contaminantes externos (ácaros).

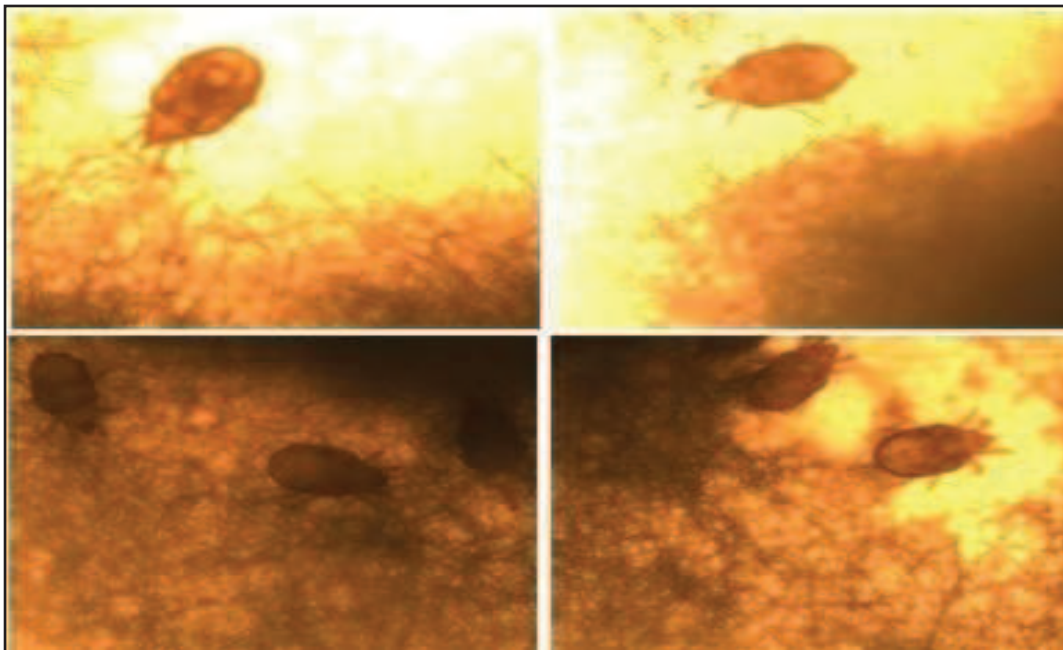


Figura 33: Ácaros presentes no interior dos frascos de cultivo que foram encontrados durante todo período de teste (60 dias). Comprimento médio de 0,5 milímetros. Fonte: Arquivo pessoal.

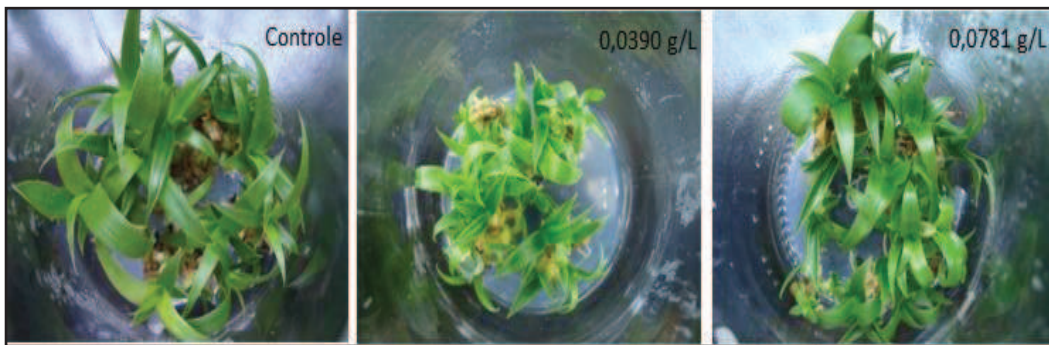


Figura 34: Plantas de *Ananas comosus* na fase de multiplicação em meio de cultura MS em diferentes concentrações de sorbato de potássio em g/L. Fonte: Arquivo pessoal.

