Daniel Gouveia Tanigushi

Sinigrina como moduladora da interação entre
Brassica oleraceae e *Atta sexdens rubropilosa*

São Paulo

2007

Daniel Gouveia Tanigushi

Sinigrina como moduladora da interação entre
Brassica oleraceae e *Atta sexdens rubropilosa*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica.

Orientador(a): Dra Déborah Yara
Alves Cursino dos Santos

São Paulo

2007

Ficha Catalográfica

Tanigushi, Daniel Gouveia
Sinigrina como moduladora da
interação entre *Brassica oleraceae* e *Atta
sexdens rubropilosa*.
123 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Botânica.

1. Ecologia Química 2. Fitoquímica 3.
Atta sexdens 4. Sinigrina I. Universidade de
São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa Dra Déborah Yara Alves Cursino dos Santos
Orientadora

Àqueles cujos esforços me
permitiram chegar até aqui: meus amados
pais Cláudio e Cecília, e avós Ana, Gabriel,
Nobuo e, em especial,
à D. Tereza, que só desta vez
não pode me acompanhar,
dedico.

**Jamais confunda conhecimento com sabedoria.
Um o ajuda a ganhar a vida,
o outro a construir uma.**

Sandra Carey

Agradecimentos

Agradeço à Dra Déborah, que desde a minha graduação me orienta e atura.

Ao Dr Salatino e à Dra Adriana de Mello Gugliotta, que me co-orientaram sempre que precisei.

Aos membros da banca, por aceitarem nosso convite.

À Dra Maria Luiza Salatino, que me auxiliou na minha qualificação.

À empresa ISLA Sementes Ltda. e à Eng^a Agr^a Juliana Trinca, pela doação das sementes e prontidão no fornecimentos de informações.

A todos meu colegas de laboratório e Departamento: Adne, Amanda, Anary, Carol, Célia, Cíntia, Cláudia, Cris, Emanuela, Fábio, Jorge, Júlia, Leila, Lucimar, Mayumi, Mourisa, Priscilla, Suzi e Thiago; pelos momentos alegres, conversas, cafés e cervejas.

Ao Pedro e ao laboratório de Ecofisiologia e Ecologia Evolutiva do IB-USP, pelo fornecimento de fungos e formigas para os experimentos.

À Capes pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Instituto de Biociências e à Universidade de São Paulo pela estrutura e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Instituto de Botânica e aos membros do laboratório de Micologia, por suporte e colaboração nos experimentos com o fungo.

Ao Carlos (mais conhecido como Confusão), por me ajudar a conhecer melhor essas tais de saúvas, pelas caronas ao Botânico e pelo companheirismo durante todo o nosso mestrado.

Ao Dr Edison (*in memoriam*) que me iniciou na ciência botânica

A toda minha família, com especial atenção à minha irmã Cláudia e meus tios Chignori e Rosalina, que me acolheram aqui em São Paulo.

A todas pessoas que mesmo indiretamente, foram muito importantes para que eu conseguisse chegar até aqui, como meus amigos Badaró, Carlos, Diego, Livia e Sônia.

À Cláudia e a Fungyi, que estiveram presentes como poucos durante essa etapa. E a Dona Adelaide e a Silvia, pela hospitalidade, carinho e guloseimas.

Perdoem-me aqueles que, por esquecimento, não foram citados. Vocês nem imaginam o que o estresse pré-entrega faz com a memória da gente! Agradeço a todos vocês!

E, por fim, em um ato contestado tanto por religiosos com por ateus, agradeço a Deus, justificando-me nas palavras de um sábio colega de profissão que dizia não haver oposição entre Ciência e Religião, mas apenas cientistas atrasados, que professam idéias de 1880 (Albert Einstein).

Índice

Introdução Geral

1. Sobre nosso trabalho	01
2. As Formigas que cultivam fungos	02
2.1. Algumas particularidades dos subgrupos da tribo	04
2.2. O gênero <i>Atta</i>	05
2.3. O Sauveiro	06
2.3.1. Estrutura física dos sauveiros	07
2.4. O Fungo	08
2.4.1. A transmissão do fungo	10
2.5. A ecologia da simbiose	11
2.5.1. O parasita <i>Escovopsis</i>	11
2.5.2. As bactérias Actinomicetes	12
2.5.3. O forrageamento e a incorporação do substrato	13
2.5.4. Integração sanitária	15
2.5.5. Cooperação digestiva	16
2.5.6. Participação do fungo na nutrição das formigas	16
2.5.7. A influência do fungo no forrageamento	18
3. Os Glucosinolatos e as Brassicaceae	19
3.1. Estrutura e Composição	21
3.2. O mecanismo de ação	22
3.3. Degradação enzimática	24
3.4. Degradação não enzimática	25
3.5. A mirosinase	25
3.5.1. Proteínas ligantes de Mirosinase	27
3.6. A localização da mirosinase e dos glucosinolatos e suas implicações estratégicas	28
3.7. Fatores que influenciam o nível de mirosinase na planta	29
3.8. Fatores que influenciam os níveis de Glucosinolatos	30
3.9. Correlações entre glucosinolatos e mirosinase	34
3.10. Transporte na planta	35
3.11. Papeis biológicas dos glucosinolatos	36
3.11.1. O sistema mirosinase-glucosinolatos na resposta da planta contra os generalistas e os especialistas	37
3.11.2. O sistema mirosinase-glucosinolatos na resposta da planta contra patógenos	41
3.11.3. Outras funções	42
3.12. Importância para o homem	43
3.13. Taxonomia	45
3.14. A sinigrina e as <i>Brassica oleraceae</i>	46
4. Bibliografia	48

Capítulo I. Efeitos da sinigrina sobre sauveiros de *Atta sexdens rubropilosa*

Resumo/Abstract	59
I.1. Introdução	60
I.2. Objetivos	63
I.3. Materiais e Métodos	63
I.3.1. Avaliação da ação da sinigrina sobre as formigas	63

I.3.1.1. Experimento de ação da sinigrina via ingestão por solução aquosa	64
I.3.1.2. Mortalidade com o oferecimento de dieta	66
I.3.2. Seleção do meio de cultura e isolamento das linhagens dos fungos	67
I.3.3. Efeito da sinigrina no crescimento do fungo	70
I.4. Resultados e Discussão	72
I.4.1. Experimento de ação da sinigrina nas saúvas via ingestão por solução aquosa	72
I.4.2. Avaliação da mortalidade das saúvas com o oferecimento de dietas sólidas	76
I.4.3. Seleção do meio de cultura do fungo	80
I.4.4 - Efeitos da sinigrina no crescimento do fungo	84
I.5. Conclusões	91
I.6. Bibliografia	92
 Capítulo II. Análise de glucosinolatos em variedades de <i>Brassica oleraceae</i>	
Resumo/Abstract	97
II.1. Introdução	98
II.2. Objetivos	100
III.3. Materiais e métodos	101
II.4. Resultados e Discussão	103
II.5. Conclusões	114
II.6. Bibliografia	115
 Comentários finais	
1. Conclusões finais	119
2. Considerações e perspectivas	120
2.1. O uso dos metabólitos secundários no controle das formigas	120
2.2. O papel dos glucosinolatos na ecologia química das plantas	121
2.3. A ecologia química entre formigas e fungos	121
3. Bibliografia	123

1. Sobre nosso trabalho

Qualquer organismo durante sua existência inevitavelmente interage tanto com o ambiente físico à sua volta quanto com outros organismos através de diversos processos (Begon *et al.*, 1996). Desde o mais simples até o mais complexo, todos dependem de interações para obter nutrientes, se estabelecer, desenvolver e reproduzir (Garcia, 1997). Foi focando no entendimento das causas de algumas dessas interações que surgiram os estudos em ecologia química, matéria que trata do reconhecimento e entendimento das origens, funções e da importância de substâncias que intermedeiam as interações dentro e entre os organismos (Harborne, 2001).

Duas linhas principais podem ser apontadas para o início do desenvolvimento dessa área de conhecimento, sendo ambas até hoje o foco de grande parte dos trabalhos publicados. Uma dessas linhas relaciona-se à descoberta dos feromônios de inseto, e o reconhecimento que quantias mínimas dessas substâncias (isto é, 1 μg ou menos) podiam acarretar em profundos efeitos comportamentais nesses seres. A outra linha na origem da ecologia química nasceu da necessidade de explicar a grande variação no metabolismo secundário encontrada nas plantas. Em 1959, Fraenkel argumentou que esses metabólitos secundários não podiam ser simples produtos indesejáveis do metabolismo primário acumulados nas células vegetais devido à ausência de um sistema excretório eficiente. Em vez disso, Fraenkel descreveu estes metabólitos como substâncias capazes de induzir ou prevenir a herbivoria, o que seria coerente com o fato de que a síntese dessas substâncias possui um custo para a planta, e ajudaria a explicar as preferências alimentares relativamente restritas de muitos insetos.

Com o passar do tempo e a contribuição de muitos outros pesquisadores, essa proposição de papéis ecológicos dos metabólitos secundários ganhou corpo e força,

principalmente no tocante à atuação dessas substâncias como mediadoras nos processos herbivóricos, particularmente como agentes anti-herbivóricos. Dessa forma, à luz das teorias evolutivas, propôs-se que, através de um processo co-evolutivo, os insetos poderiam tornar-se capazes de superar certos agentes defensivos e, eventualmente, usar esses mesmos agentes como estimulantes para a alimentação.

Desde então, foi dada mais atenção aos estudos das funções dos metabólitos secundários na inibição da herbivoria do que a qualquer outro aspecto da ecologia química (Harborne, 2001).

Neste trabalho, pretende-se de uma forma simples e pouco aprofundada, contribuir para o arcabouço teórico referente à como os metabólitos secundários podem mediar interações herbivóricas entre insetos e plantas. Para tal, dois modelos são utilizados, ambos tradicionais e, ao mesmo tempo, peculiares: os glucosinolatos (metabólitos secundários) e as saúvas (formigas pertencentes ao gênero *Atta*). Podem ser considerados tradicionais porque já vêm sendo investigados há muito tempo e contam com diversos trabalhos publicados, porém nunca combinados. Já a peculiaridade é devida ao fato de ambos serem sistemas complexos em suas respectivas funções, uma vez que os glucosinolatos são metabólitos que por si só são pouco tóxicos, porém, possuem um mecanismo catalítico que leva à liberação de produtos tóxicos; ao passo que as saúvas, apesar de serem consideradas os herbívoros mais vorazes nos Neotrópicos, não são diretamente merecedoras desse título, uma vez que a maior parte do material vegetal coletado não é ingerida, mas sim é utilizada no cultivo fungos.

O presente capítulo destina-se à revisão de alguns aspectos da biologia das saúvas e dos glucosinolatos, o que facilitará o entendimento dos capítulos que se seguem.

2. As Formigas que cultivam fungos

Dentre um total de mais de 9500 espécies de formigas existentes (Formicidae) (Bolton, 1995) estão as cerca de 220 espécies que cultivam fungos para sua alimentação, todas

descritas na tribo Attini (subfamília Myrmicinae), formando um grupo monofilético (Wetterer *et al.*, 1998; Mueller *et al.*, 2005) abrangendo 13 gêneros - *Apterostigma*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Pseudoatta*, *Cyphomyrmex*, *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex*, *Acromyrmex* e *Atta* (Brandão & Mayhé-Nunes, 2001) (Fig. 1). Essas formigas ocorrem exclusivamente no Novo Mundo entre a Argentina e o sul dos Estados Unidos, tendo grande diversidade nas florestas equatoriais da América do Sul, onde possivelmente deu-se sua origem (Mueller *et al.*, 2005).

Figura 1. Cladograma com as relações filogenéticas da tribo Attini. Em verde os gêneros do grupo das Attini basais; em vermelho e azul o grupo das Attini derivadas; e em azul as formigas cortadeiras. Fonte: Villesen, 2001

Tradicionalmente, a tribo é dividida em dois grupos informais: as chamadas Attini derivadas (do inglês "Higher Attini"), que incluem aquelas chamadas de formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*) mais os gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*; e as chamadas Attini basais ("Lower Attini"), que envolve o restante da tribo (Mueller, 2002) incluindo o gênero *Pseudoatta*, que não consta na Figura 1 por se tratar de um gênero atípico que não possui

operárias nem cultivo próprio de fungo, vivendo como parasitas sociais nas colônias de outras espécies (Villesen, 2001).

Essa capacidade de cultivar seu próprio alimento é um fenômeno muito raro no reino animal, sendo que, além das formigas e do seres humanos, apenas representantes de outras duas ordens de insetos¹ desenvolveram a habilidade de realizar o que se pode chamar de agricultura. Nas formigas, essa prática é baseada em monocultura, de uma forma totalmente restritiva dentro de cada colônia e muito possivelmente em escalas geográficas regionais, visto que a propagação dos fungos se dá principalmente por meio de propágulos vegetativos (clones). Contudo, a despeito do que geralmente se preconiza sobre os problemas relacionados à erosão genética e propagação de doenças, a agricultura monocultural das Attini vem sendo muito bem sucedida há mais de 50 milhões de anos. Todo esse sucesso, no entanto, deve-se ao intrincado sistema biológico constituído em cada colônia, cujos elementos e mecanismos ainda estão longe de seu total entendimento (Mueller, 2002; Mueller *et al.*, 2005).

Em linhas gerais, os benefícios e custos nessa relação mutualística entre fungos e formigas são facilmente identificados: as formigas dependem do fungo como fonte essencial de alimento e, em troca, fornecem ao fungo um meio de propagação, substrato adequado para o seu crescimento, proteção contra competidores e contra patógenos (Nascimento *et al.*, 1996; Currie, 2002; Currie *et al.*, 2003; Mehdiabadi *et al.*, 2006).

2.1. Algumas particularidades dos subgrupos da tribo

Todos os gêneros da tribo Attini são estritamente dependentes do cultivo de fungo para sua alimentação. Todavia, para promover o crescimento desses cultivares, os diferentes gêneros utilizam substratos diversos, tais como: excremento de insetos, cadáveres de animais e matéria vegetal fresca ou morta. Gêneros mais derivados (*Atta* e *Acromirmex*) utilizam

¹ Cupins e besouros ambrósia. Esses últimos são besouros xilomicetófagos que recebem esse nome por se alimentar de um fungo também denominado ambrósia (Mueller *et al.*, 2005; Abreu *et al.*, 1997; Berti Filho, 1979).

matéria vegetal fresca para esta finalidade, recebendo por isso a denominação de formigas cortadeiras (Richard *et al.*, 2005), já as Attini basais o fazem utilizando os demais materiais citados (Weber, 1966; Wetterer *et al.*, 1998; Mueller, 2002).

As Attini basais apresentam comumente colônias pequenas e inconspícuas, freqüentemente com menos de 3000 operárias que são pouco ou nada polimórficas. Já os gêneros mais derivados possuem colônias bem maiores, sendo que as colônias de *Atta* podem chegar à casa de oito milhões de operárias altamente polimórficas (Hölldobler & Wilson, 1990).

O grande número de indivíduos aliado ao hábito de cortarem folhas frescas conferiu a esses insetos o título de "principais herbívoros" dos Neotrópicos, podendo chegar a cortar cerca de 17% da vegetação dessas regiões (Chapela *et al.*, 1994; Currie, 2002; Mueller, 2002; Richard *et al.*, 2005). Entretanto, essa titulação relaciona-se mais à função ecológica do que ao hábito alimentar, uma vez que *stricto sensu* (Ricklefs & Miller, 2000) as formigas cortadeiras só são consideradas herbívoros por ingerirem as seivas dos vegetais (assunto sobre o qual ainda pairam algumas dúvidas), já que a grande massa foliar cortada e transportada pelas formigas se destina ao cultivo do fungo (Currie, 2002).

Tamanha voracidade, que por um lado é um dos principais fatores que sustentam o importante papel ecológico que essas formigas exercem, promovendo a reciclagem de nutrientes e a aeração do solo (Weber, 1966; Richard *et al.*, 2005), por outro lado, com a introdução da agricultura humana, fez com que as mesmas recebessem o *status* de grandes pragas da agricultura, por acarretarem enormes perdas de produtividades (Currie, 2002; Marinho *et al.*, 2006).

2.2. O gênero *Atta*

Como já mencionado, as formigas cortadeiras se dividem em dois gêneros: *Acromyrmex*, que compreende as formigas popularmente conhecidas como quenquéns e *Atta*, compreendendo as popularmente conhecidas saúvas (Loureiro & Monteiro, 2004). Esse último

se destaca pelo porte de suas colônias e possui ampla distribuição no continente americano, sendo encontrado entre as latitudes 33° norte e 33° sul (Fig. 2) (Della Lucia *et al.*, 1993; Moser, 2006), pouco menor que a distribuição da tribo, encontrada entre 40° de latitude norte a 44° da latitude sul (Weber, 1966). Somente no Brasil são encontradas 10 espécies e três subespécies de saúvas (Della Lucia *et al.*, 1993), sendo que *Atta sexdens* L. (com especial relevância da sua subespécie *A. sexdens rubropilosa* Forel) é sem dúvida a espécie mais importante economicamente, devido aos ataques a diversas culturas (Weber, 1966; Fowler, 1988).

Figura 2. Distribuição geral das formigas cortadeiras e o número de táxons por latitude. Pode-se notar uma grande variedade dessas formigas no território brasileiro, tido como centro de diversidade da tribo. Fonte: Beattie & Hughes (2002).

2.3. O Sauveiro

As colônias de saúvas (*Atta* spp.) podem ter um longo período de existência, chegando a até 20 anos (Weber, 1996). Cada colônia contém apenas uma rainha (Villesen *et al.*, 1999), que é a mesma responsável pela fundação da colônia. Nos estados de São Paulo e vizinhos, a fundação de novas colônias ocorre entre os meses de Setembro e Novembro (Autuori, 1941). É nesse período que ocorre a chamada revoada, fenômeno no qual as formas reprodutivas dotadas de alas (conhecidas popularmente como iças para a forma feminina e bitus para a

masculina) saem dos formigueiros para realizarem seu vôo nupcial, após o qual as fêmeas fecundadas perdem suas asas, cavam o solo e estabelecem novas colônias.

No início do desenvolvimento da colônia, existe apenas uma pequena câmara escavada pela própria rainha a poucos centímetros da superfície do solo. É nessa câmara que as rainhas expõem o pequeno fragmento de fungo que elas trazem de suas colônias de origem em suas cavidades infrabucais, começando assim o cultivo de seu próprio jardim de fungo. Alguns autores defendem que inicialmente o fungo é cultivado com um tipo especial de ovo produzido pela rainha (Weber, 1966), já outros defendem que o substrato utilizado trata-se do material fecal produzido por ela. A câmara primordial permanece fechada até que as primeiras operárias estejam prontas, quando então elas reabrem a abertura e passam a forragear fora da câmara (Autuori, 1941; Currie *et al.* 1999b; Mueller *et al.*, 2005).

Como já fora mencionado acima, as formigas do gênero *Atta* são altamente polimórficas, e esse polimorfismo é freqüentemente relacionado à divisão de trabalho (Weber 1966; Mueller *et al.*, 2005). Contudo, cada casta pode exercer uma dentre um leque de possíveis atividades, existindo também padrões de alocação para serviços mais insalubres no decorrer da vida da formiga (Brown *et al.*, 2006).

2.3.1. Estrutura física dos saueiros

Em um saueiro adulto a estrutura interna é composta por câmaras, também chamadas painéis, que são interligadas entre si e com a superfície através de galerias. Essas galerias abrem-se em orifícios na superfície do solo chamados de olheiros. Exteriormente, os saueiros são caracterizados pelo acúmulo de terra proveniente da escavação das painéis, caracterizando a chamada sede aparente do formigueiro. A sede real corresponde ao conjunto subterrâneo de câmaras (Della Lucia & Moreira, 1993), cada uma das quais pode estar preenchida por fungo, lixo, terra ou mesmo estar vazia (Autuori, 1947; Moser, 2006).

As cavidades que contêm os jardins de fungos são aquelas nas quais as formigas mantêm sua prole, alimentadas exclusivamente com o fungo cultivado. Não se tem certeza sobre a função das cavidades vazias, mas elas podem servir como áreas de armazenamento do contingente sobressalente de operárias. Já as cavidades contendo o chamado lixo, são aquelas que acondicionam principalmente os cadáveres de formigas e os restos do substrato não digerido pelo fungo (Moser, 2006).

Os números envolvidos com um único formigueiro de *Atta sexdens* são bastante surpreendentes. Um saúveiro pode chegar a ter mais de 2000 câmaras subterrâneas, 1000 olheiros e o número de operárias atinge a ordem de milhões (Autuori, 1942; Autuori, 1947; Weber, 1966). Esses números ajudam a explicar o porquê desses insetos terem o título de herbívoros dominantes nos Neotrópicos (Hölldobler & Wilson, 1990; Chapela *et al.*, 1994).

2.4. O Fungo

A identificação dos fungos cultivados pelas formigas não é uma tarefa fácil devido à ausência de caracteres morfológicos taxonomicamente informativos no micélio cultivado e à supressão da formação do corpo de frutificação pelas formigas (Mohali, 1998; Currie, 2002). Contudo, o uso de ferramentas moleculares, auxiliadas pela obtenção de alguns poucos corpos de frutificação (Mueller, 2002), começou a trazer luz à parte desses problemas (Chapela *et al.*, 1994; Currie, 2002; Munkacsy *et al.*, 2004).

Em um panorama geral, a despeito de algumas identificações antigas e discrepantes (Mueller, 2002), pode-se dizer de que as Attini, com exceção ao gênero *Apterostigma* (Mueller *et al.*, 2005), cultivam fungos bastante próximos pertencentes ao que seria a família Lepiotaceae (Chapela *et al.*, 1994; Currie *et al.*, 2003). Atualmente, esses fungos são melhor posicionados dentro de Agaricaceae (Vellinga *et al.*, 2003), possivelmente pertencendo à tribo Leucocoprineae (Gimenes, 2007). Já as Attini derivadas cultivam fungos pertencentes a dois

clados dessa tribo, os quais são provavelmente derivados dos fungos cultivados pelos gêneros basais (Currie *et al.*, 2003; Villesen *et al.*, 2004).

Os fungos cultivados pelas *Atta* foram classificados exclusivamente em dois gêneros: *Leucocoprinus* e *Leucoagaricus* (Mohali, 1998; Mueller, 2002). O trabalho de Mueller (2002) apresenta uma listagem correlacionando espécies de formigas e a identificação de seus respectivos fungos por muitos autores. É importante ressaltar que, nessa listagem, a única exceção ao cultivo de *Leucocoprinus* ou *Leucoagaricus* por espécies de *Atta* refere-se à *Rozites gongylophora* que segundo Mohali (1998), passou ao gênero *Leucocoprinus*, o que pôde ser confirmado no site do Index Fungorum. Esse mesmo banco de dados traz *Leucocoprinus gongylophorus* (espécie que os trabalhos freqüentemente relacionam ao gênero *Atta*) como sinônimo de *Leucoagaricus gongylophorus*, apontando este último como o nome corrente. Dessa forma, parece que *Leucoagaricus gongylophorus* é a melhor forma de se referir ao fungo cultivado por *Atta*.

Dentre todos os fungos cultivados pelas Attini, quatro linhagens podem ser distinguidas. Dessas, três têm a mesma história evolutiva, a qual é congruente com a história dessas formigas (Currie *et al.*, 2003; Gerardo *et al.*, 2006). A quarta linhagem é cultivada apenas por espécies de formigas do gênero *Apterostigma* e, provavelmente, se originou através da substituição de cultivares, originalmente Leucocoprineae (Currie *et al.*, 2003), por uma linhagem de fungo da família Pterulaceae (Munkacsi *et al.*, 2004; Villesen *et al.*, 2004; Gerardo *et al.*, 2006).

Esse padrão de divergência dos fungos leucocoprinoídeos em 3 linhagens principais, como já mencionado, repete-se também na árvore filogenética das formigas que os cultivam (Currie *et al.*, 2003), gerando um fenômeno conhecido como cocladogênese (Gerardo *et al.*, 2006), o que indica uma longa história de coevolução paralela² (Currie *et al.*, 2003).

² Todavia, esse não é um único padrão de coevolução que se pode observar nessa relação. O já mencionado sistema *Apterostigma*-Pterulaceae possui diversas similaridades com o sistema Attini-Agaricaceae, que mostram evidências de um padrão de coevolução convergente (Munkacsi, 2004).

A exceção de *Cyphomyrmex rimosus* que cultiva seu fungo em estágio leveduróide, todas as demais Attini cultivam fungos na forma de micélio (Weber, 1966), que provavelmente é a forma na qual iniciou-se o cultivo de fungo pelas Attini há cerca de 50 milhões de anos nas florestas da Amazônia, aparentemente com a domesticação de um fungo da família Lepiotaceae³ (Basidiomycotina: Agaricales). Tamanha coexistência possibilitou o desenvolvimento de algumas adaptações à existência conjunta, tais como mecanismos de integrações fisiológicas, nutricionais e antibióticas, como será mostrado adiante (Richard *et al.*, 2005). Esses mecanismos são proeminentemente observados nos fungos pertencem à linhagem denominada G1, cultivados pelas Attini derivadas (Villesen *et al.*, 2004).

2.4.1. A transmissão do fungo

Até pouco tempo pensava-se que o fungo mutualista era propagado exclusivamente como clones transmitidos através das sucessivas gerações de formigueiros. Recentemente, técnicas em biologia molecular têm mostrado que o conceito desse sistema de transmissão exclusivamente vertical e assexuado é incorreto, uma vez que diferentes cultivares podem ser transmitidos horizontalmente entre diferentes espécies de formigas e, possivelmente, através novos eventos de domesticação de populações de fungos de vida livre (Chapela *et al.*, 1994; Green *et al.*, 2002; Mueller *et al.*, 2005). Essa transmissão horizontal diminui o pareamento evolutivo das linhagens de formigas e fungos (Mueller, 2002) e por isso pode ser percebida como incongruências topológicas no cocladograma (Gerardo *et al.*, 2006). A substituição de cultivares não é um fenômeno muito comum e nem mesmo fácil de ser induzido em condições experimentais, contudo, existem alguns casos documentados e evidências da ocorrência desse fenômeno tanto em condições naturais (Mueller, 2002) como em laboratoriais (Mehdiabadi *et al.*, 2006).

³ Hoje Agaricaceae (Vellinga *et al.*, 2003).

2.5. A ecologia da simbiose

2.5.1. O parasita *Escovopsis*

Apesar de por muito tempo terem sido considerados ambientes livres de parasitas, os jardins de fungos das colônias de Attini são na verdade habitados por parasitas especializados, dentre os quais destaca-se o microfungo do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales), um parasita especializado no ataque aos fungos cultivados pelas Attini (Currie *et al.*, 1999b; Currie *et al.*, 2003). Quando a infecção por esse fungo parasita foge ao controle das formigas, a produtividade do fungo mutualista é reduzida, o que compromete todo o crescimento e a probabilidade de sobrevivência da colônia. O *Escovopsis* é encontrado em colônias de todos os gêneros de Attini (Currie *et al.*, 2003).

Existe uma considerável diversidade no gênero *Escovopsis* (Fig. 3), sendo que linhagens particulares de *Escovopsis* são especializadas em linhagens particulares dos fungos mutualistas. Este alto grau de especificidade parasita-hospedeiro sugere uma longa história de coevolução, na qual a outra parte envolvida (no caso, o sistema formado pelas formigas, seus fungos mutualistas e, como será detalhado a seguir, as bactérias actinomicetes) tem se coadaptado para se defender contra o parasita. Em contrapartida, cada espécie de *Escovopsis* especializou-se para superar as defesas de um hospedeiro particular, mas não de outros (Currie *et al.*, 2003).

Assim como ocorre entre as formigas Attini e os fungos cultivados, a longa história evolutiva em associação acarretou em um padrão filogenético congruente entre o *Escovopsis* e seus pares simbiontes, inclusive com linhagens do parasita especializadas no fungo de Pterulaceae (Currie *et al.*, 2003; Gerardo *et al.*, 2006) (Fig. 3). Algumas das poucas incongruências entre a filogenia das formigas e a dos parasitas podem ser indícios de um processo de substituição dos fungos cultivados. Nesses casos, como o *Escovopsis* é parasita do fungo e não da formiga, é esperado que esteja mais ligado ao cultivar do que ao inseto (Currie *et al.*, 2003; Gerardo *et al.*, 2006).

Figura 3. Reconstrução da coevolução tríplice entre formigas da tribo Attini (esquerda), seus fungos mutualistas (centro) e seus fungos parasitas (direita). *As linhagens dos fungos mutualistas e do *Escovopsis* estão indicadas pelo nome das espécies de formigas das colônias de onde foram isolados. O símbolo † indica a substituição dos fungos agaricáceos no gênero *Apterostigma*. Pode-se notar que o fungo cultivado pelas Attini basais não formam um grupo monofilético e que possuem representantes de vida livre. Fonte: Currie e colaboradores (2003).

2.5.2. As bactérias Actinomicetes

Certas áreas da cutícula (ou integumento) das formigas são revestidas com o que parece ser uma crosta pulverulenta cinza-esbranquiçada, a qual por muito tempo foi tida como um exudado cuticular. Hoje se sabe que essa crosta na verdade é formada por uma massa de bactérias filamentosas (actinomicetes) possivelmente pertencentes à Pseudonocardiaceae (Currie *et al.*, 2003). Essas bactérias também são transmitidas verticalmente das colônias parentais para as descendentes através das rainhas, e a elas são atribuídas funções na manutenção do saneamento dos jardins de fungos devido à produção de substâncias

antibióticas com ação sobre organismos patogênicos, especialmente contra o *Escovopsis* (Currie *et al.*, 1999a).

Assim como o *Escovopsis*, as bactérias actinomicetes são encontradas em todas as espécies da tribo Attini e, tal como ocorre entre o *Escovopsis* e os cultivares de fungos simbiossiontes, as bactérias possuem linhagens particulares para cada "linhagem" do conjunto formado pelos elementos: formiga, fungo mutualista e fungo parasita (Munkacsy *et al.*, 2004). Além disso, a localização no integumento é gênero-específica, indício de uma associação altamente desenvolvida e possivelmente de origem muito remota. Bioensaios *in vitro* mostraram que, além de inibir o crescimento do fungo parasita, a presença de extratos da bactéria eleva também a taxa de crescimento do fungo mutualista, o que pode indicar a produção de componentes promotores do crescimento tais como vitaminas, enzimas e/ou aminoácidos (Currie *et al.*, 1999a).

Outras bactérias, como as do gênero *Burkholderia*, também são encontradas nos jardins de fungo e parecem ajudar no controle do *Escovopsis* e de doenças entomopatogênicas (Santos *et al.*, 2004). Além dessas bactérias e do *Escovopsis*, outras bactérias e fungos são encontrados nos jardins, contudo ainda nada se sabe sobre suas potenciais funções à simbiose (Mueller *et al.*, 2005).

A manutenção desses microrganismos mutualistas aparentemente "secundários" pode ser vantajosa uma vez que, ao contrário das formigas, esses microrganismos podem evoluir nas mesmas taxas apresentadas pelos organismos danosos ao jardim, o que poderia ajudar a tornar as respostas mais rápidas (Mueller *et al.*, 2005).

