

MICHELINE KÉZIA CORDEIRO DE ARAÚJO

**CIANOTOXINAS EM HORTALIÇAS: INVESTIGAÇÃO DE BIOACUMULAÇÃO E
DESINTOXICAÇÃO NOS TECIDOS FOLIARES DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) E
RÚCULA (*Eruca sativa* Mill.)**

RECIFE

2016

MICHELINE KÉZIA CORDEIRO DE ARAÚJO

**CIANOTOXINAS EM HORTALIÇAS: INVESTIGAÇÃO DE BIOACUMULAÇÃO E
DESINTOXICAÇÃO NOS TECIDOS FOLIARES DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) E
RÚCULA (*Eruca sativa* Mill.)**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutora em botânica.

Orientadora:

Prof^ª Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira
USP/ESALQ/UFRPE

Co-Orientadores:

Prof. João Dias de Toledo Arruda Neto
USP/Instituto de Física

Prof. Renato José Reis Molica
UFRPE/UAG

RECIFE

2016

Ficha Catalográfica

A663c Araújo, Micheline Kézia Cordeiro de
Cianotoxinas em hortaliças: investigação de
bioacumulação e desintoxicação nos tecidos foliares de
alface (*Lactuca sativa* L.) e rúcula (*Eruca sativa* Mill.) /
Micheline Kézia Cordeiro de Araújo. – Recife, 2016.
158 f. : il.

Orientador(a): Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira.
Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia,
Recife, 2016.

Inclui anexo(s) e referências.

1. Bioacumulação 2. Cianobactérias 3. Cianotoxinas
4. Cinética 5. Depuração 6. Hortaliças I. Oliveira, Maria do
Carmo Bittencourt de, orientadora II. Título

CDD 581

**CIANOTOXINAS EM HORTALIÇAS: INVESTIGAÇÃO DE BIOACUMULAÇÃO E
DESINTOXICAÇÃO NOS TECIDOS FOLIARES DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) E
RÚCULA (*Eruca sativa* Mill.)**

MICHELINE KÉZIA CORDEIRO DE ARAÚJO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Botânica. Tese defendida e aprovada pela banca examinadora:

Orientadora:

Prof^ª Dr^ª Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira
Titular/ESALQ-USP/UFRPE

Examinadores:

Prof^ª Dr^ª Ariadne do Nascimento Moura
Titular/UFRPE

Prof^ª Dr^ª Elcida de Lima Araújo
Titular/UFRPE

Prof^ª Dr^ª Viviane Lúcia dos Santos Almeida
Titular/UPE

Dr^ª Nísia Karine Vasconcelos Aragão-Tavares
Titular/UFRPE

Prof^ª Dr^ª Sigrid Newmann Leitão
Suplente/UFPE

Prof^ª Dr^ª Elba Maria Nogueira Ferraz
Suplente/IFPE/UFRPE

*Dedico esta tese à minha mãe Margarida Maria
Cordeiro de Araújo e minha madrinha Maria Barbosa
da Silva por toda a confiança, generosidade e amor.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe Margarida, e meus queridos padrinhos Ivanildo (em memória) e Maria Barbosa (D. Lurdes) por acreditarem em mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP).

À Coordenação do PPGB e aos secretários, Kênia Muniz, Sr. Manassés (seu Mano) pela dedicação e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro através da concessão de Bolsa de Doutorado.

À Fundação de Amparo Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

À Prof^a Dr^a Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira, por aceitar participar desta longa jornada, acreditar e confiar em mim, pelos seus ensinamentos, questionamentos e por me instigar a sempre buscar muito além do resultado. Não existiria para mim outra orientação que não fosse a sua, muito obrigada por tudo!

À Prof^a Dr^a Ariadne do Nascimento Moura, por sua grande generosidade e amizade.

Aos eternos amigos que estão ou que passaram pelo Laboratório de Cianobactérias: Adriana, Cometa, Viviane Piccin, Selma, Gustavo, Gustavo Mecina, Anderson, Bárbara, Júlia, Cássia, Camila Lira, Fábio (em memória) pela amizade. Também deixo aqui um agradecimento muito especial a duas pessoas desse laboratório: Camila Paiva, a primeira estagiária que me acompanhou e sem a qual eu não teria conseguido executar os meus experimentos (uma pessoa incrível, meiga e dedicada), e Mathias Chia meu grande amigo e uma das pessoas mais

generosas que já tive o prazer de conhecer e conviver. Sua ajuda foi fundamental para a finalização da tese, além de ter me ensinado tantas coisas. A vocês dois o meu muitíssimo obrigada!

Às amigas da república virginato: Karla Villaça, Larissa Freitas, Ana Paula Battel (Praguinha), Valiana, Angel, Mariane, Mônica, Judith, Mari e Jesiani. Uma grande família que amo de coração!

Também agradeço às irmãs do Instituto Nossa Senhora do Cenáculo, em especial à Ir. Maria José e Ir. Maria Lúcia por resolverem os nossos "pepinos".

A todos os colegas do mestrado e doutorado e professores do PPGB .

Às amigas inseparáveis Suzanna e Vívian.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO.....	11
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
REFERÊNCIAS.....	22
MANUSCRITO I.....	33
<i>Resumo</i>	34
<i>Introdução</i>	35
<i>Material e Métodos</i>	37
<i>Resultados</i>	39
<i>Discussão</i>	40
<i>Conclusão</i>	43
<i>Lista de figuras</i>	44
<i>Referências</i>	48
MANUSCRITO II.....	53
<i>Resumo</i>	54
<i>Introdução</i>	55
<i>Material e Métodos</i>	56
<i>Resultados e Discussão</i>	60
<i>Conclusões</i>	63
<i>Tabelas e figuras</i>	64
<i>Referências</i>	70
MANUSCRITO III.....	76
<i>Resumo</i>	77
<i>Introdução</i>	78
<i>Material e Métodos</i>	79
<i>Resultados</i>	86
<i>Discussão</i>	87
<i>Conclusões</i>	92
<i>Tabelas e figuras</i>	93
<i>Referências</i>	101
MANUSCRITO IV.....	108
<i>Resumo</i>	109
<i>Introdução</i>	110
<i>Material e Métodos</i>	112
<i>Resultados</i>	116
<i>Discussão</i>	118
<i>Conclusão</i>	121
<i>Figuras e tabelas</i>	122
<i>Referências</i>	127
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	132
ANEXO I (Resultados de trocas gasosas - parâmetros fotossintéticos).....	134
ANEXO II (Normas para autores - Environmental Earth Science).....	138
ANEXO III (Normas para autores – Ecotoxicology and Environmental Safety).....	142
ANEXO IV (Normas para autores – Environmental Pollution).....	148
ANEXO V (Normas para autores - Chemosphere).....	154

Cordeiro-Araújo, Micheline Kézia; Dr^a. Universidade Federal Rural de Pernambuco. CIANOTOXINAS EM HORTALIÇAS: INVESTIGAÇÃO DE BIOACUMULAÇÃO E DESINTOXICAÇÃO NOS TECIDOS FOLIARES DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) E RÚCULA (*Eruca sativa* Mill.). Orientadora: Prof^a Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira; Co-Orientadores: Prof. João Dias de Toledo Arruda Neto e Prof. Renato José Reis Molica.

RESUMO

Cianobactérias são organismos procariotos, fotossintetizantes, potenciais produtores de cianotoxinas tais como as microcistinas (MCs) e a cilindrospermopsina (CYN). Estas toxinas podem ocasionar problemas graves aos seres humanos através da contaminação pelo contato com água contaminada ou alimentação. Dessa forma, os objetivos desse estudo foram investigar a incorporação de microcistinas e cilindrospermopsina nos tecidos foliares de alface (*Lactuca sativa* L.) e rúcula (*Eruca sativa* Mill.) após a irrigação com água contaminada; a desintoxicação das cianotoxinas nas plantas com água sem MCs e CYN, após a irrigação das hortaliças anteriormente contaminadas; e os processos fisiológicos que acompanham a bioacumulação e desintoxicação das toxinas nos vegetais, tais como estresse oxidativo, taxa fotossintética e permeabilidade seletiva da membrana plasmática. Para verificar a bioacumulação e desintoxicação das MCs e CYN nos tecidos foliares das hortaliças, concentrações de MC-LR purificada (1,0; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e CYN purificada (3,0; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e respectivo controle (0,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) foram aplicadas sobre as folhas das plantas, através de irrigação manual simulando “spray” que ocorreu após o transplante das mudas para vasos definitivos. Paralelamente foi realizado um experimento de bioacumulação em alface utilizando MC-LR equivalente (0,5; 2,0; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e MC-RR equivalente (0,15; 0,5; 1,5 e 3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) presentes em extrato bruto de cianobactéria produtora de MCs, *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, linhagem BCCUSP232. Além disso, os efeitos ocasionados por *M. aeruginosa* não produtora de MCs (BCCUSP03) foram investigados. Para verificar os efeitos causados pelas cianotoxinas aos vegetais foram realizadas análises de parâmetros fotossintéticos através de trocas gasosas com auxílio de um “Infrared Gas Analyser” (IRGA) e análises de atividade de enzimas antioxidantes (glutathione S-transferase, superóxido dismutase, peroxidase e catalase), e espécies reativas de oxigênio (H_2O_2 intracelular). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As concentrações de MC-LR, MC-RR e CYN presentes nos tecidos foliares das hortaliças foram analisadas através do método físico-químico Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em Sequência (LC-MS/MS). As MCs presentes em extratos brutos e purificada acumularam apenas em alface e os valores de ingestão diária total recomendados pela organização mundial de saúde para seres humanos (0,04 μg de MCs por Kg de peso corporal) seriam ultrapassados caso o vegetal fosse consumido. A CYN acumulou tanto em alface quanto em rúcula, porém em menores concentrações que as MCs. Tanto as MCs quanto a CYN ocasionaram efeitos de toxicidade e estresse fisiológico aos vegetais. Existe risco de contaminação alimentar humana por estes vegetais contaminados com cianotoxinas caso não haja um controle sobre a qualidade da água destinada para a irrigação de plantas da agricultura.

Palavras-chave: Contaminação alimentar, Estresse fisiológico, plantas da agricultura, Toxinas de cianobactérias.

Cordeiro-Araújo, Micheline Kézia; Dr^a. Universidade Federal Rural de Pernambuco. CYANOTOXINS IN VEGETABLES: BIOACCUMULATION AND DETOXIFICATION IN LEAF TISSUES OF LETTUCE (*Lactuca sativa* L.) AND ARUGULA (*Eruca sativa* Mill.). Orientadora: Prof^a Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira; Co-Orientadores: Prof. João Dias de Toledo Arruda Neto e Prof. Renato José Reis Molica.

ABSTRACT

Cyanobacteria are prokaryotic photosynthetic organisms that produce various toxins such as microcystins (MCs) and cylindrospermopsin (CYN). These toxins can pose significant public health risks via the contamination of drinking water and food. Therefore, the objectives of this study were to investigate the uptake and bioaccumulation of MCs and CYN in leaf tissues of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and arugula (*Eruca sativa* Mill.), after irrigation with contaminated water; the detoxification of the cyanotoxins after irrigation of previously contaminated vegetables with water not containing MCs and CYN; and the physiological processes that accompany the bioaccumulation and detoxification of the toxins in the vegetables, such as oxidative stress, photosynthetic rate and selective membrane permeability. In order to investigate the bioaccumulation and detoxification of MCs and CYN in leaf tissues, the vegetables were exposed to different concentrations of pure MC-LR (1.0, 5.0 and 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), CYN (3.0, 5.0 and 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and the control (0.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) by manual spray, a method employed during transplantation of seedlings. At the same time, an experiment was carried out to determine the bioaccumulation of MC-LR (0.5, 2.0, 5.0 and 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and MC-RR (0.15, 1.5 and 3.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) using crude extracts of *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing BCCUS232. Moreover, the effects caused by *M. aeruginosa* non-microcystin producing of MCs (BCCUSP03) were investigated. The physiological effects of the cyanotoxins on the vegetables were determined using gas exchange parameters with an Infrared Gas Analyser (IRGA), reactive oxygen species (intracellular H_2O_2) and antioxidant enzyme (glutathione S-transferase, superoxide dismutase, peroxidase and catalase) activities. All experiments were carried out in triplicates. The concentrations of MC-LR, MC-RR and CYN in leaf tissues of lettuce and arugula were determined by liquid chromatography mass spectroscopy (LC-MS/MS). The purified MCs and present in crude extracts, accumulated only in lettuce and the total daily intake values recommended by the World Health Organization to humans (0.04 μg of MCs per Kg of body weight) they would be exceeded if the vegetable was consumed. The CYN accumulated in lettuce and arugula, but at concentrations less than the MCs. MCs and CYN caused toxic effects and physiological stress on the vegetables. There is a risk of human food contamination by these contaminated vegetables with cyanotoxins if there is no control over the quality of water intended for irrigation of crop plants.

Key-words: Crop plants, Cyanobacterial toxins, Food contamination, Physiological stress.

1. INTRODUÇÃO

Cianobactérias são procariontes fotossintetizantes de ocorrência natural em ecossistemas aquáticos. Esses organismos podem produzir uma variedade de compostos tóxicos, incluindo neurotoxinas, dermatotoxinas e hepatotoxinas, que representam sérios riscos à saúde humana e animal (CARMICHAEL et al., 1997). A avaliação dos riscos e a caracterização das cianotoxinas em relação à saúde humana requer a identificação das suas rotas de exposição. Uma dessas rotas é o consumo de organismos que bioacumularam as cianotoxinas em seus tecidos (COX et al., 2003; MURCH et al., 2004).

Na agricultura é comum o uso da água de reservatórios de abastecimento público, rios, lagos, açudes e etc, para a irrigação de culturas. Porém, nessas águas podem estar presentes cianobactérias e cianotoxinas que, através da irrigação, podem ser bioacumuladas nos tecidos das plantas (PEUTHERT et al., 2007; PFLUGMACHER et al., 2007; MOHAMED e AL SHEHRI, 2009). Nesse sentido, uma via de exposição que vem merecendo atenção é o consumo de hortaliças e outros produtos da agricultura contaminados com cianotoxinas como as microcistinas (MCs) e cilindrospermopsina (CYN) (CODD et al., 1999; PEUTHERT et al., 2007; PFLUGMACHER et al., 2007; CHEN et al., 2012; KITTLER et al., 2012; HEREMAN e BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2012; GUTIERREZ-PRAENA et al., 2014). Com isso, as cianotoxinas podem ficar retidas nos tecidos de plantas da agricultura e na cadeia trófica do homem (HEREMAN e BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2012).