Diante da contaminação de origem fúngica observada e pelos resultados estatísticos obtidos, seria de extrema importância que esta última etapa fosse refeita, em local sem a presença de contaminantes de origem externa, como os ácaros. Assim seria possível aferir com maior precisão o poder de inibição do conservante sorbato de potássio sobre o crescimento de fungos na cultura de tecidos de plantas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O teste de toxicidade aguda realizado com *D. magna* demonstrou uma CE_{50} de 1,6 g/L, apresentando acima deste valor uma toxicidade aguda nas condições de teste, tendo nas concentrações mais elevadas uma letalidade de 100% dos organismos.
- O teste de toxicidade aguda realizado com *E. gracilis* apresentou uma CE_{50} de 5,63 g/L para os parâmetros fisiológicos observados, Dendo a velocidade, mobilidade, orientação gravitacional e alinhamento os parâmetros mais estimulados.
- Para *E. gracilis* o teste de toxicidade aguda revelou que concentrações abaixo ou iguais a 1,3 g/L provocaram uma gravitaxia positiva das algas, sendo que em concentrações acima deste valor o fenômeno foi inverso.
- Houve uma diferença de 44% no rendimento quântico das algas entre a menor concentração (0,039 g/L) e a maior concentração (10,0 g/L) de sorbato de potássio.
- Concentrações de sorbato de potássio acima ou iguais a 5 g/L provocaram uma inibição da taxa de transporte de elétrons (rETR) em irradiações de luz maiores ou iguais a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- O teste de toxicidade crônica com *D. magna* mostrou diferença estatística nos dois parâmetros analisados (longevidade e fecundidade), sendo que para longevidade a diferença encontrada foi na concentração de 1,25 g/L; para fecundidade as diferenças ocorreram em 0,625 e 1,25 g/L, sendo que nessas duas concentrações não houve postura de ovos.
- Para o teste de toxicidade crônica com *E. gracilis* o único parâmetro conclusivo obtido foi a mobilidade ascendente, a qual mostrou com exatidão

de 97,78% que concentrações acima de 0,280 g/L causaram letalidade de 50% das células.

- As plantas cultivadas *in vitro* com sorbato de potássio não apresentaram contaminação de origem bacteriana.
- Há indícios de que o sorbato de potássio inibiu o crescimento de bactérias nos explantes de *Ananas comosus*.
- As contaminações de origem fúngica encontradas nos frascos podem estar relacionadas com a presença de ácaros no interior dos frascos e não com a ineficiência do sorbato de potássio.
- Os resultados são satisfatórios nas condições em que foram conduzidos, não sendo possível a generalização para outras espécies de plantas e condições.
- O trabalho sugere que a última etapa seja refeita, em um local sem a presença de quaisquer agentes externos.

7. REFERÊNCIAS

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.648: água – ensaio de toxicidade com *Chorella vulgaris* (Chlorophyceae)**. Rio de Janeiro, 1992. 8p.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713: água ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia Similis Claus*, 1876 (Cladocera, Crustácea)**. Rio de Janeiro, 1993. 16p.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713: toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro, 2004. 21p.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088: toxicidade aguda – métodos de ensaio com peixes**. Rio de Janeiro, 2004. 19p.
- ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. **Handbook of ecotoxicology**. 2 ed. Lewis Publishers: Boca Raton, 2003, cap. 2.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. Wiley, New York, USA, 1996.
- AMABILE-CUEVAS, C. F. New antibiotics and new resistance. **American Scientist**, v. 91, p. 138-49, 2003.
- AMAZON GROUP. Sorbato de potássio. Disponível em: <http://www.amazongroup.com.br/downloads/produtos/estabilizantes/sorbato_de_potassio.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2014.
- AMONEX DO BRASIL. **Peróxido de hidrogênio**. Disponível em: <<http://www.amonex.com.br/peroxidodehidrogenio>>. Acesso em 30 abr. 2013.
- ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. p. 117-152.
- ARONSSON, K. A.; ECKELUND, N. G. A. Effects on motile factors and cell growth of *Euglena gracillis* after exposure to wood ash solution: assessment of toxicity, nutrient, availability and pH-dependency. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 162, p. 353-368, 2005.
- AZIZULLAH, A.; RICHTER, P. R.; HÄDER, D-P. **Responses of morphological, physiological, and biochemical parameters in *Euglena gracilis* to 7-days exposure to two commonly used fertilizers DAP and urea**. v. 24, n. 1, p. 21-33, 2011.