2.5.3. O forrageamento e a incorporação do substrato

O forrageamento integra as atividades individuais de busca, seleção e transporte do alimento (Mimura, 2001). Esse processo é mediado por feromônios e envolve alguns dos mais complexos sistemas de comunicação em Formicidae (Wilson, 1971). O sistema de trilhas, a

experiência prévia do indivíduo com o substrato, a quantidade de energia despendida e a competição com formigas rivais parecem ser elementos que condicionam o padrão de forrageamento das formigas cortadeiras (Bueno *et al*, 1990). Contudo, a compreensão do padrão espacial de forrageamento dessas formigas ainda é tema de muitas discussões.

Sabe-se que as formigas cortadeiras têm preferências por determinadas espécies de plantas (Rockwood, 1976, 1977). No entanto, muitas vezes plantas dessas espécies encontram-se perto do formigueiro, mas não são exploradas. A explicação clássica para esse fato é a de que as formigas apresentam estratégias para a conservação dos recursos à longo prazo, poupando, dessa forma, as plantas que estão mais próximas. Essa explicação é, no entanto, criticada por alguns pesquisadores que atribuem esse padrão a fatores de outra ordem, como por exemplo, as variações intraespecíficas no conteúdo de metabólitos secundários (Rockwood & Hubbell, 1987).

Já nos formigueiros, o substrato coletado é cortado em pequenos fragmentos, os quais são extensivamente lambidos para remover substâncias graxas e microrganismos contaminantes, adicionados ao topo do fungo e sobrepostos por um inóculo do fungo retirado da base da estrutura. Por vezes, sobre esses fragmentos são também depositadas gotículas ("droplets") fecais, as quais acredita-se poder contribuir no processo de decomposição do substrato⁴ (Weber, 1966; Currie, 2001; Currie, 2002).

Estudos utilizando técnicas em microscopia mostraram que tanto a cutícula como a epiderme das folhas não são alteradas durante o crescimento do fungo, os quais penetram apenas através dos cortes feitos pelas formigas. Possivelmente essa é a razão pela qual as formigas freqüentemente raspam o substrato antes de incorporá-lo ao fungo, o que permitiria uma maior penetração do fungo (Mohali, 1998).

⁴ Maiores detalhes sobre porque as fezes das formigas podem ajudar na decomposição do substrato serão visto a seguir.

2.5.4. Integração sanitária

Algumas pragas atacam os jardins de fungos e podem coexistir em níveis baixos ou manejáveis. Porém, se as formigas forem retiradas ou abandonarem o ninho, rapidamente o fungo é tomado por essas pragas (Mueller *et al.*, 2005). O gênero *Xylaria*, por exemplo, compreende um grupo de fungos endofíticos que são encontrados em grande parte dos fungos cultivados por formigas e mesmo cupins, provavelmente porque é introduzido nos jardins juntamente com o substrato (Fisher *et al.*, 1995). Embora esse fungo não ataque diretamente o fungo simbiote, compete com ele por nutrientes, diminuindo assim sua produtividade (Mueller *et al.*, 2005).

O monitoramento intensivo do fungo por parte das formigas assegura que doenças sejam controladas em seus estágios iniciais, antes que possam se espalhar e/ou causarem grandes danos à produção de fungo. A detecção precoce também parece ser uma medida efetiva contra novas linhagens mutantes de doenças, uma vez que em seus estágios iniciais esses patógenos podem ser rapidamente controlados pelos procedimentos padrões de remoção física (Mueller *et al.*, 2005).

Além da manipulação física (recursos comportamentais) e da ajuda bacteriana, as formigas contam também com uma série de recursos químicos próprios, para conter as infecções que acometem seus jardins de fungos. Dentre os quais se destacam aqueles produzidos pelas glândulas metapleurais⁵. Alguns trabalhos vêm demonstrando que o controle de infecções é a função primária dessas glândulas, as quais sintetizam uma série de componentes antimicrobianos usados ativamente na presença de algum agente patogênico (Fernández-Marín, 2006).

⁵ Glândulas metapleurais são estruturas diagnósticas das formigas (Formicidae) (Fernández-Marín, 2006).

2.5.5. Cooperação digestiva

Bacci e colaboradores (1995) constataram que o fungo *Leucoprinus gongylophorus* (*Leucoagaricus gongylophorus*), cultivado por *Atta sexdens rubropilosa*, possui enzimas que podem quebrar a celulose em várias formas. Ao se alimentarem do fungo as formigas ingerem também essas e outras enzimas, que então passam pelo intestino do inseto sem sofrer alterações e se concentram no fluido fecal das formigas. Com o movimento das formigas para as diferentes partes do fungo e o hábito de depositar gotículas fecais sobre o substrato, essas enzimas são espalhadas e recicladas, ajudando a acelerar a digestão do substrato e o crescimento do fungo (Martin, 1992).

Além dessa função na reciclagem e redistribuição das enzimas provenientes do fungo, aparentemente as formigas também são capazes de contribuir para a digestão do substrato através de enzimas próprias. Richard e colaboradores (2005) encontraram uma forte complementaridade entre o perfil enzimático das formigas e de seus respectivos fungos mutualistas. Além do fungo e das formigas, as bactérias encontradas no fungo também podem contribuir para a digestão do substrato com enzimas que digerem biopolímeros (Bacci *et al.*, 1995).

2.5.6. Participação do fungo na nutrição das formigas

O fungo mutualista das formigas dos gêneros mais derivados produz, nas extremidades de suas hifas, intumescências chamadas de gongilídeos. Essas estruturas são consideradas elementos adaptativos à longa existência conjunta entre os fungos e as formigas destes gêneros. São formadas por abundantes vacúolos ricos em nutrientes e servem como fonte de alimento para as formigas. Além do elevado valor nutricional, os gongilídeos se reúnem em conjuntos chamados estáfilos o que facilita a coleta e o transporte desses "pacotes nutricionais" (Mueller, 2002).

O fungo é a única fonte nutricional das larvas e pupas, provendo-as com um suprimento rico em proteínas e outros nutrientes ideais para o seu desenvolvimento. Já no caso das formigas adultas, admite-se também a existência de outras fontes de nutrientes, tais como as seivas vegetais adquiridas durante o processamento do substrato a ser incorporado nos jardins de fungos (Bass & Acherret, 1995; Mueller *et al.*, 2005).

A avaliação quantitativa da parcela com a qual o fungo contribui para a dieta das formigas adultas não é uma tarefa fácil nem mesmo consensual (Richard *et al.*, 2005). Pois, embora as formigas operárias adultas possam sobreviver com uma dieta constituída exclusivamente de fungo (Mueller, 2002), algumas estimativas indicam que a ingestão do fungo forneça somente cerca de 9% do requerimento energético do inseto, sendo os 91% restantes supridos pela ingestão de seiva dos tecidos vegetais (Bass & Cherret, 1995). Porém, recentemente, com a observação do comportamento de trofalaxia⁶ anal nas formigas cortadeiras (Soroker *et al.*, 1995; Moreira *et al.*, 2006), alguns autores passaram a especular sobre a possível contribuição indireta do fungo na nutrição das formigas adultas, que aconteceria através da ingestão dos fluidos anais das larvas, as quais se alimentam diretamente do fungo (Mueller, 2002). Outra hipótese, apontada por Silva e colaboradores (2003), que aumentaria a importância do fungo para a nutrição das formigas é a de que o fungo, durante seu processo de digestão extracelular, quebre os polissacarídeos em produtos que as operárias pudessem ingerir diretamente durante os procedimentos de manejo dos jardins de fungos.

Outro ponto importante a ser considerado é que parte da sustentação da hipótese da baixa contribuição do fungo na nutrição das formigas adultas se deve ao fato das formigas possuírem microestruturas em suas cavidades infrabucais que atuam como filtros

⁶ A trofalaxia é um processo dentro de colônia de insetos sociais estabelecido pelo compartilhamento de alimento. Pode ser oral, quando o alimento coletado e armazenado por alguns indivíduos (e.g. forrageadores) é regurgitado e oferecido a outros indivíduos, ou anal, nos casos em que em vez de regurgitados, os alimentos são oferecidos através de fluidos anais. Além da função nutricional, a trofalaxia pode também estar envolvida com diversos outros comportamentos sociais, como o reconhecimento dos membros da colônia (Moreira, *et al.*, 2006).

impossibilitando a ingestão das hifas (Quinlan & Cherret, 1978; Eelen *et al.*, 2004). Entretanto, até o momento não se sabe se essas hifas não poderiam ser digeridas nessas cavidades e depois regurgitadas, o que em parte seria sustentado pelo fato de se encontrarem nas formigas uma alta atividade de N-acetil-glucosaminidase, que atua na degradação da parede celular de fungos (Richard *et al.*, 2005).

2.5.7. A influência do fungo no forrageamento

Diversos fatores parecem influenciar a escolha do material vegetal coletado pelas formigas, tais como as características morfológicas, as propriedades físicas e a composição química das folhas (Ridley *et al.*, 1996). Como esse material é em grande parte destinado ao cultivo do fungo, e sendo a relação entre fungo e formiga, como mencionado acima, permeada por diversos mecanismos de integração entre as partes (Mueller, 2002), então há de se esperar que as formigas, de alguma forma, evitem substratos que possam ser danosos ao fungo, ou em outros termos, é esperado que o fungo de alguma forma influencie a escolha das formigas (Knapp *et al.*, 1990; Ridley *et al.*, 1996).

Dentre todos os fatores que vêm sendo apontados como capazes de influenciar o forrageamento das formigas, a composição química das folhas é especialmente proeminente. As razões disso são claras: primeiro pela presença e/ou concentração de substâncias (como reservas) que podem tornar o substrato muito mais propício ao cultivo do fungo; segundo pela presença de substâncias que podem causar efeitos nocivos às formigas durante o corte do material e/ou ingestão da seiva; e terceiro pela presença de substâncias que podem ser nocivas ao fungo cultivado. Entre essas substâncias potencialmente danosas ao inseto ou ao fungo destacam-se aquelas tradicionalmente enquadradas dentro do grupo dos metabólitos secundários (Ridley *et al.*, 1996; Richard *et al.*, 2005). Ou seja, em um quadro geral o padrão de forrageamento das formigas visa a maximização dos nutrientes e a minimização de metabólitos secundários tóxicos às formigas ou ao fungo (Rockwood, 1977).

Diversos trabalhos têm testado metabólitos secundários e extratos vegetais a fim de avaliar seus potenciais efeitos na intermediação da relação planta-sauveiros (eg. Salatino *et al.*, 1998; Petacci, 2001; Fernades *et al.*, 2002; Souza-Silva *et al.*, 2005; Pagnocca *et al.*, 2006). Alguns desses trabalhos focaram-se nos efeitos da presença desses metabólitos ao forrageamento das formigas, utilizando-se de bioensaios com colônias mantidas em laboratório e encontraram resultados bastante interessantes. Contudo, os resultados encontrados por esses estudos são fortemente influenciados por variáveis que fogem ao escopo do desenho experimental, tais como a idade e o porte das colônias, os mecanismos de rejeições e a aprendizagem por experiência (Knapp *et al.*, 1990; Ridley *et al.*, 1996), o que traz incertezas às conclusões obtidas e dificulta muito a aplicação de métodos de análises estatísticas.

Para contornar o problema de influência de variáveis externas e obter dados mais confiáveis, um novo paradigma foi instaurado. Hoje, grande parte dos estudos que visam avaliar os efeitos de metabólitos secundários às colônias das formigas cortadeiras o faz utilizando as partes isoladas, cultivando o fungo *in vitro* e segregando as formigas operárias de seus formigueiros durante o experimento. O que propicia condições bem mais controláveis.

3. Os Glucosinolatos e as Brassicaceae

Brassicaceae, também conhecida como Cruciferae (Judd *et al.*, 1999), é uma família botânica de grande importância econômica por conter tanto espécies relacionadas à produção de alimentos e sementes oleaginosas⁷ (Rask *et al.*, 2000), como algumas espécies ornamentais e daninhas (Vaughn & Berhow, 2005). Dentre algumas das espécies mais importantes citam-se a raiz-forte (*Armoracia rusticana*), a canola⁸ (algumas variedades de *Brassica*), o nabo (*B. napus*⁹ var. *napobrassica*), o nabo-branco (*B. rapa* var. *rapa*), as mostardas branca e preta (*Sinapis*

⁷ Exemplos de Brassicaceae oleaginosas: *Brassica napus* (canola), *Brassica campestris* (couve chinesa) e *Sinapis alba* (mostarda branca) (Rask *et al.*, 2000).

⁸ Outras informações sobre a canola serão discutidas oportunamente.

⁹ *B. napus* é uma espécie anfidiplóide de *B. oleracea* e *B. campestris* (Rask *et al.*, 2000).

alba e *Brassica nigra*) e as bem populares couve, couve-flor, couve-de-bruxelas, repolho e brócolis, todas variedades de uma única espécie, *Brassica oleracea*.

É característico dos membros dessa família a presença de um grupo peculiar de metabólitos secundários chamados glucosinolatos (Fig. 4) (Koroleva *et al.*, 2000; Vaughn & Berhow, 2005; Halkier & Gershenzon, 2006), também conhecidos por alguns como glicosídeos do óleo da mostarda (Fahey *et al.*, 2001; Halkier & Gershenzon, 2006). Além das crucíferas, esses metabólitos também podem ser encontrados em alguns membros de outras famílias da mesma ordem e, completamente isolado, no gênero *Drypetes* de Euphorbiaceae, totalizando cerca de 500 espécies não-crucíferas capazes de sintetizar essa classe de metabólitos (Fahey *et al.*, 2001; Angiosperm Phylogeny Website).

Figure 4 - Estrutura química dos glucosinolatos. A estrutura básica é mostrada, assim como exemplos de alguns glucosinolatos específicos com as variações na cadeia lateral (Fonte: Halkier & Gershenzon, 2006).

Os glucosinolatos têm feito parte da história da humanidade já há milhares de anos, uma vez que conferem o sabor e odor característico dos vegetais que os contêm, como aqueles bem conhecidos e característicos do repolho (*B. oleraceae*), da mostarda (*S. alba*) e da raiz forte (*A. lapathifolia*) (Rask *et al.*, 2000; Halkier & Gershenzon, 2006). Contudo, nas últimas décadas, tem-se aumentado muito a atenção dada a essa classe de metabólitos, devido às descobertas de seus potenciais usos como biofumigantes, protetores de plantações e, mais recentemente, de seus efeitos como agentes protetores contra o câncer. Além disso, a presença de glucosinolatos em *Arabidopsis thaliana*, o modelo vegetal mais extensivamente estudado, ajudou a estimular pesquisas intensivas sobre essa classe pouco comum de metabólito (Andréasson *et al.*, 2001; Halkier & Gershenzon, 2006).

3.1. Estrutura e Composição

Os glucosinolatos são ânions orgânicos contendo glicose e enxofre formando um tioglicosídeo ligado a uma cadeia lateral (Grupo R) derivada de aminoácidos (Fig. 4) (Andréasson *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2004). Os mais de 120 glucosinolatos descritos compartilham uma estrutura química semelhante, formada por uma estrutura principal fixa composta de um resíduo de β -D-glucopiranosose ligado por um átomo de enxofre a um éster de sulfato de (Z)-N-hidroximino¹⁰, além do grupo R variável derivado de um dentre oito aminoácidos (Brown *et al.*, 2003; Halkier & Gershenzon, 2006).

Dado que a estrutura principal é comum a todos os glucosinolatos, esses metabólitos são classificados de acordo com o aminoácido precursor do seu grupo R e pelos tipos de modificações sofridas por esse grupo. Assim, aqueles que derivam de alanina, isoleucina, leucina, metionina ou valina são chamados glucosinolatos alifáticos, os derivados de fenilalanina ou tirosina são chamados de glucosinolatos aromáticos, e os derivados de triptofano são

¹⁰ Ou seja, os glucosinolatos são também 1-tio- β -D-glucosídeos aniônicos (Burmeister *et al.*, 1997), β -tioglicosídeos N-hidroxissulfatos ou S-glucopiranosil tioidroximatos (Fahey *et al.*, 2001).

chamados de indolglucosinolatos (Fahey *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2005; Halkier & Gershenzon, 2006). Na maioria dos glucosinolatos os grupos R são alongados por um ou mais metilenos, contudo, alongados ou não, estão sujeitos também a uma grande variedade de outras transformações, incluindo hidroxilação, metilação, desaturação, glicosilação e acilação (Rask *et al.*, 2000; Fahey *et al.*, 2001; Halkier & Gershenzon, 2006).

3.2. O mecanismo de ação

O mecanismo de ação dos glucosinolatos é muito semelhante ao dos glicosídeos cianogênicos, grupo de metabólitos com os quais os glucosinolatos dividem muitas particularidades (Rask *et al.*, 2000; Halkier & Gershenzon, 2006). Todas as plantas produtoras de glucosinolatos apresentam pelo menos uma enzima β -tioglucosídeo-glucohidrolase, conhecidas coletivamente como mirosinase (Husebye *et al.*, 2002; Halkier & Gershenzon, 2006). Quando os tecidos são lesados e as células vegetais rompidas, os glucosinolatos, até então mantidos separados da mirosinase, entram em contato com a enzima e são rapidamente hidrolisados através da clivagem da glicose na sua ligação com o átomo de enxofre. A aglicona resultante (uma tiorhidroximato-*O*-sulfonato), instável, reorganiza-se, com a perda do sulfato, dando origem a produtos voláteis pungentes, quimicamente reativos e com diversas atividades biológicas, entre os quais estão os isotiocianatos, nitrilas, tiocianatos, epitionitrilas e oxazolidina-2-tionas (Fig. 5). As proporções desses produtos variam dependendo do tipo de glucosinolato, da espécie de planta e das condições de hidrólise como temperatura, pH, concentração de íons metálicos, presença de proteínas e co-fatores (Kelly *et al.*, 1998; Rask *et al.*, 2000; Taiz & Zeiger, 2004; Vaughn & Berhow, 2005; Bones & Rossiter, 2006; Halkier & Gershenzon, 2006; Rungapamestry *et al.*, 2006).

Figura 5 - Esquema de hidrólise de glucosinolatos. Nessa reação também é liberado um grupo sulfato (HSO₄⁻). Os colchetes indicam os intermediários instáveis. ESP = proteína epitioespecificadora; R = cadeia lateral variável (Adaptado de Bones & Rossiter, 2006 e Halkier & Gershenzon, 2006).

A esses produtos de hidrólise atribui-se a maior parte das atividades biológicas relacionadas à presença dos glucosinolatos (Buskov *et al.*, 2002; Halkier & Gershenzon, 2006). Dentre essas atividades destacam-se os efeitos repelentes e tóxicos para herbívoros generalistas e efeitos na estimulação da herbivoria e da oviposição para insetos especialistas de Brassicaceae (Rask *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 2004; Halkier & Gershenzon, 2006).

3.3. Degradação enzimática

Os produtos de hidrólise de glucosinolatos mais comuns são os isotiocianatos (Fig. 5) (Halkier & Gershenzon, 2006). Todavia, como já citado, a proporção de cada produto de hidrólise depende das condições de hidrólise da espécie em questão.

Em algumas plantas a porção principal dos produtos de hidrólise é constituída por nitrilas (Halkier & Gershenzon, 2006). Originalmente se pensava que a produção das nitrilas era um processo não-enzimático, dependente apenas da presença de íons ferrosos (Fe^{+2}) e prótons (H^+). Entretanto, hoje se sabe que, com algumas poucas exceções (Zabala *et al.*, 2005), uma proteína epitioespecificadora (ESP) é a responsável pela formação de nitrilas (Bones & Rossiter, 2006).

Outra classe de produtos de hidrólise é a dos tiocianatos, cuja formação já foi tema para várias teorias. Porém, o que hoje se aceita, é que são formados por apenas três glucosinolatos: benzil-, alil- e 4-metilsulfinilbutil-glucosinolatos (Fig. 4), os quais, em comum, têm a capacidade de dar origem a carbocátions estáveis. Tal como a formação das nitrilas, a produção de tiocianatos pode estar associada a fatores protéicos específicos, mas que ainda não foram identificados (Bones & Rossiter, 2006; Halkier & Gershenzon, 2006).

No caso dos indolglucosinolatos, o padrão de formação de produtos de hidrólise é diferente de todos os demais glucosinolatos. Inicialmente, a catálise dos seus glucosinolatos precursores dá origem a nitrilas e isotiocianatos, produtos comuns à hidrólise dos demais glucosinolatos. Todavia, esses isotiocianatos são instáveis em pH neutro ou levemente ácido e por isso são espontaneamente convertidos a uma variedade de outros produtos menos comuns, incluindo metanóis indólicos, indol-2-carbinol, ácido ascórbico conjugado e misturas oligoméricas (Agerbirk *et al.*, 1998; Fahey *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2001; Bones & Rossiter, 2006; Halkier & Gershenzon, 2006).

Alguns glucosinolatos, quando possuem cadeia lateral com uma hidroxila em C-2, podem também dar origem a isoticionatos instáveis que ciclizam formando oxazolidina-2-tionas, uma classe de substância conhecida por levar ao bócio¹¹ (Halkier & Gershenzon, 2006).

3.4. Degradação não enzimática

Existem também formas de degradação não-enzimáticas dos glucosinolatos, as quais apesar de menos estudadas, são importantes quanto aos aspectos relativos ao sabor e às propriedades nutracêuticas atribuídas aos vegetais que contêm esses metabólitos. Dentre essas alternativas de degradação citam-se a degradação térmica (Oerlemans *et al.*, 2006) e as diversas formas de degradação química. Dessa última pode-se distinguir: redução (levando a formação de aminas), decomposição ácida (formando ácidos carboxílicos e hidroxilamônio) e hidrólise alcalina (resultando em uma grande gama de produtos) (Bones & Rossiter, 2006).

3.5. A mirosinase

Mirosinase (EC 3.2.1.147) (Bones & Rossiter, 2006) é o nome genérico de uma série de enzimas β -tioglucosidases capazes de hidrolisar os glucosinolatos (Rask, *et al.*, 2000; Tierens *et al.*, 2001; Bones & Rossiter, 2006) e que nas Brassicaceae são apontadas como uma família de isoenzimas (Agerbirk *et al.*, 1998; Tierens *et al.*, 2001). As mirosinases são membros da família Glicosídeo-hidrolases 1¹² (Rask *et al.*, 2000) e, assim como os demais membros dessa família, têm estrutura tridimensional e propriedades parecidas com as de certas *O*-glucosidases. Todavia, enquanto estas são extremamente comum na natureza, as mirosinases são as únicas *S*-glicosidases conhecidas (Burmeister *et al.*, 1997).

¹¹ A oxazolidina-2-tiona reduz a capacidade de absorção de iodo pela glândula tireóide. A diminuição de iodo na dieta associada ao consumo destas substâncias leva a um quadro de bócio. Quadro reversível quando se aumenta o nível de ingestão de iodo.

Retirado de "<http://pt.wikipedia.org/wiki/Glicosinolatos>"

¹² As Glicosil-hidrolases foram classificadas em mais de 57 famílias, com base na similaridade das seqüências de aminoácidos. As mirosinases pertencem à família 1, juntamente como um grande número de *O*-glucosidases (Burmeister *et al.*, 1997)

A mirosinase apresenta uma grande abundância de pontes salinas, pontes dissulfeto e pontes de hidrogênio. Habitualmente, a presença dessas ligações confere grande estabilidade às enzimas que as contêm (Burmeister *et al.*, 1997). No caso da mirosinase, essa presença pode estar relacionada à promoção da estabilidade no ambiente extracelular, no qual a mirosinase deve atuar hidrolisando os glucosinolatos após o dano tecidual (Halkier & Gershenzon, 2006).

Essas enzimas também são bastante glicosiladas, com mais de 20% de sua massa molecular composta por carboidratos (Rask *et al.*, 2000), o que pode servir para manter a estabilidade e solubilidade em ambiente com pouca água, como aquele encontrado nas sementes (Burmeister *et al.*, 1997); ou para proteger a enzima contra inativação por produtos reativos da hidrólise (Halkier & Gershenzon, 2006).

Como único grupo de β -tioglucosidases conhecido na natureza, os substratos dessas enzimas são quase exclusivamente os glucosinolatos, não sendo, *in vitro*, constatada nenhuma atividade em *O*-glicosídeos nem em outros *S*-glicosídeos (Halkier & Gershenzon, 2006). A maioria das mirosinases pode hidrolisar múltiplos glucosinolatos, graças à sua estrutura tridimensional com porções ("pockets") hidrofóbicas capazes de se ligar às cadeias laterais hidrofóbicas dos diferentes glucosinolatos (Burmeister *et al.*, 1997), todavia, existem alguns exemplos atípicos de mirosinases altamente específicas (Bernardi *et al.*, 2003).

Além das plantas, atividade de mirosinase foi encontrada em fungos, bactérias (Rakariyatham *et al.*, 2005), afídeos (Bridges *et al.*, 2002), e residentes intestinais humanos (Halkier & Gershenzon, 2006). No pulgão *Brevicoryne brassicae*, a mirosinase foi isolada e caracterizada, mostrando ser bastante distinta daquelas encontradas em plantas (Jones *et al.*, 2002).

Grandes variações na cinética da mirosinase foram encontradas dependendo da espécie vegetal da qual essa enzima foi isolada (Fahey *et al.*, 2001), o que não é inesperado, dado que a mirosinase é composta por uma grande variedade de isoformas codificadas por uma grande família multigênica (Halkier & Gershenzon, 2006). Em *Brassica napus* e *Sinapis alba*, por

exemplo, foram encontrados 20 ou mais genes codificadores dessa enzima (Rask *et al.*, 2000), as quais têm padrões de expressão distintos nos diferentes órgãos e estágios de desenvolvimento (Bones *et al.*, 1994).

3.5.1. Proteínas ligantes de Mirosinase

Algumas interações protéicas da mirosinase têm sido caracterizadas e são referidas como MBPs ("Myrosinase-binding proteins") e MyAPs ("Myrosinase-associated proteins") (Rask *et al.*, 2000; Eriksson *et al.*, 2002). Essas proteínas, ainda que presentes na fração apolar das folhas, mostram ter atividade sobre os glucosinolatos (Eriksson *et al.*, 2002; Martin & Müller, 2007), porém a relação dessas proteínas com a hidrólise dos glucosinolatos é ainda obscura. O que se sabe é que os níveis dessas proteínas aumentam quando as plantas são lesionadas ou submetidas a tratamento com jasmonato¹³. Por isso algumas hipóteses foram lançadas relacionando-as também com os mecanismos de defesa (Rask *et al.*, 2000; Andréasson *et al.*, 2001; Eriksson *et al.*, 2002; Martin & Müller, 2007).

Certas MBPs possuem propriedades semelhantes às lectinas e formam complexos de alto peso molecular com mirosinase que talvez possam ajudar a estabilizá-las. No entanto, plantas deficientes na produção dessas proteínas não mostraram mudança na atividade de mirosinase em suas sementes (Eriksson *et al.*, 2002). Especulasse que, devido às propriedades semelhantes às lectinas, as MBPs talvez possam se ligar a carboidratos do aparelho digestivo de insetos ou da superfície de fungos. Se isto for verdadeiro, as MBPs talvez tenham um efeito sinérgico, potencializando a ação dos produtos de degradação dos glucosinolatos na defesa contra pragas e patógenos (Rask *et al.*, 2000).

¹³ Jasmonato é uma molécula sinalizadora vegetal encontrada em lipídeos de membrana. Tem sido muito estudado por estar relacionado a muitas respostas de defesa vegetal e também por regular o crescimento. No nível molecular, ativa genes envolvidos na resposta a estresses bióticos e abióticos variados (Taiz & Zeiger, 2004). Os efeitos estimulativos do jasmonato são conhecidos para muitos metabólitos secundários (Brown *et al.*, 2003).

Já as MyAPs possuem propriedades semelhantes às das lipases, o que suscitou um possível papel na liberação do grupo acil dos glucosinolatos acilados, tornando-os assim disponíveis para hidrólise. No entanto, isto ainda não foi demonstrado (Rask *et al.*, 2000).

3.6. A localização da mirosinase e dos glucosinolatos e suas implicações estratégicas

A localização celular e subcelular da mirosinase e dos glucosinolatos é uma questão muito antiga e importante uma vez que se relaciona com a estratégia de ação desse sistema (Kelly *et al.*, 1998; Halkier & Gershenzon, 2006), a qual baseia-se na separação desses dois elementos na planta íntegra e na sua pronta reunião quando a planta é lesionada, a chamada "bomba de óleo da mostarda" de Lüthy & Mathile (1984, *apud* Halkier & Gershenzon, 2006).

Há mais de 100 anos, foi reportado que a mirosinase localizava-se em idioblastos¹⁴ contendo concentrações elevadas de proteínas vacuolares chamados de células de mirosina. Essas células foram encontradas em todos os órgãos das espécies de Brassicaceae (Kelly *et al.*, 1998; Andréasson *et al.*, 2001). A localização da mirosinase no interior dessas células foi posteriormente confirmada por estudos imunocitoquímicos¹⁵, métodos de hibridação *in situ* (Andréasson *et al.*, 2001) e, mais recentemente, pelo uso de linhagens de *Arabidopsis* contendo sistemas de fusão GUS com os promotores dos genes da mirosinase (Husebye *et al.*, 2002). Nesses estudos, a mirosinase foi encontrada em células idioblásticas do parênquima ao redor do floema de folhas, caules, inflorescências (mais freqüentemente em tecidos jovens) e também em células-guardas. Esses resultados quando tomados em conjunto com outros trabalhos que localizaram células-S (células contendo altas concentrações de enxofre e referidas como armazenadoras de glucosinolatos) próximas aos feixes floemáticos (Koroleva *et al.*, 2000) sugerem que a mirosinase e os glucosinolatos encontram-se espacialmente separados

¹⁴ Idioblastos são células especializadas que estão dispersas em baixa frequência e como células isoladas entre as células característica do tecido (Kelly *et al.*, 1998). Em geral, idioblastos estão envolvidos com diferentes funções em diferentes plantas.

¹⁵ Células de mirosina são caracterizadas anatomicamente pelo alto conteúdo protéico em seus vacúolos e, desta forma, propensas a reagir citoquimicamente com certos reagentes (Andréasson *et al.*, 2001).

em diferentes células (pelo menos em *Arabidopsis*), porém adjacentes. Esse arranjo facilitaria o contato entre as partes quando da lesão do tecido, permitindo também que os produtos de hidrólise tivessem uma rápida distribuição interna, através do floema, e externa, através das células-guarda (Andréasson *et al.*, 2001 Husebye *et al.*, 2002), nos casos em que esses produtos atuassem nos processos fisiológicos naturais (Bridges *et al.*, 2002; Husebye *et al.*, 2002). No entanto, essa organização parece variar um pouco de espécie para espécie, já que em *Brassica* spp. células de mirosina foram encontradas também nos tecidos fundamentais fora do sistema vascular (Andréasson *et al.*, 2001), e, em sementes e plântulas de *B. juncea*, glucosinolatos e mirosinase aparecem juntos em células de aleurona¹⁶ (Kelly *et al.*, 1998).

A localização conjunta de ambos componentes (glucosinolatos e mirosinase) em uma mesma célula significa que, em alguns casos, o sistema glucosinato-mirosinase pode ser separado espacialmente no nível subcelular. Neste caso, glucosinolatos e mirosinases estariam segregados em vacúolos (Andréasson *et al.*, 2001), ou então a mirosinase estaria presente no mesmo compartimento que os glucosinolatos, porém, inativada por altas quantidades de ascorbato (Halkier & Gershenzon, 2006).