No Brasil, a resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, estabeleceu o nível de padrão de qualidade da água doce destinada à irrigação de hortaliças consumidas cruas, que o valor máximo de densidade de cianobactérias nesses ambientes não pode ultrapassar 20.000 cel/mL (BRASIL, 2005). No entanto, a água utilizada para a irrigação de plantas da agricultura diretamente das fontes de abastecimento, sem tratamento prévio, pode representar uma rota importante de contaminação.

As microcistinas são potentes inibidoras de proteínas fosfatases 1 e 2A tanto em mamíferos como em plantas (MACKINTOSH et al., 1990). Com base em seus efeitos toxicológicos em mamíferos, incluindo o homem, são classificadas como hepatotoxinas uma vez que causam sérios danos ao tecido hepático, tais como alterações citoesqueléticas dos hepatócitos que podem resultar em morte por hemorragia intra-hepática ou insuficiência hepática (ERIKSSON et al., 1990; YOSHIDA et al., 1997). Tais efeitos podem ser observados tanto pela utilização da toxina purificada quanto pela presente em extratos brutos de cianobactérias (CARMICHAEL, 1992; KÓS et al., 1995). Contudo, os resultados obtidos com a utilização dos extratos brutos podem indicar a ação de outros compostos presentes nas

células, não apenas as cianotoxinas, uma vez que as cianobactérias podem produzir vários outros metabólitos secundários (CARMICHAEL, 1992).

Outra importante hepatotoxina, a cilindrospermopsina, tem apresentado efeitos genotóxicos e carcinogênicos em estudos com ratos em sistemas *in vitro* (FALCONER e HUMPAGE, 2006), demonstrando inibição da síntese de glutatona e proteínas em geral (RUNNEGAR et al., 1994; 1995). Em ensaio com camundongos, a cilindrospermopsina purificada pode afetar principalmente o fígado; já os extratos brutos de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju, produtora de CYN, injetados ou administrados por via oral nestes mamíferos também podem induzir sintomas patológicos nos rins, baço, timo e coração (SIVONEN e JONES, 1999).

Nas plantas, os efeitos causados por cianotoxinas purificadas ou presentes em extratos brutos são variados. Geralmente, observa-se que microcistinas presentes em extratos brutos podem ser retidas ou bioacumuladas nos tecidos foliares (CODD et al., 1999; CRUSH et al., 2008; CHEN et al., 2010; 2012; HEREMAN e BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2012), provocar estresse oxidativo (PIETSCH et al., 2001; PFLUMACHER et al., 2007; CHEN et al., 2010; CORDEIRO-ARAÚJO et al., 2015), causar inibição no crescimento, germinação, anomalias na morfologia e desenvolvimento (GEHRINGER et al., 2003; CHEN et al., 2004; PFLUGMACHER et al., 2007) ou ainda alterações na permeabilidade da membrana plasmática (CORDEIRO-ARAÚJO et al., 2015). No caso de plantas expostas às microcistinas purificadas os efeitos variam desde inibição do crescimento, atividade de proteínas fosfatases e alterações no teor de clorofila (KURKI-HELASMO e MERILUOTO, 1998; McELHINEY et al., 2001; M-HAMVAS et al., 2003; JÄRVENPÄÄ et al., 2007) até estresse oxidativo e bioacumulação (PFLUGMACHER et al., 2004; 2007; MITROVIC et al., 2005; FREITAS et al., 2015).

Quanto à cilindrospermopsina, os estudos sobre os seus efeitos em plantas são mais escassos e o que geralmente se observa é, no caso da toxina presente em extratos, estresse fisiológico e oxidativo (PRIETO et al., 2011) e captação da toxina nos tecidos foliares após irrigação pela raiz (KITTLER et al., 2012). Já com a cilindrospermopsina purificada tem se observado, além de captação nos tecidos foliares, estímulo e inibição na formação de raízes laterais, inibição da diferenciação do xilema em raízes e folhas e alterações na divisão celular (KITTLER et al., 2012; MATHÉ et al., 2013). Dessa forma, dependendo do grau de pureza das cianotoxinas e a sua concentração de exposição às plantas, os efeitos são diferenciados. A utilização de extratos brutos de cianobactérias contendo cianotoxinas para análise dos seus efeitos tem suas vantagens, pois pode representar o que realmente acontece nos ambientes naturais. Contudo, ao se trabalhar com as cianotoxinas purificadas pode-se afirmar que os

resultados obtidos são devidos unicamente a estes metabólitos específicos, eliminando a possibilidade dos efeitos serem resultantes de uma sinergia de substâncias.

Uma vez bioacumuladas, a persistência e desintoxicação das cianotoxinas têm sido alvo de estudos em frutos do mar, peixes e animais de água doce através de um processo conhecido por depuração (YOKOYAMA e PARK, 2003; OZAWA et al., 2003; SOARES et al., 2004; MOHAMED e HUSSEIN, 2006; SMITH e HANEY, 2006). A depuração pode envolver pequenas alterações na molécula original tais como substituição ou modificação de um grupo funcional e, na maior parte dos casos, os compostos são completamente destruídos e seus produtos finais resultantes são simples como dióxido de carbono, água ou sais inorgânicos (MARSDEN, 1993).

Em plantas aquáticas existe um processo de desintoxicação semelhante. No caso da microcistina, ocorre a desintoxicação inicialmente por um sistema enzimático formado pela glutathione S-transferase (GST) que transforma a toxina em produtos conjugados menos tóxicos (PFLUGMACHER et al., 1998a; 1998b; 1999). Além disso, tanto plantas aquáticas como terrestres, apresentam importantes sistemas de desintoxicação através de atividade enzimas antioxidantes como a peroxidase (POD), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (BABICA et al., 2006; CORDEIRO-ARAÚJO et al., 2015; ROMERO-OLIVA et al., 2015). O processo de desintoxicação de cianotoxinas em plantas terrestres é pouco conhecido e isso pode estar relacionado ao fato dos estudos estarem voltados principalmente para os efeitos danosos, processos de bioacumulação e possível contaminação alimentar. Porém, o conhecimento sobre o tempo de permanência de cianotoxinas, uma vez acumuladas em tecidos foliares de hortaliças, pode contribuir com os estudos de desintoxicação.

Em hortaliças, o estudo de Hereman e Bittencourt-Oliveira (2012), mostrou que a irrigação de culturas de alface com água contaminada com extratos brutos de *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing contendo MC-LR e MC-RR permitiu a bioacumulação das cianotoxinas na planta em concentrações acima do recomendado para o consumo humano (>0,04 µg de MCs por Kg de peso corporal). Para a análise das toxinas bioacumuladas nos tecidos foliares da alface, os autores utilizaram o método imunoenzimático ELISA que para análises de água e efeitos toxicológicos na comunidade fitoplanctônica em geral, tem se mostrado muito eficiente e amplamente utilizado (MORENO et al., 2004; TENEVA et al., 2010; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2011a). Entretanto, como já descrito, o processo de desintoxicação enzimática em plantas permite a formação de produtos conjugados de cianotoxinas. O método ELISA apresenta um processo conhecido por reatividade cruzada (*cross-reactivity*) durante a triagem das amostras. Dessa forma, este método pode quantificar não apenas as moléculas de cianotoxinas, mas também alguns dos produtos conjugados

formados durante o processo de desintoxicação demonstrando, inclusive, maior afinidade por tais produtos que a própria molécula matriz (METCALF et al., 2000; 2002). Dessa forma, existe a necessidade de uma confirmação dos resultados por outro método que consiga eliminar possíveis “falsos positivos” quando se analisa organismos complexos, como plantas. Atualmente, existem vários métodos físico-químicos que são amplamente utilizados para tais finalidades, como exemplos estão a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE – HPLC), Espectrometria de Massas (MS) ou ainda a combinação desses métodos: Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Sequência (LC-MS/MS).

A alface (*Lactuca sativa* L.), família Asteraceae, e a rúcula (*Eruca sativa* Mill.) família Brassicaceae, são exemplos de hortaliças de amplo consumo no Brasil. A alface ocupa o 1º lugar entre as hortaliças mais comercializadas e a rúcula o 24º lugar (EMBRAPA, 2010). Neste sentido, o objetivo desse estudo foi investigar a bioacumulação e a desintoxicação de MCs e CYN em alface (*Lactuca sativa* L.) e rúcula (*Eruca sativa* Mill.) em concentrações ambientalmente relevantes (0,5 a 13 $\mu\text{g L}^{-1}$) através do método físico-químico LC-MS/MS, bem como avaliar os processos fisiológicos que acompanham a bioacumulação e a desintoxicação das toxinas nestes vegetais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os efeitos nocivos provocados por cianotoxinas como cilindrospermopsina e, principalmente, microcistinas em humanos, animais, plantas aquáticas e terrestres têm sido investigados nos últimos anos (PFLUGMACHER et al., 1998a; SIVONEN e JONES, 1999; BRIAND et al., 2003; MITROVIC et al., 2005; STEWART et al., 2008; SAQRANE et al., 2009; HEREMAN e BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2012; KITTLER et al., 2012; ROMERO-OLIVA et al., 2014; 2015; GUTIERREZ-PRAENA et al., 2015; FREITAS et al., 2015). Em animais e seres humanos, o que geralmente ocorre é a intoxicação devido à exposição ou ingestão de água contaminada, o que em casos extremos, pode levar até a morte (JOCHIMSEN et al., 1998). No caso das plantas aquáticas, mediante a possibilidade desses organismos entrarem em contato com as cianotoxinas diretamente pela água circundante, o que geralmente se observa é a redução da biomassa e a bioacumulação nos tecidos (MITROVIC et al., 2005; YIN et al., 2005a; SAQRANE et al., 2007; ROMERO-OLIVA et al., 2014).

As microcistinas são amplamente distribuídas em ambientes de água doce de todo o mundo (FALCONER e HUMPAGE, 1996; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2011a). No caso da cilindrospermopsina, embora as espécies produtoras dessa hepatotoxina sejam bem distribuídas tanto em ambientes tropicais e sub-tropicais como temperados, os relatos comprovados de cilindrospermopsina em ecossistemas dulciaquícolas eram restritos à Austrália (HAWKINS et al., 1985) e México (BERRY e LIND, 2010). Contudo, recentemente Bittencourt-Oliveira et al. (2011b), relataram o primeiro caso de cilindrospermopsina no Brasil em reservatórios de abastecimento público na região nordeste do país e posteriormente confirmaram os resultados em outros reservatórios da mesma região (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014) alertando as autoridades para mais esta via de contaminação nos ambientes aquáticos brasileiros.

Inicialmente, as microcistinas foram caracterizadas a partir dos gêneros de cianobactérias *Microcystis* Lemmermann, *Anabaena* Bory de Saint-Vincent ex Bornet & Flahault, *Planktothrix* Anagnostidis & Komárek, *Nostoc* Vaucher ex Bornet & Flahault, *Anabaenopsis* Miller e *Hapalosiphon* Nägeli ex Bornet et Flahault (SIVONEN e JONES, 1999). Mais recentemente foi relatada a presença de microcistinas nos gêneros *Geitlerinema* (Anagnostidis & Komárek) Anagnostidis e *Leptolyngbya* Anagnostidis & Komárek (RICHARDSON et al., 2007). No gênero *Microcystis* destaca-se a espécie *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, produtora de microcistinas relacionada a incidentes de intoxicação por água contaminada tanto de animais: peixes e crustáceos (MAGALHÃES et

al., 2003; MALBROUCK e KESTEMONT, 2006; CHELLAPPA et al., 2008), gado (MEZ et al., 1997; BRIAND et al., 2003), cães (EDWARDS et al., 1992; DeVRIES et al., 1993) e aves (STEWART et al., 2008), quanto de seres humanos (JOCHIMSEN et al., 1998). Já a cilindrospermopsina foi caracterizada inicialmente a partir da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju (BYTH, 1980; HAWKINS et al., 1985) e posteriormente verificada a sua síntese por outras espécies como *Umezakia natans* W. Watanabe (HARADA et al., 1994), *Aphanizomenon ovalisporum* Forti (BANKER et al., 1997), *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet & Flahault (PREUSSEL et al., 2006), *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gornont) Speziale & Dyck (SEIFERT et al., 2007) e *Oscillatoria* sp. (MAZMOUZ et al., 2010).

Existem registradas na literatura mais de 80 variantes de microcistinas (MERILUOTO e SPOOF, 2008) e, dentre todas essas, a microcistina LR (MC-LR) é a mais estudada por apresentar dose letal (LD₅₀) de 50 µg.Kg⁻¹ através de estudos em camundongos (injeção intraperitoneal), já a MC-RR, outra variante muito estudada, apresenta LD₅₀ de 600 µg.Kg⁻¹ (SIVONEN e JONES, 1999). A administração da cilindrospermopsina purificada em ratos mostrou que esta toxina apresenta LD₅₀ de 2.100 µg.Kg⁻¹ para 24 h ou 200 µg.Kg⁻¹ por 5 a 6 dias (SIVONEN e JONES, 1999).

Em relação à ingestão diária total (TDI) de microcistinas, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu que para seres humanos, o TDI deve ser 0,04 µg de MC-LR por Kg de peso corpóreo/dia (WHO, 2011). Até o momento, a OMS não estipulou nenhum TDI para a cilindrospermopsina. Frente a essas possibilidades, a caracterização dos riscos das cianotoxinas em relação à saúde humana requer a identificação das rotas de exposição (DIETRICH e HOEGER, 2005).

Cianotoxinas e plantas aquáticas

Um dos primeiros estudos sobre cianotoxinas em plantas aquáticas relatou os efeitos tóxicos causados por uma floração de cianobactérias, na qual predominava *Microcystis* sp. à macrófita *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel causando redução no comprimento da raiz, na massa seca e na absorção de oxigênio e nutrientes (YAMASAKI, 1993). Desde então vários estudos têm observado efeitos nocivos em plantas aquáticas após exposição à cianobactérias e/ou cianotoxinas, principalmente em relação às micricistinas. Tais estudos versam principalmente sobre redução no crescimento (YIN et al., 2005a; MITROVIC et al., 2005; SAQRANE et al., 2007), estresse oxidativo (PFLUGMACHER, 2004; ROMERO-OLIVA et al., 2015), danos nas raízes devido à obliteração do aerênquima por calos (MÁTHÉ et al., 2007) e células somáticas anormais (MÁTHÉ et al., 2009).