AZIZULLAH, A.; RICHTER, P. R.; HÄDER, D-P. Sensitivity of various parameters in *Euglena gracilis* to short-term exposure to industrial wastewaters. **J Appl Phycol**. v. 24, Issue 2, p. 187-200. DOI 10.1007/s10811-011-9667-2, 2012.

BACKER, A. W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* sp; mediated plant growth-stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 451-457, 1987.

BBE. **Biological biophysical engineering**. Disponível em: <<http://www.bbe-moldaenke.de/home.html>>. Acesso em: 18 de jul. 2013.

BECKER, H. Utersuchunger über den Einsatz des fungizides benomil in der Rebensveredlung. **Wein-Wissenschaft**. Mainz, v. 26, p. 50-56, 1971.

BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. **Revista Ciência e Cultura**, v. 43. p. 271-277, 1990.

BLAKE, J. Mites and thrips as bacterial and fungal vector between plant tissue culture. **Acta Horticulture**, Leuven, v. 225, p. 163-166, 1988.

BOHRER, M. B. **Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário do sistema de tratamento dos efluentes líquidos industriais (SITEL) do pólo petroquímico do sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplânctônica**. 1995, 469p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 1995.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual* (D. Hall, J. M. O. Scurlock, H. R. Bolhàr-Nordenkampf, C. R. C. Leegood, S. P. Long, eds.). **Chapman & Hall**, London. p. 193-206, 1993.

BOOTH, I. R.; KROLL, R. G. The preservation of foods by low pH. In: GOLD, G. W. (Ed) **Mechanisms of action of food preservation procedures**. London: Elsevier, 1989. p. 119-160.

BORGES, C. S.; CATTELAN, L. V.; VARGAS, D. P.; BOBROWSKI, V. L. Avaliação citotóxica de formol e hipoclorito de sódio utilizados na desinfestação de sementes em cultura de tecidos de plantas. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2005, Pelotas. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/CIC/2005/arquivos/conteudo_CB.html>. Acesso em: 07 jan. 2014.

BOXUX, P.; TERZI, J. M. Big losses due to bacterial contaminations can be avoided in mass propagation scheme. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 212, p. 91-93, 1987.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 4, de 15 de fevereiro de 2011**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b4e2550047458b95956fd53fbc4c6735/C+N%C2%BA+4+GPESP.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 22 maio. 2013.

BRASIL. Portaria nº 017/02, de 18 de abril de 2002. Estabelece os limites máximos de toxicidade aguda para efluentes de diferentes origens e dá outras providências. **Fundação do Meio Ambiente (FATMA)**. São Paulo-SP.

BRASIL. Resolução RDC n.389, de 05 de agosto de 1999. 16: bebidas - subcategoria 16.2.2 - bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 06 de ago. 1999. Seção 1, p. 45-53.

BRINKMANN, K. Keine geotaxis bei *Euglena*. **Pflanzenphysiologie**. v. 59, p. 12-16, 1968.

BRQUIM. Ficha de informação de segurança de produto químico – FISPQ: sorbato de potássio. Disponível em: <<http://www.brquim.com.br/fispq/14289.pdf>>. Acesso em: 29 jan. 2014.

CALDAS, L. S.; HARIDASSAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, p. 87-132, 1998.

CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. São Paulo, v. 24, n. 70, p. 149-164, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010340142010000300010&lang=pt>. Acesso em: 30 abr. 2013.

CASSELLS, A. C. Aseptic microhydroponics: a strategy to advance microplant development. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 530, p. 187-194, 2000b.

CASSELLS, A. C. Contamination detection and elimination. In: SPIER, R. E. (Ed.). **Encyclopedia of plant cell biology**. Chichester: Wiley, p. 577-586, 2000a.

CASSELLS, A. C. **Pathogen and microbial contamination management in micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p. 370.

CASSELLS, A. C. Problems in tissue culture: culture contamination. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 31-44.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma técnica L5. 025**. – água: teste para avaliação de toxicidade aguda de cianofíceas (algas azuis) - método de ensaio. 1993. 12p.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma Técnica L5. 019.**– teste de toxicidade aguda com peixes - Parte I - sistema estático. 1994.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma técnica L5. 022.**– avaliação de toxicidade crônica, utilizando *Ceriodaphnia dubia* Richard 1984, (*Cladocera*, *Crustacea*). 1994.