Andréasson e colaboradores (2001) demonstraram que em *Arabidopsis* a mirosinase encontra-se presente nos vacúolos das células de mirosina e, no caso de *B. napus*, apresentam-se aparentemente como grãos que, na verdade, são conectados entre si por ligações muito tênues, constituindo um sistema reticular contínuo que ocupa grande parte do volume celular.

3.7. Fatores que influenciam o nível de mirosinase na planta

A despeito da variabilidade natural de cada espécie, a atividade de mirosinase, assim como os glucosinolatos, foi detectada em todas as plantas e tecidos de Brassicaceae analisados (Rask *et al.*, 2000). Contudo, existem algumas exceções específicas, por exemplo, as raízes e

¹⁶ As células de aleurona formam a camada celular externa do endosperma de algumas sementes. Aleurona (de grego *aleuron*, farinha) é uma proteína encontrada nessas células (Raven *et al.*, 2001) que durante a germinação das sementes é hidrolisada, levando a formação de aminoácidos.

sementes de *Arabidopsis*, nas quais, de acordo com estudos citoquímicos, imunohistoquímicos e sistemas de fusão GUS, não há expressão ou sinais dessa enzima (Andréasson *et al.*, 2001; Husebye *et al.*, 2002).

Diferentes espécies, cultivares, órgãos e estágios de desenvolvimento das plantas também apresentam diferentes níveis de atividade de mirosinase (Rask *et al.*, 2000). Alguns trabalhos mostram que os níveis de atividade dos promotores de mirosinase encontram-se especialmente elevados em folhas jovens. Essa alta atividade do promotor de mirosinase em tecidos jovens pode indicar, além das funções rotineiramente correlacionadas à proteção, outros papéis, tais como comunicação. Como já mencionado, a localização da mirosinase no floema e nas células-guarda seria estratégica para que os produtos de hidrólise dos glucosinolatos pudessem ser utilizados como fatores de comunicação internos (pela degradação e transporte no floema) e externos (por distribuição de produtos voláteis através dos estômatos) (Husebye *et al.*, 2002).

Estresses bióticos também são capazes de induzir aumento da mirosinase. Martin & Müller (2007) demonstraram que pressões herbivóricas podem induzir o aumento da atividade dessa enzima. Além disso, infecções por fungos também induzem localmente a expressão da mirosinase ao redor do sítio de infecção e, tanto MBPs quanto MyAPs são induzidas por metil-jasmonato (Rask *et al.*, 2000).

3.8. Fatores que influenciam os níveis de Glucosinolatos

Apesar do grande número de glucosinolatos conhecidos e de algumas espécies apresentarem mais de 23 diferentes tipos desses metabólitos, acredita-se que a maioria das plantas contenha um número limitado de glucosinolatos principais, usualmente seis ou menos, além de outros poucos presentes em quantidades mínimas (Rask *et al.*, 2000; Fahey *et al.*, 2001).

Esses metabólitos têm sido detectados em todos os órgãos das plantas que os contêm (Halkier & Du, 1997), os quais apresentam variações quantitativas e qualitativas em sua composição (Fahey *et al.*, 2001) determinadas pela dinâmica de três processos endógenos: biossíntese, transporte e degradação (Brown *et al.*, 2003). Esses processos são, por sua vez, reflexos tanto de fatores genéticos quanto ambientais, sendo que alguns tipos de glucosinolatos estão presentes constitutivamente e outros podem ser induzidos (Sarwar & Kirkegaard, 1998; Rask *et al.*, 2000; Halkier & Gershenzon, 2006; Velasco *et al.*, 2007). Dentre os fatores ambientais potencialmente capazes de levar a modificações no perfil de glucosinolatos citam-se os fatores climáticos (temperatura, estresse hídrico, comprimento do dia e intensidade de radiação), os edáficos (tipo de solo e nutrientes) e os bióticos (como pressão herbivórica e infecção por patógenos) (Sarwar & Kirkegaard, 1998; Brader *et al.*, 2001; van Dam *et al.*, 2005; Martin & Müller, 2007; Velasco *et al.*, 2007). Além disso, tratamentos com metil-jasmonato (MeJa), ácido jasmônico e ácido salicílico também são capazes de induzir modificações nos níveis desses metabólitos (Bodnaryk, 1994; Rask *et al.*, 2000; Brader *et al.*, 2001). Elevações nos níveis de glucosinolatos foram associadas à maior resistência a herbívoros, mesmo que especialistas (van Dam *et al.*, 2005; Martin & Müller, 2007). Além disso, as plantas respondem a danos causados por insetos acumulando sistematicamente níveis mais elevados de glucosinolatos, o que presumivelmente aumenta sua resistência a ataques subseqüentes (Halkier & Gershenzon, 2006).

Com relação aos fatores climáticos, nota-se que a temperatura (Velasco *et al.*, 2007) e intensidade de radiação luminosa (Sarwar & Kirkegaard, 1998) exercem influência positiva na concentração de glucosinolatos. Quanto ao estresse hídrico, não há consenso em estabelecer uma correlação negativa ou positiva com o conteúdo total de glucosinolatos, uma vez que existem trabalhos divergentes abordando essa questão (Rask *et al.*, 2000).

Rosa (1997) descreveu um ciclo circadiano de variação nos níveis de glucosinolatos em *Brassica oleraceae* var *capitata*, no qual o pico máximo de concentração era encontrado por

volta das 02:00h, seguido de uma queda ao longo do dia e um novo pico às 18:00h. Todavia esse trabalho deixa dúvidas sobre o procedimento de amostragem, o número amostral e sobre os dados utilizados nas análises estatísticas.

Na esfera ontogênica, tanto a concentração quanto a composição dos glucosinolatos variam em função do tecido e da etapa de desenvolvimento da planta (Sarwar & Kirkegaard, 1998; Brown *et al.*, 2003; Velasco *et al.*, 2007). Em *Arabidopsis* e algumas outras espécies estudadas, folhas jovens e tecidos reprodutivos tais como siliqua e sementes contêm concentrações mais elevadas de glucosinolatos, ao passo que as folhas senescentes da roseta contêm concentrações mais baixas. Concentrações intermediárias são encontradas nos órgãos principais, tais como as raízes, folhas e caules (Brown *et al.*, 2003; Halkier & Gershenzon, 2006).

Em *Brassica napus*, a concentração de glucosinolatos, principalmente os alifáticos, diminui drasticamente durante os 7 primeiros dias de embebição das sementes (padrão muito semelhante ao encontrado por Kelly e colaboradores (1998) para sementes de *Brassica juncea*). Concomitantemente, houve a síntese de indolglucosinolatos e também de um glucosinolato aromático, a gluconasturtina, que não estava presente nas sementes. Durante as fases que se seguem existe um aumento da concentração de glucosinolatos em todos os órgãos da planta, seguida de uma queda quando as folhas se encontram totalmente expandidas e uma nova queda durante floração (Rask *et al.*, 2000). Padrão semelhante foi observado em plantas de couve (*Brassica oleracea*), nas quais houve um aumento na concentração de glucosinolatos até o início da floração, quando então os maiores níveis desses metabólitos passam a ser detectados nos botões florais (Velasco *et al.*, 2007).

Os padrões acima citados sugerem a existência de um mecanismo de translocação dos glucosinolatos das partes vegetativas para as reprodutivas (Rask *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2003). Tamanha concentração de glucosinolatos nas sementes, flores e frutos é estratégica quanto à função de defesa desses metabólitos, visto que enfatiza a proteção aos órgãos que

mais contribuem para o "fitness" da planta (Brown *et al.*, 2003). Essa estratégia vai ao encontro do princípio que é expresso pela "Teoria de Defesa Otimizada", a qual diz que tecidos de "maior valor" para as plantas tendem a possuir mecanismos de defesa constitutivos melhor estabelecidos¹⁷ (Martin & Müller, 2007).

Ainda no campo das modificações regidas pelas dinâmicas ontogênicas, alguns autores (e.g. Rask *et al.*, 2000; Tierens *et al.*, 2001; Rangkadilok *et al.*, 2002; Halkier & Gershenzon, 2006; Martin & Müller, 2007) apontam a tendência de maior acúmulo de glucosinolatos e mirosinases em tecidos jovens. Porém isso não tem sido um consenso entre todos os autores (Velasco *et al.*, 2007).

Apesar de todo esse leque de influências às quais esses metabólitos estão sujeitos, tanto seus tipos principais quanto suas proporções são relativamente estáveis e previsíveis para uma espécie ou subespécie (Sarwar & Kirkegaard, 1998). Além disso, muitos estudos também sugerem que os indolglucosinolatos são especialmente susceptíveis a fatores ambientais, ou seja, respondem mais às induções, diferente dos glucosinolatos alifáticos que são menos variáveis (Bodnaryk, 1994; Brader *et al.*, 2001; Velasco *et al.*, 2007).

Contudo, a produção de glucosinolatos também representa um custo para a planta. Mauricio (1998) mostrou esse custo em termos da diminuição da produção de sementes em ambientes livres de herbívoros. No entanto, é difícil mensurar o custo exato de se produzir os glucosinolatos, uma vez que não se pode inferi-lo simplesmente por uma correlação negativa entre resistência e "fitness", pois além do custo poder manifestar-se de formas diferentes em

¹⁷ Os mecanismos de defesa vegetal podem ser divididos entre constitutivos (sempre presentes) e induzidos (que apenas surgem sob algum tipo de ataque). A lógica em se "optar" por um sistema de defesa cujos componentes só são sintetizados após a planta sofrer uma injúria (em linhas gerais, pois em alguns casos um sinal de risco eminente já induz esses mecanismos) reside na economia energética referente à produção das substâncias envolvidas. Esta energia, caso não haja necessidade de produzir essas substâncias, pode ser alocada para o crescimento e reprodução da planta. Ainda segundo a Teoria de Defesa Otimizada, órgãos de "menor valor" para a planta seriam, preferencialmente, protegidos por esses mecanismos induzidos (Martin & Muller, 2007), como forma de se evitar esse desvio energético do metabolismo primário. Os glucosinolatos, particularmente, podem ser interpretados como exemplos desses dois tipos de defesa, uma vez que sempre são encontrados nas plantas capazes de sintetizá-los, mas também podem ser induzidos.

ambientes diferentes, podem também ser diminuídos caso haja alguma função desconhecida do objeto ao qual é atribuído (Mauricio, 1998; Rask et al., 2000).

3.9. Correlações entre glucosinolatos e mirosinase

Dado o mecanismo catalítico e a atuação conjunta à qual frequentemente são associadas às funcionalidades do sistema glucosinato-mirosinase, há de se esperar que exista alguma correlação entre esses dois elementos. Contudo, no âmbito fenotípico, Martin & Müller (2007) e Li & Kushad (2004) não encontraram correlação direta entre atividade de mirosinase e conteúdo total de glucosinolatos, indicando que esses dois parâmetros são regulados independentemente, de formas temporal e localmente específicas.

Na esfera genotípica, os resultados também não são muito diferentes, uma vez que o número de tipos de glucosinolatos não parece estar correlacionado com o número de genes de mirosinase. *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, contém um número maior de diferentes glucosinolatos do que *Brassica napus*, porém tem de 6 a 7 vezes menos genes codificadores de mirosinase (Burmeister et al., 1997).

A diferença encontrada na composição de glucosinolatos entre sementes e tecidos vegetativos associada com a também diferente expressão de subfamílias de mirosinase, suscitou a análise da especificidade de diferentes mirosinases aos glucosinolatos. No entanto, poucas variações foram encontradas (Rask et al., 2000). Tal inespecificidade pode ser atribuída à estrutura tridimensional das mirosinases que contam com uma grande região ("pocket") hidrofóbica capaz de se ligar às cadeias laterais hidrofóbicas dos diferentes glucosinolatos (Burmeister et al., 1997).

Então por que múltiplos genes de mirosinase estão presentes em *B. napus*? Na verdade pouco se sabe a respeito dos padrões temporais e espaciais de expressão para todas as isoformas dessa enzima e tão pouco sobre quantos dos genes de mirosinase são funcionais e expressos. Uma explicação para a existência de múltiplas mirosinases seria tornar a planta

mais efetiva na produção de produtos tóxicos específicos a um inimigo em particular. Outra função para certas mirosinases (ou subfamílias de mirosinase) seria a degradação de glucosinolatos durante processos próprios das plantas, como o que talvez ocorra na germinação de semente, permitindo que os glucosinolatos exerçam as demais funções especuladas, tal como atuar como fonte de nitrogênio e enxofre ou sinalizador volátil, além de permitir seu transporte em formas derivadas (Rask *et al.*, 2000).

3.10. Transporte na planta

A alta concentração de glucosinolatos nas sementes não tem correspondência com o nível de biossíntese associado aos seus tecidos, o que sugere a presença de um sistema de importação (Du & Halkier, 1998). Além dessa, várias outras evidências indicam a existência de transporte a longa distância de glucosinolatos, tais como o fato dos glucosinolatos e desulfoglucosinolatos possuírem as propriedades físico-químicas requeridas para transporte pelo floema (Chen *et al.*, 2001), requisito essencial para o transporte a longas distâncias. Além disso, o exame dos exsudados do floema, obtidos após alimentação de pulgões, mostrou concentrações de até 10 mM de glucosinolatos na seiva elaborada (Merritt, 1996). Finalmente, o indício mais forte de transporte a longa distância de glucosinolatos vem de um estudo por Chen e colaboradores (2001) mostrando que em plantas de *Arabidopsis* que tiveram aplicação de *p*-hidroxibenzilglucosinolato marcado aplicado nas folhas de suas rosetas, esses metabólitos foram posteriormente encontrados em exsudados do floema e exportados para as sementes (Halkier & Gershenzon, 2006).

Muitas questões permanecem em aberto com relação ao transporte dos glucosinolatos, tais como as relacionadas às células-S, as quais se encontram distribuídas em diversos órgãos e possuem altas concentrações de glucosinolatos. Ainda não se sabe se essas células possuem maquinaria biossintética própria ou se importam esses glucosinolatos de outros tecidos (Halkier & Gershenzon, 2006). Outra controvérsia é a forma na qual os glucosinolatos são

transportados. Experiências com desulfoglucosinolatos radiomarcados aplicados nas paredes das siliquas e em plântulas mostraram que esses precursores são absorvidos e convertidos em glucosinolatos (Thangstad *et al.*, 2001), todavia, Chen e colaboradores (2001) isolaram glucosinolatos íntegros em exsudados floemáticos de folhas de *B. napus*.

3.11. Papeis biológicas dos glucosinolatos

O mecanismo que leva à degradação dos glucosinolatos quando os tecidos são lesados, e as atividades biológicas dos produtos resultantes dessa degradação sugerem que a função primordial destes metabólitos é a defesa contra herbívoros e patógenos (Rask *et al.*, 2000; Kliebenstein *et al.*, 2002; Halkier & Gershenzon, 2006). Contudo, a complexidade do sistema mirosinase/glucosinolatos sugere que esses metabólitos possuem outras funções nas plantas que os produzem (Kelly *et al.*, 1998).

Os metabólitos secundários são reconhecidamente capazes de atuar como mediadores das interações inseto-plantas, por exemplo, protegendo as plantas diretamente ou indiretamente de inimigos e/ou estimulando a alimentação e a oviposição de insetos. Essas interações podem potencialmente guiar mudanças evolutivas (Rask *et al.*, 2000; Tierens *et al.*, 2001), pois plantas de uma população contendo altas concentrações de metabólitos secundários podem estar mais protegidas contra o ataque de herbívoros, ganhando assim vantagens competitivas sobre aquelas com menores concentrações. Da mesma forma, os insetos que conseguirem superar essas defesas ganham uma vantagem competitiva em relação aos demais insetos não-adaptados, ainda mais se desenvolverem mecanismos de desintoxicação e armazenagem fazendo uso desses como compostos tóxicos contra seus próprios inimigos.

Nesse complexo cenário, sinais químicos podem tanto indicar a presença de compostos defensivos nas plantas, quanto facilitar aos insetos especializados encontrar suas hospedeiras (Rask *et al.*, 2000). Esse segundo cenário é muito bem ilustrado pelas Brassicaceae, que possuem muitos inimigos especializados, ou seja, insetos que atacam somente plantas dessa

família, sugerindo a existência de um fator especial que as distinga das demais plantas, no caso, os glucosinolatos (Andréasson *et al.*, 2001).

3.11.1. O sistema mirosinase-glucosinolatos na resposta da planta contra os generalistas e os especialistas

Numerosos estudos já demonstraram que os glucosinolatos possuem efeitos tais como toxicidade, inibição de crescimento ou da herbivoria a um vasto leque de inimigos potenciais de plantas, incluindo mamíferos, aves, insetos, moluscos, invertebrados aquáticos, nemátodes, bactéria, e fungos (Newman *et al.*, 1996; Busch *et al.*, 1994; Brader *et al.*, 2001; Tierens *et al.*, 2001; Aliabadi *et al.*, 2002; Buskov *et al.* 2002; Li & Kushad, 2004; Vlieger *et al.*, 2004). Quando os produtos de hidrólise foram testados isoladamente, os isotiocianatos revelaram-se freqüentemente responsáveis por esses efeitos (Tierens *et al.*, 2001; Buskov *et al.*, 2002). Infelizmente, pouco se sabe sobre o mecanismo específico pelo qual os isotiocianatos exercem sua toxicidade, com exceção de sua propensão de, *in vitro*, reagir com grupos amino sulfidríla das proteínas (Halkier & Gershenzon, 2006).

Além de proteger a planta diretamente, o sistema glucosinato-mirosinase pode proporcionar também um tipo de proteção indireta, uma vez que as substâncias voláteis produzidas durante sua hidrólise atuam na atração de inimigos naturais dos herbívoros (van Poecke *et al.*, 2003).

Todavia, assim como outras substâncias de defesa vegetal, os mesmos glucosinolatos que servem como venenos e dissuasores para muitos herbívoros também podem atrair herbívoros especializados (Rask *et al.*, 2000; Kliebenstein *et al.*, 2002). Muitos insetos herbívoros especializaram-se em plantas produtoras de glucosinolatos e, por vezes, usam os esses metabólitos ou seus subprodutos como sinais para alimentação, oviposição ou localização da planta hospedeira (Rask *et al.*, 2000; Husebye *et al.* 2002; Kliebenstein *et al.*, 2002; Renwick *et al.*, 2006; Velasco *et al.*, 2007).

Já há quase um século que os glucosinolatos vêm sendo apontados como fatores relacionados à atratividade de certas plantas a determinados herbívoros. Desde então, os glucosinolatos foram documentados como estimulantes da herbivoria para besouros, borboletas, mariposas e pulgões (Rask *et al.*, 2000). Além disso, efeitos na estimulação da oviposição também possuem fartos relatos, a exemplo de *Athalia rosae* (mosca do nabo) (Barker *et al.*, 2006) e *Plutella xylostella* (traça das crucíferas) (Renwick *et al.*, 2006) que tiveram sua oviposição estimulada por diversos produtos de hidrólise, e de *Delia radicum* (Marazzi & Städler, 2004) e *Delia floralis* (moscas da couve) (Simmonds *et al.*, 1994) que foram estimuladas pelos glucosinolatos intactos. Nessas últimas já se encontram bem caracterizadas as células quimiorreceptoras capazes de responder a graus variáveis dessas substâncias (Simmonds *et al.*, 1994; Marazzi & Städler, 2004; Barker *et al.*, 2006; Renwick *et al.*, 2006).

A maioria dos insetos especialistas de *Brassica* é atraída por alil-isotiocianatos, que são produzidos a partir da sinigrina (Rask *et al.*, 2000). No entanto, quando escolhem um local para oviposição, os insetos, através de seus quimiorreceptores, podem discriminar entre espécies de plantas que contenham glucosinolatos diferente (Simmonds *et al.*, 1994; Marazzi & Städler, 2004). Assim, os produtos voláteis da hidrólise de glucosinolatos aparentemente são os mediadores da atração à distância (Renwick *et al.*, 2006), ao passo que os glucosinolatos íntegros servem como sinais de contato para alimentação ou estímulo da oviposição (Halkier & Gershenzon, 2006).

Aliado à capacidade de distinguir os diferentes glucosinolatos, existem evidências que especialistas de Brassicaceae respondem de maneira diferenciada a glucosinolatos particulares (Simmonds *et al.*, 1994). Dessa forma, em alguns casos, nas interações inseto-planta, a composição do perfil de glucosinolatos nas plantas pode ser mais importante do que a concentração total desses metabólitos (Rask *et al.*, 2000; Marazzi & Städler, 2004).

Os herbívoros que se especializaram em plantas contendo glucosinolatos devem ter algum mecanismo para superar a toxicidade de seu hospedeiro (Halkier & Gershenzon, 2006). Recentemente, foi demonstrado que larvas de três espécies de lepidóptera empregam estratégias metabólicas diferentes para contornar a toxicidade dos glucosinolatos. No caso de *Plutella xylostella* a estratégia é empregar uma sulfatase endógena para clivar o resíduo de sulfato da estrutura principal do glucosinolato, gerando um produto que não pode mais ser hidrolisado pela mirosinase (Ratzka *et al.*, 2002). Já *Pieris brassicae* e *Pieris rapae*, as borboletas brancas da couve, possuem fatores protéicos de ação semelhante às ESP (e por isso chamados NSP - proteína nitríla especificadora), o que redireciona a catálise dos glucosinolatos para a formação de nitrilas em vez de isotiocianatos. Essas nitrilas são menos tóxicas e podem ser eliminadas com as fezes. Desta forma, essas três espécies evitam a formação de isotiocianatos, potencialmente tóxicos, em seus aparelhos digestivos (Wittstock *et al.*, 2004). Outros insetos especialistas que se alimentam de Brassicaceae podem ter mecanismos semelhantes (Halkier & Gershenzon, 2006).

Uma vez superada a toxicidade das defesas químicas de seus hospedeiros, alguns herbívoros acabaram por desenvolver mecanismos de seqüestro dessas substâncias e explorá-las para sua própria auto-proteção¹⁸ (Halkier & Gershenzon, 2006). Vários exemplos de seqüestro de glucosinolatos por insetos foram descritos recentemente, tais como o arlequim-da-mata, *Murgantia histrionica* (Hemiptera) (Aliabadi *et al.*, 2002); a mosca-de-serra, *Athalia rosae* (Hymenoptera) (Vlieger *et al.*, 2004; Martin & Müller, 2007); e os afídeos, *Brevicoryne brassicae* e *Lipophis erysimi* (Homoptera) (Bridges *et al.*, 2002). Em *M. histrionica* e *A. rosae*, o seqüestro de glucosinolato parece deter predadores como pássaros, vespas e formigas (Aliabadi *et al.*, 2002; Vlieger *et al.*, 2004). Contudo, a exploração de glucosinolatos por herbívoros para propósitos defensivos próprios é complicada pelo fato da mirosinase também ser necessária para a formação dos produtos de hidrólise tóxicos. Todavia, o pulgão

¹⁸ Ver abaixo: Paradoxo da Defesa Vegetal Letal.

Brevicoryne brassicae possui uma atividade de mirosinase própria bastante distinta daquelas encontradas em plantas (Jones *et al.*, 2002). Esta enzima aparentemente é armazenada em microcorpos cristalinos do tecido muscular do pulgão, separadamente dos glucosinolatos, e catalisa a formação de isotiocianatos a partir dos glucosinolatos seqüestrados quando o pulgão é ferido ou morto. Esses produtos, além da função defensiva, servem de alarme para os outros membros da colônia, tal qual ocorre com o pulgão-da-mostarda (*Liaphis erysimi*), que possui isotiocianatos como componentes do seu feromônio de alarme e também possui mirosinase no tecido muscular (Bridges *et al.*, 2002). Para os outros insetos que seqüestram glucosinolatos, não está claro se utilizam uma mirosinase endógena ou se contam apenas com a atividade de mirosinase presente normalmente no intestino de seus inimigos (Halkier & Gershenzon, 2006).

O seqüestro de glucosinolatos e seu uso em benefício da defesa do herbívoro, apesar de estender a importância ecológica destes compostos (Halkier & Gershenzon, 2006), podem ser interpretados como um impasse ao valor defensivo intrínseco desses metabólitos para as plantas que os produzem. Isso expõe um aspecto peculiar expresso pelo "Paradoxo da Defesa Vegetal Letal", que, como o nome já diz, é o contra-senso entre o dispêndio de se produzir uma substância para impedir agressões e os benefícios que ela traz ao agressor (Martin & Müller, 2007). Contudo, apesar dos inconvenientes que isso acarreta à parte vegetal envolvida, assim como a produção de glucosinolatos tem custos e benefícios para as plantas, o seqüestro de glucosinolatos pelos insetos também estão sujeitos a esses pesos¹⁹. Conseqüentemente, as plantas poderiam contornar esse impasse com uma produção maciça de glucosinolatos, de forma a tornar o seqüestro demasiadamente custoso, como mostram as evidências levantadas por Martin & Müller (2007) e van Dam e colaboradores (2005).

Todavia, nem todo herbívoro especializado nesse grupo de plantas utiliza os glucosinolatos para mediar a escolha de seus hospedeiros (Marazzi & Städler, 2004), bem

¹⁹ Os custos podem ser claramente percebidos quando se pensa nos custos inerentes à produção de todo o aparato enzimático, como aquele utilizado por *P. rapae* para contornar a toxicidade dos glucosinolatos (van Dam *et al.*, 2007).

como o sistema glucosinolato-mirosinase não é responsável por todas as interações entre Brassicaceae e insetos, já existindo diversos outros fatores químicos descritos como mediadores dessas interações (Chew, 1988).

3.11.2. O sistema mirosinase-glucosinolatos na resposta da planta contra patógenos

Embora haja menor documentação relativa às interações entre o sistema de glucosinolato-mirosinase e patógenos, há indicações que alguns aspectos são semelhantes àqueles encontrados nas interações com herbívoros (Rask *et al.*, 2000). Por exemplo, existem relatos da elevação na concentração de alguns glucosinolatos em plantas sob ataque de patógenos (Brader *et al.*, 2001). Além disso, em geral vários produtos de degradação de glucosinolatos apresentaram toxicidade *in vitro* a patógenos, um paralelo aos efeitos a herbívoros generalistas. Em contrapartida, algumas espécies como os fungos *Botrytis cinerea* e *Alternaria brassicicola*, não são inibidas *in vitro* pelo isotiocianato 4-metilsulfinilbutila²⁰, sugerindo algum tipo de adaptação que levou essas espécies a contornar a toxicidade dessa substância. Recentemente, em *Leptosphaeria maculans*, um patógeno de *Brassica*, identificou-se um gene codificador de uma cianeto hidratase que degrada nitrilas à formamidas (menos tóxicas), indicando uma adaptação dos patógenos às plantas que contêm glucosinolatos, analogamente ao que ocorre com os insetos especialistas (Rask *et al.*, 2000; Tierens *et al.*, 2001).

No entanto, alguns autores alertam que deve ser mantido em mente que toxicidade *in vitro* não necessariamente se traduz em toxicidade na planta, uma vez que mecanismos de tolerância podem ser ativados especificamente durante a patogênese (Tierens *et al.*, 2001; Halkier & Gershenzon, 2006). Além do mais, sabe-se que alguns desses patógenos, notavelmente os biotróficos como *Pseudomonas syringae* e *Peronospora parasitica*, causam

²⁰ Também conhecido como sulforafano, 4-metilsulfinilbutila é uma das duas principais fitoanticipinas hidrossolúveis em folhas de *Arabidopsis* (Tierens *et al.*, 2001)

pouco ou nenhum dano ao tecido durante a patogênese, evitando a liberação do glucosinolato e da mirosinase, e, conseqüentemente, a ativação desse sistema de defesa. O mesmo não é válido para outros patógenos tais como *Botrytis cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina* e *Erwinia carotovora* que causam necrose e maceração dos tecidos (Tierens *et al.*, 2001).

No solo, os glucosinolatos são liberados pela deterioração de órgãos de planta ou através de exsudados da raiz, e por isso podem ter efeitos importantes na comunidade da rizosfera. Exemplo disso é a predominância, na rizosfera de Brassicaceae, de espécies de fungos diferentes daquelas encontradas em outros locais, as quais são particularmente mais tolerantes a isotiocianatos (Ishimoto *et al.*, 2000). Certas espécies de ectomicorrizas também tiveram seu crescimento estimulado por produtos de hidrólise de indolglucosinolatos (Zeng *et al.*, 2003).

3.11.3. Outras funções

Embora o sistema de glucosinolato-mirosinase seja freqüentemente associado a mecanismos de defesa vegetal, modulando as interações da planta com pragas e doenças, atualmente, novas evidências têm revelado outros papéis para esse sistema (Kelly *et al.*, 1998; Rask *et al.*, 2000; Husebye *et al.*, 2002).

Indícios de um possível papel dos glucosinolatos no controle do crescimento e do desenvolvimento das plantas foram obtidos em experimentos com plantas silenciadas que perderam a capacidade de sintetizar glucosinolatos alifáticos e tiveram grandes alterações em seus fenótipos (Kelly *et al.*, 1998; Husebye *et al.*, 2002).

Além disso, como os glucosinolatos contêm enxofre e nitrogênio podem servir como estoques destes nutrientes (Bones *et al.*, 1994; Kelly *et al.*, 1998), de forma influenciar a capacidade das Brassicaceae em competir com outras plantas (Kim *et al.* 2002). Porém essa proposta é ainda muito questionada por alguns autores (Halkier & Gershenzon, 2006).

3.12. Importância para o homem

Há muito tempo os glucosinolatos marcam presença nas sociedades humanas dado a sua presença em vegetais largamente consumidos (e.g. repolho, couve-flor e brócolis) e em condimentos populares (e.g. wassabi, mostarda e raiz-forte), alimentos cujos sabores e odores são caracterizados principalmente pela presença dos isotiocianatos resultantes da hidrólise desses metabólitos. Entretanto, nos últimos 30 anos os glucosinolatos têm ganhado atenção ainda maior na agricultura devido à crescente importância da canola²¹ como fonte de sementes oleaginosas em áreas temperadas e subtropicais. A canola contém glucosinolatos em todos os órgãos e foi alvo de grandes esforços visando diminuir os níveis desses metabólitos em suas sementes. Isso permitiu que a torta resultante da extração do óleo, rica em proteínas, pudesse ser utilizada como suplemento em rações animais (Rask *et al.*, 2000; Halkier & Gershenzon, 2006), o que normalmente não seria possível porque um dos glucosinolatos predominante na canola, o 2-hidroxi-3-butenila (Griffiths *et al.*, 1998), quando hidrolisado forma uma oxazolidina-2-tiona, que, entre outros efeitos prejudiciais na nutrição animal, leva ao bócio (Fahey *et al.*, 2001; Halkier & Gershenzon, 2006). Existem também algumas tentativas de aumentar os níveis de glucosinolatos nas folhas, o que poderia prevenir danos por insetos e fungos. Porém, essa não é uma estratégia muito simples, visto que apesar de seus efeitos repelentes contra a maioria dos insetos, os glucosinolatos são fatores de atração para outros (Halkier & Gershenzon, 2006).