Os efeitos da microcistina também foram observados na macrófita submersa *Ceratophyllum demersum* L., na qual foi detectada a absorção de 11,2% de MC-LR após exposição por sete dias a uma concentração de 2.500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Após a avaliação da atividade das enzimas glutatona S-transferases, verificou-se um possível metabolismo de desintoxicação similar ao que ocorre com substâncias tóxicas (xenobióticos) (PFLUGMACHER et al., 1998a).

Em estudo com níveis de toxicidade de extratos de cianobactérias foi observado que os semi-purificados contendo MC-LR de uma floração de *M. aeruginosa* podem apresentar maior toxicidade que concentrações semelhantes (10 a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$) de MC-LR comercial sobre determinados parâmetros, tais como, biomassa, conteúdo de clorofila, atividade de fosfatases ácidas e de RNase na macrófita livre flutuante *Spirodela oligorrhiza* (Kurz.) Hegelm (ROMANOWSKA-DUDA e TARCZYNSKÁ, 2002). Extrato bruto contendo MC-LR e RR, em concentrações de 0,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$, provocou maior redução da fotossíntese e elevação da enzima peroxidase na microalga verde *Scenedesmus armatus* (Chodat) G.M. Smith (microalga verde) e na macrófita *C. demersum* do que com as variantes purificadas (PIETSCH et al., 2001).

Cianotoxinas e plantas terrestres

Em relação às plantas terrestres, em muitos países, é comum a utilização de águas superficiais para irrigação a partir de fontes que naturalmente podem conter cianobactérias e cianotoxinas (PEUTHERT et al., 2007). A possibilidade desses vegetais, principalmente aqueles inclusos na dieta humana, entrarem em contato com as cianotoxinas via irrigação com água contaminada tem levado os pesquisadores a avaliarem os efeitos destes compostos, dentre eles as microcistinas e cilindrospermopsina nestes organismos (CODD et al., 1999; CRUSH et al., 2008; MOHAMED e AL SHEHRI, 2009; HEREMAN e BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2012; KITTLER et al., 2012; FREITAS et al., 2015; GUTIERREZ-PRAENA et al., 2015). Portanto, a introdução das cianotoxinas na cadeia alimentar humana é uma possibilidade preocupante, pois através da irrigação com água contaminada, várias culturas de plantas, inclusive as hortaliças, podem reter as cianotoxinas e chegar até os seres humanos através da alimentação (CODD et al., 1999; CRUSH et al., 2008; KITTLER et al., 2012; GUTIERREZ-PRAENA et al., 2015).

Como exemplo, onze espécies de plântulas de significativa importância econômica cultivadas em meio solidificado (soja - *Glycine max* (L.) Merrill, feijão - *Phaseolus vulgaris* L., milho - *Zea mays* L., entre outras) após exposição a MC-LR e MC-LF e extrato de células contendo MC-LR durante 24 h, a uma concentração de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, apresentaram maior

bioacumulação nas raízes (12 a 127 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca) que nos caules (1 a 64 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa fresca) (PEUTHERT et al., 2007).

Em plantas frutíferas como a macieira (*Malus pumila* Mill.), a bioacumulação de microcistina em tecidos foliares, assim como os efeitos danosos foi causada por exposição *in vitro* a extratos brutos de *M. aeruginosa* produtora de MC-LR (CHEN et al., 2010). Após exposição à MCs (acima de 0,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), o crescimento e a proliferação de brotos de *M. pumila* diminuíram notadamente. Além disso, após 14 dias de exposição a 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de microcistinas, a planta acumulou o equivalente a 36,45 ng.g^{-1} dia.

Além da bioacumulação, diversos outros efeitos causados por cianotoxinas têm sido evidenciados em plantas terrestres, especialmente os relacionados às microcistinas. Tais efeitos estão atrelados às atividades enzimáticas dessas plantas (MACKINTOSH et al., 1990; PEUTHERT et al., 2008), a redução da atividade da enzima sacarose-fosfato sintetase (SPS) decorrente da inibição das proteínas PP1 e PP2A por MC-LR em folhas de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), tanto *in vitro* como *in vivo*, resultando na redução da biossíntese de sacarose e fixação de gás carbônico (SIEGL et al., 1990), estresse oxidativo (YIN et al., 2005b; XUE et al., 2010), respostas a estresse oxidativo através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes (STÜVEN e PFLUGMACHER, 2007), redução na taxa líquida de fotossíntese nas folhas primárias de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (ABE et al., 1996), redução no crescimento, na produtividade, na atividade do fotossistema II e aumento no acúmulo de nutrientes minerais na raiz de plantas de ervilha (*Pisum sativum* L.), lentilha (*Lens esculenta* Moench), milho (*Zea. mays* L.) e trigo (*Triticum durum* L.) (SAQRANE et al., 2009) e redução nos estágios de desenvolvimento, no comprimento da raiz e formação de nódulos radiculares em alfafa (*Medicago sativa* L.) (EL KHALLOUFI et al., 2011).

Além disso, foram observados inibição do crescimento de plântulas devido aos efeitos tóxicos de microcistinas em mostarda (*Synapis alba* L.) (KÓS et al., 1995); em sementes e plântulas também de *S. alba* sob a ação de microcistinas purificadas dentre elas MC-LR e MC-RR (KURKI-HELASMO e MERILUOTO, 1998) e inibição do crescimento de batata (*Solanum tuberosum* L.) feijão (*P. vulgaris*) e mostarda (*S. alba*) devido aos efeitos de MC-LR e MC-LF (McELHINEY et al., 2001). Já as mudas de brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck.) e mostarda (*S. alba*) crescidas em solo e vermiculita (60:40, v/v) e irrigadas com água contendo microcistinas purificadas nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ tiveram uma ligeira inibição (10%) apenas no crescimento do brócolis. Por espectrometria de massa, detectou-se uma das quatro variantes da mistura (MC-LR), sendo que a toxina foi detectada apenas nas raízes das plantas em concentrações de 900 a 2.600 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa fresca (JÄRVENPÄÄ et al., 2007). Já a cilindrospermopsina tem apresentado retardamento na

divisão mitótica devido a um atraso na síntese de proteínas e anomalias nos planos de divisão celular de *Vicia faba* L. (fava) após exposição por 3 ou 6 dias (GARDA et al., 2015). Além de provocar alterações na organização da cromatina de células de plantas (MÁTHÉ et al., 2013).

Além das cianotoxinas, as cianobactérias podem produzir diversos outros metabólitos secundários com função desconhecida (LEÃO et al., 2012). Tem sido demonstrado que os efeitos de extratos brutos de cianobactérias não produtoras de cianotoxinas podem afetar o crescimento e o teor de óleo em plantas medicinais (SHARIATMADARI et al., 2015)

Bioacumulação de cianotoxinas em hortaliças

A bioacumulação de microcistinas em plantas pode variar conforme a espécie, tempo de exposição e concentração (JÄRVENPÄÄ et al., 2007; MOHAMED e SHERI, 2009). O primeiro estudo a relatar o processo de acúmulo de cianotoxinas em hortaliças foi realizado por Codd et al. (1999). Os autores observaram em folhas de alface comercial (*L. sativa*) colônias e células individuais de *M. aeruginosa* após dez dias da última irrigação com água em que, posteriormente, verificou-se conter a cianobactéria e microcistinas numa concentração de 3,23 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de massa seca de floração. O conteúdo de microcistina foi avaliado por imunoenensaio e obteve-se um valor de 2.490 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ de massa seca de folhas centrais (denominado de “heart”), 94 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ na zona basal e 880 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ na zona distal de folhas medianas.

Em estudo realizado no Brasil, Hereman e Bittencourt-Oliveira (2012) encontraram bioacumulação de microcistinas no tecido foliar de alface (*L. sativa*) utilizando irrigação do tipo “spray” com concentrações variando de 0,62 a 12,5 $\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$ de microcistinas totais provenientes de extratos de *Microcystis aeruginosa* BCCUSP232 contendo MC-LR e MC-RR. Os autores encontraram 8,31 a 177,8 $\mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$ de microcistinas totais, nos tecidos foliares de alface demonstrando claramente o processo de bioacumulação na hortaliça após 15 dias de aplicação de MCs totais. Um outro estudo realizado no Brasil abordando este tema foi o de Macedo-Silva (2011). Neste caso, para a obtenção dos extratos brutos com microcistinas foi cultivada a mesma linhagem *M. aeruginosa* BCCUSP232. Contudo, após a aplicação dos extratos com as mesmas concentrações não foram evidenciados eventos de bioacumulação nos tecidos foliares de rúcula (*E. sativa*). Foi observado que entre os dois estudos as concentrações e variantes de microcistinas presentes nos extratos brutos de *M. aeruginosa* diferiram substancialmente. Enquanto em Hereman e Bittencourt-Oliveira (2012) havia MC-LR (~75%) e MC-RR (~25%) nos extratos brutos, em Macedo-Silva (2011) menos de 2% da MC-LR e MC-RR foi encontrado, além de outras variantes demetiladas.

Em outro estudo, Crush et al. (2008) observaram diferença na bioacumulação de MCs totais (valores entre 550 e 3.330 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa seca) após aplicação de 100 mL de extrato bruto proveniente de uma floração de cianobactérias que continha 1.700 $\mu\text{g.L}^{-1}$ com dez variantes (principalmente MC-RR e MC-LR), diretamente na raiz ou na parte aérea de alface (*L. sativa* L.), nabo (*B. napus*), azevém perene (*Lolium perene* L.) e trevo-branco (*Trifolium repens* L.) crescidos em areia. Contudo, as MCs totais aplicadas diretamente na raiz não foram encontradas nas folhas, indicando ausência de translocação da molécula.

A bioacumulação de microcistinas em plantas de horticultura, dentre elas rabanete, alface, rúcula, repolho, salsa e couve foi evidenciada após irrigação com água subterrânea contaminada com MC-YR (MOHAMED e SHEHRI, 2009). Tanto raízes quanto folhas acumularam concentrações que variaram de 0,07 a 1,2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa fresca. Apesar deste acúmulo, as plantas não apresentaram quaisquer alterações morfológicas e fisiológicas. Para os autores, a ausência de alterações morfológicas e fisiológicas está relacionada às baixas concentrações de MCs encontradas nas águas subterrâneas (0,30 a 1,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$) que não seriam suficientes para causar efeitos nas plantas. Os autores detectaram microcistinas nas folhas e raízes de plantas consumíveis por humanos em concentrações variando de 0,11 a 0,36 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa fresca, o que poderia ultrapassar os valores recomendados pela OMS.

Plantas adultas (2 meses de cultivo) de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) foram expostas por 2 semanas a MC-LR purificada e MC-LR presente em extratos brutos de *M. aeruginosa* (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) (GUTIERREZ-PRAENA et al., 2015). Os autores observaram que a MC-LR ficou retida nas raízes (1635,21 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso fresco), tomates verdes (5,15 – 5,41 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso fresco), tomates maduros (10,52 - 10,83 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso fresco) e folhas (12.298,18 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso fresco).

Kittler et al. (2012) observaram significativa captação de cilindrospermopsina (CYN), em vegetais de horticultura (*Brassica oleracea* var. *sabellica* L., *Brassica juncea* (L.) Czerny, e *Sinapis alba* L.). Os experimentos buscaram determinar quais eram os níveis de CYN presentes nas folhas após a aplicação dos extratos contendo a toxina nas raízes. Os autores observaram os níveis de CYN nas folhas variando de 15% e 21% (2,71 e 3,78 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de massa fresca) comparados com as concentrações de CYN aplicadas nas raízes (18,2 e 35,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Dessa forma, os autores alertaram para a possibilidade de acúmulo dessa toxina em plantas de *Brassica*.

Cianotoxinas e a sua desintoxicação nas plantas

Estudos abordando o período de desintoxicação de cianotoxinas têm sido realizados com o intuito de compreender quais seriam as vias de metabolização ou degradação dos organismos ao entrarem em contato com essas substâncias. Estes estudos têm sido realizados principalmente em animais aquáticos, em eventos conhecidos por depuração, por estarem naturalmente em contato com as cianotoxinas e bioacumularem em seus tecidos (OZAWA et al., 2003; SOARES et al., 2004; MOHAMED e HUSSEIN, 2006; SMITH e HANEY, 2006; DEBLOIS et al., 2008; GARCIA et al., 2010).

Em animais aquáticos o processo de depuração, no caso das microcistinas, pode explicar as diferenças existentes entre o acúmulo em diferentes espécies, como por exemplo, entre peixes e o seston, e pode ser a hipótese de que a depuração metabólica é mais eficaz em certas variantes ocasionando maior acúmulo das variantes mais difíceis de eliminar (DEBLOIS et al., 2008).

Em plantas, a desintoxicação pela via glutathione S-transferase ocorre semelhante à degradação de substâncias tóxicas (depuração) que ocorre em animais aquáticos, na qual se dá a captação com posterior degradação parcial ou completa de tais substâncias em compostos menos tóxicos (PFLUGMACHER et al., 1999). De acordo com Metcalf et al. (2000; 2002), essa degradação parcial das cianotoxinas pode ocasionar uma reação cruzada em determinadas análises como as utilizadas pelo método ELISA, nas quais os produtos derivados podem ser detectados e causar um resultado de "falso positivo". Assim, outros métodos tais como o LC-MS/MS devem ser utilizados para uma possível confirmação dos resultados, uma vez que o citado método físico-químico consegue caracterizar e quantificar com precisão a molécula matriz, evitando a conhecida reação cruzada.

Em plantas de arroz foi verificado que após irrigação com água contaminada com microcistinas (0, 1, 100, 1000, and 3000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) por 7 dias e em seguida com água não contaminada por mais 7 dias houve uma menor concentração da toxina nas plantas neste último período (LIANG e WANG, 2015). Isso mostrou que nessas plantas existiu uma resposta importante do sistema de desintoxicação após a contaminação. Dessa forma, estudos sobre desintoxicação de cianotoxinas em plantas poderiam auxiliar no esclarecimento da causa da bioacumulação ocorrer em diferentes níveis dependendo da espécie de planta estudada e da variante de toxina utilizada.