CHAROY, C. P.; JANSSEN, C. R.; PERSOONE, G.; CLÉMENT. The swimming behavior of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) under toxic stress. I. The use of automated trajectometry for determining sublethal effects of chemicals. **Aquatic Toxicology**, v. 32, p. 271-282, 1995.

CHECCUSSI, A.; COLOMBETTI, G.; FERRARA, R.; LENCI, F. Action spectra for photoaccumulation of Green and colorless *Euglena*: evidence for identification of receptor pigments. **Photochem. Photobiol.** v. 23, p. 51-54, 1976.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T. de; CARVALHO, J. F. R. P. de; ASSIS, A. M. de; FONSECA, I. C. de B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Horticulturae**, Maringá, v. 26. n. 2, p. 253-258, 2004.

DANBY, S.; BERBER, F.; HOWITT, D. Fungal contaminants of *Primula*, *Coffea*, *Musa* and *Iris* tissue cultures. In: LUMSDEN, P. J.; NICHOLAS, J. R.; DAVIES, W. J. (Ed). **Physiology, growth and development of plants in culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 397-403, 1994.

DANILOV, R. A.; EKELUND, N. G. A. Responses of photosynthetic efficiency, cell shape and motility in *Euglena gracilis* (Euglenophyceae) to short-term exposure to heavy metals and pentachlorophenol. **Water Air Soil Pollut.** v. 132, p. 61–73, 2001.

DODSON, S. I.; HANAZATO, T.; GORSKI, P. R. Behavioral responses of *Daphnia pulex* exposed to carbaryl and *Chaoborus kairomonae*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 14, p. 43-50, 1995.

EDWIN, D. C. Systemic fungicides: disease control, translocation, and mode of action. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 11, p. 389-422, 1973.

EKELUND, N. G. A.; ARONSSON K. A. Changes in chlorophyll a fluorescence in *Euglena gracilis* and *Chlamydomonas reinhardtii* after exposure to wood-ash. **Environ Exp Bot.** v. 59, p. 92–98, 2007.

EMMANUEL, E.; HECK, G.; BLANCHARD, J.; VERMANDE, P.; PERRODIN, Y. Toxicological effects of desinfestations using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Environment Internacional**, Cumbria, v. 30, p. 891-900, 2004.

ERZINGER, G. S.; HÄDER, D-P. Equipamento e processo para análise de toxicidade em sistemas aquáticos. **Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI**. Nº. 0000221105523696. 2011.

FERREIRA, W. R.; RANAL, M. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de *Brassica chinensis* L. Var. *Parachinensis* (Bailey) Sinskaja (couve-da-malásia). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**; Brasília, v. 24, n. 3, p. 353-361, 1999.

FINKLER, R. **Avaliação do efeito tóxico de líquidos percolados sobre o sistema reprodutivo de *Daphnia magna***. 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2002.

FIOR, C. S. **Paraformaldeído como desinfestante no cultivo *in vitro* de *Limonium platyphyllum* Lincz**. 2004. 25 f. Monografia (Especialização em Cultura de Tecidos Vegetais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. São Paulo: Artmed, 2013. 602 p.

FREESE, E.; CHEU, C. W.; GALLIERS, E. **Function of lipophilic acids and antimicrobial food additives**. *Nature*, London, v. 241, n. 5399, p. 321-325, 1973.

FUJIMOTO, R. Y.; GABBAY, M. I.; ANJOS E. C. S.; CARRASCHI, S. P.; CRUZ C. Toxicidade e risco ambiental da oxitetraciclina e efeito em leucócitos de mato grosso (*Hyphessobrycon eques*). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** v. 7, n. 2, 2012.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993.

GEORGE, F. E.; HALL, M. A.; DE-KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht, The Netherlands: The Background, 2008. v.1.

GOKTEPE, I.; PORTIER, R.; AHMEDNA, M. Ecological risk assessment of neem-based pesticides. **Journal of Environmental Science Health Part B. Pestic. Food Contam. Agric. Wastes B.** v. 39, n. 2, p. 311-320, 2004.