Trabalhos relatando bons resultados com o uso de cultivares de *Brassica* para "Biofumigação"²² também estão sendo publicados. Nesse método, a matéria vegetal é incorporada ao solo para suprimir patógenos, nemátodes e outras pragas, tendo despertado

²¹ O termo canola não se refere a uma espécie ou variedade. Canola são plantas melhoradas de colza desenvolvidas na década de 1970 no Canadá a partir de esforços para diminuir a quantidade de glucosinolatos e ácido erúico no óleo de Colza (Busch *et al.*, 1994). Seu nome deriva da contração de "Canadian Oil" ou talvez "Canadian Oil Low Acid". Pelo menos 3 espécies de *Brassica* : *B. napus*, *B. juncea* e *B. rapa* são referidas como canola. (Mais informações em: www.saskcanola.com, <http://www.canola-council.org/portal.html> e Fahey *et al.* (2001)).

²² Biofumigação é um termo recentemente usado para descrever a supressão de pragas e patógenos presentes no solo por meio de manejo e rotação de cultura de *Brassica* (Sarwar & Kirkegaard, 1998).

muito interesse devido às restrições, cada vez mais severas, ao uso de muitos pesticidas e fumigantes sintéticos. Admite-se que os agentes ativos nesse tratamento alternativo são os produtos de hidrólise dos glucosinolatos (Sarwar & Kirkegaard, 1998).

Outra razão para a crescente atenção dada aos glucosinolatos nos últimos anos foi a identificação, na década passada, de que alguns glucosinolatos, quando presentes na alimentação, atuavam como agentes na prevenção contra o câncer em uma série de modelos animais. Essa propriedade deve-se à habilidade de certos produtos de hidrólise em induzir enzimas do metabolismo xenobiótico fase II, tais como glutathione S-transferase, quinona redutase, NADPH redutase e glucuronil transferase, que estão relacionadas, entre outras funções, à apoptose de células cancerosas; e por inibir as enzimas fase I²³ (do citocromo P450), as quais estão relacionadas com a ativação de alguns carcinogênicos (Shikita *et al.*, 1999; Li & Kushad, 2004; Halkier & Gershenzon, 2006). O indol-3-carbinol, derivado do glucosinolato glucobrassicina presente na couve, apresentou também efeitos sobre o desenvolvimento do câncer, bloqueando a progressão de ciclo celular, desencadeando apoptose, reduzindo a metástase e a invasão do tumor e bloqueando os receptores de estrógeno nos cânceres do tipo estrógeno dependentes²⁴ (Meng *et al.*, 2001). Além disso, isotiocianatos derivados da sinigrina mostraram efeitos na redução do nível de colesterol em camundongos (Balasinska *et al.*, 2005).

O sulforafano, um isotiocionato derivado do glucosinolato 4-metilsulfinilbutila encontrado em brócolis, além de bloquear o ciclo celular e promover apoptose, mostra potencial para o tratamento de câncer de estômago e gastrite provocada por *Helicobacter pylori* (Fahey *et al.* 2002). Esses resultados têm motivado estudos visando aumentar conteúdo de

²³ Essas enzimas também são conhecidas como enzimas de detoxificação fase I e fase II (Velasco *et al.*, 2007).

²⁴ O hormônio estrógeno é reconhecidamente responsável pela regulação da proliferação de alguns tecidos. Tal regulação tem a participação de receptores de estrógeno, os quais interagem com o gene *BRCA1* (*breast cancer susceptibility gene 1*), que está relacionado à cânceres como o de mama, próstata e cervical (Meng *et al.*, 2001)

sulforafana em brócolis e, por consequência, os benefícios à saúde promovidos por esse vegetal (Halkier & Gershenzon, 2006).

Todavia, como brevemente mencionado acima, para certos produtos de degradação dos glucosinolatos documenta-se algumas propriedades antinutricionais, sendo a goitrina (5-vinila oxazolidina-2-tiona) e os tiocinatos, apontados como os principais fatores antinutricionais (Velasco *et al.*, 2007). As oxazolidina-2-tionas são derivadas de β -hidroxialcenila glucosinolatos que quando hidrolisados, geram β -hidroxialcenila isotiocianatos, os quais ciclizam gerando essas substâncias que são potencialmente bociogênicas (Fahey *et al.*, 2001; Halkier & Gershenzon, 2006). No caso particular da goitrina documenta-se uma atividade inibidora da tireóide peroxidase, o que impede a oxidação de iodeto a iodo para subsequente iodação do resíduo de tirosina durante a biossíntese dos hormônios tireoidianos T_3 a T_4 (Fahey *et al.*, 2001; Bones & Rossiter, 2006) - apesar de seus efeitos na tireóide, a goitrina pode sofrer reações de nitrosação que talvez tenham implicações benéficas para saúde humana quando os níveis de nitrato na água são altos. Já os ânions de tiocinatos atuam como inibidores competitivos de iodeto e assim impedem a absorção deste pela tireóide. Os potenciais efeitos negativos dos glucosinolatos exigem mais exames, uma vez que o tema foi pouco pesquisado nos últimos anos (Bones & Rossiter, 2006). Todavia, vegetais tradicionalmente consumidos, como *Brassica oleraceae*, contêm quantidades muito baixas de protogoitrina, de modo a não haver riscos aparentes associados à ingestão desses vegetais (Velasco *et al.*, 2007).

3.13. Taxonomia

Como mencionado acima, os glucosinolatos possuem uma distribuição bastante restrita à ordem Capparales sendo o gênero *Drypetes* (Euphorbiaceae) a única exceção. Além disso, apenas cerca de 5.000 espécies já foram descritas como capazes de sintetizar essa classe de metabólitos (Fahey *et al.*, 1997). Essas características atraíram muita atenção por parte dos taxonomistas e várias interpretações diferentes foram publicadas. Os esquemas propostos por

Cronquist sugerem múltiplas origens para os glucosinolatos, os quais teriam surgido por convergência em várias ordens. Já Dahlgren reuniu a maioria dos táxons produtores de glucosinolatos numa única grande ordem, Capparales, prevendo assim uma origem comum para as plantas que sintetizam esses metabólitos (Rodman *et al.*, 1996; Rask *et al.*, 2000).

Estudos subseqüentes baseados em análises cladísticas, utilizando um grande número de caracteres morfológicos e seqüências de marcadores moleculares, apoiaram a proposta de Dahlgren (Rodman *et al.*, 1996), demonstrando a existência de um grande clado de plantas portadoras de glucosinolatos, e de um clado menor (um "outlier filogenético") formado pelo gênero *Drypetes* (Euphorbiaceae). Assim, sugere-se que o sistema glucosinato-mirosinase tenha se desenvolvido convergentemente e duas vezes durante evolução de plantas, provavelmente a partir do sistema glicosídeos cianogênicos, mais antigo e amplamente distribuído (Rodman *et al.*, 1996; Rask *et al.*, 2000).

Existem também alguns indícios que os glucosinolatos poderiam ajudar na delimitação de alguns grupos internos dentro desse grande clado de plantas. Os metil-glucosinolatos, por exemplo, não são encontrados em Brassicaceae, mas são componentes distintos de Capparaceae, família próxima; glucosinolatos com grupos R glicosilados aparecem limitados a Resedaceae e Moringaceae²⁵ (Fahey *et al.*, 2001).

3.14. A sinigrina e as *Brassica oleraceae*

Quase tanto quanto *Arabidopsis*, o gênero *Brassica* é um dos modelos vegetais mais utilizado em trabalhos com glucosinolatos (Fahey *et al.*, 2001). Esse gênero abrange um grande número de plantas cultivadas (Fahey *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002), muitas das quais são hortaliças importantes em sistemas tradicionais de cultivo, particularmente, *Brassica*

²⁵ Esses glucosinolatos possuem uma ramnose ou uma arabinose ligadas ao anel aromáticos de glucosinolatos benzil-glucosinolatos (Fahey *et al.*, 2001).

oleraceae (Velasco *et al.*, 2007) que possui um grande número de variedades comumente cultivadas, como couve, repolho, couve-de-bruxelas, couve flor, brócolis, entre outras.

São de *Brassica* as classes de glucosinatos mais intensivamente estudadas (Fahey *et al.*, 2001), sendo comumente encontrados cerca de 20 glucosinatos nesse gênero (Sarwar & Kirkegaard, 1998). Velasco e colaboradores (2007) encontraram em couve a predominância de glucosinatos alifáticos (78%), seguida de indólicos (24,4%) e por último os benzilglucosinatos (1,6%), padrão esse bastante conservado entre as variedades de *Brassica oleraceae*.

A sinigrina (2-propenil- ou alil-glicosinolato), um glucosinolato alifático derivado de metionina, é freqüentemente o glucosinolato predominante em brássicas (Rosa *et al.*, 1997; Andréasson *et al.*, 2001; Buskov *et al.*, 2002; Li & Kushad, 2004; Velasco *et al.*, 2007). Trata-se de uma substância bastante estudada devido às suas proeminentes propriedades anticancerígenas (Rangkadilok *et al.*, 2002; Velasco *et al.*, 2007), além de ser um dos primeiros glucosinatos isolados, já na década de 1830 (tendo seu nome popular derivado da planta na qual se deu a descoberta, *Brassica nigra*) (Fahey *et al.*, 2001) e o único glucosinolato identificado imunohistoquimicamente (Kelly *et al.*, 1998; Andréasson *et al.*, 2001). Também é um dos poucos que já se encontra disponível comercialmente (Brown *et al.*, 2003) dada a relativa facilidade com a qual se consegue obtê-lo puro e cristalizado. Dentre os glucosinatos para os quais existem métodos de síntese, é um dos poucos cujo processo já atinge a escala de gramas (Fahey *et al.*, 2001), o que possibilita seu uso em experimentos que requerem quantidades maiores de metabólitos, como aqueles sobre a modulação das interações inseto-planta (Simmonds *et al.*, 1994).

4. Bibliografia

- Abreu, R.L.S.; Fonseca, C.R.V. & Marques, E.N. 1997. Análise das Principais Espécies de Scolytidae Coletadas em Floresta Primária no Estado do Amazonas. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 26(3):527-535.
- Aliabadi, A.; Renwick, J.A.A.; & Whitman, D.W. 2002. Sequestration of glucosinolates by harlequin bug *Murgantia histrionica*. *Journal of Chemical Ecology*, 28(9):1749-1762.
- Agerbirk, N.; Olsen, C.E. & Sørensen, H. 1998. Initial and final products, nitriles, and ascorbigens produced in myrosinase-catalyzed hydrolysis of indole glucosinolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4):1563-1571
- Andréasson, E.; Jørgensen, L.B.; Höglund, A.S.; Rask, L. & Meijer, J. 2001. Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 127:1750-1763.
- Angiosperm Phylogeny Website. Banco de dados mantido pelo Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acessado em 09/08/2007.
- Autuori, M. 1941. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. - Hymenoptera-Formicidae). I. Evolução do saueiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). *Arquivos do Instituto Biológico*, 12:197-228.
- Autuori, M. 1942. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. - Hymenoptera-Formicidae). III - Escavação de um saueiro (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). *Arquivos do Instituto Biológico*, 13:137-148.
- Autuori, M. 1947. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. - Hymenoptera-Formicidae). IV - O saueiro depois da primeira revoadada (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). *Arquivos do Instituto Biológico*, 18:39-70.
- Bacci, M.; Anversa, M.M. & Pagnocca, F.C. 1995. Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus culture by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67:385-386.
- Balasinska, B.; Nicolle, C.; Gueux, E.; Majewska, A.; Demigne, C. & Mazur, A. 2005. Dietary Horseradish Reduces Plasma Cholesterol in Mice. *Nutrition Research*, 25:937-945.
- Barker, A.M.; Molotsane, R.; Müller, C.; Schaffner U. & Städler, E. 2006. Chemosensory and behavioural responses of the turnip sawfly, *Athalia rosae*, to glucosinolates and isothiocyanates. *Chemoecology* 16:209-218.
- Bass, M. & Cherrett, J.M. 1995. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Physiological Entomology*, 20(1):1-6.
- Beattie, A.J. & Hughes, L. 2002. *Ant-plant interactions*. In: Herrera, C.M. & Pellmyr, O. 2002. *Plant-animal interactions: an evolutionary approach*. Blackwell Science, Oxford. Pág. 211-235.

- Begon, M.; Harper, J.L. & Townsend, C.R. 1996. *Ecology: individuals, populations and communities*. 3^o ed. Blackwell Science. Oxford.
- Bernardi, R.; Finiguerra, M.G.; Rossi, A.A. & Palmieri, S. 2003. Isolation and biochemical characterization of a basic myrosinase from ripe *Crambe abyssinica* seeds, highly specific for *epi*-progoitrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:2737-2744.
- Berti Filho, E. 1979. Coleópteros de importância florestal: 1 - *Scolytida*. *Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais*, 19:39-43.
- Bodnaryk, R.P. 1994. Potent Effect of Jasmonates on Indole Glucosinolates in Oilseed Rape and Mustard. *Phytochemistry*, 35(2):301-305.
- Bolton, B. 1995. *A new general catalogue of the ants of the world*. Harvard Univ Press. Cambridge.
- Bones, A.M.; Visvalingam, S.; Thangstad, O.P. 1994 Sulfate can induce differential expression of thioglucoside glucohydrolases (myrosinases). *Planta*, 193(4):558-566.
- Bones, A.M. & Rossiter, J.T. 2006. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolatos. *Phytochemistry*, 67:1053-1067.
- Brader, G.; Tas, E. & Palva, E.T. 2001. Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiology*, 126:849-860.
- Brandão, C.R.F. & Mayhé-Nunes, A.J. 2001. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 38:639-665.
- Bridges, M.; Jones, A.M.E.; Bones, A.M.; Hodgson, C.; Cole, R.; Bartlet, E.; Wallsgrove, R.; Karapapa, V.K. ; Watts, N. & Rossiter J.T. 2002. Spatial organization of the glucosinolate-myrosinase system in brassica specialist aphids is similar to that of the host plant. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 269(1487):187-191.
- Brown, P.D.; Tokuhisa, J.G.; Reichelt, M. & Gershenzon, J. 2003. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 62:471-481.
- Brown, M.J.F.; Bot, A.N.M. & Hart, A.G. 2006. Mortality rates and division of labor in the leaf-cutting ant, *Atta colombica*. *Journal of Insect Science*, 6: Art. N° 18.
- Bueno, O.C.; Hebling-Beraldo, M.J.A.; Silva, O.A.; Pagnocca, F.; Fernandez, J.B. & Viera, P.C. 1990. *Toxic effect of plant on leaf-cutting ants and their symbiotic fungus*. In: Vander Meer, R.K.; Jaffé, K. & Cedeno, A. *Applied Myrmecology: a World Perspective*. Westview Press. Boulder. pag. 420-426.
- Burmeister, W.P.; Cottaz, S.; Driguez, H.; Iori, R.; Palmieri, S. & Henrissat, B. 1997. The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure*, 5(5):663-676.

- Busch, L.; Gunter, V.; Mentele, T.; Tachikawa, M. & Tanaka, K. 1994. Socializing nature - technoscience and the transformation of rapeseed into canola. *Crop Science*, 34(3):607-614.
- Buskov, S.; Serra, B.; Rosa, E.; Sørensen, H. & Sørensen, J.C. 2002. Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* Cv. Woll). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:690-695.
- Chapela, I.H.; Rehner, S.A.; Schultz, T.R. & Mueller, U.G. 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science*, 266:1691-1694.
- Chew F.S. 1988. *Searching for defensive chemistry in the Cruciferae, or do glucosinolates always control interactions of Cruciferae with their potential herbivores and symbionts? No!* In: Spencer, K.C. 1988. *Chemical Mediation of Coevolution*. Academic Press. San Diego. pp. 81-112.
- Chen, S.; Petersen, B.L.; Olsen, C.E.; Schulz, A. & Halkier, B.A. 2001. Long-distance phloem transport of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127:194-201.
- Currie, C.R.; Scott, J.A.; Summerbell, R.C. & Malloch, D. 1999a. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, 398:701-704.
- Currie, C.R.; Mueller, U.G. & Malloch, D. 1999b. The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(14):7998-8002.
- Currie, C.R. 2001. A Community of Ants, Fungi and Bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, 55:357-380.
- Currie, C.R. 2002. *Ants, Agriculture, And Antibiotics*. In: Seckbach, J. 2002. *Symbiosis: mechanisms and model system*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston.
- Currie, C.R.; Scott, J.A.; Summerbell, R.C. & Malloch, D. 2003. Corrigenda de "Currie e colaboradores 1999a (Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites)". *Nature*, 423:461.
- Della Lucia, T.M.C. & Moreira, D.D.O. 1993. Caracterização dos ninhos. In Della Lucia, T.M.C. (ed.). *Formigas Cortadeiras*. Editora Follha de Viçosa, Viçosa. pp. 32-42.
- Della Lucia, T.M.C.; Fowler, H.G. & Moreira, D.D.O. 1993. Espécies de formigas cortadeiras no Brasil. In Della Lucia, T.M.C. (ed.). *Formigas Cortadeiras*. Editora Follha de Viçosa, Viçosa.
- Du, L. & Halkier, B.A. 1998. Biosynthesis of glucosinolates in the developing silique walls and seeds of *Sinapis Alba*. *Phytochemistry*, 48(7):1145-1150.
- Eelen, D.; Børgesen, L.W. & Billen, J. 2004. Morphology of a novel glandular epithelium lining the infrabuccal cavity in the ant *Monomorium pharaonis* (Hymenoptera, Formicidae). *Arthropod Structure & Development*, 33:471-475.
- Eriksson, S.; Andréasson, E.; Ekblom, B.; Granér, G.; Pontoppidan, B.; Taipalensuu, J.; Zhang, J.; Rask, L. & Meijer, J. 2002. Complex formation of myrosinase isoenzymes in oilseed rape seeds are dependent on the presence of myrosinase-binding proteins. *Plant Physiology*, 129:1-8.

- Fahey, J.W., Zhang, Y. & Talalay, P. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 94(19):10367-10372.
- Fahey, J.W.; Zalcman, A.T. & Paul Talalay. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56:5-51.
- Fahey, J.W.; Haristoy, X.; Dolan, P.M.; Kensler, T.W.; Scholtus, I.; Stephenson, K.K.; Talalay, P. & Lozniewski, A. 2002. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 99(11):7610-7615.
- Fernandes, J.B.; David, V.; Facchini, P.H.; Silva, M.F.G.F.; Rodrigues Filho, E.; Vieira, P.C.; Galhiane, M.S.; Pagnocca, F.C.; Bueno, O.C.; Hebling, M.J.; Victor, S.R. & Santos, A.M.R. 2002. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbionte. *Química Nova*, 25:1091-1095.
- Fernández-Marín, H.; Zimmerman, J.K.; Rehner, S.A. & Wcislo, W.T. 2006. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proceedings of the Royal Society B- Biological Sciences*, 273(1594):1689-1695.
- Fisher, P.J.; Stradling, D.J.; Sutton, B.C. & Petrini, L.E. 1995. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. *Mycological Research*, 100:541-46.
- Fowler H.G. 1988. Organização e Regulação social em Formigas. *Etologia*, 5:235-247.
- Fraenkel, G.S. 1959. The raison d'être of secondary plant substances. *Science* 129:1466-1470.
- Garcia, M.A. 1997. *Interações Ecológicas e Biodiversidade*. In: Araújo, M.C.P.; Coelho, G.G. & Medeiros, L. 1997. *Interações ecológicas e biodiversidade*. Unijui. Ijuí.
- Gerardo, N.M.; Jacobs, S.R.; Currie, C.R. & Mueller, U.G. 2006. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. *Plos Biology*, 4(8):1358-1363.
- Gimenes, L.J. 2007. *A tribo Leucocoprineae (Agaricaceae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil*. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo.
- Green, A.M.; Mueller, U.G. & Adams, R.M.M. 2002. Extensive exchange of fungal cultivars between sympatric species of fungus-growing ants. *Molecular Ecology*, 11:191-195.
- Griffiths, D.W.; Birch, A.N.E. & Hillman, J.R. 1998. Antinutritional compounds in the *Brassicaceae*: analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73(1):1-18.
- Guo, W.; Yuan, L.; Chen, P. & Guo, J. 2005. Determination of glucosinolates in rapeseeds by liquid chromatography - electrospray mass spectrometry. *Analytical Letters*, 38:343-351.
- Halkier, B.A. & Du, L.C. 1997. The biosynthesis of glucosinolates. *Trends in Plant Science*, 2(11):425-431.

- Halkier, B.A. & Gershenzon, J. 2006. Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 57:303-333.
- Harborne, J.B. 2001. Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Product Reports*, 18(4):361-379.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. 1990. The ants. Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge.
- Husebye, H.; Chadchawan, S.; Winge, P.; Thangstad, O.P. & Bones, A.M. 2002. Guard Cell- and Phloem Idioblast-Specific Expression of Thioglucoside Glucohydrolase 1 (Myrosinase) in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 128:1180-1188.
- Index Fungorum. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>>. Acessado em (acessado em 16/06/2007).
- Ishimoto, H.; Fukushi, Y.; Yoshida, T. & Tahara, S. 2000. *Rhizopus* and *Fusarium* are selected as dominant fungal genera in rhizospheres of Brassicaceae. *Journal of Chemical Ecology*, 26(10):2387-2399.
- Jones, A.M.E.; Winge, P.; Bones, A.M.; Cole, R. & Rossiter J.T. 2002. Characterization and evolution of a myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32:275-284.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; & Stevens, P.F. 1999. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates. Sunderland.
- Kelly, P.J.; Bones, A. & Rossiter, J.T. 1998. Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrinin seedlings of *Brassica juncea*. *Planta*, 206:370-377.
- Kim, S.J.; Matsuo, T.; Watanabe, M. & Watanabe, Y. 2002. Effect of nitrogen and sulphur application on the glucosinolate content in vegetable turnip rape (*Brassica rapa* L.). *Soil Science and Plant Nutrition*, 48(1):43-49.
- Kliebenstein, D.; Pedersen, D.; Barker, B. & Mitchell-Olds, T. 2002. Comparative analysis of quantitative trait loci controlling glucosinolates, myrosinase and insect resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 161:325-332.
- Knapp, J.J.; Howse, P.E. & Kermarrec, A. 1990. *Factors controlling foraging patterns in the leaf-cutting ant Acromyrmex octospinosus (Reich)*. In: Vander Meer, R.K.; Jaffé, K. & Cedeno, A. *Applied Myrmecology: a World Perspective*. Westview Press. Boulder. pág. 382-409.
- Koroleva, O.A.; Davies, A.; Deeken, R.; Thorpe, M.R.; Tomos, A.D. & Hedrich, R. 2000. Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk. *Plant Physiology*, 124:599-608.
- Li, X. & Kushad, M.M. 2004. Correlation of glucosinolate content to myrosinase activity in horseradish (*Armoracia rusticana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:6950-6955.
- Loureiro, E.S. & Monteiro, A.C. 2004. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*, patogênicos para operárias de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, 71(1):35:40.

- Marazzi, C. & Städler, E. 2004. *Arabidopsis thaliana* leaf-surface extracts are detected by the cabbage root fly (*Delia radicum*) and stimulate oviposition. *Physiological Entomology*, 29:192-198.
- Marinho, C.G.S.; Della Lucia, T.M.C. & Picango, M.C. 2006. Fatores que dificultam o controle das formigas cortadeiras. *Bahia Agrícola*, 7(2):18-21.
- Martin, M.M. 1992. The evolution of insect-fungus associations - from contact stable symbiosis. *American Zoologist*, 32(4):593-605.
- Martin, N. & Müller, C. 2007. Induction of plant responses by a sequestering insect: Relationship of glucosinolate concentration and myrosinase activity. *Basic and Applied Ecology*, 8:13-25.
- Mauricio, R. 1998. Cost of resistance to natural enemies in field populations of the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *The American Naturalist*, 151(1):20-28.
- Mehdiabadi, N.J.; Hughes, B. & Mueller, U.G. 2006. Cooperation, conflict, and coevolution in the attine ant-fungus symbiosis. *Behavioral Ecology*, 17(2):291-296.
- Meng, Q.; Yuan, F.; Goldberg, I.D.; Rosen, E.M.; Auborn, K. & Fan, S. 2001. Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen receptor- α signaling in human tumor cells. *Journal of Nutrition*, 130(12):2927-2931.
- Merritt, S.Z. 1996. within-plant variation in concentrations of Amino acids, sugar, and sinigrin in phloem sap of black mustard, *Brassica nigra* (L.) Koch (Cruciferae). *Journal of Chemical Ecology*, 22(6):1133-1145.
- Mimura, M.R.M. 2001. *Influência das ceras Epicuticulares foliares de espécies do cerrado na atividade forrageira da saúva (Atta sexdens) L..* Tese de Doutorado apresentada no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Mohali, S. 1998. Ultrastructural and morphological study of the mutualistic fungus of the ant *Atta cephalotes*. *Revista de Ecología Latino Americana*, 5(3):1-6.
- Moreira, D.D.O.; Erthal Jr., M.; Carrera, M.P.; Silva, C.P. & Samuels, R.I. 2006. Oral trophallaxis in adult leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*, 53:345-348.
- Moser, J.C. 2006. Complete Excavation and Mapping of a Texas Leafcutting Ant Nest. *Annals of The Entomological Society of America*, 99(5):891-897.
- Mueller, U.G. 2002. Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. *The American Naturalist*, 160(Supplement):67-98.
- Mueller, U.G.; Gerardo, N.M.; Aanen, D.K.; Six, D.L. & Schultz, T.R. 2005. The evolution of agriculture in insects. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 36:563-95.
- Munkacsi, A.B.; Pan, J.J.; Villesen, P.; Mueller, U.G.; Blackwell, M. & McLaughlin, D.J. 2004. Convergent coevolution in the domestication of coral mushrooms by fungus-growing ants. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 271(1550):1777-1782.

- Nascimento, R.R.D.; Schoeters, E.; Morgan, E.D.; Billen, J. & Stradling, D.J. 1996. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes* and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera:Formicidae). *Journal of Chemical Ecology*, 22(5):987-1000.
- Newman, R.M.; Kerfoot, W.C. & Hanscom, Z. 1996. Watercress allelochemical defends high-nitrogen foliage against consumption: Effects on freshwater invertebrate herbivores. *Ecology*, 77(8):2312-2323.
- Oerlemans, K.; Barrett, D.M.; Suades, C.B.; Verkerk, R. & Dekker, M. 2006. Thermal degradation of glucosinolates in red cabbage. *Food Chemistry*, 95(1):19-29.
- Pagnocca, F.C.; Victor, S.R.; Bueno, F.C.; Crisóstomo, F.R.; Castral, T.C.; Fernandes, J.B.; Corrêa, A.G.; Bueno, O.C.; Bacci, M.; Hebling, M.J.A.; Vieira, P.C. & Silva, M.F.G.F. 2006. Synthetic amides toxic to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* L. and its symbiotic fungus. *Agricultural and Forest Entomology*, 8:17-23.
- Petacci, F. 2001. *Aspectos Químicos de Um Ninho de Saúvas (Atta sexdens L.) e Propriedades Inseticidas de Dimorphandra mollis (Fabaceae, Caesalpinoideae)*. Tese de doutorado apresentada no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.
- Quinlan, R.J. & Cherret, J.M. 1978. Aspects of the symbiosis of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. *Ecological entomology*, 3:221-230.
- Rakariyatham, N.; Butrindr, B.; Niamsup, H. & Shank, L. 2005 - Screening of filamentous fungi for production of myrosinase Screening of filamentous fungi for production of myrosinase. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(3):242-245.
- Rangkadilok, N.; Nicolas M.E.; Bennett, R.N.; Premier, R.R.; Eagling, D.R. & Taylor, P.W.J. 2002. Developmental Changes of Sinigrina and Glucoraphanin in three *Brassica* species (*Brassica nigra*, *Brassica juncea* and *Brassica oleracea* var. *italica*). *Scientia Horticulturae*, 96:11-26.
- Rask, L.; Andreasson, E.; Ekbom, B.; Eriksson, S.; Pontoppidan, B. & Meijer J. 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology*, 42(1):93-113.
- Ratzka, A.; Vogel, H.; Kliebenstein, D.J.; Mitchell-Olds, T. & Kroymann, J. 2002. Disarming the mustard oil bomb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17):11223-11228.
- Raven, P.H.; Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. 2001. *Biologia vegetal* 6ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Reddy, G.V.P.; Tossavainen, P.; Nerg, A. & Holopainen J.K. 2004. Elevated Atmospheric CO₂ Affects the Chemical Quality of *Brassica* Plants and The Growth Rate of The Specialist, *Plutella xylostella*, but not the Generalist, *Spodoptera littoralis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:4185-4191.
- Renwick, J.A.A.; Haribal, M.; Gouinguene, S. & Stadler, E. 2006 - Isothiocyanates stimulating oviposition by the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Chemical Ecology*, 32(4):755-766.

- Richard, F.J.; Mora, P.; Errard, C. & Rouland, C. 2005. Digestive capacities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 175(5):297-303.
- Ricklefs, E.R. & Miller, G.L. 2000. *Ecology*. 4^o ed. W.H. Freeman. New York.
- Ridley, P.; Howse, P.E. & Jackson, C.W. 1996. Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their symbiotic fungus. *Experientia*, 52:631-365.
- Rockwood, L.L. 1976. Plant selection and foraging patterns in two species of leaf-cutting ants (*Atta*). *Ecology*, 57:48-61.
- Rockwood, L.L. 1977. Foraging patterns and plant selection in Costa Rica leaf cutting ants. *Journal of the New York Entomological Society*, 85:222-233.
- Rockwood, L.L. & Hubbell, S.P. 1987. Host-plant selection, diet diversity, and optimal foraging in a tropical leafcutting ant. *Oecologia*, 74:55-61.
- Rodman, J.E.; Karol, K.G.; Price, R.A. & Sytsma, K.J. 1996. Molecules, morphology, and Dahlgren's expanded order Capparales. *Systematic Botany*, 21(3):289-307.
- Rosa, E.A.S. 1997. Daily variation in glucosinolate concentrations in the leaves and roots of cabbage seedlings in two constant temperature regimes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(3):364-368.
- Rungapamestry, V.; Duncan, A.J.; Fuller, Z. & Ratcliffe, B. 2006. Changes in glucosinolate concentrations, myrosinase activity, and production of metabolites of glucosinolates in cabbage (*Brassica oleracea* Var. *capitata*) cooked for different durations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20):7628-7634.
- Salatino, A.; Sugayama, R.L.; Negri, G. & Vilegas, W. 1998. Effect of constituents of the foliar wax of *Didymopanax vinosum* on the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 86(3):261-266.
- Santos, A.V.; Dillon, R.J.; Dillon, V.M.; Reynolds, S.E. & Samuels, R.I. 2004. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Fems Microbiology Letters*, 239(2):319-323.
- Sarwar, M. & Kirkegaard, J.A. 1998. Biofumigation potential of brassicas - II. Effect of environment and ontogeny on glucosinolate production and implications for screening. *Plant and Soil*, 201(1):91-101.
- Shikita, M.; Fahey, J.W.; Golden, T.R.; Holtzclaw, W.D. & Talalay, P. 1999. An unusual case of 'uncompetitive activation' by ascorbic acid: purification and kinetic properties of a myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings. *Biochemical Journal*, 341:725-732.
- Silva, A.; Bacci, M.; Siqueira, C.G.; Bueno, O.C.; Pagnocca, F.C. & Hebling, M.J.A. 2003. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology*, 49(4):307-313.
- Simmonds, M.S.J.; Blaney, W.M.; Mithen, R.; Birch ANE & Lewis, J. 1994. Behavioral and chemosensory responses of the turnip root fly (*Delia floralis*) to glucosinolatos. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 71(1):41-57.