REFERÊNCIAS

- ABE, T.; LAWSON, T.; WEYERS, J. D. B.; CODD, G. A. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytologist*, v. 133, p. 651-658, 1996.
- BABICA, P.; BLÁHA, L.; MARSALEK, B. Exploring the natural role of microcystins - a review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology*, v.42, p.9 – 20, 2006.
- BANKER, P.D.; CARMELI, S.; HADAS, O.; TELTSCH, B.; PORAT, R.; SUKENIK, A. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *Journal of Phycology*, v.33, p.613-616, 1997.
- BERRY, J.P.; LIND, O. First Evidence of Paralytic Shellfish Toxins and Cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in ‘Tegogolo’ Snails (*Pomacea patula catemacensis*). *Toxicon*, vl. 55, p.930-938, 2010.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, M.C.; PINTO, E. Diversity of microcystin-producing genotypes in Brazilian strains of *Microcystis* (Cyanobacteria). *Brazilian Journal of Biology*, v. 71, p. 209-216, 2011a.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; Piccin-Santos,V.; Kujbida, P.; Moura, A.N. Cylindrospermopsin in water supply reservoirs in Brazil determined by immunochemical and molecular methods. *Journal of Water Resource and Protection*, v.3, p.349-355, 2011b.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; PICCIN-SANTOS, V.; MOURA, A.N.; ARAGÃO-TAVARES, N.K.C.; CORDEIRO-ARAÚJO, M.K. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.86, 296-309, 2014.
- BRASIL, CONSELHO NACIONAL Do MEIO AMBIENTE - CONAMA, 2005. Resolução 357: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. pp.58-63.
- BRIAND, J. F.; JACQUET, S.; BERNARD, C.; HUMBERT, J. F. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research*, n. 34, p. 361-377, 2003.

- BYTH, S. Palm Island mystery disease. *Medical Journal of Australia*, v.2, p.40-42, 1980.
- CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, v.72, p.445-459, 1992.
- CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, v.72, p.445-459, 1992.
- CARMICHAEL, W.W. The cyanotoxins. In: *Advances in Botanical Research*, v.27 (Callow J, ed). London: Academic Press, 1997, p.211-256.
- CHELLAPPA, N. T.; CHELLAPPA, S. L.; CHELLAPPA, S. Harmful phytoplankton blooms and fish mortality in a eutrophicated reservoir of northeast Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.1, p.833-841, 2008.
- CHEN, J.; SONG, L.; DAI, J.; GAN, N.; LIU, Z. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon*, v.43, n.4, p.393-400, 2004.
- CHEN, J.; DAI, J.; ZHANG, H.; WANG, C.; ZHOU, G.; HAN, Z.; LIU, Z. Bioaccumulation of microcystin and its oxidative stress in the apple (*Malus pumila*). *Ecotoxicology*, v.19, p.796-803, 2010.
- CHEN, J.; HAN, F.X.; WANG, F.; ZHANG, H.; SHI, Z. Accumulation and phytotoxicity of microcystin-LR in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 76, p.193-199, 2012.
- CODD, G. A., METCALF, J. S.; BEATTIE, K. A. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon*, v.37, p.1181-1185, 1999.
- CORDEIRO-ARAÚJO, M.K.; CHIA, M.A.; HEREMAN, T.C.; SASAKI, F.F.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. Selective membrane permeability and peroxidase activity response of lettuce and arugula irrigated with cyanobacterial-contaminated water. *Environmental Earth Sciences*, 2015. DOI :10.1007/s12665-015-4147-7.
- COX, P. A.; BANACK, S. A.; MURCH, S. J. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, p. 13.380-13.383, 2003.
- CRUSH, J. R.; BRIGGS, L. R.; SPROSEN, J. M.; NICHOLS; S. N. Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. *Environmental Toxicology*, v. 23, p. 246-252, 2008.

- DEBLOIS, C.P., ARANDA-RODRIGUEZ, R., GIANI, A., BIRD, D.F. Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. *Toxicon*, v.51, p.435-448, 2008.
- DeVRIES, S.E.; GALEY, F.D.; NAMIKOSHI, M.; WOO, J.C. Clinical and pathologic findings of blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) intoxication in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.5, p.403-408, 1993.
- DIETRICH, D.; HOEGER, S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach?. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.203, p.273-289, 2005.
- EDWARDS, C.; BEATTIE, K. A.; SCRIMGEOUR, C. M.; CODD, G. A. Identification of anatoxin-a in a benthic Cyanobacteria (blue-green-algae) and in associated dog poisoning at Loch Inch, Scotland. *Toxicon*, v.30, p.1165-1175, 1992.
- EL KHALLOUFI, F.; OUFDOU, K.; LAHROUNI M., EL GHAZALI, I.; SAQRANE, S.; VASCONCELOS, V.; OUDRA, B. Allelopathic effects of cyanobacteria extracts containing microcystins on *Medicago sativa*-Rhizobia symbiosis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.74, p. 431-438, 2011.
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Catálogo brasileiro de hortaliças: saiba como plantar e aproveitar 50 das espécies mais comercializadas no país*. Brasília (DF), 2010, 60p.
- ERIKSSON, J. E.; GRONBERG, L.; NYGARD, S.; SLOTTE, J. P.; MERILUOTO, J.A.O. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochemical et Biophysica Acta*, v.1025, p. 60-66, 1990.
- FALCONER, I.R.; HUMPAGE, A.R. Tumour promotion by cyanobacterial toxins. *Phycologia*, v.35, p.74-79, 1996.
- FALCONER, I.R.; HUMPAGE, A.R. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsins. *Environmental Toxicology*, v.21, p.299-304, 2006.
- FREITAS, M.; AZEVEDO, J.; PINTO, E.; NEVES, J.; CAMPOS, A.; VASCONCELOS, V. Effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin and amicrocystin-LR/cylindrospermopsin mixture on growth, oxidative stress and mineral content in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.16, p.59-67, 2015.
- GARCIA, A.C.; BARGU, S.; DASH, P.; RABALAIS, N.N.; SUTOR, M.; MORRISON, W.; WALKER, N.D. Evaluating the potential risk of microcystins to blue crab (*Callinectes sapidus*) fisheries and human health in a eutrophic estuary. *Harmful Algae*, v.9, p.134-143, 2010.

- GARDA, T.; RIBA, M.; VASAS, G.; BEYER, D.; M-HAMVAS, M.; HAJDU, G.; TANDOR, I.; MÁTHÉ, C. Cytotoxic effects of cylindrospermopsin in mitotic and non-mitotic *Vicia faba* cells. *Chemosphere*, v.120, p.145-153, 2015.
- GEHRINGER, M.M.; KEWADA, V.; COATES, N.; DOWNING, T.G. The use of *Lepidium sativum* in a plant bioassay system for the detection of microcystin-LR. *Toxicon*, v.41, p.871-876, 2003.
- GUTIÉRREZ-PRAENA, D.; CAMPOS, A.; AZEVEDO, J.; NEVES, J.; FREITAS, M.; GUZMÁN-GUILLÉN, R.; CAMEÁN, A.M.; RENAUT, J.; VASCONCELOS, V. Exposure of *Lycopersicon esculentum* to microcystin-LR: effects in the leaf proteome and toxin translocation from water to leaves and fruits. *Toxins*, v.6, p. 1837-1854, 2014.
- HARADA, K.I.; OHTANI, I.; IWAMOTO, K.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.; WATANABE, M.; TERAOKA, K. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon*, v.32, p.73-84, 1994.
- HAWKINS, P.R.; RUNNEGAR, M.T.C.; JACKSON, A.R.B.; FALCONER, I.R. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, v.50, p.1292-1295, 1985.
- HEREMAN, T.C.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. Bioaccumulation of microcystins in lettuce. *Journal of Phycology*, v.48, p.1535-1537, 2012.
- JÄRVENPÄÄ, S.; LUNDBERG-NIINISTÖ, C.; SPOOF, L.; SJÖVALL, O.; TYYSTJÄRVI, E.; MERILUOTO, J. Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography–mass spectrometry. *Toxicon*, v.49, n.6, p. 865-874, 2007.
- JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J.; CARDO, D.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. B. C.; MELO-FILHO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V.; AZEVEDO, S. M. F. O.; JARVIS, W. R. Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*, v.36, p.873-878, 1998.
- KITTLER, K. ; SCHREINER, M.; KRUMBEIN, A.; MANZEI, S.; KOCH, M.; ROHN S.; MAUL, R. Uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in *Brassica* vegetables. *Food Chemistry*, v.133, p.875-879, 2012.
- KÓS, P.; GORZÓ, G.; SURÁNYI, G.; BORBÉLY, G. Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Analytical Biochemistry*, v. 225, p. 49-53, 1995.

- KURKI-HELASMO, K.; MERILUOTO, J. 1998. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Toxicon*, v. 36, n.12, p. 1921-1926, 1998.
- LEÃO, P.N.; RAMOS, V.; VALE, M.; MACHADO, J.P.; VASCONCELOS, V.M. Microbial community changes elicited by exposure to cyanobacterial allelochemicals. *Microbial Ecology*, v.63, p.85-95, 2012.
- LIANG, C.; WANG, W. 2015. Response and recovery of rice (*Oryza sativa*) seedlings to irrigation with microcystin-contaminated water. *Environmental Earth Science*, April 2015, v.7, p.4573-4580, 2015.
- MACEDO-SILVA, I. *Efeitos alelopáticos de microcistinas em rúcula (Eruca sativa Mill.)* 2011. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas – Biologia vegetal). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP, 2011.
- MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K.A.; KLUMPP, S.; COHEN, P., CODD, G.A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v.264, p.187-192, 1990.
- MAGALHÃES, V.F.; MARINHO, M.M.; DOMINGOS, P.; OLIVEIRA, A.C.; COSTA, S.M.; AZEVEDO, L.O.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, v.42, p.289-295, 2003.
- MALBROUCK, C.; KESTEMONT, P. Effects of microcystins on fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.25, p.72-86, 2006.
- MARSDEN, I.D. Effects of algal blooms on shellfish biology and metabolism. Proceedings of the workshop "Marine toxins and New Zealand shellfish". *Royal Society of New Zealand Miscellaneous Series*, v.24, p.23-27, 1993.
- MÁTHÉ, C.; M-HAMVAS, M.; VASAS, G.; SURÁNYI, G.; BÁCSI, I.; BEYER, D.; TÓTH, S.; TÍMÁR, M.; BORBÉLY, G. Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, induces growth inhibition and histological alterations in common reed (*Phragmites australis*) plants regenerated from embryogenic calli. *New Phytologist*, v.176, p. 824-835, 2007.
- MÁTHÉ, C.; BEYER, D.; ERDÖDI, F., SERFÖZÖ, Z.; SZÉKVOLGYI, L., VASAS, G., M-HAMVAS, M., JÁMBRIK, K.; GONDA, S.; KISS, A., SZIGETI, Z. M., SURÁNYI, G. Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets. *Aquatic Toxicology*. v.92, p. 122-130, 2009.

- MÁTHÉ, C.; VASAS, G.; BORBÉLY, G.; ERDŐDI, F.; BEYER, D.; KISS, A.; SURÁNYI, G.; GONDA, S.; JÁMBRIK, K.; M-HAMVAS, M. Histological, cytological and biochemical alterations induced by microcystin-LR and cylindrospermopsin in white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Acta Biologica Hungarica*, v.64, p.71-85, 2013.
- MAZMOUZ, R.; CHAPUIS-HUGON, F.; MANN, S.; PICHON, V.; MEJEAN, A.; PLOUX, O. Biosynthesis of cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin in oscillatoria pcc 6506; identification of the gene cluster and toxin analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v.76, p.4943-4949, 2010.
- McELHINEY, J.; LAWTON, L. A.; LEIFERT, C. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon*, v. 39, p. 1411-1420, 2001.
- MERILUOTO, J.A.; SPOOF, L.E. Cyanotoxins: sampling, sample processing and toxin uptake. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.619, p.483-499, 2008.
- METCALF, J.S.; BEATTIE, K.A.; PFLUGMACHER, S.; CODD, G.A. Immuno-crossreactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *FEMS Microbiology Letters*, v.189, p.155-158, 2000.
- METCALF, J.S.; BEATTIE, K.A.; RESSLER, J.; GERBERSDORF, S.; PFLUGMACHER, S.; CODD, G.A. Cross-reactivity and performance assessment of four microcystin immunoassays with detoxication products of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA*, v.51, p. 145-151, 2002.
- MEZ, K.; BEATTIE, K. A.; CODD, G. A.; HANSELMANN, K.; HAUSER, B.; NAEGELI, H.; PREISIG, H. R. Identification of microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *Europe Journal of Phycology*, n. 32, p. 111-117, 1997.
- M-HAMVAS, M.; MATHÉ, C.; MOLNÁR, E.; VASAS, G.; GRIGORSZKY, I.; BORBELY, G. Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L. seedlings. *Aquatic Toxicology*, v.62, p.1-9, 2003.
- MITROVIC, S. M.; ALLIS, O.; FUREY, A.; JAMES, K. J. Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 61, p. 345-352, 2005.
- MOHAMED, Z.A.; AL SHEHRI, A.M.A. Microcystins in groundwater wells and their accumulation in vegetable plants irrigated with contaminated waters in Saudi Arabia. *Journal of Hazardous Materials*, v.172, p.310-315, 2009.

- MOHAMED, Z.A.; HUSSEIN, A.A. Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: A laboratory study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.63, p. 424–429, 2006.
- MORENO, I.M.; PEREIRA, P.; FRANCA, S.; CAMEÁN, A. Toxic cyanobacteria strains isolated from blooms in the Guadiana River (southwestern Spain). *Biological Research*, v.37, p. 405-417, 2004.
- MURCH, S.J.; COX, P.A.; BANACK, S.A. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *PNAS*, v.101, n.33, p.12228–12231, 2004.
- OZAWA, K.; YOKOYAMA, A.; ISHIKAWA, K.; KUMAGAI, M.; WATANABE, M. F.; PARK, H. Accumulation and depuration of microcystin produced by the cyanobacterium *Microcystis* in a freshwater snail. *Limnology*, v.4, p.131-138, 2003.
- PEUTHERT, A.; CHAKRABARTI, S.; PFLUGMACHER, S. Uptake of Microcystins-LR and -LF (Cyanobacterial Toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). *Environmental Toxicology*, n. 22(4), p. 436-442, 2007.
- PEUTHERT, A.; LAWTON, L.; PFLUGMACHER, S. *In vivo* influence of cyanobacterial toxins on enzyme activity and gene expression of protein phosphatases in alfalfa (*Medicago sativa*). *Toxicon*, v. 52, p. 84-90, 2008.
- PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C.; OBEREMM, A.; BEATTIE, K. A.; KRAUSE, E., CODD, G. A.; STEINBERG, C. E. W. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochemica et Biophysica Acta*, n. 1425, p. 527-533, 1998a.
- PFLUGMACHER, S.; CODD, G. A.; CHRISTIAN, E. W.; STEINBERG, C. E. W. Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. *Environmental Toxicology*, v.14, p. 111-115, 1998b.
- PFLUGMACHER, S.; CODD, G.A.; STEINBERG, C.E.W. Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. *Environmental Toxicology*, v.14, p.111-117, 1999.
- PFLUGMACHER, S. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquatic Toxicology*, v.70, p. 169-178, 2004.
- PFLUGMACHER, S.; AULHORN, M.; GRIMM, B. Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants. *New Phytologist*, v.175, p.482-489, 2007.