GOLDSTEIN, E. G. Testes de toxicidade de efluentes industriais. **Revista Ambiente**, v. 2, n.2, p. 33-38, 1988.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP/Embrapa-CNPQ, p. 99-170, 1990.

GRUE, C. E.; GARDNER, S. C.; GIBERT, P. L. 2002. On the Significance of pollutant-induced alterations in the behaviour of fish wildlife. p. 1-90. In: G. DELL'OMO (ed). **Behavioural Ecotoxicology**. John Wiley; Sons, LTD.

HÄDER, D. P.; LEBERT, M. Real time computer controlled tracking of motile microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 42, p. 509-14, 1985.

HÄDER, D-P.; VOGEL, K. **Graviorientation in photosynthetic flagellates**. ESA SP307, p. 521-526, 1990.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol**, v. 11, 7 ed. p. 714 - 719, 1977.

HERMAN, E. B. Non-axenic plant tissue culture: possibilities and opportunities. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 280, p. 112-117, 1990.

HODA, A.; HÄDER, D-P. Rapid ecotoxicological bioassay of nickel and cadmium using motility and photosynthetic parameters of *Euglena gracilis*. **Environmental and Experimental Botany**. Erlagen. Germany. n. 69, p. 68-75, 2010.

HÖRNER, L. de A.; AUGUSTIN, L.; FORCELINI, C. A. Estudo do desenvolvimento e identificação dos agentes contaminantes da erva-mate cultivada *in vitro*. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA MATE, 2.; REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA MATE, 3. 2000. Encantado. **Anais...** Porto Alegre: Comissão dos Organizadores; Universidade do Rio Grande do Sul; Fundação de Pesquisa Agropecuária, 2000. p. 453-456.

HUANG, X. D.; MCCONKEY, B. J.; BABU, T. S.; GREENBERG, B. M. Mechanisms of photoinduced toxicity of photomodified anthracene to plants: inhibition of photosynthesis in the aquatic higher plant *Lemna gibba* (duckweed). **Environ. Toxicol. Chem.** v. 16, p. 1707-1715, 1997.

INGRAM, L. O. Ethanol tolerance in bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 9, p. 305-319, 1990.

INGRAM, L. O.; BUTKE, T. M. Effect of alcohols on microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, New York, v. 25, p. 253-300, 1983.

JENNINGS, J. R. The effect of cadmium and lead on the growth of two species of marine phytoplankton with particular reference to the development of tolerance. **J Plankton Res.** v. 1, p. 121-136, 1979.

KENDALL, R. J.; ANDERSON, T. A.; BAKER, R. J. **Casarett and doull's toxicology** – The basic science of poisons; 6 ed., MacGraw-Hill: New York, 2001.

KLOPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trend in Biochemical Science**, Amsterdam, NL, v. 7, p. 39-44, 1989.

KROMKAMP, J. C.; FORSTER, R. M. The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. **European Journal of Phycology**. v. 38, p. 103-112, 2003.

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WRIGHT, S. M et al. Elimination of *Lactobacillus pantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. **Journal of Applied Bacteriology**, London, UK, v. 71, n. 4, p. 307-330, 1991.

LEIFERT, C.; CASSELLS, A. C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In vitro Cellular & Developmental Biology**: plant, New York, v. 37, p. 133-138, 2003.

LEIFERT, C.; WAITES, W. M. **Contaminants of plant tissue cultures. Newsletter**: International Association Plant Tissue Culture, Calgary, v. 60, p. 2-13, 1990.

LEIFERT, C.; WOODWARD, S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, p. 83-88, 2001.

LONG, R. D.; CURTIN, T. F.; CASSELLS, A. C. An investigation of the effects of bacterial contaminants on potato nodal cultures. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p. 83-91, 1988.

MANTELL, S. H.; MATHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas**: uma introdução a engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. p. 344, 1994.

MCCORMICK, P. V.; CAIRNS, J. Algae as indicators of environmental change. **Journal Apply Phycology**, n. 6, p. 509-526, 1994.

MENEZES, Camila Carvalho. **Influence of packaging and potassium sorbate on the physical, physicochemical and microbiological alterations of guava preserves**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [online]. v. 31, n. 3, p. 674-680, 2011.