- Soroker, V.; Vienne, C. & Hefetz, A. 1995. Hydrocarbon dynamics within and between nestmates in *Cataglyphis niger* (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of chemical ecology*, 21(3):365-378.
- Souza-Silva, A.; Zanetti, R.; Carvalho, G.A.; Santos, A. & Mattos, J.O.S. 2005. Preferência de formigas cortadeiras por mudas de eucalipto pulverizadas ou imersas em soluções de extrato pirolenhoso em diferentes concentrações. *Scientia Forestalis*, 67:9-13.
- Taiz L. & Zeiger E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3º ed. Artmed. Porto Alegre.
- Thangstad, O.P.; Bones, A.M.; Holton, S.; Moen, L. & Rossiter, J.T. 2001. Microautoradiographic localisation of a glucosinolate precursor to specific cells in *Brassica napus* L. embryos indicates a separate transport pathway into myrosin cells. *Planta*, 213(2):207-213.
- Tierens, K.F.M.J.; Thomma, B.P.H.; Brouwer, M.; Schmidt, J.; Kistner, K.; Porzel, A.; Mauch-Mani, B.; Cammue, B.P.A. & Broekaert, W.F. 2001. Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of arabidopsis to microbial pathogens. *Plant Physiology*, 125(4):1688-1699.
- van Dam, N.M.; Raaijmakers, C.E. & van der Putten, W.H. 2005. Root herbivory reduces growth and survival of the shoot feeding specialist *Pieris rapae* on *Brassica nigra*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115(1):161-170.
- van Poecke, R.M.P.; Roosjen, M.; Pumarino, L. & Dicke, M. 2003. Attraction of the specialist parasitoid *Cotesia rubecula* to *Arabidopsis thaliana* infested by host or non-host herbivore species. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 107(3):229-236.
- Vaughn, S.F. & Berhow, M.A. 2005. Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Industrial Corps and Products*, 21:193-202.
- Velasco, P.; Cartea, M.E.; Gonzalez, C.; Vilar, M. & Ordas, A. 2007. Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea acephala* group). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3):955-962.
- Vellinga, E.C.; de Kok, R.P.J. & Bruns, T.D. 2003. Phylogeny and taxonomy of *Macrolepiota* (Agaricaceae). *Mycologia*, 95(3):442-456.
- Vlieger, L.; Brakefield, P.M. & Muller, C. 2004. Effectiveness of the defence mechanism of the turnip sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera : Tenthredinidae), against predation by lizards. *Bulletin of Entomological Research*, 94(3):283-289.
- Villesen, P.; Gertsch, P.J.; Frydenberg, J.; Mueller, U.G. & Boomsma, J.J. 1999. Evolutionary transition from single to multiple mating in fungus-growing ants. *Molecular Ecology*, 8(11):1819-1825.
- Villesen, P. 2001. *Summary of mating system evolution, worker reproduction and symbiont diversity in Attini ants*. Doctorates and PhDs 2001, Faculty of Science, University of Aarhus, s. 616-618. Ph.D.thesis presented in Institute of Biological Sciences of the University of Aarhus.
- Villesen, P.; Mueller, U.G.; Schultz, T.R.; Adams, R.M.M. & Bouck, A.C. 2004. Evolution of ant-cultivar specialization and cultivar switching in *Apterostigma* fungus-growing ants. *Evolution*, 58(10):2252-2265.

- Weber, N.A. 1966. Fungus-Growing Ants. *Science*, 153:587-604.
- Wetterer, J.K.; Schultz, T.R. & Meier, R. 1998. Phylogeny of Fungus-Growing Ants (Tribe Attini) Based on mtDNA Sequence and Morphology. *Molecular phylogenetics and evolution*, 9(1):42-47.
- Wilson, E.O. 1971. *The insects societies*. Imprenta Cambridge. Belknap.
- Wittstock, U.; Agerbirk, N.; Stauber, E.J.; Olsen, C.E.; Hippler, M.; Mitchell-Olds, T.; Gershenson, J. & Vogel, H. 2004. Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14):4859-4864.
- Zabala, M.D.; Grant, M.; Bones, A.M.; Bennett, R.; Lim, Y.S.; Kissen, R. & Rossiter, J.T. 2005. Characterisation of recombinant epithiospecifier protein and its over-expression in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 66(8):859-867.
- Zeng, R.S.; Mallik, A.U. & Setliff, E. 2003. Growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by root exudates of Brassicaceae plants: Role of degraded compounds of indole glucosinolatos. *Journal of Chemical Ecology*, 29(6):1337-1355.

Resumo

As formigas da tribo Attini são obrigatoriamente dependentes da simbiose que mantêm com fungos cultivados no interior de suas colônias. Nas Attini mais derivadas (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) esse fungo é cultivado com substratos vegetais frescos cortados pelas formigas, constituindo a única fonte de nutrientes durante os estágios imaturos (larvas e pupas) e fonte parcial de nutrientes durante a fase adulta. Nesta fase, as formigas obtêm grande parte de seus nutrientes através da ingestão de seivas foliares durante o corte e o processamento do material a ser incorporado ao fungo. Assim, dado o duplo destino que os produtos vegetais têm nessa relação simbiótica entre fungos e formigas, os metabólitos secundários contidos nas plantas cortadas pelas formigas são também capazes de atuar nessas duas instâncias. Dentre os metabólitos secundários, os glucosinolatos são conhecidos por intermediarem muitas das interações das plantas que os contêm e por possuírem um mecanismo de ação envolvendo a hidrólise pela enzima mirosinase. O presente estudo avaliou os efeitos da sinigrina sobre o crescimento radial do fungo mutualista de *Atta sexdens* e sobre a mortalidade das operárias isoladas das colônias. Para isso os fungos foram cultivados *in vitro* em meio de cultura MEA-LP contendo sinigrina e incubados a 25° C em BOD. A mortalidade dos insetos foi avaliada de duas maneiras: com o oferecimento sinigrina em dietas sólidas ou em solução aquosa. Os resultados mostraram que a sinigrina intacta não apresentou efeitos sobre qualquer um dos dois. Porém, apresentou indícios de que os produtos de hidrólise podem vir a inibir o crescimento do fungo.

Abstract

Attini ants have as obligatory symbiont a fungus growing in their colonies. Higher Attini (genera *Atta* and *Acromyrmex*) provide the symbiont with fresh plant tissue. Such fungus has been pointed out as exclusive food source of larvae, but adult ants obtain most of

their nutrients from plant juices. Secondary metabolites from plants have been suggested as mediating agents in plant selection by ants; these compounds may act either on insects or on fungus. The present aims to evaluate the effects of sinigrin (a glucosinolate) regarding radial growth of the symbiont fungus cultivated by *Atta sexdens rubropilosa*, and mortality of isolated ants. Fungi were cultivated *in vitro* with MEA-LP medium in Petri dishes at BOD chambers at 25° C. Sinigrin was added to the culture medium before fungus inoculation. Insect mortality was assayed by two models: with liquid and solid diets. Results showed that intact sinigrin has no effect either on fungus or on ants. However, inhibition was observed toward fungus growth by sinigrin hydrolysis products.

I.1. Introdução

A tribo Attini (subfamília Myrmicinae) é um clado de formigas composto por cerca de 220 espécies (Mueller *et al.*, 2005) distribuídas em 13 gêneros (Brandão & Mayhé-Nunes, 2001), todas obrigatoriamente dependentes do cultivo de fungo (Mueller *et al.*, 2005). *Atta* e *Acromyrmex* são os gêneros mais derivados dessa tribo, constituindo um clado popularmente conhecido como formigas cortadeiras, devido ao seu hábito voraz de cortar flores e folhas para cultivar seus fungos (Currie, 2002).

O fungo cultivado constitui a única fonte de alimento para as larvas e pupas dessas formigas. Já os indivíduos adultos têm apenas parte de seu requerimento nutricional oriunda do fungo, sendo o restante obtido através da ingestão de seivas vegetais durante a manipulação do substrato (Bass & Cherrett, 1995; Mueller *et al.*, 2005). Em troca, o fungo recebe os cuidados empregados pelas formigas para o seu bom crescimento, como o fornecimento de um farto suprimento de substrato, proteção contra inimigos e propagação para as novas colônias (Nascimento, 1996; Currie, 2002; Currie *et al.*, 2003; Mehdiabadi *et al.*, 2006).

Esse mutualismo entre fungo e formigas parece ser extremamente bem sucedido evolutivamente, trazendo benefícios substanciais a cada uma das partes e possibilitando um

grau de polifagia inexpugnável (Mueller, 2002). Tamanho grau de polifagia é, em grande parte, fruto de um sistema intrigado de cooperação digestiva do qual se destaca a complementaridade enzimática entre as partes (Richard *et al.*, 2005).

Contudo, apesar de ambas as partes poderem contribuir enzimaticamente para a digestão do substrato, isso é feito principalmente pelo fungo, que também é o grande responsável pela absorção dos nutrientes então disponibilizados (Silva *et al.*, 2003). Assim, baseado no comportamento nutricional em questão, as formigas cortadeiras só seriam consideradas herbívoros devido à ingestão das seivas vegetais (Ricklefs & Miller, 2000), sendo seu título de principais herbívoros neotropicais na verdade reflexo da capacidade do fungo assimilar o substrato coletado pelo inseto através de uma atividade saprófita.

Devido a todo esse direcionamento no uso do material vegetal coletado, parece haver uma forte participação do fungo na tomada de decisões sobre o forrageamento das formigas (Knapp *et al.*, 1990; Ridley *et al.*, 1996), que evidentemente acontece por meio de diversos mecanismos de integração e de um forte sinergismo, mas cujas bases moleculares ainda não foram esclarecidas (Mueller, 2002).

Dentre os fatores capazes de influenciar o forrageamento das formigas, a composição química das folhas é especialmente proeminente. Primeiro, porque a presença de certas substâncias torna o substrato mais apropriado ao crescimento do fungo, como o é caso de muitas daquelas que constituem as reservas vegetais. Segundo, porque a presença de outras substâncias pode ter efeitos deletérios ao fungo ou mesmo às formigas durante o procedimento de corte e ingestão das seivas. Dentre as substâncias potencialmente nocivas, destacam-se aquelas tradicionalmente chamadas de metabólitos secundários (Ridley *et al.*, 1996; Richard *et al.*, 2005). Portanto, em linhas gerais, pode-se dizer que grande parte das decisões de forrageamento das formigas leva em conta o princípio de se maximizar os nutrientes e minimizar os metabólitos secundários presentes no substrato (Rockwood, 1977).

Dentre os diversos metabólitos secundários, a classe dos glucosinolatos chama a atenção por sua distribuição quase que exclusiva dentro de Capparales (Fahey *et al.*, 2001; Angiosperm Phylogeny Website), por seu reconhecido papel na ecologia química das plantas que os contêm (Halkier & Gershenzon, 2006) e pelo engenhoso sistema que formam com a enzima mirosinase (Rask *et al.*, 2000). Essa enzima, uma β -tioglucosidase, é mantida separada fisicamente dos glucosinolatos nos tecidos vegetais íntegros, contudo, quando os tecidos são lesados, como durante o ataque por um herbívoro, esses dois elementos se encontram e a mirosinase rapidamente cliva os glucosinolatos em isotiocianatos e/ou outros produtos de hidrólise voláteis (nitrilas, tiocianatos, epitionitrilas e oxazolidinas) (Bones & Rossiter, 2006). Muitos autores atribuem a esses subprodutos a maior parte das atividades biológicas associadas à presença dos glucosinolatos (Buskov *et al.*, 2002; Halkier & Gershenzon, 2006), dentre as quais citam-se a estimulação de alguns insetos especializados e a dissuasão de herbívoros generalista (Rask *et al.*, 2000; Kliebenstein *et al.*, 2002), além da comprovada toxicidade a mamíferos, aves, molusco, insetos, fungos e bactérias (Mewman *et al.*, 1992; Busch *et al.*, 1994; Brader *et al.*, 2001; Tierens *et al.*, 2001; Aliabadi *et al.*, 2002; Buskov *et al.*, 2002; Li & Kushad, 2004; Vlieger *et al.*, 2004).

O gênero *Brassica*, além de se destacar por abranger diversas plantas corriqueiramente utilizadas na dieta de diversas populações (Kim *et al.*, 2002), é também um dos modelos vegetais mais comumente empregados nos estudos dos glucosinolatos (Fahey *et al.*, 2001). *B. oleraceae* é uma de suas espécies mais conhecidas por possuir diversas variedades tradicionalmente consumidas (Velasco *et al.*, 2007), dentre as quais pode-se citar o repolho, a couve, a couve-de-bruxelas, a couve-flor e o brócolis.

Um dos glucosinolatos mais abundante nessa espécie é a sinigrina (2-propenil- ou alil-glicosinolato) (Rosa, 1997; Andréasson *et al.*, 2001; Buskov *et al.*, 2002; Li & Kushad, 2004), um glucosinolato alifático que tem ganhado bastante atenção devido às suas propriedades anticancerígenas (Rangkadilok *et al.*, 2002; Velasco *et al.*, 2007). Além dessa virtude, esse

glucosinolato ganhou proeminência por ter sua síntese estabelecida em maiores escalas quando comparado com os demais glucosinolatos (Fahey *et al.*, 2001), o que passou a permitir sua utilização como modelo em experimentos sobre os papéis dessa peculiar classe de metabólitos (Simmonds *et al.*, 1994).

Até o momento nada se sabe a respeito de como os glucosinolatos poderiam modular a interação entre as plantas e as formigas cortadeiras. Alguns poucos relatos dão conta de ataques dessas formigas às plantas que contêm esse metabólito. Além disso, em lavouras de canola, existem observações de que as saúvas cortam preferencialmente plantas crescidas próximas às estradas de chão. Essas plantas, bem menores que as crescidas nas demais zonas da lavoura, apresentam sintomas de amarelamento e/ou aroxeamento provavelmente devido à deficiência nutricional, influenciada pela compactação do solo (Nei Lucio Domiciano, comunicação pessoal), o que pode refletir no nível de glucosinolatos e ser uma das razões para essa maior susceptibilidade.

I.2. Objetivos

Mensurar os efeitos da sinigrina sobre o crescimento radial do fungo mutualista cultivado *in vitro* e os efeitos da ingestão desse metabólito sobre as taxas de mortalidade de formigas isoladas das colônias, avaliando indiretamente os potenciais efeitos da sinigrina intacta ao desenvolvimento de saúveiro e testando metodologias para a realização desse estudo.

I.3. Materiais e Métodos

I.3.1. Avaliação da ação da sinigrina sobre as formigas

A avaliação do efeito da ingestão de sinigrina na mortalidade das formigas foi feita através dos dois métodos descritos a seguir. A diferença fundamental entre os dois é o veículo

usado para que as formigas ingerissem o metabólito. Assim, enquanto um disponibilizou o metabólito em solução aquosa, o outro o fez através de dieta artificial sólida.

I.3.1.1. Experimento de ação da sinigrina via ingestão por solução aquosa

Esse experimento foi realizado com formigas provenientes de duas colônias com seis repetições para cada uma. As formigas foram coletadas em trilhas de forrageamento de formigueiros de vida livres do *campus* da Universidade de São Paulo (São Paulo-SP). A opção por esses formigueiros, e não por aqueles mantidos em laboratório, foi feita devido ao grande número de formigas necessárias para a realização desse experimento. Tamanha alocação de formigas, caso fosse feita dos formigueiros mantidos no Laboratório de Fitoquímica, poderia debilitar essas colônias que ainda estavam pouco desenvolvidas na época. Além disso, estes formigueiros ainda não apresentavam as castas de maiores portes, as quais foram utilizadas no experimento²⁶.

Sete tratamentos experimentais foram utilizados: quatro oferecimentos de sinigrina e três controles. Cada tratamento contou com um conjunto de 12 placas de petri (seis para cada colônia), cada uma contendo 10 formigas grandes (diâmetro da cápsula cefálica maior que 3 mm). As placas possuíam 10 cm de diâmetro e foram forradas com papel de filtro umedecido com 1 mL de água (Fig. 1). Os tratamentos com o oferecimento de sinigrina foram feitos em quatro diferentes concentrações: 1,5; $1,5 \times 10^{-1}$; $1,5 \times 10^{-2}$; $1,5 \times 10^{-3}$ μmol de sinigrina por mL. Essas concentrações foram baseadas nos valores máximos e mínimos encontradas por Tian e colaboradores (2005) em diferentes cultivares comerciais de *Brassica oleracea*. Já os três controles correspondiam ao oferecimento de água (Controle Água), o oferecimento de água e de solução aquosa de sinigrina a 1,5 μmol de sinigrina por mL (Controle Misto) e a ausência de oferecimento de água e/ou solução de sinigrina (Controle Seco). As placas foram mantidas a temperatura de $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ com umidade relativa ambiental acima de 70%.

²⁶ Segundo Weber (1966) a maior casta aparece apenas 22 meses após a fundação da colônia.

Figura 1. Fotografia ilustrando uma placa (ou uma réplica) do experimento de oferecimento de sinigrina em solução aquosa. Seta: recipiente no qual a água ou as soluções de sinigrina foram oferecidas.

A razão da existência de três controles é possibilitar a verificação das reais razões por trás da mortalidade das formigas. Para exemplificar, caso a morte das formigas fosse antecipada pela ingestão da sinigrina, então os valores de sobrevivência obtidos nos tratamentos seriam menores que os valores no Controle Água. Porém, para esse mesmo resultado, haveria também a possibilidade de que as formigas tivessem a capacidade de perceber a presença da substância potencialmente nociva e por isso não ingerissem a solução contendo o metabólito. Neste caso, os demais controles ajudariam na elucidação das causas, uma vez que os valores dos tratamentos seriam próximos àqueles do Controle Seco e os valores do Controle Água se aproximariam aos do Controle Misto (partindo da premissa de que as formigas ingeriram água (Bueno *et al.*, 1997; Moser, 2006) e que isso aumente sua sobrevivência (Löeck & Rosenthal, 1990)).

O oferecido de água e/ou das soluções de sinigrina foi feito em pequenas tampas plásticas de 20 mm de diâmetro e 6 mm de altura contendo 0,5 mL do líquido (Fig. 1). Essas tampas, seus conteúdos e também os papeis de filtro que forravam as placas, foram trocados a cada dois dias. As formigas mortas eram contadas diariamente até a morte da última

sobrevivente. Os dados utilizados nas análises estatísticas como parâmetro da sobrevivência das formigas (ou mortalidade, em sua razão complementar) foi o tempo (em dias) no qual metade das formigas em cada placa morreu (adaptado de Silva *et al.*, 2003). Esses dados foram então submetidos a análises estatísticas não-paramétricas utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

I.3.1.2. Mortalidade com o oferecimento de dieta

As formigas utilizadas nesse experimento foram coletadas da mesma maneira descrita no item anterior.

Também como no anterior, esse experimento utilizou sete tratamentos: três controles e quatro oferecimentos de sinigrina. Cada tratamento compreendia um conjunto de 12 placas de petri (6 para cada colônia) contendo 8 formigas grandes (diâmetro da cápsula cefálica maior de 3 mm) em cada uma. As placas possuíam 10 cm de diâmetro e eram forradas com papel de filtro umedecido com 1 mL de água (adaptado de Silva *et al.*, 2003) (Fig. 2).

Figura 2. Fotografia ilustrando uma placa (ou uma réplica) do experimento de oferecimento de dieta. Seta azul: recipiente no qual as dietas foram disponibilizadas. Seta vermelha: recipiente com algodão e água.

Os três controles correspondiam ao oferecimento da dieta artificial sólida sem sinigrina (Controle Dieta), ao oferecimento apenas de água (Controle Água), e à ausência de qualquer oferecimento (Controle Seco). Os demais tratamentos correspondiam ao oferecimento de substrato contendo sinigrina em quatro concentrações diferentes: 1,5; $1,5 \times 10^{-1}$; $1,5 \times 10^{-2}$; $1,5 \times 10^{-3}$ μmol do metabólito por grama de dieta. As placas foram mantidas a temperatura de $25^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ com umidade relativa ambiental acima de 70%.

A dieta artificial foi preparada com glucose (50 g/L), peptona bacteriológica (10 g/L), extrato de levedura (1,0 g/L), ágar (15 g/L) (Bueno *et al.*, 1997; Pagnocca *et al.*, 2006) e, nos devidos casos, sinigrina. O oferecimento da dieta foi feito em blocos de 0,4 a 0,5 g depositados sobre pequenas tampas plásticas de 20 mm de diâmetro e 6 mm de altura. Com exceção do Controle Seco, todos os demais tratamentos tiveram oferecimento de água *ad libitum* feito em recipientes idênticos contendo algodão saturado de água purificada (Fig. 2). Diariamente realizava-se a troca do papel de filtro e das tampas com seus respectivos conteúdos, bem como procedia-se a remoção e contagem das formigas mortas. Assim como no experimento anterior, os dados utilizados nas análises estatísticas como parâmetro da sobrevivência das formigas (ou mortalidade, em sua razão complementar) foi o tempo (em dias) no qual metade das formigas em cada placa morreu (adaptado de Silva *et al.*, 2003). Esses dados foram então submetidos a análises estatísticas não-paramétricas utilizando o teste de Kruskal-Wallis e métodos de comparações multipareadas indicados.

I.3.2. Seleção do meio de cultura e isolamento das linhagens dos fungos

Para a realização dessa etapa foram coletados fungos de nove colônias de *Atta sexdens* mantidas no Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências-USP.

O isolamento e a manutenção dos fungos simbiotes é uma tarefa reconhecidamente árdua (Mohali, 1998; Silva-Pinhati *et al.*, 2005), principalmente devido às suas baixas taxas de crescimento e ao fato que, na ausência dos cuidados empregados pelas formigas, o fungo

facilmente perde em competitividade e é acometido por infestações por outros microrganismos como o fungo *Aspergillus* (possivelmente o *Escovopsis*), *Penicillium* e *Trichoderma* (Mohali, 1998). Por essa razão, alguns cuidados foram tomados a fim de se evitar a contaminação das culturas de fungos. A coleta do fungo nos formigueiros foi feita da forma mais estéril possível, com o auxílio de pinças flambadas e proximidade à chama de lamparina. O acondicionamento desses fragmentos foi feito em potes estéreis para coleta de amostras clínicas, juntamente (e inevitavelmente) com algumas formigas. Esse material foi levado para o Departamento de Micologia do Instituto de Botânica de São Paulo onde foram realizados todos os experimentos micológicos. Os fragmentos de fungos retirados dos formigueiros foram utilizados para a preparação de placas matrizes, que forneceram inóculos dos fungos isolados para a realização dos experimentos. Cada matriz (ou conjunto de placas matrizes) contendo o fungo de um determinado formigueiro constituiu o que foi chamado de uma linhagem de fungo.

O presente experimento foi realizado para se obter um meio de cultura que propiciasse melhores condições para o desenvolvimento das etapas posteriores, visando principalmente uma maior taxa de crescimento do fungo, o que permitiria um maior número de repetições e poderia evitar parte das infestações por microrganismos contaminantes. Esta etapa foi subsidiada por resultados de trabalhos anteriores de Myiashira e colaboradores (em preparação) e Silva-Pinhati e colaboradores (2005). Assim, foram testados, um contra o outro, os Meio MEA-LP (20 g/L de ágar; 20 g/L de extrato de malte; 2 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona bacteriológica) e o Meio B ágar (contendo: 17 g/L ágar; 10 g/L de glucose; 2 g/L de NaCl; 2 g/L de peptona; 10 g/L de extrato de malte; 20 g/L de caseína hidrolisada; 20 g/L de flocos de soja; 20 g/L de flocos de aveia; 3,8 g/L fostato de sódio dibásico; 2,5 g/L de ácido cítrico e pH final = 5,0) indicados por esses respectivos autores como os mais favoráveis ao crescimento do fungo. Ambos os meios tiveram seus componentes homogeneizados em erlenmeyers, autoclavados, vertidos nas placas de petri (10 cm de diâmetro) em câmara de fluxo e expostos à luz UV por 20 minutos para desinfecção.

Para esse experimento foram utilizadas oito linhagens de fungos, todas cultivadas em placas matrizes contendo o meio de cultura MEA-LP. A escolha desse meio de cultura para o cultivo das matrizes foi tomada pela pronta disponibilidade dos materiais para sua elaboração. Os inóculos retirados das matrizes eram fragmentos circulares com 3 mm de diâmetro do fungo e o meio de cultura subjacente. Esses inóculos foram posicionados no centro das placas de petri contendo os meios de cultura testados. Foi feita uma réplica de cada linhagem (opção 1 e opção 2), de modo a existir uma placa reserva para o caso de contaminações. Assim, para cada meio de cultura testado havia um conjunto de 16 placas, ou dois conjuntos idênticos de oito, totalizando 32 placas no experimento. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em estufas para B.O.D. na temperatura de 25°C para o crescimento do fungo.

O parâmetro utilizado para inferir o crescimento do fungo foi a média das medidas de seu crescimento radial nas placas. Para essa medição, foram traçados dois eixos perpendiculares no verso das placas, de forma a terem seu ponto de intersecção no centro do inóculo. Assim a partir desse ponto, foram delimitados quatro semi-eixos nomeados raio A, raio B, raio C e raio D; em sentido horário (Fig. 3). A partir da borda do inoculo, ao longo de cada um dos raios, foram tomadas medidas do crescimento do fungo semanalmente (Peres *et al.*, 2003). As médias dos valores dos quatro raios no 28º dia foi o valor utilizado como estimativa do crescimento do fungo em cada placa. Os resultados foram analisados através do teste estatístico Mann-Whitney Rank Sum (não-paramétrico).

Figura 3. Esquema do método de mensuração do crescimento do fungo. A, B, C e D são os quatro semi-eixos ao longo dos quais foram tomadas as medidas (X_A , X_B , X_C e X_D) a partir da borda do inóculo inicial (círculo verde central) até a borda do fungo (círculo branco).

I.3.3. Efeito da sinigrina no crescimento do fungo

A avaliação do efeito da sinigrina no crescimento do fungo foi realizada em duas etapas, referidas como "ensaio 1" e "ensaio 2", cujas particularidades serão descritas adiante. Assim, ao longo deste trabalho, entenda-se por ensaios as subdivisões do presente experimento.

Ambos os ensaios foram realizados em placas de petri de 5 cm de diâmetro contendo cerca de 6 mL de meio de cultura MEA-LP (em virtude dos testes anteriores). Após a solidificação do meio, as placas de petri foram expostas à luz ultravioleta por 20 minutos e inoculadas com discos de ágar de 3 mm de diâmetro, retirados das matrizes. Esses inóculos foram posicionados no centro de cada placa. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em estufas para B.O.D. na temperatura de 25° C.

Durante as quatro semanas seguintes, foram tomadas as medidas de crescimento seguindo o mesmo método de retas perpendiculares descritos no experimento anterior, obtendo-se assim, quatro medidas do crescimento do fungo em cada placa (Peres *et al.*, 2003).

Os valores médios entre as quatro medições de cada placa no 28º dia foram analisados através do método de análise de variâncias não paramétrico Kruskal-Wallis, para verificar se as diferenças no crescimento do fungo em meios contendo diferentes concentrações de sinigrina foram estatisticamente significantes ou não. Nos casos em que a diferença foi constatada, foram utilizados métodos de comparações multipareadas para verificar entre quais tratamentos existia a diferença.

Particularidades do ensaio 1

Com o ensaio 1, o primeiro a ser planejado, pretendia-se avaliar o efeito da sinigrina no crescimento do fungo mutualista. Para isso, foram utilizados meios de cultura contendo quatro concentrações de sinigrina: 1,5; $1,5 \times 10^{-1}$; $1,5 \times 10^{-2}$ e $1,5 \times 10^{-3}$ μmol por grama de meio de cultura. A incorporação da sinigrina no meio de cultura foi feita através da sua dissolução na água usada no preparo do meio (ver item I.2.3). Conseqüentemente, o metabólito foi submetido ao processo de autoclavagem durante a esterilização do meio de cultura.

Oito linhagens de fungos foram usadas nesse experimento, as mesmas utilizadas no experimento anterior de seleção de meio de cultura.

Particularidades do ensaio 2

Já o ensaio 2 não havia sido planejado originalmente, mas foi realizado devido a alguns resultados obtidos após o ensaio 1, do qual se distingue basicamente pelo maior número de linhagens de fungos testadas (18), pelas concentrações de sinigrina utilizadas (1 e 10 μmol por grama de meio de cultura) e pela maneira como essa substância foi incorporada ao meio de

cultura. Neste ensaio, a sinigrina foi incorporada somente após a autoclavagem do meio de cultura. Todas as 18 linhagens de fungo aqui utilizadas foram distintas daquelas utilizadas no ensaio 1.

A incorporação do metabólito foi feita através de soluções de sinigrina adicionadas logo após a autoclavagem do meio de cultura. Essas soluções foram preparadas em câmara de fluxo, com água autoclavada e submetidas a 30 minutos de exposição a luz UV. Além disso, as soluções foram filtradas em membrana Millex™ (Millipore) com 0,45 µm de porosidade. Esses procedimentos foram realizados para prevenir que a solução de sinigrina contivesse algum contaminante.

I.4. Resultados e Discussão

I.4.1. Experimento de ação da sinigrina nas saúvas via ingestão por solução aquosa

Encontrar uma forma para se avaliar o potencial tóxico dos metabólitos secundários sobre os insetos não é uma tarefa simples, face à dificuldade em se obter uma metodologia com a qual se possa reproduzir o modo como essas substâncias naturalmente agiriam nos corpos dos insetos. Com as formigas da tribo Attini essa questão é ainda mais complicada, uma vez que até então não foram esclarecidas quais são as fontes imediatas de nutrientes dessas formigas que mantêm um intrigado complexo nutricional entre plantas e o fungo (Bass & Cherrett, 1995; Bueno *et al.*, 1997; Mueller, 2002; Silva *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2005).

Diversas metodologias para se avaliar a ação dos metabólitos nas formigas são encontradas na literatura. Em uma dessas, as formigas foram "banhadas" com a solução contendo a substância testada (Fernandes *et al.*, 2002), contudo, dentre os artrópodes, os insetos são pródigos por possuírem a camada de cera da epicutícula bem desenvolvida. Essa camada, juntamente com a camada lipoprotéica mais externa, promove um eficaz isolamento entre o meio interno e o meio externo, principalmente em relação à permeabilidade da água (Brusca & Brusca, 2007). Assim sendo, pouco provavelmente uma solução aquosa seria capaz de

ultrapassar a cutícula da formiga, e mesmo se o fizesse, nada garantiria que sua ação seria similar àquela apresentada quando a substância penetrasse via tubo digestivo, como naturalmente ocorreria caso o inseto se alimentasse diretamente da planta. Provavelmente por essas razões essa metodologia caiu em desuso.

Alguns autores (Löeck & Rosenthal, 1990; Bueno *et al.*, 1997) investigando a sobrevivência de formigas *Attini* isoladas de seus formigueiros, observaram a ingestão de água e de dietas artificiais líquidas por essas formigas, o que aumentava a sobrevivência do inseto nas condições experimentais. Baseados nesses resultados os autores propuseram o uso de dietas artificiais líquidas como veículo nos estudos de ação de metabólitos secundários em formigas. Contudo, até o momento, aparentemente nenhum trabalho foi realizado nestes moldes.