- PIETSCH, C.; WIEGAND, C.; AMÉ, M. V.; NICKLISCH, A.; WUNDERLIN, D.; PFLUGMACHER, S. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environmental Toxicology*, v.16, p. 535-542, 2001.
- PREUSSEL, K.; STUKEN, A.; WIEDNER, C.; CHORUS, I.; FASTNER, J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon*, v.47, p.156-162, 2006.
- PRIETO, A.; CAMPOS, A.; CAMEÁN, A.; VASCONCELOS, V. Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.74, p.1973-1980, 2011.
- RICHARDSON, L.L.; SEKAR, R.; MYERS, J.L.; GANTAR, M.; VOSS, J.D.; KACZMARSKY, L.; REMILY, E.R.; BOYER, G.L.; ZIMBA, P.V. The presence of the cyanobacterial toxin microcystin in black band disease of corals. *Federation of European Microbiological Societies Microbiological Letters*, Amsterdam, v.272, p.182-187, 2007.
- ROMANOWSKA-DUDA, Z. & TARCZYNSKA, M. The influence of microcystin-LR and hepatotoxic cyanobacterial extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*. *Environmental Toxicology*, v.17, p.434-440, 2002.
- ROMERO-OLIVA, C.S.; CONTARDO-JARA, V.; BLOCK, T.; PFLUGMACHER, S. Accumulation of microcystin congeners in diferente aquatic plants and crops – A case study from lake Amatitlán, Guatemala. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.102, p.121-128, 2014.
- ROMERO-OLIVA, C.S., CONTARDO-JARA, V., PFLUGMACHER, S., 2015. Antioxidative response of the three macrophytes *Ceratophyllum demersum*, *Egeria densa*, and *Hydrilla verticillata* to a time dependent exposure of cell-free crude extracts containing three microcystins from cyanobacterial blooms of Lake Amatitlán, Guatemala. *Aquatic Toxicology*, v.163, p.130-139.
- RUNNEGAR, M.T.C.; KONG, S.M.; ZHONG, Y.Z.; GE, J.L.; LU, S.C. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.201, p.235-241, 1994.
- RUNNEGAR, M.T.C.; KONG, S.M.; ZHONG, Y.Z.; LU, S.C. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biocheical. Pharmacology*, v.49, p.219-225, 1995.

- SAQRANE, S.; GHAZALI, I. E.; OUAHID, Y.; HASSNI, M.; HADRAMI, I. E.; BOUARAB, L.; CAMPO, F. F.; OUDRA, B.; VASCONCELOS, V. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. *Aquatic Toxicology*, v.83, p.284-284, 2007.
- SAQRANE, S.; OUAHID, Y.; GHAZALI, Y.; OUDRA, B.; BOUARAB, L.; CAMPO, F. F. Physiological changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* cultivars, caused by irrigation with water contaminated with microcystins: A laboratory experimental approach. *Toxicon*, v.53, p.786-796, 2009.
- SEIFERT, M.; MCGREGOR, G.; EAGLESHAM, G.; WICKRAMASINGHE, W.; SHAW, G. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gornont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae*, V.6, p.73-80, 2007.
- SHARIATMADARI, Z.; RIAHI, H.; ABDI, M.; HASHTROUDI, M.S.; GHASSEMPOUR, A.R. 2015. Impact of cyanobacterial extracts on the growth and oil content of the medicinal plant *Mentha piperita* L. *Journal of Applied Phycology*, v.27, p.2279-2287.
- SIEGL, G.; MacKintosh, C.; STITT, M. Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves. Evidence from the effects of ocadaic acid and microcystin. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v. 270, p. 198-202, 1990.
- SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I. & BARTRAM, J. (Orgs.). *Toxic cyanobacteria in water: A guide to the Public Health Consequences, Monitoring and Management*. J.E and FN Spon, London, 1999. pp. 41-111.
- SMITH, J.L.; HANEY, J.F. Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon*, v.48, p. 580-589, 2006.
- SOARES, R.M.; MAGALHÃES, V.F., AZEVEDO, S.M.F.O. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, v.70, p.1-10, 2004.
- STEWART, I.; SEAWRIGHT, A.A.; SHAW, G.R. *Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds – an overview*, in *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms State of the Science and Research Needs*, H.K. Hudnell, Editor. Springer, 2008.
- STÜVEN, J.; PFLUGMACHER, S. Antioxidative stress response of *Lepidium sativum* due to exposure to cyanobacterial secondary metabolites. *Toxicon*, v. 50, p. 85-93, 2007.

- TENEVA, I.; MLADENOV, R.; BELKINOVA, D.; DIMITROVA-DYULGEROVA, I.; DZHAMBAZOV, B. Phytoplankton community of the drinking water supply reservoir Borovitsa (South Bulgaria) with an emphasis on cyanotoxins and water quality. *Central European Journal of Biology*, v.5, p.231-239, 2010.
- WHO. Cyanobacterial toxins: microcystin-LR. Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, 4th ED, Geneva, pp.518, 2011.
- XUE, Y.; LI, Y.; YI, N.; LI, H.; SHI, Z. Investigations into the Effects of microcystin-LR on the growth and antioxidant enzymes in Chinese cabbage and rape. *IEEE*, v. 978, n.1, 4244-4713, 2010.
- YAMASAKI, S. Probable effects of algal bloom on the growth of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. *Journal of Plant Research*, v.106, p.113-120, 1993.
- YIN, L.; HUANG, J.; LI, D.; LIU, Y. Microcystin-RR uptake and its effects on the growth of submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* (L.) Hara. *Environmental Toxicology*, v. 20, p.308-313, 2005a.
- YIN, L.; HUANG, J.; HUANG, W.; LI, D.; LIU, Y. Responses of antioxidant system in *Arabidopsis thaliana* suspension cells to the toxicity of microcystin-RR. *Toxicon*, v. 46, p. 859–864, 2005b
- YOKOYAMA, A.; PARK, H-D. Depuration kinetics and persistence of the cyanobacterial toxin microcystin-LR in the freshwater bivalve *Unio douglasiae*. *Environmental Toxicology*, v.18, p.61-67, 2003.
- YOSHIDA, T.; MAKITA, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; SEKIJIMA, M.; TAMARU, S.I.; UENO, Y. Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. *Natural Toxins*, v.5, p. 91-95, 1997.

Manuscrito I: Publicado na revista:



**Resposta da permeabilidade da membrana plasmática e da atividade da peroxidase em
alface e rúcula à irrigação com água contaminada com cianobactérias**

Environ Earth Sci (2015) 74:1547–1553
DOI 10.1007/s12665-015-4147-7



ORIGINAL ARTICLE

**Selective membrane permeability and peroxidase activity
response of lettuce and arugula irrigated with cyanobacterial-
contaminated water**

Micheline Kézia Cordeiro-Araújo · Mathias Ahii Chia ·
Talita Caroline Hereman · Fabiana Fumi Sasaki ·
Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira

Received: 7 July 2014 / Accepted: 31 January 2015 / Published online: 10 February 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Micheline Kézia Cordeiro-Araújo^{1,2}, Mathias Ahii Chia², Talita Caroline Hereman², Fabiana
Fumi Sasaki², Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R.
Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, CEP 52171-030, Recife, PE, Brazil.

²Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, São Dimas, CEP 13418-900, Piracicaba, SP,
Brazil

*Autor para correspondência: mbitt@usp.br; fone: +5519-3429-4128; Fax: +5519-3434-8295.

Resumo

A irrigação de plantas da agricultura com água contaminada com microcistinas pode causar diversos efeitos, tanto no desenvolvimento e estresse oxidativo quanto na queda nos níveis de produção. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de extratos brutos de cianobactérias produtoras e não produtoras de microcistinas em alface e rúcula, em relação à permeabilidade da membrana plasmática e ao estresse oxidativo através da análise da atividade da enzima peroxidase (POD). Para tanto, plantas de alface e rúcula foram irrigadas durante 15 dias com água contaminada com extratos brutos de cianobactérias produtoras (MC+) e não produtoras (MC-) de microcistinas (MCs) (*Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing). Para verificar os efeitos causados pelos extratos brutos, as folhas e as raízes das plantas foram submetidas às análises da enzima peroxidase e, quanto à permeabilidade seletiva da membrana plasmática e conteúdo de clorofila, nas quais as folhas foram analisadas durante o período de 15 dias de irrigação. Os valores da atividade da POD encontrados nos tratamentos com MCs foram maiores que o controle indicando, claramente, que os extratos brutos MC+ e MC- causaram estresse oxidativo na rúcula. Contudo, a alface apresentou menores valores da POD que o controle, indicando inibição da sua atividade. Ambos os extratos brutos MC+ e MC- causaram alterações na permeabilidade da membrana plasmática das hortaliças, mas os efeitos foram acentuados quando utilizados os extratos MC+. Nenhum tipo de alteração foi verificado no conteúdo de clorofila. O fato de os extratos brutos MC+ e MC- terem provocado estresse oxidativo e alterações na permeabilidade da membrana nas hortaliças representa um problema adicional quanto à produção de hortaliças.

Palavras-Chave: Atividade antioxidante, Hortaliças, Membranas, Microcistinas.

Introdução

Microcistinas (MCs) são toxinas produzidas por cianobactérias (cianotoxinas) que causam inibição de proteínas fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A) presentes tanto em plantas como em animais (Mackintosh et al. 1990). Em plantas, as proteínas fosfatases regulam importantes processos celulares, tais como a atividade dos canais de íons, o metabolismo do carbono e nitrogênio, expressão gênica e processos de crescimento e desenvolvimento (Smith e Walker 1996; Luan 2003). Nesse sentido, a irrigação de plantas da agricultura com água contaminada com microcistinas pode ocasionar vários problemas tanto para o seu desenvolvimento como para a saúde humana (Codd et al. 1999; Mohamed e Shehri 2009; Máthé et al. 2013).

A contaminação da água com as MCs decorre, principalmente, do fato de que em ambientes aquáticos naturais e artificiais constantemente ocorre a formação de florações de cianobactérias (Bittencourt-Oliveira et al. 2014). Quando estas florações são compostas por espécies potencialmente produtoras de microcistinas, essas toxinas podem ser liberadas na água devido à lise celular ou liberação ativa (Cordeiro-Araújo e Bittencourt-Oliveira 2013).

De maneira geral, as microcistinas têm sido muito estudadas devido aos registros de acidentes de intoxicação e morte de seres humanos e animais silvestres e/ou domésticos, principalmente pela ingestão ou utilização de água contaminada (Jochimsen et al. 1998). Em plantas, a sua ação pode conduzir ao estresse oxidativo (Pflugmacher et al. 2007), pois induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Isso resulta em danos celulares tais como peroxidação de membranas lipídicas, o que pode ocasionar alterações na permeabilidade da membrana plasmática, genotoxicidade ou modulação de apoptose (Ding et al. 2000).

Outro importante aspecto da ação de cianotoxinas em plantas diz respeito às propriedades da membrana plasmática (MP). De acordo com Wang et al. (2011), as propriedades elétricas da MP desempenham papéis fundamentais na distribuição de íons na superfície exterior de MPs e no transporte desses através de membranas. Dessa forma, no presente estudo a avaliação da condutividade elétrica da MP de plantas poderia indicar as alterações nas atividades iônicas diante de um agente xenobiótico como os presentes em irrigação com água contaminada por extratos brutos de cianobactérias. Já é conhecido que as MCs têm o potencial de causar peroxidação lipídica e proteica em plântulas da agricultura (Peuthert et al. 2007). Esse potencial poderia ocasionar uma ligação entre a composição da MP e a sua permeabilidade e isso poderia ser investigado através da análise da condutividade elétrica. Para tanto, a variação na permeabilidade da MP poderia ser utilizada como um importante marcador para efeitos de contaminação por cianotoxinas e outros compostos produzidos por cianobactérias em hortaliças, sendo um método fácil, rápido e econômico de

análise. No entanto, até o momento nenhum estudo investigou o efeito de MC ou extratos brutos de cianobactérias não tóxicas sobre a permeabilidade da membrana plasmática de plantas utilizadas na agricultura em estágio adulto de desenvolvimento.

Embora o contato natural com as microcistinas seja raro em plantas terrestres, o processo de irrigação com água contaminada com estas toxinas pode causar diversos efeitos, tanto no desenvolvimento da planta, conteúdo de clorofila e queda nos níveis de produção como o acúmulo nos tecidos foliares (Wiegand et al. 2002; Xue et al. 2010; El Khalloufi et al. 2012; Hereman e Bittencourt-Oliveira 2012). Além disso, tem sido demonstrado que as MCs afetam os sistemas de defesa antioxidativos, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), peroxidase (POD) entre outras (Babica et al. 2006). Dentre estas, a POD é uma das principais enzimas oxidantes de xenobióticos em plantas com um amplo espectro de especificidade para o substrato, potencialmente considerada como uma medida de estresse mais sensível que a própria avaliação do crescimento (Mitrovic et al. 2005).

Todavia, cianobactérias produzem diversos outros compostos bioativos além de cianotoxinas (Kehr et al. 2011; Engene et al. 2012; Leão et al. 2012) e seus efeitos em plantas terrestres ainda são pouco conhecidos. Os extratos brutos de cianobactérias, mesmo daquelas não produtoras de cianotoxinas, podem provocar efeitos tóxicos em outros organismos, como exemplo os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular das cianobactérias (Sivonen e Jones 1999; Carillo et al. 2014). Assim, experimentos em laboratório a partir da utilização de extratos brutos de cianobactérias, no qual não se utiliza apenas a toxina purificada, podem representar o que realmente ocorre na natureza e quais os possíveis efeitos, caso entrem em contato com as plantas através da irrigação com água contaminada.