MERCK. Ficha de dados de segurança: sorbato de potássio, 2010. Disponível em: <http://www.emdmillipore.com/pharmaceutical-ingredients/en_US/Merck-GB-Site/GBP/ViewProductDocuments-File?ProductSKU=MDA_CHEM105119&DocumentType=MSD&DocumentId=%252Fmda%252Fchemicals%252Fmsds%252Fpt-PT%252F105119_PT_PT.PDF&DocumentSource=GDS&Country=GB&Channel=Merck-GB-Site>. Acesso em: 29 jan. 2014.

MILLÁN DE KUHN, R.; STREB, C.; BREITER, R.; RICHTER, P.; NEEBE, T.; HÄDER, D-P. Screening for unicellular algae as possible bioassay organisms for monitoring marine water samples. **Water Research**, n. 40, p. 2695-2700, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiol.** v. 15, p. 473-479, 1962.

NADKARNI, N. M. The conservation of epiphytes and their habitats: summary of a discussion at the international symposium on the biology and conservation of epiphytes. **Selbyana**, Sarasota, n. 13, p. 140- 142, 1991.

NAGY, J. K.; SULE, S.; SAMPAIO, J. P. Apple tissue culture contamination by *Rhodotorula* spp.: identification and prevention. **In vitro Cellular & Developmental Biology**: plant, Ner York, v. 41, p. 520-524, 2005.

ODA, M. L.; FARIA, R. T de; FONSECA, I. C. B.; SILVA, G. L. Avaliação da fitotoxicidade de fungicidas e germicidas na propagação *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae) para o controle de microrganismos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 273-276, jul./dez. 2003.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). **OECD Guidelines for Testing Chemicals** – Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study. Guideline 204. p. 9, 1984.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). **OECD Guidelines for Testing Chemicals** – Fish, Acute Toxicity Test. Guideline 203. p. 9, 1992.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). **OECD Guidelines for Testing Chemicals** – *Daphnia magna* Reproduction Test. Guideline 211, 1998.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). **OECD Guidelines for Testing Chemicals** – *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test. Guideline 202. p. 12, 2004.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). **OECD. Guidelines for Testing Chemicals** – Fish, Prolonged Toxicity Test: 13-day Study. Guideline 204. p. 9, 1984.

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS: *Daphnia* sp., **acute immobilisation test and reproduction test**. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948249.pdf>>. Acesso em: 29 jan. 2014.

OLLA, B. L.; PEARSON, W. H.; STUDHOLME, A. L. Applicability of behavioral measures in environmental stress assessment. **Rapp P-V Reún-Cons Int Explor Mer**, v. 179, p. 162-173, 1980.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: UFLA-FAEPE, 2001b. 74p.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. v. 1, São Paulo: Makron Books, p. 210-224, 1996.

PEREIRA, E. P. R.; FARIA, J. A. F.; PINTO, U. M. Optimizing the use of potassium sorbate and sodium metabisulphite for the chemical and microbial stability of carbonated coconut water. **Braz. J. Food Technol.** [online]. Epub: v. 16, p. 125-132, 2013.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht: M. Nyhoff, p.344, 1987.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. London: Blackie Academic & Professional, p. 413, 1985.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELD, R. The toxicity of antibiotics to plant cell culture. **Plant Cell Reports**, New York, v. 2, p. 36-39, 1983.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. 2 ed. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis. p. 1125, 1995.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington, p. 665, 1985.

RAND, G. M.; PETROCELLI, J. R. **Fundamentals of aquatic toxicity**. McGraw Hill International Book Company, p. 666, 1995.

REIVERS, B. de. **Biologia e filogenia das algas**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 280p.

REUSTLE, G.; MANN, M.; HEINTZ, C. Experience and problems with infections in tissue culture of grapevine. **Acta Horticulture**, Leuven, v. 225, p. 119-127, 1988.

RIBO, J. M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. **Environ. Toxicol. Water Qual**, 12 ed. p. 283-294, 1997.

RICHTER, P. R.; SCHUSTER, M.; LEBERT, M.; STREB, C.; HÄDER, D.-P. Gravitaxis of *Euglena gracilis* depends only partially on passive buoyancy. **Advances in Space Research**. v. 39, p. 1218 - 1224, 2007.