Já há algum tempo e com certa frequência, vêm sendo utilizadas metodologias baseadas no oferecimento de dietas sólidas das quais as formigas podem se alimentar e que incorporaram em suas formulações as substâncias a serem testadas (Bueno *et al.*, 1997; Petacci, 2001; Silva *et al.*, 2003). No entanto, essas metodologias não são totalmente alinhadas com o comportamento nutricional das formigas apontado por muitos autores, os quais atribuem grande parte da obtenção de nutrientes das formigas à ingestão de líquidos como as seivas foliares obtidas durante o processamento do substrato vegetal utilizado no cultivo do fungo (Bass & Cherrett, 1995) ou os fluidos intestinais de larvas através da trofalaxia anal (Mueller, 2002).

Além desse predomínio de líquidos na dieta das formigas, os "filtros" das cavidades infrabucais desses insetos talvez dificulte a ingestão dessas dietas sólidas, a exemplo do que ocorre com os polissacarídeos das plantas e das hifas dos fungos, que não conseguem ultrapassar tal barreira física (Richard *et al.*, 2005). Assim, tendo em vista essas informações sobre o hábito alimentar das formigas e a observação de que as formigas das colônias mantidas no Laboratório de Fitoquímica freqüentemente se aglomeravam em torno de poças e gotículas

de água esgotando-as, a opção por um veículo líquido para a realização dos testes de ingestão de metabólitos secundários foi considerada mais apropriada. Dentro desse contexto, a utilização de metabólitos em solução aquosa seria a candidata mais prática e viável.

Contudo, como mostram os resultados da Tabela 1, esse experimento não responde à questão para a qual foi proposto, uma vez que a análise estatística rejeitou a hipótese de haver diferenças estatísticas entre quaisquer tratamentos e controles (Relatório 1 - CD). O mesmo resultado foi obtido quando a análise estatística foi feita comparando somente os dados dentro cada colônia (Relatório 2 - CD).

Tabela 1. Dia em que 50% ou mais das formigas morreram em cada placa do experimento de oferecimento de sinigrina em solução aquosa. Controle Misto: oferecimento de água pura e solução de 1,5 μmol de sinigrina em água; Controle Seco: sem nenhum oferecimento; Controle Água: oferecimento de água pura. I-VI: colônia 1, VII-XII: colônia 2.

Placas	Controle Misto	Controle Seco	Controle Água	1,5 μmol de sinigrina	1,5x10 ⁻¹ μmol de sinigrina	1,5x10 ⁻² μmol de sinigrina	1,5x10 ⁻³ μmol de sinigrina
I	7	7	7	6	7	7	7
II	6	7	7	7	4	7	7
III	9	6	7	6	7	7	6
IV	5	7	7	7	7	7	7
V	6	9	9	7	7	7	10
VI	7	7	6	7	7	7	9
VII	4	4	5	3	5	5	5
VII	5	5	5	4	5	4	5
IX	4	5	5	4	5	5	5
X	5	5	5	5	5	5	5
XI	5	5	5	5	5	4	5
XII	5	5	4	5	5	5	5
Média	5,67	6,00	6,00	5,50	5,75	5,83	6,33

O desalinhamento do experimento com a sua proposição é nitidamente evidenciado pela semelhança dos resultados encontrados nos três controles. O fato das formigas no Controle Água e no Controle Misto morrerem nas mesmas taxas daquelas submetidas ao Controle Seco sugere duas interpretações: ou os insetos não ingeriram o líquido, ou, se o fizeram, que a ingestão de água não prolongou sua sobrevivência nas condições desse experimento. Ambas interpretações são incompatíveis com a proposição do experimento.

Esses resultados apresentam-se em contra-senso com aquilo que relatam os trabalhos de Löeck & Rosenthal (1990) e Bueno e colaboradores (1997), os quais encontraram que o simples oferecimento de água já levava a um aumento no tempo de sobrevivência de formigas dessa mesma espécie mantidas enclausuradas. No caso do trabalho de Löeck & Rosenthal, talvez essa diferença seja mera consequência da baixa amostragem e da ausência da aplicação de testes estatísticos aos dados obtidos por esses autores, o que poderia levar a conclusões precipitadas conduzidas pela casualidade amostral.

Já as diferenças na comparação com o trabalho de Bueno e colaboradores (1997) são mais intrigantes. Nesse trabalho 100% das formigas no Controle Seco morreram após 2 dias de experimento e após 8 dias no Controle Água, ao passo que o presente estudo encontrou que, na média das placas, a morte de 100% das formigas ocorreu somente após cerca de 9 dias tanto no Controle Seco e quando no Controle Água (Tabela 2[†]). No entanto, no conjunto das placas, como fizeram Bueno e colaboradores (1997), isso só ocorreu após 12 dias tanto no Controle Seco com no Controle Água (Tabela 2[†]). Baseando-se nesses resultados, não há como depreender uma hipótese fundamentada sobre os motivos dessa divergência, contudo, como será visto adiante, outros resultados trazem alguma luz a essa questão.

Tabela 2. Dia em que 100% das formigas morreram em cada placa do experimento de oferecimento de sinigrina em solução aquosa. Controle Misto: oferecimento de água pura e solução de 1,5 μmol de sinigrina em água; Controle Seco: sem nenhum oferecimento; Controle Água: oferecimento de água pura. [‡] Valor médio no qual 100% das formigas morreram nas placas de cada tratamento; [†] Dia em que as 120 formigas de cada tratamento morreram.

Placas	Controle Misto	Controle Seco	Controle Água	1,5 μmol de sinigrina	1,5x10 ⁻¹ μmol de sinigrina	1,5x10 ⁻² μmol de sinigrina	1,5x10 ⁻³ μmol de sinigrina
I	10	11	12	8	10	8	9
II	9	10	10	9	10	10	8
III	11	9	10	12	12	11	12
IV	9	10	10	12	12	10	10
V	13	12	11	11	12	10	13
VI	13	11	10	10	12	12	11
VII	6	6	7	7	7	8	7
VII	6	6	8	7	8	6	6
IX	10	7	7	6	10	7	10
X	8	10	8	11	6	8	10
XI	8	8	8	8	8	7	8
XII	7	7	6	7	7	7	8
Média [‡]	9,17	8,92	8,92	9,00	9,50	8,67	9,33
Máximo [†]	13	12	12	12	12	12	13

I.4.2. Avaliação da mortalidade das saúvas com o oferecimento de dietas sólidas

Durante o experimento, assim como descrito por Silva e colaboradores (2003), as formigas foram muito mais ativas nos primeiros dias, cortando ferozmente o papel que forrava as placas de petri e "atacando" os blocos de dieta. Tamanha atividade decaiu progressivamente com o passar dos dias até a morte das formigas. Durante esse intervalo de tempo, nos dias anteriores à sua morte, algumas formigas entraram em um estado de aparente morte, deitando-se imóveis com as pernas dobradas não sendo facilmente "despertadas". Todavia, quando devidamente estimuladas, esse estado era revertido e as formigas freqüentemente voltavam a caminhar normalmente. Esse comportamento exigiu cuidados redobrados para que formigas vivas não fossem contabilizadas como mortas. Por isso, todas as formigas aparentemente mortas foram estimuladas em graus de intensidade progressivos a fim de se confirmar sua morte. Qualquer sinal de movimento foi considerado como sinal de vida.

O dia em que 50% das formigas morreram em cada placa pode ser visto na Tabela 3. Na mesma tabela pode-se ver que, com exceção aos Controles Secos e Água, todos os demais tratamentos tiveram em média 50% da população das placas morrendo em torno do sétimo dia.

Tabela 3. Dia em que 50% ou mais das formigas morreram em cada placa no experimento com dieta sólida. Controle Dieta: oferecimento de água pura e dieta sólida sem sinigrina; Controle Seco: sem nenhum oferecimento; Controle Água: oferecimento de água pura sem dieta sólida. I-VI: colônia 1, VII-XII: colônia 2.

Placas	Controle Seco	Controle Água	Controle Dieta	1,5 μ mol de sinigrina	1,5x10 ⁻¹ μ mol de sinigrina	1,5x10 ⁻² μ mol de sinigrina	1,5x10 ⁻³ μ mol de sinigrina
I	5	6	9	6	8	8	7
II	5	5	7	5	7	8	7
III	5	7	6	7	5	4	7
IV	5	7	5	10	5	6	4
V	5	7	5	12	8	8	6
VI	5	4	10	4	8	6	6
VII	5	6	8	9	8	9	9
VIII	5	6	8	7	5	7	11
IX	5	6	10	8	7	9	10
X	5	5	9	7	8	9	8
XI	5	5	6	7	9	7	8
XII	5	4	8	8	8	10	9
Média	5,00	5,67	7,58	7,50	7,17	7,58	7,67

A análise estatística desses dados (Relatório 3 - CD) apontou a não existência de diferenças significativas entre o Controle Seco e o Controle Água, porém, o Controle Seco apresentou diferenças significativas em relação a todos os demais tratamentos, já o Controle Água, não foi apontado como distinto dos demais controles e tratamentos.

As duas partes do experimento (cada uma referente a uma colônia) também foram analisadas uma contra a outra, em seus respectivos pares correlatos (Relatório 4 - CD). O resultado dessa análise apontou que, com exceção do tratamento com a menor concentração de sinigrina (1,5x10⁻³ μ mol/g), todos os demais tratamentos não apresentam diferenças significativas entre as colônias I e II. Apesar disso, foram feitas as análises estatísticas para testar a hipótese de existirem diferenças entre os tratamentos dentro de cada uma das duas

partes do experimento (Colônias I e II) separadamente (Relatório 5 - CD). Essa análise não detectou a existência de diferenças significativas entre os tratamentos da colônia I, mas, no caso da colônia II, tanto o Controle Seco quanto o Controle Água apresentaram resultados estatisticamente distintos dos tratamentos com as duas menores concentrações ($1,5 \times 10^{-2}$ $\mu\text{mol/g}$ e $1,5 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/g}$), assim como o Controle Seco apresentou resultados distintos do Controle Dieta.

Esses resultados são bastante interessantes, pois no conjunto das duas colônias, os dados apontaram que as formigas quando submetidas à ausência de alimento (Controle Seco) morriam em taxas semelhantes às aquelas submetidas somente ao oferecimento de água (Controle Água) e mais rápido do que todo o restante (ou seja: Controle Seco $\approx$ Controle água, e Controle Seco $<$ demais tratamentos). Contudo, as formigas no Controle Água, apesar de apresentarem sobrevivência semelhante ao Controle Seco, também apresentaram taxas semelhantes aos demais tratamentos (ou seja: apesar de Controle água $\approx$ Controle seco, e Controle Seco $<$ demais tratamentos; Controle água $\approx$ demais tratamentos).

Relacionando os resultados obtidos com o conjunto total ao apresentado pela colônia II, optamos por realizar uma análise estatística diferente (Relatório 6 - CD), na qual retiramos o Controle Seco e comparamos todos os tratamentos restantes. O resultado dessa análise também revelou questões interessantes, pois apesar da análise de variâncias acusar diferença significativa, o teste de Tukey para comparação multipareada, não foi capaz de encontrar entre quais tratamentos estava(m) essa(s) diferença(s). Essa curiosa rede de fatos envolvendo o Controle Água levou a optar-se por mais uma forma de analisar os dados, substituindo o teste de Tukey para comparação multipareada (que compara pareadamente todos contra todos) pelo teste de Dunn (Relatório 7 - CD), que permite que se comparem todos contra um, no caso definido como Controle Água. Essa análise, na ausência do Controle Seco, apontou diferenças significativas entre o Controle Água e as duas menores concentrações, e entre o Controle Água e o Controle Dieta. Em todos esses casos a mortalidade foi mais rápida no Controle Água.

Assim sendo, o que se pode depreender é que o oferecimento da dieta sólida (Controle Dieta) é capaz de prolongar a vida das formigas quando comparado com a ausência de oferecimentos (Controle Seco), corroborando a idéia proposta por Bueno e colaboradores (1997). Já em relação ao oferecimento de água, os resultados não foram capazes de nos indicar relações claras com a sobrevivência das formigas. Como mencionado, os valores obtidos no Controle Água não se distanciavam nem dos resultados encontrados no Controle Seco e nem dos encontrados no Controle Dieta. Contudo, como pode ser visto na Tabela 3, os resultados do Controle Água (média = 5,67 dias) estão muito mais próximos aos do Controle Seco (média = 5,00 dias) do que dos resultados dos demais tratamentos (médias > 7 dias). Assim, uma possível explicação para esse comportamento seria o fato de que a ingestão de água seja capaz de prolongar a sobrevivência das formigas em condições experimentais, conforme descrito por Löeck & Rosenthal (1997) e Bueno e colaboradores (1997), contudo, de maneira extremamente sutil, de forma que não pode ser sensivelmente detectada nem pelos testes estatísticos empregados aos dados desse experimento e àqueles gerados pelo experimento de oferecimento de sinigrina em solução aquosa.

Em relação aos efeitos da sinigrina sobre a mortalidade das formigas, os resultados fornecem fortes indícios que, nas condições testadas, esse metabólito não tem efeito algum sobre a sobrevivência das formigas. Essa observação reforça e estende a afirmação de muitos autores (e.g. Buskov *et al.*, 2002; Halkier & Gershenzon, 2006) de que os glucosinolatos por si só não possuem efeitos biológicos, mas sim seus subprodutos.

Assim, parece indiscutível que a utilização de dietas sólidas artificiais, uma metodologia já bastante utilizada na modelagem de experimentos para o estudo dos efeitos de substância sobre a sobrevivência das formigas (e.g. Bueno *et al.*, 1997; Petacci, 2001; Pagnocca *et al.*, 2006), realmente atende o pré-requisito mínimo de prolongar a sobrevivência das formigas. Todavia, a aplicação dos resultados gerados através dessa metodologia à resolução das questões referentes à toxicidade dessas substâncias em condições naturais não parece tão

direta. Uma das razões é o fato das condições experimentais serem muito diferentes daquelas do inseto em suas condições naturais. Tal fato é notadamente evidenciado pelo tempo de sobrevivência das formigas que, mesmo nas condições Controle mais favoráveis, não passaram de algumas semanas (o mesmo pode ser visto em outros trabalhos Bueno *et al.*, 1997; Petacci, 2001; Silva *et al.*, 2003; Pagnocca *et al.*, 2006) ao passo que algumas estimativas a respeito do tempo de vida de *Atta* chegam a mais de 30 semanas (Ridley *et al.*, 1996) e 19 meses no caso de *Cyphomyrmex* (Weber, 1966). Esses dados denotam que as condições experimentais são por si só altamente nocivas às formigas. Além disso, os efeitos das substâncias podem variar muito entre a condição natural e a experimental, visto que no primeiro caso a ação sinérgica de outras substâncias poderia modificar os efeitos dos metabólitos.

I.4.3. Seleção do meio de cultura do fungo

O estabelecimento das linhagens dos fungos foi um processo bastante trabalhoso que exigiu uma série de tentativas antes de se conseguir obter culturas dos fungos mutualistas crescendo livres de agentes contaminantes. A identificação do fungo pode ser facilmente feita com base na sua coloração bastante alva e na presença dos gongilídeos (Fig. 4), estruturas diagnósticas dos fungos das Attini derivadas.

Figura 4. Fotografias em microscopia dos gongilgideos sob diferentes aumentos.

Após estabelecimento das linhagens, pode-se dar início ao experimento para seleção do meio de cultura. Nesse experimento, somente em uma placa para cada meio de cultura testado se desenvolveram outros microrganismos (Tabela 4). Dessa forma, quase todas as linhagens apresentaram duplicatas, que no conjunto de dados do experimento constituem pseudoréplicas denominadas de "opção 1" e "opção 2". Diante dessa situação, algumas posturas poderiam ser tomadas. A mais indicada seria a escolha, ao acaso, de apenas uma dentre as duas pseudoréplicas. Uma forma para exercer esse tipo de escolha é o sorteio amostra por amostra, entre a opção 1 ou a opção 2. Porém, dado que na montagem do experimento não havia nada que distinguisse as duas opções, de forma que a numeração 1 ou 2 foi atribuída a réplicas

originalmente indistinguíveis, então a simples opção por uma seqüência (todas as "1" ou todas as "2") já é uma forma de escolha ao acaso. Assim sendo, optou-se por utilizar aquelas seqüências completas, ou seja, sem placas excluídas por contaminações e que por isso forneceriam o maior número amostral: MEA LP-1 e Meio B ágar-1 (Tabela 4). A aplicação do teste Mann-Whitney Rank Sum sobre essas duas seqüências (Relatório 8 - CD) apontou que os valores de crescimento radial do fungo obtidos no meio MEA LP são estatisticamente superiores àqueles obtidos no Meio B ágar.

Tabela 4. Médias em milímetros dos 4 raios de cada placa no 28º dia do experimento de seleção de meio de cultura. O * corresponde às placas contaminadas e que por isso tiveram seus resultados descartados.

	Médias dos raios (mm)			
	MEA LP - 1	MEA LP - 2	Meio B ágar - 1	Meio B ágar - 2
Linhagem 1	26,25	25,50	18,25	35,00
Linhagem 2	25,75	25,25	29,50	31,00
Linhagem 3	29,00	28,25	20,75	32,25
Linhagem 4	30,75	22,50	16,75	*
Linhagem 5	22,25	22,25	16,00	16,50
Linhagem 6	19,00	18,25	25,75	22,25
Linhagem 7	19,75	22,00	12,25	20,75
Linhagem 8	33,50	*	17,50	13,50
Média	25,78	23,42	19,59	24,46

Porém, uma observação mais atenta dos resultados mostrados na Tabela 4 chama a atenção para dois fatos. O primeiro é que as duas pseudoréplicas de cada amostra (opção 1 e opção 2) nem sempre apresentaram valores mais próximos entre si do que com aqueles das outras linhagens, indicando a existência de outras fontes de variabilidade que não simplesmente a genética individual de cada linhagem. O segundo é que as duas seqüências analisadas na primeira análise estatística (Relatório 8), a qual apontou a diferença entre os dois meios, acabou por comparar a seqüência de maior média (25,78 mm) com aquela de menor média (19,59 mm). Por isso, uma nova abordagem estatística foi realizada comparando uma a uma as 4 seqüências (Relatório 9 - CD). Essa análise apontou que as duas seqüências

(pseudoréplicas) de cada meio de cultura (opções 1 e 2) não eram estatisticamente distintas entre si, o que era esperado, dado que se tratavam da mesma população amostral. Porém, mostrou que dentre as 4 possíveis comparações entre o meio MEA LP e o Meio B ágar (MEA LP-1 x Meio B ágar-1, MEA LP-1 x Meio B ágar-2, MEA LP-2 x Meio B ágar-1 e MEA LP-2 x Meio B ágar-2) apenas a comparação entre as duas seqüências casualmente usadas no Relatório 8 (MEA LP-1 x Meio B ágar-1) apresentaria diferenças estatisticamente significantes.

Como já foi dito anteriormente, o uso da seqüência 1 ou da seqüência 2 ou mesmo da mistura randômica não redundante entre as duas (sorteio par a par de uma dentre as duas opções), não altera o princípio da aleatoriedade da amostragem. Contudo, assim como a comparação entre o meio MEA LP e o Meio B ágar, quando feito com diferentes seqüências, apresenta resultados estatisticamente diferentes, é dedutível que a randomização por sorteio par a par poderia tanto intensificar a existência de diferença quanto a ausência de diferença entre os dois meios de cultura. Essa observação denota que, nas condições em que o experimento foi desenvolvido, os dois meios de cultura testados não influenciam de maneira significativa o crescimento radial do fungo.

Assim, definido que as taxas de crescimento foram semelhantes em ambos os meios, o meio de cultura MEA-LP apresentou-se como uma alternativa tão adequada quanto o do Meio B ágar. No entanto, por apresentar formulação mais simples e ser mais translúcido e homogêneo, o meio MEA-LP foi adotado para a realização dos ensaios da influência da sinigrina no crescimento *in vitro* do fungo. Tendo em vista que essa aparência do meio MEA LP é mais adequada ao método de medição radial, pois permite melhor visualização do contraste entre as regiões cobertas pelo fungo e aquelas onde o fungo ainda não cresceu (Fig. 5).

Figura 5. Fotos tiradas do verso de placas contendo o fungo mutualista crescendo sobre o meio de MEA-LP. I - Fungo em seu estágio inicial de crescimento em placa de petri de 10 cm. A, B, C e D são os eixos de medida. O círculo preto corresponde à marcação da borda do inóculo. O círculo vermelho pontilhado destaca a área sobre a qual o fungo já cresceu. II - Fungo após 4 semanas de crescimento em placa de petri de 5 cm. Cada marcação nos eixos corresponde a uma semana de medição.

I.4.4 - Efeitos da sinigrina no crescimento do fungo

Um estudo completo sobre os efeitos de alguma substância sobre colônias de formigas Attini não pode restringir-se ao inseto e omitir-se das investigações sobre o fungo mutualista (Godoy *et al.*, 2005), afinal, não se pode esquecer que grande parte do título de herbívoro dado a esses insetos é na verdade um reflexo da habilidade do fungo em digerir os substratos vegetais coletados pelas formigas. No presente estudo, o fungo foi isolado e testado *in vitro* em meio de cultura contendo sinigrina por meio de dois ensaios (ver item I.3.3).

Durante a realização do ensaio 1, uma das linhagens sofreu contaminação em todos os tratamentos e por isso foi eliminada do teste, já que esse padrão de contaminação em todas as placas contendo determinada linhagem sugere uma possível contaminação da matriz. Houve mais dois casos de contaminações, ambos no tratamento de menor concentração ($1,5 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/g}$). Contudo, esses padrões de contaminações mais esparsos provavelmente se devem a falhas na manipulação das placas, e por isso somente as placas contaminadas foram descartadas e não a linhagem toda.

A média entre os quatro raios de cada placa, assim como a média total para cada tratamento, podem ser vistas na Tabela 5. A análise estatística desses dados (Relatório 10 - CD) mostrou que os valores de crescimento dos fungos na maior concentração testada ($1,5 \mu\text{mol/g}$) são significativamente menores do que nos demais tratamentos, com exceção do tratamento com a menor concentração do metabólito ($1,5 \times 10^{-3} \mu\text{mol/g}$).

Tabela 5. Médias em milímetros dos 4 raios de cada placa no 28º dia do ensaio 1 do experimento de crescimento do fungo em meio de cultura contendo sinigrina. O * corresponde às placas contaminadas e que por isso tiveram seus resultados descartados.

	Tratamentos				
	Controle	$1,5 \mu\text{mol/g}$	$1,5 \times 10^{-1} \mu\text{mol/g}$	$1,5 \times 10^{-2} \mu\text{mol/g}$	$1,5 \times 10^{-3} \mu\text{mol/g}$
Linhagem 2	11,75	11,75	16,00	14,50	*
Linhagem 3	18,87	0	13,75	17,50	13,00
Linhagem 4	16,00	6,75	10,75	14,00	*
Linhagem 5	11,12	0	12,50	9,37	11,50
Linhagem 6	9,75	9,12	13,00	9,62	10,50
Linhagem 7	11,25	0	10,00	12,50	8,50
Linhagem 8	16,50	0	17,00	15,00	15,25
Média em cada tratamento	13,60	3,94	13,28	13,21	11,75

O comportamento do fungo em cada um dos tratamentos pode ser visualizado na figura 6. Em linhas gerais esse resultado mostra que a presença de sinigrina na concentração de $1,5 \mu\text{mol/g}$ de meio de cultura é potencialmente nociva ao desenvolvimento do fungo e que concentrações iguais ou abaixo de $1,5 \times 10^{-1} \mu\text{mol/g}$ de meio provavelmente não afetam o seu desenvolvimento (visto que não foram estatisticamente diferentes do controle).

Figura 6 Crescimento médio do fungo em milímetros ao longo do experimento. Em rosa, destaca-se a seqüência correspondente ao comportamento do fungo no meio de cultura contendo a maior concentração de sinigrina.

Porém, esses dados mostram algumas peculiaridades que devem ser exploradas para compreender melhor as razões por trás desses resultados. A primeira delas é o fato de que apesar do crescimento do fungo na maior concentração ($1,5 \mu\text{mol/g}$) ser estatisticamente diferente do crescimento do fungo nas concentrações intermediárias ($1,5 \times 10^{-1}$ e $1,5 \times 10^{-2} \mu\text{mol/g}$), não é diferente do fungo crescido na menor concentração ($1,5 \times 10^{-3} \mu\text{mol/g}$). Isso provavelmente foi fruto de casualidade amostral aliada à sensibilidade do teste. Pois, como pode ser visto na figura 6, claramente os resultados do tratamento com a maior concentração ($1,5 \mu\text{mol/g}$) se distanciam do grupo formado por todos os demais tratamentos (controle; $1,5$; $1,5 \times 10^{-1}$; $1,5 \times 10^{-2}$ e $1,5 \times 10^{-3} \mu\text{mol/g}$).

Outro ponto há ser explorado é a peculiaridade dos resultados encontrados no tratamento de maior concentração ($1,5 \mu\text{mol/g}$). Como pode ser visto na Tabela 5 e na figura 7, em algumas placas o fungo teve crescimento zero, ou seja, ocorreu a morte do inóculo. O que já podia ser percebido desde a primeira semana de experimento. Contudo, observando-se individualmente os valores de cada placa desse tratamento, percebe-se que aqueles valores das placas onde o inóculo sobreviveu foram muito semelhantes àqueles encontrados nos demais tratamentos. Assim, mesmo sabendo da implicação na redução do número amostral, a opção por

realizar uma análise estatística excluindo os valores das placas em que houve morte do fungo pareceu interessante. Nessa análise, o número amostral do tratamento com a maior concentração de metabólito ($1,5 \mu\text{mol/g}$) foi reduzido a somente três amostras, o que acarreta em uma série de imprecisões estatísticas. Contudo, o que se notou foi que apesar de ainda se manter em média menor, o crescimento do fungo nesse tratamento aproximou-se consideravelmente dos valores dos demais (fig. 8), a ponto dos testes estatísticos não mais acusarem diferenças significativas entre esse tratamento e os demais.

Figura 7. Conjunto de tratamentos do ensaio 1. A - controle (meio de cultura sem sinigrina); B - meio de cultura contendo $1,5 \mu\text{mol/g}$ de sinigrina; C - meio de cultura contendo $1,5 \times 10^{-1} \mu\text{mol/g}$ de sinigrina; D - meio de cultura contendo $1,5 \times 10^{-2} \mu\text{mol/g}$ de sinigrina; E - meio de cultura contendo $1,5 \times 10^{-3} \mu\text{mol/g}$ de sinigrina.

Esses resultados indicam que possivelmente $1,5 \mu\text{mol/g}$ de meio de cultura seria uma concentração muito próxima de uma concentração crítica, acima da qual a sinigrina tenha efeitos nocivos e abaixo da qual o fungo possa se desenvolver. Entretanto, por algum motivo, como predisposição genética, algumas linhagens de fungo poderiam ter esse limiar de toxicidade variando acima e abaixo dessa concentração, explicando assim a sobrevivência de alguns dos inóculos.

Figura 8. Crescimento médio do fungo em milímetros excluindo-se os valores de crescimento zero (morte do inoculo). Em rosa, nota-se que a seqüência correspondente ao crescimento do fungo no tratamento contendo a maior concentração de sinigrina aproximou-se bastante dos demais tratamentos.

Além dessas questões expostas pelas análises dos resultados do primeiro experimento, foram encontrados alguns trabalhos que relataram a ocorrência de degradação térmica da sinigrina (Bones & Rossiter, 2006), o que suscitou a realização de um breve teste para verificar se o processo de autoclavagem poderia levar à degradação da sinigrina. O resultado mostrou que uma solução concentrada de sinigrina autoclavada por 30 min a 1,2 kgf/cm² apresentou uma queda de quase 50% na área de seu pico obtidos em CLAE. Por isso, um segundo ensaio (ensaio 2) foi desenhado visando sanar essas questões.

O ensaio 2 foi executado com três mudanças básicas em relação ao ensaio 1: o aumento do número amostral de 7 para 18, o que permitiria uma maior resolução nos testes estatísticos; a incorporação da sinigrina somente após a autoclavagem do meio de cultura, para se evitar qualquer degradação térmica; e a utilização de duas concentrações de sinigrina: 1 µmol/g (Tratamento 1) e 10 µmol/g (Tratamento 2) de sinigrina, que envolveu um intervalo abaixo e acima da concentração crítica encontrada no ensaio 1.

Contudo, diferente do que aconteceu no primeiro ensaio, desta vez não houve a morte ou ausência de crescimento do inoculo em qualquer placa, e tanto as médias (Tabela 6) quanto o

comportamento (Fig. 9) do fungo em todos os tratamentos foram muito semelhantes, o que foi confirmado pelo teste Kruskal-Wallis (Relatório 11 - CD), que apontou a ausência de diferenças estatisticamente significantes entre esses três tratamentos.

Tabela 6. Médias em milímetros dos 4 raios de cada placa no 28º dia do ensaio 2 do experimento de crescimento do fungo em meio de cultura contendo sinigrina. O * corresponde às placas contaminadas e que por isso tiveram seus resultados descartados.

	Tratamentos		
	Controle	1 $\mu\text{Mol/g}$	10 $\mu\text{Mol/g}$
Linhagem 1	9,33	*	9,25
Linhagem 2	7,37	9,00	8,12
Linhagem 3	8,37	9,75	10,75
Linhagem 4	9,75	10,75	15,00
Linhagem 5	14,00	12,62	15,25
Linhagem 6	8,00	7,62	6,75
Linhagem 7	9,00	10,50	7,50
Linhagem 8	9,75	9,75	9,75
Linhagem 9	17,00	9,33	16,25
Linhagem 10	9,62	14,50	13,00
Linhagem 11	11,50	11,50	11,75
Linhagem 12	10,25	9,75	9,75
Linhagem 13	8,00	11,00	17,50
Linhagem 14	9,00	9,75	9,75
Linhagem 15	10,00	15,62	10,50
Linhagem 16	8,50	7,75	9,50
Linhagem 17	12,25	13,12	13,50
Linhagem 18	9,66	13,37	12,12
Média em cada tratamento	10,07	10,92	11,44

Figura 9. Linhagem de fungo após 28 dias de cultivo. 23A - no controle; 23B - Tratamento 1 (1 $\mu\text{mol/g}$); 23C - Tratamento 2 (10 $\mu\text{mol/g}$).

Dentre outras razões, esse segundo ensaio foi pensado devido a provável degradação térmica da sinigrina durante a autoclavagem (Bones & Rossiter, 2006). A princípio, a maior preocupação foi a suspeita de superestimar os valores críticos das concentrações nas quais a sinigrina teria efeito no crescimento do fungo, pois provavelmente a concentração real do metabólito no meio de cultura autoclavado seria menor do que aquela originalmente incorporada. Mesmo não tendo avaliado diretamente a ocorrência dessa degradação no meio de cultura, o simples teste de autoclavagem da solução de sinigrina mostrou indícios dessa degradação. Contudo, aparentemente o principal efeito dessa degradação não foi a queda na concentração do metabólito, mas sim uma provável geração de isotiocianatos e nitrilas como subprodutos da degradação térmica da sinigrina (Bones & Rossiter, 2006). Possivelmente esses produtos permaneceram retidos na matriz do meio de cultura e foram os responsáveis pela mortalidade de alguns inóculos e pela queda do crescimento dos fungos sobreviventes.

Como já mencionado algumas vezes, a grande maioria dos autores não atribui atividades biológicas aos glucosinolatos intactos, mas sim aos seus produtos de hidrólise (Halkier & Gershenzon, 2006; Buskov *et al.*, 2002). Assim, dadas as circunstâncias envolvidas em cada caso, as divergências entre o ensaio 1 e o ensaio 2 podem ser explicadas em termos da presença ou ausência desses produtos formados via degradação térmica (Bones & Rossiter, 2006).