Hortaliças fazem parte diariamente da dieta humana e podem representar uma importante e ainda desconhecida fonte de contaminação alimentar se expostas à cianotoxinas. A alface (*Lactuca sativa* L.), família Asteraceae, e a rúcula (*Eruca sativa* Mill.) família Brassicaceae, representam bons exemplos de hortaliças de amplo consumo em todo o mundo. Do nosso conhecimento, não existem estudos abordando os efeitos tóxicos sobre estes dois vegetais na fase adulta de desenvolvimento após irrigação com água contaminada por extratos brutos de cianobactérias não produtoras de cianotoxinas.

Dessa forma, este estudo testa a hipótese de que a irrigação com água contaminada com extratos brutos de cianobactérias produtoras e não produtoras de microcistinas causam toxicidade em hortaliças. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de extratos brutos de cianobactérias produtoras e não produtoras de microcistinas em alface e rúcula, em relação à permeabilidade da membrana plasmática e ao estresse oxidativo através da análise da atividade da enzima peroxidase (POD).

Material e Métodos

Linhas e condições de cultivo

Foram utilizadas linhagens de *Microcystis aeruginosa*, BCCUSP232 produtora de microcistinas LR e RR (MC+) (Hereman e Bittencourt-Oliveira 2012) e BCCUSP03 não produtora (MC-) (Bittencourt-Oliveira 2003) pertencentes ao “Brazilian Cyanobacteria Collection of the University of São Paulo”. As linhagens foram cultivadas em meio ASM-1, pH 7.4 (Gorham et al. 1964) sob condições controladas de luz ($30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotômetro LICOR, mod. LI-250, sensor esférico subaquático), fotoperíodo (14:10 h claro:escuro) e temperatura ($22 \pm 1.0^\circ\text{C}$).

Quantificação das microcistinas e obtenção dos extratos brutos

As biomassas resultantes (extratos brutos) das culturas de ambas as linhagens foram centrifugadas, congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas e acondicionadas em freezer a -80°C até o momento da sua utilização. A quantificação de microcistinas presentes na linhagem BCCUSP232 foi realizada utilizando processo de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de acordo com Bittencourt-Oliveira et al. (2005). As biomassas liofilizadas foram eluídas em água deionizada e ultrassonicadas (Microson Ultrasonic Cell Disruptor, Misonix, USA) em banho de gelo por 5 min (15W and 22.5 kHz) para o total rompimento das células, o qual foi confirmado em microscópio óptico.

Concentrações de MC totais presentes no extratos brutos da linhagem BCCUSP232 (MC+), foram utilizadas para irrigação nas folhas de alface (0,6; 2,5; 6,2 e 12,5 μg de MC totais por litro) e rúcula (0,5; 2,0; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC totais por litro) e controle (irrigação com água sem MCs). Para a linhagem BCCUSP03 (MC-), biomassas correspondentes à linhagem produtora de microcistina foram utilizadas na irrigação.

Desenho experimental

Plantas de alface (Vanda cultivar) e rúcula (Folha larga cultivar) com 30 e 20 dias de cultivo, respectivamente, foram transplantadas para vasos com substrato vermiculita (Basaplant, Brasil) e mantidas em casa de vegetação. Após esta etapa as plantas foram irrigadas com água destilada e solução nutritiva durante 10 dias (427 mg L^{-1} de MgSO_4 , 478 mg L^{-1} $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 134 mg.L^{-1} de KNO_3), antes de serem expostas às diferentes soluções de irrigação contendo MC totais, como descrito anteriormente. Cada planta foi irrigada com 100 mL de solução sobre as folhas por 15 dias consecutivos, volume suficiente para manter o substrato permanentemente úmido. Foram utilizadas três plantas para cada tratamento e

controle ($n = 3$). Não foi aplicado qualquer tipo de defensivo agrícola durante todo o ciclo de desenvolvimento das culturas.

Um dia após o término da aplicação das soluções contendo os extratos MC+ e MC-, as plantas foram coletadas, as folhas foram lavadas com água destilada e discos foliares de 1 cm de diâmetro foram cortados de folhas médias de cada planta, em cada tratamento, pesados em balança de precisão e submetidos à extração de clorofila e análise de permeabilidade seletiva da membrana plasmática. Para a análise da POD, além das folhas também foram utilizadas as raízes.

Análises de POD, permeabilidade seletiva da membrana plasmática e conteúdo de clorofila de alface e rúcula

Para a avaliação de estresse oxidativo foi realizada a análise da atividade da enzima peroxidase (POD), para a qual utilizou-se 300 mg de massa fresca de folhas e raízes de alface e rúcula, provenientes do bioensaio de crescimento, previamente congeladas em nitrogênio líquido. A extração da POD foi realizada macerando-se em almofariz com nitrogênio líquido e acrescentados 5 mL de tampão fosfato a 0,2 M (pH 6,8) e polivinilpirolidona (PVP), sendo o procedimento realizado em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 4°C, 12.000 g por 10 min, utilizando-se o sobrenadante como extrato enzimático para quantificação. A metodologia utilizada para a determinação da POD foi adaptada de Lima (1994). Para tanto, foram elaboradas duas soluções: A e B. Para preparo da Solução A, 2,2 mL de H₂O₂ (35%) foram diluídos com água destilada até volume de 10 mL, sendo retirado desta solução 0,5 mL e o volume completado com tampão fosfato (0,2 M) até 50 mL. A Solução B foi preparada diluindo-se 83,3 mg de aminoantipirina em 10 mL de água destilada e 163 mg de fenol diluídos em 70 mL de água destilada, em seguida misturou-se os dois reagentes e o volume foi completado para 100 mL com água destilada. A quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando o comprimento de onda de 505 nm. Em tubos de ensaio foram colocados 1,0 mL do extrato enzimático, 0,5 mL da solução A e 0,5 mL da solução B. As amostras permaneceram em banho-maria a 30°C durante 5 min, após este período, a reação foi encerrada adicionando 2 mL de álcool etílico absoluto. Os resultados foram expressos em $\mu\text{Moles de H}_2\text{O}_2 \text{ decomposto} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de massa fresca.

A análise da permeabilidade seletiva da membrana plasmática de alface e rúcula foi realizada através da análise da condutividade elétrica da membrana plasmática de folhas de plantas adultas com auxílio de um condutivímetro (HI 9043, Hanna Instruments) em solução de sacarose 0,2 M. Para tanto, quinze discos foliares dos diferentes tratamentos foram

emmersos em béqueres contendo 20 mL da solução, sendo as leituras de condutividade realizadas em duplicata a cada 30 min durante as primeiras 3 horas e na 24^a hora para todas as amostras.

A concentração das clorofilas totais foi obtida após a extração em penumbra a 20°C por 48 h com MeOH 100% e determinação espectrofotométrica das absorbâncias a 662 nm (clorofila *a*) e 645 nm (clorofila *b*). Os teores de clorofila *a* + *b* foram calculados segundo Lichtenthaler (1987) e expressos em µg de pigmento por grama de massa fresca (µg.g⁻¹).

Análise dos dados

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (one-way ANOVA) com comparação de médias por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro utilizando o programa SAS (SPSS version 9.0). Nos ensaios com resultados significativos, utilizou-se o teste de Dunnett para verificar quais tratamentos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Resultados

Atividade da enzima peroxidase em folhas e raízes de alface e rúcula

Observaram-se variações quanto aos efeitos dos extratos tóxicos aplicados em alface e rúcula. A rúcula demonstrou maior sensibilidade à irrigação com os extratos brutos de cianobactérias tanto em folhas quanto em raízes indicando diferenças entre as rotas de desintoxicação das duas hortaliças (Fig. 1). Entretanto, de maneira geral tanto os extratos brutos com microcistinas (MC+) quanto os sem microcistinas (MC-) apresentaram efeitos fitotóxicos sobre a alface e a rúcula.

Em alface, a atividade da POD foi maior nas folhas (Fig. 1a) que nas raízes (Fig. 1b). Nas folhas, em geral, ocorreu maior atividade da POD quando utilizado o extrato MC+. Já nas raízes, a maior atividade da POD foi observada quando utilizados os extratos MC-. Contudo, embora não tenha havido diferença estatística significativa, a atividade da POD tanto nas plantas irrigadas com os extratos MC+ quanto MC- foi menor que a atividade obtida nas plantas controle.

Por outro lado, na rúcula a atividade da POD após tratamento com os extratos com e sem MC totais nas raízes (Fig. 1c) foi quase 100 vezes maior que o observado nas folhas (Fig. 1d). Os valores da atividade da POD encontrados nos tratamentos com MC+ foram maiores que os encontrados no controle e, com exceção de alguns tratamentos (2 µg.L⁻¹ nas raízes e 10 µg.L⁻¹ nas folhas), foram maiores também em relação aos extratos MC-.

Permeabilidade seletiva da membrana plasmática de folhas de alface e rúcula

A análise da permeabilidade seletiva da membrana plasmática mostrou que, em folhas de alface, houve influência do tempo e da concentração aplicada de extratos no aumento da perda de eletrólitos para o meio (Fig. 2a). Embora tenha ocorrido diferença estatística significativa apenas em comparação com a média do controle pelo teste de Dunnett, este apresentou valores de condutividade elétrica menores que todos os tratamentos com MC+ e MC-. De maneira semelhante, em rúcula todos os tratamentos com MC+ e MC- influenciaram na permeabilidade das folhas, uma vez que os valores de condutividade elétrica foram maiores que os observados no controle (Fig. 2b). Todavia, o tratamento de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MC+) foi o único que apresentou diferença estatística significativa na permeabilidade de folhas de rúcula. Os valores de condutividade elétrica da membrana plasmática encontrados foram até 8 vezes maiores do que em alface (Fig. 2).

Teor de clorofila nas folhas de alface e rúcula

Os extratos brutos de *M. aeruginosa* (MC+ e MC-) não apresentaram interferência no teor de clorofila de rúcula e alface utilizadas neste estudo (Fig. 3a-b). Nenhuma média dos tratamentos utilizando extratos brutos MC+ e MC- apresentou diferenças estatísticas significativas.

Na alface, houve uma pequena variação quanto ao conteúdo de clorofila nas folhas em relação ao extrato utilizado (Fig. 3a), nos quais os extratos MC+ estimularam os maiores valores de clorofila após irrigação com concentrações de 0,62 e 6,23 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e com os extratos de MC- nas concentrações de 2,5 e 12,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Na rúcula, em todos os tratamentos houve maior influência dos extratos MC-.

Discussão

A exposição de plantas às microcistinas tem demonstrado que os efeitos causados por estas toxinas podem variar significativamente tanto de acordo com a variante estrutural utilizada (McElhiney et al. 2001) quanto às doses utilizadas nos tratamentos (Crush et al. 2008; Hereman e Bittencourt-Oliveira 2012). No presente estudo, os extratos brutos utilizados para a irrigação da alface possuíam em média uma concentração de MC totais 20% maior que os utilizados na rúcula. Nesse sentido, esperava-se que os efeitos fossem potencializados na alface, contudo isso não ocorreu.

Na rúcula, a maior atividade da POD nas raízes, em relação às folhas e o aumento da atividade de ambos os tecidos em relação ao controle ocorreu quando utilizado o extrato bruto MC+. Isso pode ser um indício de que a raiz foi o local onde houve maior retenção de

microcistinas. A variação na atividade da POD nas raízes e folhas de rúcula em relação ao controle demonstraram claramente que os extratos brutos MC+ e MC- apresentaram efeitos fitotóxicos sobre este vegetal, possivelmente induzindo ao estresse oxidativo. A promoção de estresse oxidativo em plantas causada pela exposição à extratos brutos contendo MC-LR já foi demonstrada por Pflugmacher et al. (2007). Os autores observaram que em sete variedades de espinafre (*Spinacia oleracea* L.) houve elevação da POD após 6 semanas de exposição. No presente estudo, a alface e a rúcula foram expostas durante 15 dias aos extratos brutos de cianobactérias contendo MC totais, bem como extratos brutos sem MCs. O estresse oxidativo observado através do aumento da atividade da POD foi evidenciado na rúcula, isso indica que a atividade da enzima potencializou o combate ao efeito de produtos de ROS na planta produzidos na presença dos extratos brutos de cianobactéria (Mitrovic et al. 2005; Pflugmacher et al. 2007).

A redução da atividade da POD em ambos os tecidos da alface nos tratamentos com MCs em relação ao controle pode indicar que o contato com extratos brutos MC+ permitiu maior retenção das MCs e, possivelmente outros compostos presentes nos extratos. Em condições controladas (cultivo *in vitro*), Chen et al. (2010) não encontraram alterações na atividade da POD em brotos de maçã em concentrações de 30 e 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs, demonstrando que os efeitos sobre a atividade da POD também variaram de acordo com a espécie e as formas de exposição. Contudo, o porquê da diminuição da POD em relação ao controle na alface pode estar relacionado a outras rotas de desintoxicação da planta. Estes resultados conflitantes podem significar que a rúcula apresentou um sistema de desintoxicação para a microcistina e outros compostos produzidos por cianobactérias mais eficiente que a alface. Um indício disso foi a grande elevação da POD pela rúcula. Além disso, a redução da atividade da POD observada na alface pode implicar em inibição da atividade da enzima. Estudos têm mostrado que, na presença de agentes patogênicos ou substâncias xenobióticas (como metais pesados e toxinas) em plantas, a produção de substâncias, tais como o óxido nítrico e peróxido de hidrogênio é aumentada, o que poderia causar a inibição de enzimas importantes como POD e catalase (Clark et al. 2000; Chia et al. 2014; Qiao et al. 2014).

A membrana plasmática (MP) expressa um potencial elétrico negativo que influencia a composição de solução da sua superfície (Kopittke et al. 2011). Alterações neste potencial elétrico geralmente ocasionadas por estímulos externos podem influenciar a sua permeabilidade, pois as propriedades elétricas das MPs de plantas são parcialmente controladas pela composição iônica do meio de exposição (Wang et al. 2011). A permeabilidade da membrana plasmática de folhas de alface apresentou aumento da perda de

eletrólitos para o meio em relação ao controle indicando influência do tempo e das concentrações aplicadas, tanto para os tratamentos com MC+ como os MC-. Já a rúcula apresentou diferença principalmente no tratamento de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ MC+.