RICHTER, P.; BÖRNIG, A.; STREB, C.; NTEFIDOU, M.; LEBERT, M.; HÄDER, D.-P. Effects of increased salinity on gravitaxis in *Euglena gracilis*. **J. Plant Physiol**. v. 160, p. 651-656, 2003a.

RICHTER, P.; LEBERT, M.; KORN, R.; HÄDER, D.-P. Possible involvement of the membrane potential in the gravitactic orientation of *Euglena gracilis*. **J. Plant Physiol**. v. 158, p. 35-39, 2001a.

RICHTER, P.; LEBERT, M.; TAHEDL, H.; HÄDER, D.-P. Calcium is involved in the gravitactic orientation in colorless flagellates. **J. Plant Physiol**. v. 158, p. 689-697, 2001b.

RICHTER, P. R.; NTEFIDOU, M.; STREB, C.; FADDOUL, J.; LEBERT, M.; HÄDER, D.-P. High light exposure leads to a sign change of gravitaxis in the flagellate *Euglena gracilis*. **Acta Protozool**. v. 41, p. 343-351, 2002a.

RICHTER, P. R.; SCHUSTER, M.; LEBERT, M.; HÄDER, D.-P. Gravitactic signal transduction elements in *Astasia longinvestigata* during parabolic flights. **Microgravity Sci. Tec**. v. 14, p. 17-24, 2003b.

RICHTER, P. R.; SCHUSTER, M.; WAGNER, H.; LEBERT, M.; HÄDER, D.-P. Physiological parameters of gravitaxis in the flagellate *Euglena gracilis* obtained during a parabolic flight campaign. **J. Plant Physiol**. v. 159, p. 181-190, 2002b.

RICHTER, P. R.; STREB, C.; NTEFIDOU, M.; LEBERT, M.; HÄDER, D.-P. High light induced sign change of gravitaxis in the flagellate *Euglena gracilis* mediated by reactive oxygen species. **Acta Protozool**. v. 42, p. 197-204, 2003c.

ROBERTS, A. M. Geotaxis in motile microorganisms. **J. Exp. Biol**. v. 53, p. 687-699, 1970.

ROY, J.; FAKTOROVA, J. **Unusual mitochondrial genome structures throughout the Euglenozoa**. *Protist*. v. 158, p. 385-396, 2007.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6 ed. São Paulo: Roca, 1996. 1029p.

SAENGER, H. L. Control of *Thielaviopsis* root of tobacco with benomyl fungicide drenches. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 54, p. 136-140, 1970.

SALEHI, H.; KNOSH-KHUI, M. A. A simple procedure for disinfection of "baby masquerade" miniature rose explants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 69, p. 145-148, 1997.

SANTANA, J. R. F. de; PAIVA, R.; ALOUFA, M. A. I.; LEMOS, E. E. P. de. Efficiency of ampicillin and benomyl at controlling contamination of *Annonaceae* leaf segments cultured in vitro. **Fruits**, Paris, v. 58, n. 26 p. 357-361, 2003.

SANTOS, B. A.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A.; VALE, F. X. R. Severidade de isolados de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* sensíveis e resistentes ao benomyl, em abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 1, p. 101-103, 2002.

SANTOS, O. S. N.; SOUZA, F. V. D.; SOUZA, E. H. Germinação *in vitro* de sementes de *Aechmea* sp. In: 16° Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 3° Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas e 1° Simpósio de Plantas Ornamentais Nativas, 2007, Goiânia. **Revista Brasileira de Horticultura**. Goiânia: Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais, v. 13, p. 1585-1588, 2007.

SCHREIBER, L. R.; HOCK, W. K. Effect of benomyl and thiabendazol on growth of several plants species. **Journal of the American Society for Horticulturae Science**, Alexandria, v. 100, p. 309-313, 1975.

SCHRUFF, G. Die wirkung des *Botrytis* preparates benomyl in *Amaranthus* cytokinin test. **Wein-Wissenschaft**, Mainz, v. 25, p. 329-33, 1970.