Apesar de alguns autores considerarem os glucosinolatos alifáticos uma classe relativamente mais estável termicamente (Oerlemans *et al.*, 2006), experimentos baseados na degradação da sinigrina utilizando cromatógrafo a gás com diferentes temperaturas do injetor e da coluna mostraram que à temperatura de 200° C, 76% da sinigrina foi decomposta a nitrilas e isotiocianatos (MacLeod *et al.*, 1981). Produtos esses possivelmente responsáveis pelos resultados encontrados no primeiro ensaio.

I.5. Conclusões

O meio de cultura MEA-LP apresentou taxas de crescimento radial bastante similares ao encontrado com o Meio B Ágar, prestando-se assim como alternativa mais prática ao sistema de medição radial, uma vez que apresenta composição mais simples e maior transparência. Já o crescimento do fungo neste meio de cultura não parece sofrer qualquer alteração quando se incorpora sinigrina íntegra. Contudo, quando o meio de cultura contendo esse metabólito em concentrações acima de 1,5 $\mu\text{mol/g}$ é submetido ao processo de autoclavagem, esse quadro apresenta diferenças significativas, provavelmente em decorrência da decomposição térmica da sinigrina gerando isotiocianatos e nitrilas, tornando o ambiente bastante hostil ao desenvolvimento do fungo.

Quanto às formigas, o método de oferecimento de metabólitos em solução aquosa se mostrou inadequado, pois não mostrou sinais claros da ingestão de água ou que isso aumentaria a sobrevivência das formigas. Já a ingestão de sinigrina intacta via dieta sólida deu sinais de que não é capaz de alterar as taxas de mortalidade do inseto.

Esses resultados são congruentes com os muitos relatos sobre os baixos níveis de atividades biológicas dos glucosinolatos íntegros. Contudo, também dão indícios de que os glucosinolatos podem vir a intermediar a interação entre as plantas que os produzem e as formigas cortadeiras, pois os supostos subprodutos da sinigrina formados via degradação térmica mostraram ter fortes efeitos negativos sobre o desenvolvimento do fungo. Esses efeitos podem ser similares aos que apresentariam os produtos formados através de degradação enzimática.

I.6. Bibliografia

- Aliabadi, A.; Renwick, J.A.A.; & Whitman, D.W. 2002. Sequestration of glucosinolates by harlequin bug *Murgantia histrionica*. *Journal of Chemical Ecology*, 28(9):1749-1762.
- Andréasson, E.; Jørgensen, L.B.; Höglund, A.S.; Rask, L. & Meijer, J. 2001. Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 127:1750-1763.
- Angiosperm Phylogeny Website. Banco de dados mantido pelo Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acessado em 09/08/2007.
- Bass, M. & Cherrett, J.M. 1995. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Physiological Entomology*, 20(1):1-6.
- Bones, A.M. & Rossiter, J.T. 2006. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolatos. *Phytochemistry*, 67:1053-1067.
- Brader, G.; Tas, E. & Palva, E.T. 2001. Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiology*, 126:849-860.
- Brandão, C.R.F. & Mayhé-Nunes, A.J. 2001. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 38:639-665.
- Brusca, C. & Brusca, J. 2007. *Invertebrados*. 2ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Bueno, O.C.; Morini, M.S.C.; Pagnocca, F.C. & Hebling, M.J.A. 1997. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 26(1):107-113.
- Busch, L.; Gunter, V.; Mentele, T.; Tachikawa, M. & Tanaka, K. 1994. Socializing nature - technoscience and the transformation of rapeseed into canola. *Crop Science*, 34(3):607-614.
- Buskov, S.; Serra, B.; Rosa, E.; Sørensen, H. & Sørensen, J.C. 2002. Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* Cv. Woll). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:690-695.
- Currie, C.R. 2002. *Ants, Agriculture, And Antibiotics*. In: Seckbach, J. 2002. *Symbiosis: mechanisms and model system*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston.
- Currie, C.R.; Scott, J.A.; Summerbell, R.C. & Malloch, D. 2003. Corrigenda de "Currie e colaboradores 1999a (Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites)". *Nature*, 423:461.

- Domiciano, N.L. Publicação on-line [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <danieltanigushi@yahoo.com.br> em 13/09/05.
- Fahey, J.W.; Zalcman, A.T. & Paul Talalay. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56:5-51.
- Fernandes, J.B.; David, V.; Facchini, P.H.; Silva, M.F.G.F.; Rodrigues Filho, E.; Vieira, P.C.; Galhiane, M.S.; Pagnocca, F.C.; Bueno, O.C.; Hebling, M.J.; Victor, S.R. & Santos, A.M.R. 2002. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbionte. *Química Nova*, 25:1091-1095.
- Godoy, M.F.P.; Victor, S.R.; Bellini, A.M.; Guerreiro, G.; Rocha, W.C.; Bueno, O.C.; Hebling, M.J.A.; Bacci, M.C.; Silva, M.F.G.F.; Vieira, P.C.; Fernandes, J.B. & Pagnocca, F.C. 2005. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(3B):669-672.
- Halkier, B.A. & Gershenzon, J. 2006. Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 57:303-333.
- Kim, S.J.; Matsuo, T.; Watanabe, M. & Watanabe, Y. 2002. Effect of nitrogen and sulphur application on the glucosinolate content in vegetable turnip rape (*Brassica rapa* L.). *Soil Science and Plant Nutrition*, 48(1):43-49.
- Kliebenstein, D.; Pedersen, D.; Barker, B. & Mitchell-Olds, T. 2002. Comparative analysis of quantitative trait loci controlling glucosinolates, myrosinase and insect resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 161:325-332.
- Knapp, J. J.; Howse, P. E.; Kermarrec, A., 1990: Factors controlling foraging patterns in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich). In: Vander Meer, R.K.; Jaffé, K. & Cedenio, A. 1990. *Applied Myrmecology: a World Perspective*. Boulder: Westview Press. San Francisco, Oxford: 382-409.
- Li, X. & Kushad, M.M. 2004. Correlation of glucosinolate content to myrosinase activity in horseradish (*Armoracia rusticana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:6950-6955.
- Löeck, A.E. & M.D.A. Rosenthal. 1990. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens* piriventris (Hymenoptera: Formicidae) na presença de substratos líquidos. *Revista Ciência e Cultura*, 42:990-992.
- MacLeod, A.J.; Panesar, S.S. & Gil, V. 1981. Thermal-degradation of glucosinolatos. *Phytochemistry*, 20(5):977-980.
- Mehdiabadi, N.J.; Hughes, B. & Mueller, U.G. 2006. Cooperation, conflict, and coevolution in the attine ant-fungus symbiosis. *Behavioral Ecology* 17(2):291-296.
- Mohali, S. 1998. Ultrastructural and morphological study of the mutualistic fungus of the ant *Atta cephalotes*. *Revista de Ecología Latino Americana*, 5(3)01-06.

- Moser, J.C. 2006. Complete Excavation and Mapping of a Texas Leafcutting Ant Nest. *Annals of The Entomological Society of America*, 99(5):891-897.
- Mueller, U.G. 2002. Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. *The American Naturalist*, 160(Supplement): 67-98.
- Mueller, U.G.; Gerardo, N.M.; Aanen, D.K.; Six, D.L. & Schultz, T.R. 2005. The evolution of agriculture in insects. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 36:563-95.
- Nascimento, R.R.D.; Schoeters, E.; Morgan, E.D.; Billen, J. & Stradling, D.J. 1996. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes* and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera:Formicidae). *Journal of Chemical Ecology*, 22(5):987-1000.
- Newman, R.M.; Hanscom, Z. & Kerfoot, W.C. 1992. The watercress glucosinolate-myrosinase system - a feeding deterrent to caddisflies, snails and amphipods. *Oecologia*, 92(1):1-7.
- Oerlemans, K.; Barrett, D.M.; Suades, C.B.; Verkerk, R. & Dekker, M. 2006. Thermal degradation of glucosinolates in red cabbage. *Food Chemistry*, 95(1):19-29.
- Pagnocca, F.C.; Victor, S.R.; Bueno, F.C.; Crisóstomo, F.R.; Castral, T.C.; Fernandes, J.B.; Corrêa, A.G.; Bueno, O.C.; Bacci, M.; Hebling, M.J.A.; Vieira, P.C. & Silva, M.F.G.F. 2006. Synthetic amides toxic to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* L. and its symbiotic fungus. *Agricultural and Forest Entomology*, 8:17-23.
- Peres, A.P.; Silva-Mann, R.; Vieira, M.G.G.C. & Machado, J.C. 2003. Variabilidade Morfocultural e Genética de Fungos Associados à Podridão Peduncular do Mamão. *Ciência e Agrotecnologia*, 27(5):1053-1062.
- Petacci, F. 2001. *Aspectos Químicos de Um Ninho de Saúvas (Atta sexdens L.) e Propriedades Inseticidas de Dimorphandra mollis (Fabaceae, Caesalpinoideae)*. Tese de doutorado apresentada no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.
- Rangkadilok, N.; Nicolas M.E.; Bennett, R.N.; Premier, R.R.; Eagling, D.R. & Taylor, P.W.J. 2002. Developmental Changes of Sinigrina and Glucoraphanin in three *Brassica* species (*Brassica nigra*, *Brassica juncea* and *Brassica oleracea* var. *italica*). *Scientia Horticulturae*, 96:11-26.
- Rask, L.; Andreasson, E.; Ekbom, B.; Eriksson, S.; Pontoppidan, B. & Meijer J. 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology*, 42(1):93-113.
- Richard, F.J.; Mora, P.; Errard, C. & Rouland, C. 2005. Digestive capacities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 175(5):297-303.
- Ricklefs, E.R. & Miller, G.L. 2000. *Ecology*. 4^o ed. W.H. Freeman. New York.

- Ridley, P.; Howse, P.E. & Jackson, C.W. 1996. Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their symbiotic fungus. *Experientia*, 52:631-365.
- Rockwood, L.L. 1977. Foraging patterns and plant selection in Costa Rica leaf cutting ants. *Journal of the New York Entomological Society*, 85:222-233.
- Rosa, E.A.S. 1997. Daily variation in glucosinolate concentrations in the leaves and roots of cabbage seedlings in two constant temperature regimes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(3):364-368.
- Silva, A.; Bacci, M.; Siqueira, C.G.; Bueno, O.C.; Pagnocca, F.C. & Hebling, M.J.A. 2003. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology*, 49(4):307-313.
- Silva-Pinhati, A.C.O.; Bacci, M.; Siqueira, C.G.; Silva, A.; Pagnocca, F.C.; Bueno, O.C. & Hebling, M.J.A. 2005. Isolation and maintenance of symbiotic fungi of ants in the tribe Attini (Hymenoptera : Formicidae). *Neotropical Entomology*, 34(1):1-5.
- Simmonds, M.S.J.; Blaney, W.M.; Mithen, R.; Birch ANE & Lewis, J. 1994. Behavioral and chemosensory responses of the turnip root fly (*Delia floralis*) to glucosinolatos. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 71(1):41-57.
- Tian, Q.G.; Rosselot, R.A. & Schwartz, S.J. 2005. Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 343(1):93-99.
- Tierens, K.F.M.J.; Thomma, B.P.H.; Brouwer, M.; Schmidt, J.; Kistner, K.; Porzel, A.; Mauch-Mani, B.; Cammue, B.P.A. & Broekaert, W.F. 2001. Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of arabidopsis to microbial pathogens. *Plant Physiology*, 125(4):1688-1699.
- Velasco, P.; Cartea, M.E.; Gonzalez, C.; Vilar, M. & Ordas, A. 2007. Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea acephala* group). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3):955-962.
- Vlieger, L.; Brakefield, P.M. & Muller, C. 2004. Effectiveness of the defence mechanism of the turnip sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera : Tenthredinidae), against predation by lizards. *Bulletin of Entomological Research*, 94(3):283-289.
- Weber, N.A. 1966. Fungus-Growing Ants. *Science*, 153:587-604.

Resumo

Os glucosinolatos são metabólitos secundários amplamente conhecidos por terem sua distribuição quase totalmente restrita às Brassicales, permeando grande parte das interações ecológicas dessas plantas. Recentemente, esses metabólitos vêm sendo apontados como proeminentes fatores na dieta humana, pois diversos estudos apontaram que a ingestão de alguns desses metabólitos tem efeitos positivos para a saúde, como propriedades anticarcinogênicas relacionadas à ativação de enzimas do metabolismo xenobiótico. Dentre as fontes dietéticas desses metabólitos, destaca-se a espécie *Brassica oleraceae*, que compreende uma grande diversidade de hortaliças tradicionalmente cultivadas. Neste estudo, foram analisadas as composições de glucosinolatos em plântulas de 6 variedades de *B. oleraceae* utilizando-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção em UV (CLAE) e em espectrômetro de massas (CLAE/MS). Dez glucosinolatos foram encontrados, dentre os quais glucoiberina, sinigrina e progoitrina foram os mais abundantes. Os resultados também apontaram que, apesar de se tratarem da mesma espécie, o conteúdo de glucosinolatos é bastante distinto entre as variedades, dentro das quais as amostras mostraram um padrão relativamente bem estável, apresentando sempre os mesmos glucosinolatos em proporções relativas semelhantes.

Abstract

Glucosinolates are secondary metabolites with restrict distribution among Angiosperms, almost exclusively in Capparales. These compounds have been shown to exert important roles in plant-herbivore relationships. Recently, glucosinolates have been pointed out as health promoters regarding cancer prevention in a wide range of animal models. Several crops of *Brassica oleracea* are important sources of glucosinolates in human diet. In the

present study, glucosinolate contents of seedlings of six varieties of *B. oleracea* were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (HPLC/MS). Ten glucosinolates were identified. Glucoiberin, sinigrin and progoitrin were the most abundant. Although all analyzed varieties belong to the same species, they are distinct as to the respective glucosinolate contents. However, glucosinolate profiles were highly conservative among different samples of the same variety.

II.1. Introdução

Brassicaceae, também conhecida como Cruciferae, é uma importante família botânica por apresentar diversas espécies cultivadas para a produção de sementes oleaginosas, hortaliças, condimentos, entre outras (Rask *et al.*, 2000). Caracteristicamente, as plantas dessa família apresentam uma classe de metabólitos secundários chamados de glucosinolatos, ou glicosídeos do óleo da mostarda (Halkier & Gershenzon, 2006; Vaughn & Berhow, 2005; Koroleva, *et al.*, 2000). Esses metabólitos possuem distribuição quase que exclusiva às Brassicales (Angiosperm Phylogeny Website; Fahey *et al.*, 2001), por isso já foram utilizados em algumas propostas taxonômicas como importantes caracteres para o agrupamento das plantas que os contêm (Rodman *et al.*, 1996; Rask *et al.*, 2000).

Cerca de 120 glucosinolatos já foram descritos, todos com estruturas químicas muito semelhantes, contendo um tioglicosídeo formando uma estrutura principal fixa e uma cadeia lateral variável (Grupo R) derivada de aminoácidos (Andréasson *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2004). Sendo o grupo R a única região variável na estrutura dos glucosinolatos, é com base nessa porção da molécula que se faz a classificação desses metabólitos. Como esse grupo deriva de aminoácidos, então a primeira divisão dos glucosinolatos pode ser feita com base nos seus aminoácidos precursores. Assim, aqueles que derivam de alanina, isoleucina, leucina, metionina ou valina são chamados glucosinolatos alifáticos, os derivados de fenilalanina ou

tirosina são chamados de glucosinolatos aromáticos, e os derivados de triptofano são chamados de indolglucosinolatos (Fahey *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2005; Halkier & Gershenzon, 2006).

Os glucosinolatos são os responsáveis pelo odor e sabor característicos dos vegetais que os contêm, tais como o repolho (*Brassica oleraceae*), a mostarda (*Sinapis alba*) e a raiz forte (*Armoracia lapathifolia*) (Rask *et al.*, 2000; Halkier & Gershenzon, 2006), sendo essas características mais diretamente relacionadas aos produtos de hidrólise desses metabólitos.

A hidrólise dos glucosinolatos é catalisada pela mirosinase, nome dado a uma família de isoenzimas β -tioglucosídeo-glucohidrolases presentes em todas as plantas produtoras de glucosinolatos (Husebye *et al.*, 2002; Halkier & Gershenzon, 2006). Na planta íntegra, essa enzima encontra-se separada espacialmente dos glucosinolatos, mas quando os tecidos são lesados a enzima encontra com seu substrato e desencadeia a produção de uma gama de possíveis produtos, como ticianatos, nitrilas, epitionitrilas, oxazolidina-2-tionas e, principalmente, isotiocianatos. A produção desses produtos é definida pelos glucosinolatos de origem e por fatores que alteram as condições de hidrólise tais como temperatura, pH, concentração de íons metálicos, presença de proteínas e co-fatores (Kelly *et al.*, 1998; Rask *et al.*, 2000; Tais & Zeiger, 2004; Vaughn & Berhow, 2005; Bones & Rossiter, 2006; Halkier & Gershenzon, 2006; Rungapamestry *et al.*, 2006).

Esse conjunto formado pela mirosinase, os glucosinolatos e seus produtos de hidrólise está envolvido em grande parte das interações ecológicas das Brassicaceae. A esse conjunto são atribuídas atividades na dissuasão de uma grande variedade de herbívoros generalistas. Porém, esses mesmos elementos atuam de maneira inversa em herbívoros especialistas, atraindo e estimulando a oviposição e herbivoria desses insetos especializados. Tal como na palatabilidade aos seres humanos, grande parte dessas atividades biológicas atribuídas aos glucosinolatos é diretamente relacionada aos seus produtos de hidrólise.

Apesar dos produtos de hidrólise de certos glucosinolatos causarem efeitos indesejáveis à saúde humana, principalmente por apresentarem ação bociogênica, muitos outros

foram apontados como proeminentes fatores nutracêuticos, principalmente devido às suas propriedades anticarcinogênicas relacionadas à ativação do metabolismo xenobiótico (Halkier & Gershenzon, 2006).

Dentre os modelos vegetais usados nos estudos dos glucosinolatos destacam-se o gênero *Arabidopsis*, que por ter seu genoma completamente sequenciado fornece informações importantes sobre os mecanismos gênicos envolvidos na síntese dessas substâncias, e o gênero *Brassica* (Fahey *et al.*, 2001), por possuir diversas espécies cultivadas tanto em escala industrial (como no caso da canola), como espécies de hortaliças de grande importância em sistemas tradicionais de cultivo. Dentre as hortaliças, *Brassica oleraceae* se destaca por possuir um grande número de variedades cultivadas, como couve, repolho, couve-de-bruxelas, couve-flor, brócolis, entre outras (Velasco *et al.*, 2007).

Brassica possui os glucosinolatos mais intensivamente estudados (Fahey *et al.*, 2001), sendo encontrados cerca de 20 dessas substâncias nesse gênero (Sarwar & Kirkegaard, 1998), dentre os quais a sinigrina (2-propenil- ou alil-glicosinolato) é frequentemente apontada como o glucosinolato predominante (Rosa, 1997; Andréasson *et al.*, 2001; Buskov *et al.*, 2002; Li & Kushad, 2004; Velasco *et al.*, 2007). Esse glucosinolato é também um dos poucos que já se encontra disponível comercialmente (Brown *et al.*, 2003), devido à relativa facilidade com a qual se consegue obtê-lo puro e cristalizado e por ser um dos poucos cujo processo de síntese já atinge a escala de gramas (Fahey *et al.*, 2001).

II.2. Objetivos

Avaliar qualitativa e quantitativamente o conteúdo de glucosinolatos em 6 variedades comerciais de *Brassica oleraceae*.

III.3. Materiais e métodos

Sementes de 6 variedades comumente cultivadas de *Brassica oleracea* foram obtidas junto à empresa ISLA Sementes Ltda. As variedades correspondem a: **Brócolis** - *Brassica oleracea* var. *italica* e *Brassica oleracea* var. *botrytis*, **Couve-de-bruxelas** - *Brassica oleracea* var. *gemmifera*, **Couve-chinesa** - *Brassica oleracea* var. *pekinensis*, **Couve-manteiga** - *Brassica oleracea* var. *acephala* e **Couve-rabano** - *Brassica oleracea* var. *gongylodes*.

O plantio dessas sementes foi realizado em bandejas de isopor de 0,67 m x 0,34 m divididas em 200 células. As células foram preenchidas com substrato comercial indicado para o plantio de solanáceas e brássicas Plantmax Hortaliças HT da Eucatex®, composto por: casca de *Pinus*, vermiculita expandida, turfa, corretivo de acidez e aditivos. Uma semente por célula foi enterrada com o auxílio de um pinça a cerca de 3 mm da superfície. As placas foram molhadas até que o substrato se tornasse saturado e então mantidas a 9°C por dois dias para vernalização. Durante esses dois dias foram tomados os cuidados necessários para compensar a perda d'água do substrato. Após esse período as placas foram transferidas para uma sala de germinação com fotoperíodo controlado de 15 h de claro. A rega foi realizada duas vezes ao dia de modo a garantir condições hídricas adequadas.

Após 10 dias do plantio, as plântulas foram cortadas na altura do substrato. Em virtude da baixa massa da porção aérea de cada plântula, cada amostra foi composta pelo conjunto da porção aérea de cinco plântulas, que foram pesadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Para cada variedade estudada foram coletadas 11 amostras (55 plântulas). As amostras, com 0,3 a 0,6 g, foram armazenadas em freezer a -20° C.

Ainda congeladas, de forma a impedir que a mirosinase degradasse os glucosinolatos, as plântulas foram transferidas para tubos de microcentrífuga com tampas perfuradas e pesados. Esses tubos foram levados a um liofilizador²⁷, onde permaneceram por 3 dias, até que as amostras estivessem completamente secas. Após esse procedimento os tubos foram repesados

²⁷ Liofilização é um processo no qual as amostras são secas a temperaturas negativas por meio de um sistema de vácuo.

e os glucosinolatos extraídos utilizando adaptações entre os métodos descritos por Li & Kushad (2004) e Rangkadilok *et al.* (2002). Os tubos foram aquecidos por 3 min em banho-maria a 95° C para inativação da mirosinase. Em seguida, acrescentou-se 0,5 mL de água fervente e manteve-se os tubos por mais 5 min em banho-maria. Com um pequeno pistilo plástico o material foi triturado com auxílio de sílica para coluna, que serviu como abrasivo. Mais 0,4 mL de água quente foram acrescentados aos tubos, lavando o pistilo utilizado na trituração. A amostra foi centrifugada a 14000 rpm por 15 min a 25° C. O sobrenadante foi recolhido em um novo tubo de microcentrífuga e o resíduo re-extraído mais duas vezes usando 0,5 mL de água em cada re-extração. Os sobrenadantes foram reunidos e o volume final ajustado para 2 mL.

As amostras foram analisadas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em Cromatógrafo HP series II 1090 aparelhado com uma coluna de fase reversa Agilent Zorbax SB-C18 de dimensões: 4,6 x 250 mm. O sistema de solventes utilizado foi baseado no trabalho de Tian e colaboradores (2005) empregando assim ácido trifluoracético 0,5% em água (A) e acetonitrila (B). O gradiente empregado foi: de 0 a 10 minutos = 0 a 15% de B; de 10 a 25 minutos = 15 a 50% de B; de 25 a 27 minutos = 50 a 100% de B; de 27 a 29 minutos = 100 a 15% de B; de 29 a 33 minutos = 15 a 0 % de B e de 33 a 35 minutos = 0 % de B. O fluxo do solvente foi de 1 mL/min, a detecção dos picos feita a 229 ± 4 nm e o volume de amostra injetado foi de 62,4 µL.

A identificação do pico correspondente à sinigrina foi feita por comparação do tempo de retenção de uma cromatografia utilizando-se padrões de sinigrina hidratada de *Armoracia rusticana* da Sigma-Aldrich®. Também foram realizadas cromatografias adicionando o padrão ao extrato de algumas amostras, observando o aumento em intensidade do pico correspondente a substância. A identificação de outros glucosinolatos foi feita através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massas (CLAE/EM) equipado de Electrospray Ion Trap modelo Bruker Daltonics Esquire 300 Plus. A amostra analisada em

CLAE/EM resultou da mistura dos extratos de *Brassica oleraceae* var. *itálica* e *Brassica oleraceae* var. *acephala*, afim de garantir a presença que todos os picos detectados na CLAE. Essa análise foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química-USP com coluna idêntica à utilizada na CLAE e o mesmo gradiente de solventes, mas com fluxo reduzido para 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. O Electrospray foi programado em modo negativo e o Skimmer ajustado em 59V, que conforme o indicado por Mellon e colaboradores (2002), forneceria um número maior de fragmentos dos glucosinolatos. Duas voltagens foram utilizadas no capilar: 2500V, para detecção dos fragmentos abaixo de $m/z = 100$ e 4000V, para detecção dos fragmentos acima de $m/z = 100$.

A quantificação da sinigrina foi feita com base na comparação da área do pico com uma curva padrão, construída com amostra autêntica. A quantificação dos demais glucosinolatos foi de acordo com o método descrito por Brown e colaboradores (2003) para desulfoglucosinolatos baseado no uso de fatores de respostas relativas calculados com referência à sinigrina. Picos com áreas abaixo de 600 mAUxs foram eliminados das análises numéricas e considerados em quantidades traços de glucosinolatos.

II.4. Resultados e Discussão

Um grande obstáculo na análise dos glucosinolatos por métodos de cromatografia líquida, principalmente em fase reversa, é o efeito da carga do grupo sulfato das moléculas desses metabólitos (Bringmann *et al.*, 2005). Para contorná-lo, grande parte dos trabalhos utiliza processos de desulfatação dos glucosinolatos, o que torna o protocolo analítico mais oneroso (Mellon *et al.*, 2002) e impossibilita que esses metabólitos sejam recuperados e utilizados em outros experimentos, pois a eliminação do grupo sulfato acaba por alterar as suas propriedades (Botting *et al.*, 2002). Todavia, o uso de reagentes formadores de pares iônicos também são alternativas capazes de neutralizar a carga do grupo sulfato sem precisar descaracterizar o metabólito. O ácido trifluoracético é um desses reagentes, apontado como a

opção mais prática e que apresenta o melhor resultado em separação (Mellon *et al.*, 2002; Bringmann *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2005), como pode ser visto nas análises em CLAE da Figura 1.

Contudo, aparentemente os diferentes sistemas de detecção e a diminuição do fluxo de solventes empregado acarretaram em diferenças na resolução dos cromatogramas, de forma que as análises feitas em CLAE/EM não apresentaram a mesma eficácia na separação dos picos (Fig. 2). De modo que alguns espectros de massas obtidos mostraram indícios da sobreposição de espectros de mais de um glucosinolato. Algumas diferenças na resolução, nos tempos de retenção e na abundância dos picos também foram detectadas na comparação entre os cromatogramas gerados pelo espectrômetro de massas nas duas diferentes voltagens empregadas no capilar (2500 V e 4000 V).

Figura 1. Cromatogramas representativos das análises em CLAE. A - mistura dos extratos de *B. oleraceae* var. *itálica* e *B. oleraceae* var. *acephala*. B - *B. oleraceae* var. *itálica*. C - *B. oleraceae* var. *acephala*. D - *B. oleraceae* var. *gemmifera*. E - *B. oleraceae* var. *botrytis*. F - *B. oleraceae* var. *pekinensis*. G - *B. oleraceae* var. *gongylodes*. As setas indicam os picos cujos espectros possuem máximo de absorção em 221-230nm. As setas vermelhas indicam os picos relacionados aos glucosinolatos e a seta azul é o único dentre os picos numerados de I a XI que não foi confirmado como glucosinolato.

Figura 2. Cromatogramas gerados pelo espectrômetro de massas referentes às análises da mistura de *B. oleraceae* var. *itálica* e *B. oleraceae* var. *acephala*. Cada seta indica a ocorrência de um possível glucosinolato. A seta verde indica a presença de glucoiberberina ($m/z = 406$), glucosinolato não detectado por Tian e colaboradores (2005) em *B. oleraceae*. A seta amarela indica a presença de 4-metoxiglucobrassicina, que não aparece claramente distinto no cromatograma gerado com capilar em 4000 V (*), provavelmente por que não há uma boa definição dos picos.

Essas diferenças dificultaram a comparação direta entre os cromatogramas gerados em CLAE/EM e entre esses e os cromatogramas gerados em CLAE. Para contornar essa questão, no caso dos cromatogramas gerados em CLAE/EM (com 2500 V e 4000 V), a correspondência dos picos foi feita com base em seus tempos de retenção relativos e, principalmente, nos espectros de massas. Assim, dentre os 17 picos obtidos com capilar em 4000 V e os 18 picos obtidos com capilar em 2500 V, foram encontrados 12 picos que possuíram correspondências. Dentre esses picos, sete mostraram evidências claras de estarem relacionados a glucosinolatos. Porém, devido à sobreposição de espectros em um mesmo pico,

oito glucosinolatos (setas vermelhas na figura 2) puderam ser identificados: glucoiberina, progoitrina, sinigrina, glucorafanina, gluconapina, glucoerucina, glucobrassicina e neoglucobrassicina (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos glucosinolatos mostrados na figura 2 e suas massas moleculares (m/z). A direita estão os glucosinolatos identificados por Tian e colaboradores (2005). Em destaque estão os glucosinolatos encontrados em apenas um dos trabalhos. Frr - Fatores de resposta relativa, retirados de Brown e colaboradores (2003).

Picos	Encontrado		Tian <i>et al.</i> , 2005		Fcr
	Glucosinolatos	m/z	Glucosinolatos	m/z	
1	Glucoiberina	422,0	Glucoiberina	422,0	1,2
2	Progoitrina	388,1	Progoitrina	388,0	1
3	Sinigrina	357,9	Sinigrina	358,0	1
4	Glucorafanina	436,0	Glucorafanina	436,0	0,9
5	Gluconapina	372,0	Gluconapina	372,0	1
6	Glucoiberverina	406,0			0,8
7	Glucoerucina	420,0	Glucoerucina	420,0	0,9
8	Glucobrassicina	447,0	Glucobrassicina	447,0	0,3
			Glucoalissina	450,0	0,9
9	4-Metoxiglucobrassicina	477,0	4-Metoxiglucobrassicina	477,0	0,3
10	Neoglucobrassicina	477,0	Neoglucobrassicina	477,0	0,2

A identificação dos glucosinolatos foi feita com base nos espectros de massas apresentados por Tian e colaboradores (2005), utilizando principalmente os íons moleculares (Tabela 1). A utilização de outros fragmentos não foi possível, pois, apesar de ter-se seguido a opção de voltagem do Skimmer que Mellon e colaboradores (2002) apontaram como mais eficiente para a fragmentação dos glucosinolatos (59V), praticamente não foram detectados fragmentos e os espectros de massas dos glucosinolatos restringiram-se basicamente aos íons moleculares.