Os resultados mostraram que nestas hortaliças as MC totais, além de outros possíveis compostos presentes nos extratos brutos de cianobactérias, causaram alterações quanto à permeabilidade da membrana. Isto fica evidente quando se observa que para estas duas hortaliças os controles apresentaram valores de condutividade elétrica sempre menores que os tratamentos com e sem microcistinas. Porém, na maioria dos casos, os valores mais significativos ocorreram em relação aos extratos brutos MC+ mostrando a influência decisiva das microcistinas sobre este parâmetro nas hortaliças. Substâncias tóxicas produzidas por cianobactérias podem causar alterações na membrana lipídica de plantas. Em plântulas de alface, já foi comprovada a ação fitotóxica de um hexapeptídeo (“hapalocyclamide”) isolado da cianobactéria *Hapalosiphon* sp. (Koodkaew et al. 2012). Foram encontrados efeitos sobre diversos processos fisiológicos tais como a superprodução de ROS e indução de peroxidação lipídica em ambas raízes e parte aérea. De acordo com os autores, a ação primária do composto suprimiu o crescimento de alface e induziu maior dano oxidativo nos lipídios da membrana.

A exposição às microcistinas causam estresse às plantas e as ROS produzidas atacam a parte lipídica da membrana celular conduzindo à peroxidação lipídica seguida por danos na membrana (Apel e Hirt 2004). De acordo com Chen et al. (2012), a MC-LR induziu o aumento da formação da ROS intracelular em raízes de arroz. Em nosso estudo, as grandes alterações na permeabilidade da membrana em alface e rúcula forneceram indícios desse estresse nas folhas das hortaliças possivelmente relacionada à formação das ROS. Em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), a exposição a MC-RR por 5 dias (60 mg.mL^{-1}) mostrou um mecanismo de indução de apoptose em células dessa planta, envolvendo não só o excesso de geração de ROS e estresse oxidativo, como também a abertura dos poros de transição de permeabilidade específica, que pode induzir à perda do potencial de membrana mitocondrial (Huang et al. 2008).

Tem sido demonstrado que as MCs podem afetar não somente a quantidade de clorofilas (Pflugmacher 2002; Wiegand et al. 2002), mas também o fotossistema II de plantas expostas (Saqrane et al. 2009). Em outro estudo, observou-se redução no conteúdo de clorofila em cultura de tecidos de *Solanum tuberosum* L. expostas por 16 dias à concentrações de MCs semelhantes às utilizadas nesta pesquisa (5 a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR) (McElhiney et al. 2001). No presente estudo, para as plantas de rúcula e alface não foram encontradas alterações no conteúdo da clorofila presente nas folhas. Dessa forma, as moléculas de clorofila

demonstraram-se estáveis, não variando em presença de extratos brutos (MC+ e MC-) de cianobactérias. Esse fato pode ser preocupante, pois em caso de contaminação de culturas de alface e rúcula após irrigação com cianotoxinas ou outros metabólitos possivelmente tóxicos presentes em cianobactérias, essa contaminação não seria perceptível como em casos de doenças e pragas. Nossos resultados coincidem com os encontrados por Järvenpää et al. (2007) que também não encontraram alterações nos valores para o teor de clorofila em experimento com brócolis em concentrações de 0,1 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de quatro variantes de MCs, incluindo MC-LR (33%) e MC-RR (25%).

Conclusão

De modo geral, tanto os extratos brutos de cianobactérias produtoras de microcistinas quanto os de não produtoras apresentaram algum efeito de toxicidade sobre alface e rúcula. Esse fato representa um problema adicional quanto à produção de vegetais da agricultura, uma vez que não apenas as MCs podem ser danosas como outro extrato de cianobactéria não produtora destas substâncias. Há potencial risco de queda na produção e contaminação de hortaliças caso não haja um controle sobre a qualidade da água utilizada na irrigação de culturas de plantas.

Agradecimentos

À FAPESP (Processos 2014/01934-0; 2013/11306-3), CNPq (Proc. 470198/2011-7) e FACEPE (Proc. AMD-0186-2.00/13) pelo apoio financeiro e à CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Lista de figuras

Fig 1. Atividade da enzima peroxidase em folhas (a) e em raiz (b) de plantas de alface e em folhas (c) e em raiz (d) de plantas de rúcula. (■). Controle; (■). Extrato bruto com microcistina; (□). Extrato bruto sem microcistina; (**). Diferença significativa entre as médias no teste Tukey; (*). Diferença significativa em comparação das médias com o controle pelo teste Dunnett. As barras de erro representam o erro padrão ($n = 3$).

Fig 2. Permeabilidade seletiva da membrana plasmática de folhas oriundas do bioensaio de crescimento de plantas de alface (a) e rúcula (b). (C). Controle; (TOX). Extrato bruto com microcistina; (NT). Extrato bruto sem microcistina. Valores representam a média de leituras de discos foliares provenientes de três plantas ($n = 3$).

Fig 3. Teor de clorofila em (a) folhas de alface e (b) folhas de rúcula. (■). Controle; (■): Extrato bruto com MC totais; (□). Extrato bruto sem MC. Barras de erro representam o desvio padrão ($n=3$).

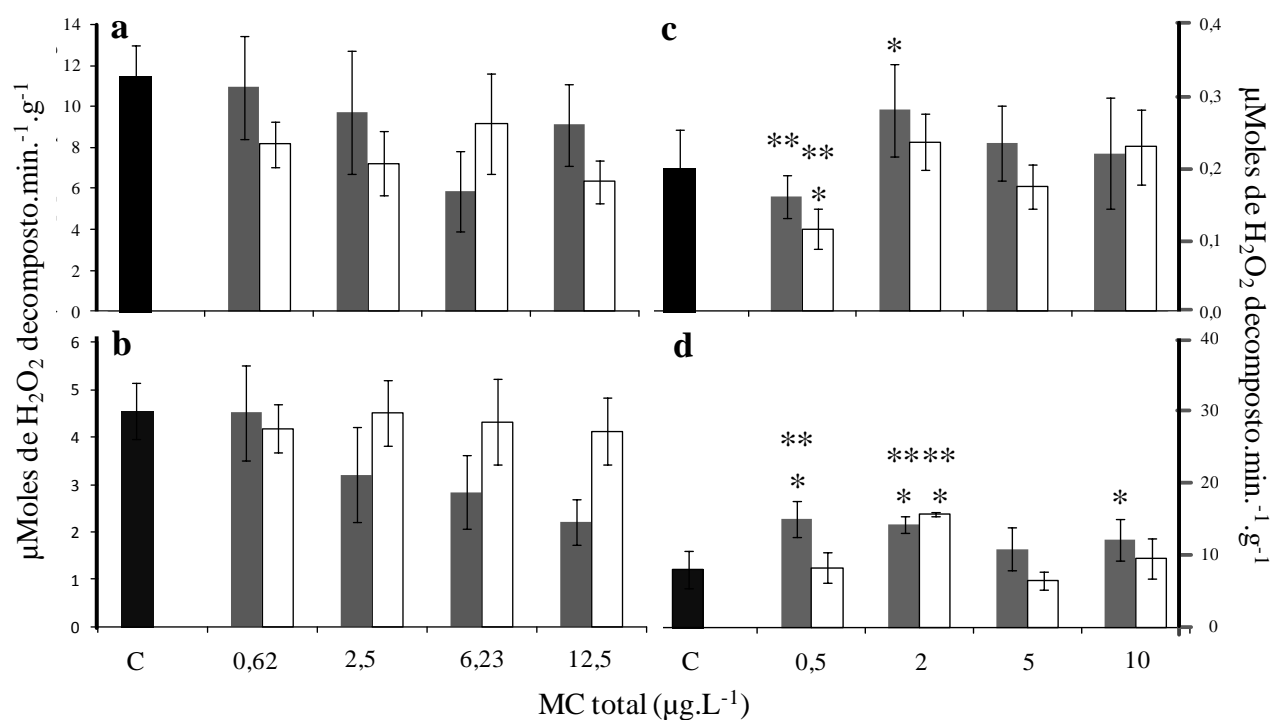


Fig 1. Atividade da enzima peroxidase em folhas (a) e em raiz (b) de plantas de alfafa e em folhas (c) e em raiz (d) de plantas de rúcula. (■) Controle; (■) Extrato bruto com microcistina; (□) Extrato bruto sem microcistina; (**) Diferença significativa entre as médias no teste Tukey; (*) Diferença significativa em comparação das médias com o controle pelo teste Dunnett. As barras de erro representam o erro padrão ($n = 3$).

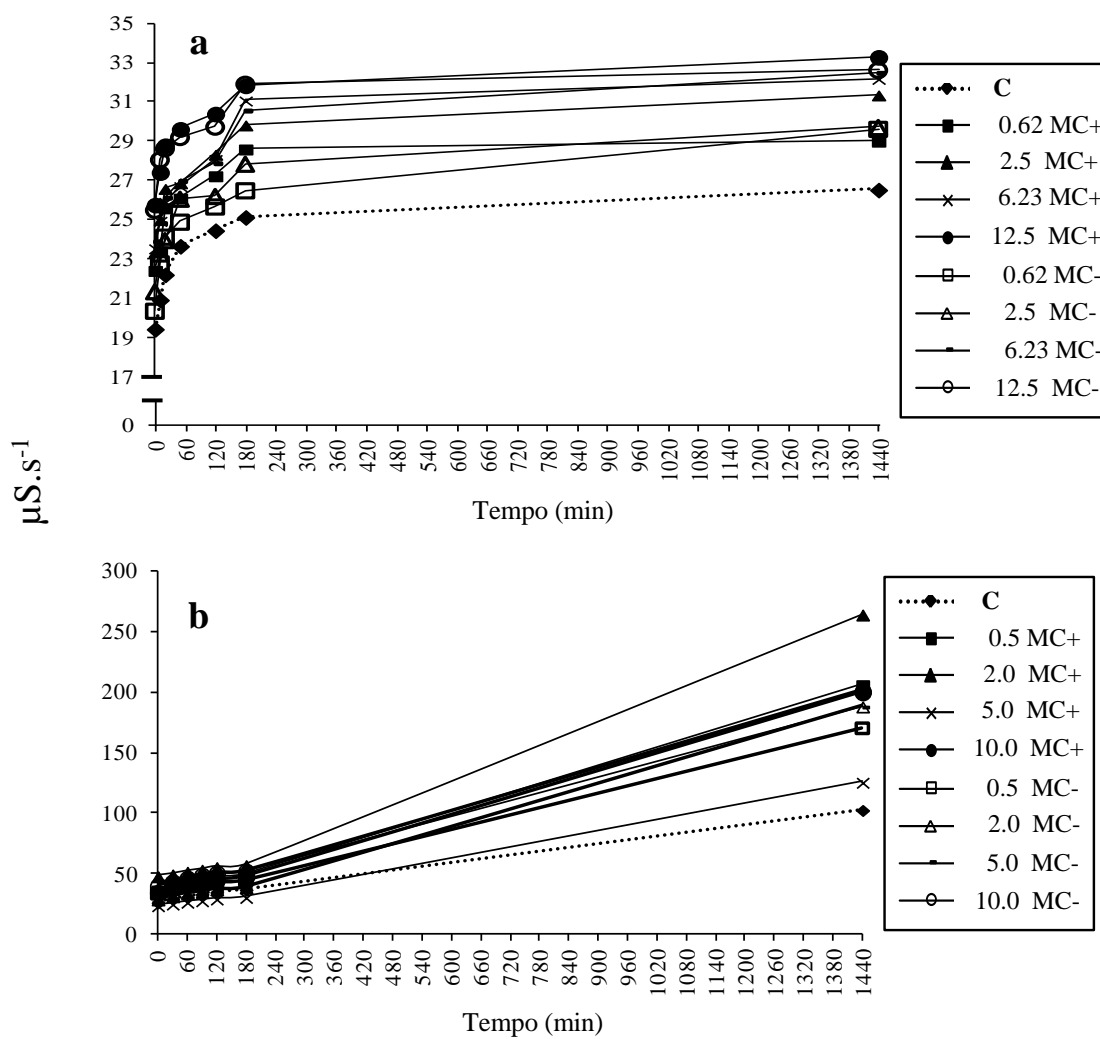


Fig 2. Permeabilidade seletiva da membrana plasmática de folhas oriundas do bioensaio de crescimento de plantas de alface (a) e rúcula (b). (C). Controle; (MC+). Extrato bruto com microcistina; (MC-). Extrato bruto sem microcistina. Valores representam a média de leituras de discos foliares provenientes de três plantas ($n = 3$).

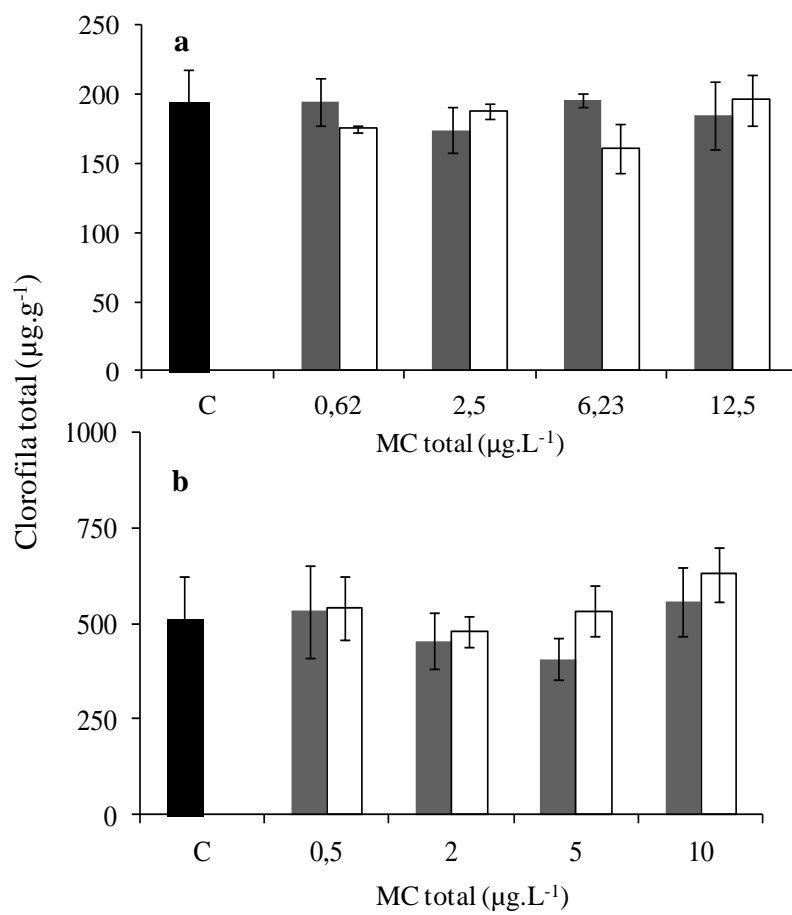


Fig 3. Teor de clorofila em (a) folhas de alface e (b) folhas de rúcula. (■). Controle; (■): Extrato bruto com MC totais; (□). Extrato bruto sem MC. Barras de erro representam o desvio padrão ($n=3$).