SCOPE - Scientific Committee on Problems of the Environment. Report 12: **Principles of Ecotoxicology**. 1978. Edited by G. C. Butler, published on behalf of the Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE) of the International Council of Scientific Unions (ICSU) by John Wiley e Sons. Chichester, New York, Brisbane, Toronto. Disponível em: <http://globalecology.stanford.edu/SCOPE/SCOPE_12/SCOPE_12.html>. Acesso em: 28 maio. 2013.

SILVA, J. A. T. da. Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 21, p. 715-766, 2003.

SOFOS, J. N. Antimicrobial agents. In: MAGA, J. A.; TU, A. T. (Ed). **Food additive toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 501-529.

SORENSEN, F.; BAYLEY, M.; BAATRUP, E. The effects of sublethal dimethoate exposure on the locomotor behavior of the collembolan *Folsomia candida* (*Isotomidae*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 14, p. 1587-1590, 1995.

SPIRONELLO, A.; BORTOLETTO, N.; SIGRIST, J.M.M.; NAGAI, V. Avaliação agrotecnológica e do ciclo de variedades de abacaxizeiro, em duas densidades, em Votuporanga (SP). **Bragantia**, Campinas, v. 56, n. 2, p. 343-355, 1997a.

STANIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS, M. L.; PAINTER, P. R. **General microbiology**. London, UK: MacMillan, p.689, 1987.

STREB, C., RICHTER, P., NTEFIDOU, M., LEBERT, M., HÄDER, D.-P. Sensory transduction of gravitaxis in *Euglena gracilis*. **J. Plant Physiol.** v. 159, p. 855-862, 2002.

TAHEDL, H.; HÄDER, D.-P. Automated biomonitoring using real time movement analysis of *Euglena gracilllis*. **Ecotoxicology and Environmental Satefy**, v. 48, p. 161-169, 2001.

TAHEDL, H.; HÄDER, D.-P. Fast examination of water quality using the automatic biotest ecotox based on the movement behavior of freshwater flagellate. **Water Research**, v. 33, p. 426-432, 1999.

TAHEDL, H.; RICHTER, P.; LEBERT, M.; HÄDER, D.-P. AMP is involved in gravitaxis signal transduction of *Euglena gracilis*. **Microgravity Sci. Tec.** v. 11, p. 173-178, 1998.

TEIXEIRA, S. L.; TEIXEIRA, M. T.; CAMPANATI, M.; ALMEIDA, R. F. de. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais, pela combinação de esterilizantes químicos e forno de microondas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 52, n. 301, p. 343-349, 2005a.

TERRA, N. R.; FEIDEN, I. R. Reproduction and survival of *Daphnia magna* Straus, 180 (*Crustacea: Cladocera*) under different hardness conditions. **Acta Limnologica Brasilis**, v. 15, n. 2, p. 51-55, 2003.

TERRA, N. R.; FEIDEN, I. R.; CORREA, L. M. Ação tóxica do sedimento do Rio dos Sinos na sobrevivência e na reprodução de *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea). In: VI Congresso de Ecologia do Brasil, 2003, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, p. 397-399, 2003.

TOLEDO, J.; ROCA, W. Eliminación de bacterias endogenas en *Ipomea batata*. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: RedBio, p. 88, 2001.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, p. 128, 2000.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Satefy**. New York, v. 1, p. 151-173, 1977.

USEPA - Environmental Protection Agency. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to fresh water organisms**, EPA-Washington D.C. 2002.

USEPA - Environmental Protection Agency. **Technical Support Document for Water Quality-Based Toxic Control**. EPA-Washington D.C., p. 135. 1984.

VILLARROEL, M. J.; SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; ANDREU, E. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicides propanil on *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 53, p. 857-864, 2003.

WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. C.; GAUNTLETT, B. A. Effect of anti-fungal agents on *in vitro* cultures of *Eucalyptus grandis*. **South Africa Journal of Forestry**, Durban, n. 171, p. 23-27, 1996.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília: Embrapa, v. 1, p. 297-330, 1998.

YEPES, M. L.; ALDWINCKLE, H. S. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotic on proliferation. **Plant Growth Regulation**, Berlin, DE, V.15, p. 55-67, 1994.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E.; GOLDSTEIN, E. G. Toxicidade de efluentes industriais da bacia do rio Piracicaba. In: **Revista Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 39-42, 1988.