A mencionada sobreposição dos espectros de massas de diferentes glucosinolatos ocorreu de forma mais intensa no cromatograma em 4000 V (com a sobreposição dos espectros de até 3 glucosinolatos em um único pico) e em menor grau no cromatograma em 2500 V (com apenas 2 glucosinolatos em um único pico). Essas sobreposições se deram entre o segundo e o

quarto glucosinolatos (Progoitrina, Sinigrina e Glucorafanina), grupo que também aparece em posição bem próxima ao primeiro glucosinolato (Glucoiberina). Esse padrão de separação é muito semelhante ao encontrado por Tian e colaboradores (2005) no estudo que serviu como base para o sistema de solventes usado. Nesse trabalho de 2005, utilizando variedades da mesma espécie, esses mesmos quatro glucosinolatos foram detectados em tempos de retenção muito próximos, chegando a apenas 0,01 minuto de intervalo entre os três primeiros. A proximidade entre esses glucosinolatos foi a motivação dos ajustes no gradiente de solventes usado neste trabalho.

O pico 6 (seta verde na figura 2) apresentou íon molecular de $m/z = 406$ e estava entre o pico referente a gluconapina e glucoerucina. Nessa mesma posição, Tian e colaboradores (2005) não detectaram qualquer glucosinolato nas variedades analisadas de *Brassica oleraceae*. Contudo, 406 é a massa esperada para outro glucosinolato chamado glucoiberverina (Bringmann *et al.*, 2005), o qual já foi encontrado em *B. oleraceae* por Ménard e colaboradores (1999) e que possui estrutura molecular muito semelhante à glucoerucina, com apenas uma unidade CH_2 a mais na cadeia alifática. Assim, dada sua similaridade estrutural, nas presentes condições analíticas a presença da glucoiberverina seria detectada pouco antes da glucoerucina (Bringmann *et al.*, 2005). Dessa forma, o referido pico com íon molecular de $m/z = 406$ foi considerado como glucoiberverina no presente trabalho.

Além desses glucosinolatos que foram detectados pelos espectros de massas das duas análises, um outro foi detectado apenas pela análise em 2500 V (Fig. 2), provavelmente porque essa mostrou melhor delimitação dos picos. Esse glucosinolato, representado pelo pico 9 (seta amarela na figura 2), apresentou $m/z = 477$, a mesma massa da neoglucobrassicina, que aparece pouco depois no pico 10, o que evidencia sua correspondência com o glucosinolato 4-metoxiglucobrassicina (Tian *et al.*, 2005).

Definidas as presenças dos glucosinolatos através da CLAE/MS, pode-se então passar a correlacionar esses resultados com aqueles obtidos para cada amostra em CLAE. Para fazê-lo,

primeiro os cromatogramas referentes a cada variedade foram analisados pico a pico quanto aos seus espectros em UV e todos aqueles que mostraram picos de absorbância entre 221 e 230 nm (Kiddle *et al.*, 2001) foram tabelados, totalizando-se assim 11 picos candidatos a glucosinolatos (I - XI). Assim, pode-se facilmente estabelecer a correlação desses picos candidatos entre as variedades, visto que apresentaram valores de tempos de retenção muito próximos (Fig. 1). Já a correspondência com os 10 glucosinolatos apontados pelas análises em CLAE/EM pode ser feita através de análises de correlação dos tempos de retenção desses 10 picos com os tempos de retenção médios dos 11 picos. Permutando-se 10 a 10, a análise que apresentou o maior índice R^2 foi tomada como a correspondência entre glucosinolatos apontados pelo CLAE/EM e os picos dos cromatogramas das seis variedades em CLAE. Dessa forma, os 10 primeiros picos (I - X) foram identificados como sendo os glucosinolatos relacionados com os picos de 1 a 10. Sendo pareados em ordem sequencial (I-1, II-2, III-3, ..., X-10).

Grande parte das variedades apresentou apenas alguns desses glucosinolatos, sendo *B. oleraceae* var. *gongylodes*. (couve-rabano) a única a possuir todos os 10. Já a variedade *B. oleraceae* var. *pekinensis* (couve-chinesa), no outro extremo, apresentou apenas cinco glucosinolatos. Mesmo quando presentes, alguns foram detectados em quantidades tão pequenas que não puderam ser quantificados seguramente. Por isso, os picos com áreas abaixo de 600 mAUxs foram considerados apenas traços e eliminados das análises numéricas. A Tabela 2 mostra os glucosinolatos identificados em cada variedade.

Tabela 2. Concentração média dos glucosinolatos em cada variedade ($\pm$ desvio padrão) expressa em $\mu\text{mol/g}$ de massa seca. O hífen "-" representa a ausência do glucosinolato. Zero (0) representa os glucosinolatos com abundância muito baixa que não puderam ser analisados quantitativamente. (1) Glucoiberina, (2) Progoitrina, (3) Sinigrina, (4) Glucorafanina, (5) Gluconapina, (6) Glucoiberiverina, (7) Glucoerucina, (8) Glucobrassicina, (9) 4-Metoxiglucobrassicina, (10) Neoglucobrassicina.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Glucosinolatos Totais
<i>B. oleraceae</i> var. <i>itálica</i> (Brócolis)	-	12,22 $\pm 4,11$	9,64 $\pm 3,21$	3,01 $\pm 1,34$	5,63 $\pm 2,28$	3,97 $\pm 2,55$	0	1,63 $\pm 0,74$	0,86 $\pm 0,71$	0,69 $\pm 0,58$	36,83 $\pm 13,06$
<i>B. oleraceae</i> var. <i>acephala</i> (Couve-manteiga)	14,05 $\pm 3,66$	9,77 $\pm 5,42$	19,35 $\pm 5,63$	10,91 $\pm 4,02$	6,81 $\pm 4,75$	9,43 $\pm 5,82$	13,18 $\pm 8,29$	3,68 $\pm 2,26$	2,92 $\pm 1,87$	3,11 $\pm 1,50$	93,20 $\pm 29,69$
<i>B. oleraceae</i> var. <i>gemmifera</i> (Couve-de-bruxelas)	12,18 $\pm 5,15$	11,56 $\pm 2,46$	15,23 $\pm 4,35$	9,27 $\pm 3,30$	-	14,05 $\pm 9,88$	12,50 $\pm 10,07$	4,51 $\pm 3,29$	2,61 $\pm 1,53$	3,07 $\pm 1,57$	84,98 $\pm 35,18$
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (Brócolis)	30,03 $\pm 4,33$	-	13,71 $\pm 2,85$	1,45 $\pm 2,05$	-	3,04 $\pm 3,65$	-	1,05 $\pm 1,56$	0,57 $\pm 0,84$	0,47 $\pm 0,78$	50,30 $\pm 13,69$
<i>B. oleraceae</i> var. <i>pekinensis</i> (Couve-chinesa)	-	19,16 $\pm 11,41$	-	-	11,74 $\pm 4,01$	-	0	-	0	0,26 $\pm 0,16$	31,16 $\pm 11,24$
<i>B. oleraceae</i> var. <i>gongylodes</i> (Couve-rabano)	17,60 $\pm 5,28$	4,22 $\pm 2,59$	-	7,84 $\pm 2,41$	-	0	2,69 $\pm 1,10$	0	0	0,39 $\pm 0,11$	32,73 $\pm 7,77$
Média por glucosinolato	18,14	11,21	14,04	6,30	7,86	7,41	9,06	2,64	1,67	1,28	

Apesar de se ter relatos na literatura de algumas espécies com mais de 23 diferentes glucosinolatos, usualmente a maioria das plantas não contem mais do que seis glucosinolatos principais e outros poucos presentes em quantidades mínimas (Rask *et al.*, 2000; Fahey *et al.*, 2001). No caso das variedades de *Brassica oleraceae* aqui estudadas isso não foi muito diferente, cada uma apresentando de cinco a dez glucosinolatos (Tabela 2), resultado semelhante ao encontrado por Tian e colaboradores (2005), que também encontraram 10 glucosinolatos em brócolis, couve-flor e couve-de-bruxelas, nove dos quais também foram encontrados neste trabalho.

B. oleraceae var. *acephala* (Couve-manteiga) e *B. oleraceae* var. *gemmifera* (Couve-de-bruxelas) foram as variedades que apresentaram em média as maiores concentrações de glucosinolatos totais, com 93,2 $\mu\text{mol/g}$ de massa seca ($\pm 29,69$) e 84,98 $\mu\text{mol/g}$ de massa seca ($\pm 35,18$), respectivamente. Contudo, como pode ser notado pelos desvios padrão, houve uma considerável variação na concentração de alguns glucosinolatos mesmo dentro de cada

variedade. Apesar dessa variação quantitativa, qualitativamente as amostras dentro de cada variedade mostraram pouca variação. Desse modo, cada variedade apresentou perfis cromatográficos muito semelhantes (Anexo 1 - CD), ou seja, apresentaram porcentagens relativas dos glucosinolatos muito próximas (os valores de proporção relativa de cada amostra não são mostrados, mas as médias das proporções relativas para cada variedade encontram-se na Tabela 3). Essa tendência de plantas de um determinado grupo apresentarem perfis semelhantes também foi observada por Kushad e colaboradores (1999) e por Heaney & Fenwick (1980). Estes últimos, estudando cultivares de uma mesma variedade de *B. oleracea*, chegaram a propor que diferentes cultivares poderiam ser distinguidos com bases nos perfis de seus glucosinolatos.

Tabela 3. Proporções relativas médias dos glucosinolatos em cada variedade e no conjunto de todas as variedades. O hífen "-" representa a ausência do glucosinolato. Zero (0) representa os glucosinolatos com abundância muito baixa que não puderam ser analisados quantitativamente. (1) "Glucoiberina, (2) Progoitrina, (3) Sinigrina, (4) Glucorafanina, (5) Gluconapina, (6) Glucoiberiverina, (7) Glucoerucina, (8) Glucobrassicina, (9) 4-Metoxiglucobrassicina, (10) Neoglucobrassicina.

	Alifáticos								Indólicos			
	1	2	3	4	5	6	7	Total	8	9	10	Total
<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>italica</i> (Brócolis)	-	0,33	0,26	0,08	0,15	0,11	0,00	0,94	0,04	0,02	0,02	0,09
<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>acephala</i> (Couve-manteiga)	0,15	0,10	0,21	0,12	0,07	0,10	0,14	0,90	0,04	0,03	0,03	0,10
<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>gemmifera</i> (Couve-de-bruxelas)	0,14	0,14	0,18	0,11	-	0,17	0,15	0,88	0,05	0,03	0,04	0,12
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (Brócolis)	0,60	-	0,27	0,03	-	0,06	-	0,96	0,02	0,01	0,01	0,04
<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>pekinensis</i> (Couve-chinesa)	-	0,61	-	-	0,38	-	0,00	0,99	-	0,00	0,01	0,01
<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>gongylodes</i> (Couve-rabano)	0,54	0,13	-	0,24	-	0,00	0,08	0,99	0,00	0,00	0,01	0,01
Proporção relativa média	0,23	0,14	0,18	0,08	0,10	0,09	0,12	0,93	0,03	0,02	0,02	0,07

Assim como relataram Velasco e colaboradores (2007) os glucosinolatos alifáticos foram os mais abundantes, constituindo em média de 88% a 99% dos glucosinolatos totais (Tabela 3). Os glucosinolatos indólicos representaram em média apenas de 1% a 12% dos glucosinolatos. Contudo, no presente estudo, não foram detectados benzilglucosinolatos, os

quais foram encontrados por Velasco e colaboradores (2007) em quantidades muito baixas. Todavia, essa classe de glucosinolatos também não foi encontrada por Tian e colaboradores (2005).

Na média das variedades estudadas, a glucoiberina foi o glucosinolato mais abundante, com 18,14 $\mu\text{mol/g}$ de massa seca, seguida pela sinigrina com 14,04 $\mu\text{mol/g}$ de massa seca. Já em cada variedade, a glucoiberina foi o glucosinolato mais abundante em *Brassica oleracea* var. *botrytis* (30,03 $\mu\text{mol/g}$) e *B. oleraceae* var. *gongylodes* (17,60 $\mu\text{mol/g}$), e a sinigrina foi em *B. oleraceae* var. *gemmifera* (15,23 $\mu\text{mol/g}$) e *B. oleraceae* var. *acephala* (19,35 $\mu\text{mol/g}$). Esses dois glucosinolatos também foram apontados como os mais abundantes em *B. oleraceae* var. *acephala* por Velasco e colaboradores (2007) e em *B. oleracea* var. *capitata* por Rosa (1997). Já Kushad e colaboradores (1999) encontraram glucoiberina apenas em quantidades muito pequenas em diversas outras variedades dessa mesma espécie.

Contudo, o que mais chama a atenção são as altas concentrações de progoitrina, que foi o glucosinolato predominante em *B. oleraceae* var. *itálica* (12,22 $\mu\text{mol/g}$) e *B. oleraceae* var. *pekinensis* (19,16 $\mu\text{mol/g}$), além de estar entre os mais abundantes em *B. oleraceae* var. *gemmifera* (11,56 $\mu\text{mol/g}$), *B. oleraceae* var. *acephala* (9,77 $\mu\text{mol/g}$) e *B. oleraceae* var. *gongylodes* (4,22 $\mu\text{mol/g}$). Tian e colaboradores (2005) também encontraram progoitrina como principal glucosinolato em couve-de-bruxelas com 1,33 μmol desse metabólito por grama de massa fresca. Valor ainda mais elevado do que os aqui encontrados em *B. oleraceae* var. *itálica* e *B. oleraceae* var. *pekinensis* (respectivamente 0,68 μmol e 0,86 μmol por grama de massa fresca, que foi cerca de 22,2 vezes maior do que a massa seca). Esse glucosinolato, descrito como um fator antinutricional devido ao seu potencial bociogênico, é em geral apontado como glucosinolato pouco abundante em *Brassica oleraceae*, o que reduziria seus potenciais riscos à saúde. Porém, os resultados aqui encontrados revelam que as plântulas de quase todas as espécies estudadas possuem níveis bastante elevados desse glucosinolato. Entretanto, não necessariamente esse nível também está presente nos seus estágios de desenvolvimento mais

tardios nos quais essas plantas são consumidas, uma vez que a composição dos glucosinolatos varia consideravelmente durante o desenvolvimento da planta (Sarwar & Kirkegaard, 1998; Brown *et al.*, 2003; Velasco *et al.*, 2007). Além disso, apesar do efeito bociogênico da progoitrina ter sido mostrado em modelos animais, não há evidências diretas de que o consumo de *Brassica* tenha o mesmo efeito em humanos (Padilla *et al.*, 2007).

Kushad e colaboradores (1999) realizaram um estudo bastante abrangente analisando os glucosinolatos de diversas variedades de brócolis, couve-de-bruxelas, couve-flor, repolho e couve. As variedades aqui usadas não tinham correspondência com as utilizadas por Kushad e colaboradores (1999), mas as comparações das hortaliças dos mesmos tipos (brócolis, couve-de-bruxelas e couve) mostraram muitas diferenças em termos dos glucosinolatos principais. Essas diferenças também existiram entre o trabalho desses autores e trabalhos anteriores por eles citados.

As razões dessas diferenças podem residir em diversos fatores, dentre os quais estão os fatores genéticos, expressos pelo grande número de variedades de *B. oleraceae* disponíveis comercialmente (Kushad *et al.*, 1999) e os fatores ambientais tais como temperatura, estresse hídrico, comprimento do dia, intensidade de radiação, fatores edáficos (tipo de solo e nutrientes) e bióticos (Sarwar & Kirkegaard, 1998; Brader *et al.*, 2001; van Dam *et al.*, 2005; Martin & Müller, 2007; Velasco *et al.*, 2007). Além desses, o tipo e idade dos tecidos coletados também podem interferir quantitativa e qualitativamente no conteúdo dos glucosinolatos (Rask *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2003; Halkier & Gershenzon, 2006; Velasco *et al.*, 2007).

Esses fatores nem sempre são incluídos como variáveis controladas no plano experimental, como no caso do trabalho de Kushad e colaboradores (1999), que foi feito em campo e utilizando as plantas em seus estados "maduros", o que implicava em tecidos diferentes, em idades diferentes e colhidos em diferentes épocas do ano. Já no presente estudo, tentou-se controlar essas variáveis, de forma a se esperar que os resultados aqui

gerados possam ser reproduzíveis e comparáveis com outros estudos feitos nos mesmos moldes.

II.5. Conclusões

Dez glucosinolatos foram encontrados no conjunto das 6 variedades estudadas, que, apesar de se tratarem de uma mesma espécie, apresentaram padrões bem característicos mas bastante distintos na composição qualitativa dos seus glucosinolatos.

Apenas *B. oleraceae* var. *acephala* apresentou todos os dez glucosinolatos. As demais apresentaram um número variável desses glucosinolatos, sendo 4-metoxiglucobrassicina e neoglucobrassicina os únicos presentes em todas as variedades analisadas.

Os resultados apontaram que em cada variedade o padrão dos glucosinolatos é relativamente bem estável, apresentando sempre os mesmos glucosinolatos em proporções relativas semelhantes.

II.6. Bibliografia

- Andréasson, E.; Jørgensen, L.B.; Höglund, A.S.; Rask, L. & Meijer, J. 2001. Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 127:1750-1763.
- Angiosperm Phylogeny Website. Banco de dados mantido pelo Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acessado em 09/08/2007.
- Bones, A.M. & Rossiter, J.T. 2006. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolatos. *Phytochemistry*, 67:1053-1067.
- Botting C.H.; Davidson, N.E.; Griffiths, D.W.; Bennett, R.N. & Botting, N.P. 2002. Analysis of intact glucosinolates by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5):983-988.
- Brader, G.; Tas, E. & Palva, E.T. 2001. Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiology*, 126:849-860.
- Bringmann, G.; Kajahn, I.; Neuss, C.; Pelzing, M.; Laug, S.; Unger, M. & Holzgrabe, U. 2005. Analysis of the glucosinolate pattern of *Arabidopsis thaliana* seeds by capillary zone electrophoresis coupled to electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 26:1513-1522.
- Brown, P.D.; Tokuhisa, J.G.; Reichelt, M. & Gershenzon, J. 2003. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 62:471-481.
- Buskov, S.; Serra, B.; Rosa, E.; Sørensen, H. & Sørensen, J.C. 2002. Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* Cv. Woll). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:690-695.
- Fahey, J.W.; Zalcmann, A.T. & Paul Talalay. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56:5-51.
- Guo, W.; Yuan, L.; Chen, P. & Guo, J. 2005. Determination of glucosinolates in rapeseeds by liquid chromatography - electrospray mass spectrometry. *Analytical Letters*, 38:343-351.
- Halkier, B.A. & Gershenzon, J. 2006. Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 57:303-333.
- Heaney, R.K. & Fenwick, G.R. 1980. The glucosinolate content of brassica vegetables - a chemotaxonomic approach to cultivar identification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31(8):794-801.
- Husebye, H.; Chadchawan, S.; Winge, P.; Thangstad, O.P. & Bones, A.M. 2002. Guard Cell- and Phloem Idioblast-Specific Expression of Thioglucoside Glucohydrolase 1 (Myrosinase) in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 128:1180-1188.

- Kelly, P.J.; Bones, A. & Rossiter, J.T. 1998. Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrinin seedlings of *Brassica juncea*. *Planta*, 206:370-377.
- Kiddle, G.; Bennett, R.N.; Botting, N.P.; Davidson, N.E.; Robertson, A.A.B. & Wallsgrove, R.M. 2001. High-performance liquid chromatographic separation of natural and synthetic desulphoglucosinolates and their chemical validation by UV, NMR and chemical ionisation-MS methods. *Phytochemical Analysis*, 12(4):226-242.
- Koroleva, O.A.; Davies, A.; Deeken, R.; Thorpe, M.R.; Tomos, A.D. & Hedrich, R. 2000. Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk. *Plant Physiology*, 124:599-608.
- Kushad, M.M.; Brown, A.F.; Kurilich, A.C.; Juvik, J.A.; Klein, B.P.; Wallig, M.A. & Jeffery, E.H. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4):1541-1548.
- Li, X. & Kushad, M.M. 2004. Correlation of glucosinolate content to myrosinase activity in horseradish (*Armoracia rusticana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:6950-6955.
- Martin, N. & Müller, C. 2007. Induction of plant responses by a sequestering insect: Relationship of glucosinolate concentration and myrosinase activity. *Basic and Applied Ecology*, 8:13-25.
- Mellon, F.A.; Bennett, R.N.; Holst, B. & Williamson, G. 2002. Intact glucosinolate analysis in plant extracts by programmed cone voltage electrospray LC/MS: Performance and comparison with LC/MS/MS methods. *Analytical Biochemistry*, 306(1):83-91.
- Ménard, R.; Larue, J.P.; Silué, D. & Thouvenot, D. 1999. Glucosinolates in cauliflower as biochemical markers for resistance against downy mildew. *Phytochemistry*, 52:29-35.
- Padilla, G.; Cartea, M.E.; Velasco, P.; Haro, A. & Ordás, A. 2007. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochemistry*, 68:536-545.
- Rangkadilok, N.; Nicolas M.E.; Bennett, R.N.; Premier, R.R.; Eagling, D.R. & Taylor, P.W.J. 2002. a. Determination of Sinigrina and Glucoraphanin in *Brassica* Species Using a Simple Extraction Method Combined with Ion Pair HPLC Analysis. *Scientia Horticulturae*, 96:27-41.
- Rask, L.; Andreasson, E.; Ekbom, B.; Eriksson, S.; Pontoppidan, B. & Meijer J. 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology*, 42(1):93-113.
- Reddy, G.V.P.; Tossavainen, P.; Nerg, A. & Holopainen J.K. 2004. Elevated Atmospheric CO₂ Affects the Chemical Quality of *Brassica* Plants and The Growth Rate of The Specialist, *Plutella xylostella*, but nor the Generalist, *Spodoptera littoralis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:4185-4191.
- Rodman, J.E.; Karol, K.G.; Price, R.A. & Sytsma, K.J. 1996. Molecules, morphology, and Dahlgren's expanded order Capparales. *Systematic Botany*, 21(3):289-307.
- Rosa, E.A.S. 1997. Daily variation in glucosinolate concentrations in the leaves and roots of cabbage seedlings in two constant temperature regimes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(3):364-368.

- Rungapamestry, V.; Duncan, A.J.; Fuller, Z. & Ratcliffe, B. 2006. Changes in glucosinolate concentrations, myrosinase activity, and production of metabolites of glucosinolates in cabbage (*Brassica oleracea* Var. *capitata*) cooked for different durations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20):7628-7634.
- Sarwar, M. & Kirkegaard, J.A. 1998. Biofumigation potential of brassicas - II. Effect of environment and ontogeny on glucosinolate production and implications for screening. *Plant and Soil*, 201(1):91-101.
- Taiz L. & Zeiger E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3° ed. Artmed. Porto Alegre.
- Tian, Q.G.; Rosselot, R.A. & Schwartz, S.J. 2005. Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 343(1):93-99.
- van Dam, N.M.; Raaijmakers, C.E. & van der Putten, W.H. 2005. Root herbivory reduces growth and survival of the shoot feeding specialist *Pieris rapae* on *Brassica nigra*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115(1):161-170.
- Vaughn, S.F. & Berhow, M.A. 2005. Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Industrial Corps and Products*, 21:193-202.
- Velasco, P.; Cartea, M.E.; Gonzalez, C.; Vilar, M. & Ordas, A. 2007. Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea* acephala group). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3):955-962.

1. Conclusões finais

Apesar do escopo dos experimentos do capítulo I envolver apenas a avaliação dos efeitos da sinigrina íntegra, forma na qual esse metabólito não mostrou atividade sobre fungo ou formigas de *Atta sexdens*, os resultados encontrados apresentaram indícios de que os produtos de hidrólise da sinigrina podem atuar na interação entre plantas e formigas cortadeiras. Esses produtos parecem ser capazes de atuar pelo menos sobre o fungo simbiote, trazendo efeitos nocivos ao seu desenvolvimento, os quais foram percebidos quando os meios contendo 1,5 μmol de sinigrina por grama de meio de cultura foram autoclavados. Todas as demais concentrações testadas desta mesma forma (todas inferiores a 1,5 $\mu\text{mol/g}$) não apresentaram efeitos perceptíveis. Assim, aparentemente a autoclavagem por 30 min a 1,2 kgf/cm^2 do meio de cultura contendo concentrações iguais ou superiores a 1,5 μmol de sinigrina por grama é capaz de hidrolisar esse glucosinolato e liberar produtos em níveis que tornam as condições nocivas ao desenvolvimento do fungo. Provavelmente, devido à presença de isotiocianatos e nitrilas.

Essa concentração é superior àquelas encontradas nas variedades de *B. oleraceae* estudadas, cujas plântulas, com exceção de *B. oleraceae* var. *pekinensis* (Couve-chinesa) e *B. oleraceae* var. *gongylodes* (Couve-rabano) que não apresentaram esse glucosinolato, possuíam em média algo em torno de 0,405 μmol e 0,855 μmol de sinigrina por grama de massa fresca (a qual corresponde cerca de 22,2 vezes a massa seca).

Todavia, nas condições de autoclavagem utilizadas, a temperatura de operação do equipamento atinge cerca de 125° C, temperatura na qual MacLeod e colaboradores (1981) encontraram pouca degradação dos glucosinolatos e a formação principalmente de nitrilas, que são menos tóxicas do que os isotiocianatos (Wittstock *et al.*, 2004). Esse baixo índice de degradação térmica contrasta com os resultados obtidos com a degradação enzimática, capaz

de degradar todo o conteúdo de glucosinolatos após 30 min da maceração de tecidos (Li & Kushad, 2004), como provavelmente ocorreria caso essas plantas fossem coletadas pelas formigas, dado que o substrato é altamente processado por esses insetos.

Além do mais, não se pode relegar a potencial contribuição dos demais glucosinolatos na formação dos produtos de hidrólise. Neste caso, os valores encontrados nas plântulas variam entre 1,4 μmol e 4,19 μmol de glucosinolatos totais por grama de massa fresca.

Dessa forma, apesar da sinigrina em sua forma íntegra não apresentar efeitos às formigas ou ao fungo, há de se esperar que esse metabólito possa atuar na interação entre as plantas e as formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*, por haver forte indício de que os produtos de hidrólise desse metabólito apresentem efeitos nocivos ao desenvolvimento do fungo cultivado por essas formigas. No caso das plântulas de *B. oleraceae* estudadas, apesar da concentração desse metabólito estar abaixo da concentração crítica encontrada no experimento em que o meio de cultura contendo sinigrina foi autoclavado, possivelmente a alta eficiência da degradação enzimática seja capaz de produzir isotiocianatos e nitrilas em níveis suficientes para causar esse efeito em intensidade igual ou mesmo superior ao produzido via degradação térmica. Além disso, os demais glucosinolatos também contribuem para a formação desses produtos, possivelmente intensificando ainda mais os efeitos deletérios.

2. Considerações e perspectivas

2.1. O uso dos metabólitos secundários no controle das formigas

Apesar de alguns autores traçarem relações que claramente nutrem aspirações à utilização direta dos metabólitos isolados de plantas no combate às formigas cortadeiras, o uso nesses termos não parece estar próximo de uma realidade prática. Essa baixa possibilidade de transferência dos dados experimentais para a prática em campo se deve ao intrincado sistema de cooperação entre fungo e formiga, que em grande parte dos experimentos não é considerado. Em condições naturais, a integração digestiva entre as partes desse mutualismo é

capaz de contornar a toxicidade de algumas dessas substâncias e, de forma ainda mais relevante, a íntima comunicação entre fungo e inseto evita que substratos tóxicos sejam levados inadvertidamente ao formigueiro (Knapp *et al.*, 1990; Ridley *et al.*, 1996), comportamento que desarticula o mecanismo de grande parte dos métodos de controle químicos empregados no combate a esses insetos.

O que se tem de mais concreto até o momento sobre o uso dos metabólitos secundários no controle biológico dessas formigas é a possibilidade de que essas substâncias possam atuar de forma coadjuvante, por auxiliar no rompimento de algumas defesas do sistema mutualístico, suscitando a possibilidade de seu uso conjunto com outros recursos, como os fungos entomopatogênicos e/ou micopatogênicos (Silva *et al.*, 2006).

2.2. O papel dos glucosinolatos na ecologia química das plantas

Os recursos sem precedentes apoiando pesquisa funcional de genoma de *Arabidopsis* levaram a um aumento notável no conhecimento sobre a bioquímica de glucosinolatos (Brown *et al.*, 2003). Tamanha disponibilidade de informação possibilitou o desenvolvimento de ferramentas para o controle da expressão de perfis, de forma que linhagens recombinantes podem ser desenvolvidas com conteúdos pré-determinados de glucosinolatos (Halkier & Gershenzon, 2006). Essas linhagens são ferramentas valiosas ainda pouco exploradas, mas que em breve devem se tornar mais freqüentes nas investigações sobre as funções de cada glucosinolato nas interações planta-inseto.

2.3. A ecologia química entre formigas e fungos

O cultivo do fungo *in vitro* e a aplicação de ferramentas químicas e fisiológicas são perspectivas promissoras na resolução da questão que permanece mais obscura na ecologia das formigas cortadeiras: os mecanismos de comunicação entre os fungos e formigas.

Ainda nada se sabe sobre como se dá e quais são os elementos envolvidos no evidente sistema de comunicação entre as formigas e seu fungo mutualista. Todavia, no decorrer do desenvolvimento deste trabalho, se notou a formação de exsudados quando o fungo permaneceu por períodos prolongados nas placas de petri, possivelmente porque o meio de cultura já exaurido e desidratado se tornou impróprio para o desenvolvimento do fungo. Esses exsudados, produzidos sob diferentes tratamentos, como a presença de metabólitos secundários, poderiam ser analisados em eletroantenografia e, caso detectada a presença de estímulos fisiológicos sobre o inseto, poderiam ser alvo de tentativas do isolamento das substâncias envolvidas nessa comunicação. O reconhecimento dessas substâncias e de seus mecanismos de ação poderia ser explorado de forma eficiente para o combate controlado a esses insetos, uma vez que poderia ser utilizado de forma a inibir os mecanismos de aprendizagem e rejeição tardia, que são os pontos fracos dos métodos atuais de controle dessas formigas, ou então serem utilizadas para romper o íntimo sinergismo entre as formigas e seus fungos, debilitando as colônias e facilitando seu controle.

3. Bibliografia

- Brown, P.D.; Tokuhsa, J.G.; Reichelt, M. & Gershenzon, J. 2003. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 62:471-481.
- Halkier, B.A. & Gershenzon, J. 2006. Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 57:303-333.
- Knapp, J.J.; Howse, P.E. & Kermarrec, A. 1990. *Factors controlling foraging patterns in the leaf-cutting ant Acromyrmex octospinosus (Reich)*. In: Vander Meer, R.K.; Jaffé, K. & Cedeno, A. *Applied Myrmecology: a World Perspective*. Westview Press. Boulder. pág. 382-409.
- Li, X. & Kushad, M.M. 2004. Correlation of glucosinolate content to myrosinase activity in horseradish (*Armoracia rusticana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:6950-6955.
- MacLeod, A.J.; Panesar, S.S. & Gil, V. 1981. Thermal-degradation of glucosinolatos. *Phytochemistry*, 20(5):977-980.
- Ridley, P.; Howse, P.E. & Jackson, C.W. 1996. Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their symbiotic fungus. *Experientia*, 52:631-365.
- Silva, A.; Bacci, M.; Siqueira, C.G.; Bueno, O.C.; Pagnocca, F.C. & Hebling, M.J.A. 2003. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology*, 49(4):307-313.
- Wittstock, U.; Agerbirk, N.; Stauber, E.J.; Olsen, C.E.; Hippler, M.; Mitchell-Olds, T.; Gershenzon, J. & Vogel, H. 2004. Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14):4859-4864.