Referências

- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.
- Babica P, Bláha L, Marsalek B (2006) Exploring the natural role of microcystins - A review of effects on photoautotrophic organisms. *J Phycol* 42: 9-20. doi: 10.1111/j.1529-8817.2006.00176.x.
- Bittencourt-Oliveira MC (2003) Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. *Harmful Algae* 2: 51-60. doi: 10.1016/S1568-9883(03)00004-0.
- Bittencourt-Oliveira MC, Kujbida P, Cardozo KHM, Carvalho VM, Moura AN, Colepicolo P, Pinto E (2005) A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komárek et al.. *Biochem Biophys Res Commun*, 326: 687-694. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.11.091.
- Bittencourt-Oliveira MC, Piccin-Santos V, Moura AN, Aragão-Tavares, NKC, Cordeiro-Araújo MK (2014) Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *An Acad Bras Ciênc* 86: 297-309. doi: 10.1590/0001-3765201302512.
- Carillo S, Pieretti G, Bedini E, Parrilli M, Lanzetta R, Corsaro MM (2014) Structural investigation of the antagonist LPS from the cyanobacterium *Oscillatoria planktothrix* Fp1. *Carbohydr Res* 388: 73-80. doi: 10.1016/j.carres.2013.10.008.
- Chen J, Dai J, Zhang H, Wang C, Zhou G, Han Z, Liu Z (2010) Bioaccumulation of microcystin and its oxidative stress in the apple (*Malus pumila*). *Ecotoxicology* 19:796-803. doi: 10.1007/s10646-009-0456-5.
- Chen J, Han FX, Wang F, Zhang H, Shi Z (2012) Accumulation and phytotoxicity of microcystin-LR in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicol Environ Saf* 76:193-199. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.09.022.
- Chia AM, Chimdirim PK, Japhet WS (2014) Lead induced antioxidant response and phenotypic plasticity of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) de Brébisson under different nitrogen concentrations. *J Appl Phycol*. doi: 10.1007/s10811-014-0312-8.
- Clark D, Durner J, Navarre DA, Klessig DF (2000) Nitric oxide inhibition of Tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol Plant-Microb Interact* 13: 1380-1384. doi:10.1094/MPMI.2000.13.12.1380.

- Codd GA, Metcalf JS, Beattie KA (1999) Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 37:1181-1185. doi: 10.1016/S0041-0101(98)00244-X.
- Cordeiro-Araújo MK, Bittencourt-Oliveira MC (2013) Active release of microcystins controlled by an endogenous rhythm in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Phycol Res* 61: 1-6. doi: 10.1111/j.1440-1835.2012.00663.x.
- Crush JR, Briggs LR, Sprosen JM, Nichols SN (2008) Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. *Environ Toxicol* 23: 246-252. doi: 10.1002/tox.20331.
- Ding WX, Shen HM, Ong CN (2000) Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 32: 547-555. doi: 10/S0270-9139(00)07751-X.
- El Khalloufi F, El Ghazali I, Saqrane S, Oufdou K, Vasconcelos V, Oudra B (2012) Phytotoxic effects of a natural bloom extract containing microcystins on *Lycopersicon esculentum*. *Ecotoxicol Environ Saf* 79: 199-205. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.01.002.
- Engene N, Rottacker EC, Kastovsky J et al. (2012) *Moorea producens* gen. nov., sp. nov. and *Moorea bouillonii* comb. nov., tropical marine cyanobacteria rich in bioactive secondary metabolites. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 1171–1178.
- Gorham PR, McLachlan J, Hammer UT, Kim WK (1964) Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verh Internat Verein Theor Angew Limnol* 15:796-804.
- Hereman TC, Bittencourt-Oliveira MC (2012) Bioaccumulation of microcystins in lettuce. *J Phycol* 48: 1535-1537. doi: 10.1111/jpy.12006.
- Huang W, Xing W, Li D, Liu W (2008) Microcystin-RR induced apoptosis in tobacco BY-2 suspension cells is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *Toxicol in Vitro*, 22:328-337. doi: 10.1016/j.tiv.2007.09.018.
- Järvenpää S, Lundberg-Niinistö C, Spoof L, Sjövall O, Tyystjärvi E, Meriluoto J (2007) Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography–mass spectrometry. *Toxicon* 49: 865-874. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.12.008.
- Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, Cardo D, Cookson ST, Holmes CEM, Antunes, MBC, MELO-FILHO DA, Lyra TM, Barreto V, Azevedo SMFO, Jarvis WR (1998) Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *New Engl J Med* 36:873-878. doi: 10.1056/NEJM199803263381304.

- Kehr J-C, Picch DG, Dittmann E (2011) Natural product biosyntheses in cyanobacteria: A treasure trove of unique enzymes. *Beilstein J Org Chem* 7: 1622-1635. doi: 10.3762/bjoc.7.191.
- Koodkaew I, Yukari S, Matsuyama S, Matsumoto H (2012) Phytotoxic action mechanism of hapalocyclamide in lettuce seedlings. *Plant Physiol Biochem* 58: 23-28. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.06.002.
- Kopittke PM, Blamey FPC, Wang P, Menzies NW (2011) Calculated activity of Mn²⁺ at the outer surface of the root cell plasma membrane governs Mn nutrition of cowpea seedlings. *J Exp Bot* 62: 3993-4001. doi:10.1093/jxb/err097.
- Leão PN, Ramos V, Vale M, Machado JP, Vasconcelos VM (2012) Microbial community changes elicited by exposure to cyanobacterial allelochemicals. *Microb Ecol* 63: 85-95. doi: 10.1007/s00248-011-9939-z.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer L, Douce R (EDs). *Methods in Enzymology*. Academic Press, London, UK, pp.350-381.
- Lima GPP (1994) Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas e atividade da peroxidase e redutase do nitrito em calos de arroz (*Oriza sativa* L. cv. IAA 4440). Tese Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu.
- Luan S (2003) Protein phosphatases in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54:63-92. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134743.
- Mackintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 264:187-192. doi: 10.1016/0014-5793(90)80245-E.
- Máthé C, M-Hamvas M, Vasas G (2013) Microcystin-LR and cylindrospermopsin induced alterations in chromatin organization of plant cells. *Mar Drugs* 11:3689-3717. doi:10.3390/md11103689.
- McElhiney J, Lawton LA, Leifert C (2001) Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon* 39: 1411-1420. doi: 10.1016/S0041-0101(01)00100-3.
- Mitrovic SM, Allis O, Furey A, James KJ (2005) Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicol Environ Saf* 61: 345-352. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.11.003.

- Mohamed ZA, Shehri AMA (2009) Microcystins in groundwater wells and their accumulation in vegetable plants irrigated with contaminated waters in Saudi Arabia. *J Hazard Mater* 172:310-315. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.010.
- Peuthert A, Chakrabarti S, Pflugmacher S (2007) Uptake of Microcystins-LR and -LF (Cyanobacterial Toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). *Environ Toxicol* 22:436-442. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02144.x.
- Pflugmacher S (2002) Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environ Toxicol* 17:407-413. doi: 10.1002/tox.10071.
- Pflugmacher S, Aulhorn M, Grimm B (2007) Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants. *New Phytol* 175: 482-489. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02144.x.
- Qiao W, Li C, Fan LM (2014) Cross-talk between nitric oxide and hydrogen peroxide in plant responses to abiotic stresses. *Environ Exp Bot* 100: 84-93. doi: 10.1016/j.envexpbot.2013.12.014.
- Saqrane S, Ouahid Y, Ghazali Y, Oudra B, Bouarab L, Campo FF (2009) Physiological changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* cultivars, caused by irrigation with water contaminated with microcystins: A laboratory experimental approach. *Toxicon* 53:786-796. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.01.028.
- Sivonen K, Jones G (1999) Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J (EDs.). *Toxic cyanobacteria in water: A guide to the Public Health Consequences, Monitoring and Management*. J.E and FN Spon, London, pp. 41-111.
- Smith RD, Walker, JC (1996) Plant protein phosphatases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:101-25. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.101.
- Wang P, Kinraide TB, Zhou D, Kopittke PM, Peijnenburg WJGM (2011) Plasma membrane surface potential: dual effects upon ion uptake and toxicity. *Plant Physiol* 155: 808-820. doi: 10.1104/pp.110.165985
- Wiegand C, Peuthert S, Pflugmacher S, Carmeli S (2002) Effect of microcin SF608 and microcystin-LR, two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms. *Environ Toxicol* 17: 400-406. doi: 10.1002/tox.10065.
- Xue Y, Li Y, Yi N, Li H, Shi Z (2010) Investigations into the Effects of microcystin-LR on the growth and antioxidant enzymes in Chinese cabbage and rape. *IEEE* 978: 4244-4713. doi: 10.1109/ICBBE.2010.5516409.

Manuscrito II: Submetido à revista:



**Efeitos fotossintéticos, resposta antioxidativa e bioacumulação de congêneres de
microcistina em alface irrigada com água contaminada**

Micheline Kézia Cordeiro-Araújo^{1,2}, Mathias Ahii Chia², João Dias de Toledo Arruda-Neto^{3,4},
Ênio Tiago de Oliveira², Flávio dos Santos², Renato José Reis Molica⁵, Maria do Carmo
Bittencourt-Oliveira^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R.
Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-030, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, São Dimas, CEP 13418-900, Piracicaba, SP,
Brasil.

³Instituto de Física, Universidade de São Paulo, Rua do Matão Travessa R Nr.187, CEP
05508-090 Cidade Universitária, SP, Brasil.

⁴CEPESq/Unifitalo – Italy-Brazilian University Center, Avenida João Dias, 2046, CEP
04724-003, São Paulo, SP, Brasil.

⁵Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Av. Bom
Pastor, s/n, Boa Vista, CEP: 55292-270, Garanhuns, PE, Brasil.

*Autor para correspondência: mbitt@usp.br

Resumo

A utilização de água contaminada com microcistinas (MCs) para a irrigação de plantas da agricultura representa risco para a saúde humana devido ao seu potencial de bioacumulação. Além disso, MCs podem causar efeitos danosos aos vegetais através de alterações fotossintéticas e estresse oxidativo. O objetivo desse estudo foi determinar os efeitos de extratos de cianobactérias, contendo diferentes congêneres de MCs, sobre os parâmetros fotossintéticos e resposta antioxidativa de alface, bem como a sua bioacumulação nesta planta após a irrigação com água contaminada. Cultivos de alface foram irrigados durante 15 dias com água contaminada com extratos brutos de cianobactéria (*Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, linhagem BBCUSP232) contendo MC-LR (0,0; 0,5; 2,0; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), MC-RR (0,0; 0,15; 0,5; 1,5 e 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e MCs totais (0,0; 0,65; 2,5; 6,5 e 13,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Alterações na taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração do tecido foliar e concentração interna de CO_2 foram registradas em alface expostas a diferentes concentrações de MCs. A resposta antioxidante mostrou que a atividade da glutathione S-transferase foi infra-regulada pela presença das MCs. Por outro lado, as atividades da superóxido dismutase, catalase e peroxidase foram reguladas de acordo com o aumento das concentrações de MCs. O fator de bioacumulação das MCs totais e MC-LR foi maior em 6,50 e 5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, enquanto que para a MC-RR, o maior BCF foi encontrado na concentração de 1,50 $\mu\text{g L}^{-1}$. A quantidade total de MCs, MC-LR e MC-RR bioacumuladas em alface foi maior nas concentrações de exposição mais elevadas. No entanto, sob a exposição à concentração mais baixa, não existiram níveis detectáveis de MC-LR, MC-RR e MCs no vegetal. A bioacumulação de MCs em alface variou de acordo com a concentração aplicada. Além disso, a extensão da resposta fisiológica de alface às toxinas depende das concentrações de exposição.

Palavras-chave: Contaminação alimentar, Estresse oxidativo, Fotossíntese, Microcistinas, Saúde humana.

1. Introdução

As mudanças simultâneas nas condições climáticas globais e crescentes pressões antropogênicas sobre os ecossistemas aquáticos estão alterando a composição desses ecossistemas e favorecendo o aumento na ocorrência de florações de cianobactérias (Houghton et al., 2001; IPCC, 2007; Paerl e Huisman, 2008). Dependendo da composição das florações de cianobactérias, sua capacidade de produzir substâncias bioativas, tais como microcistinas, cilindrospermopsina, anatoxinas e saxitoxinas podem afetar negativamente a vida animal e vegetal nos ecossistemas aquáticos (Kozdęba et al., 2014). Além de causar estresse oxidativo em plantas (Cordeiro-Araújo et al., 2015; Pflugmacher et al., 2007; Saqrane et al., 2007), microcistinas (MCs) induzem alterações no desenvolvimento (Mathé et al., 2007; Pflugmacher et al., 2007), taxa fotossintética (Abe et al., 1996; Weiss et al., 2000) e permeabilidade da membrana plasmática (Cordeiro-Araújo et al., 2015).

Embora o contato direto das MCs com plantas terrestres seja raro, a irrigação com água contaminada aumenta a possibilidade disso acontecer. Após exposição às MCs, as plantas produzem quantidades mais elevadas de espécies reativas de oxigênio (ROS) do que sob condições normais de crescimento, o que pode resultar em danos oxidativos às suas células (Peuthert et al., 2007; Pflugmacher et al., 2007). Evolutivamente, as plantas são equipadas com sólidos sistemas de defesa antioxidante que compreendem enzimas, tais como a glutatona S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalase (CAT) que combatem e previnem os efeitos prejudiciais associados à produção elevada de ROS (Babica et al., 2006; Cordeiro-Araújo et al., 2015; Romero-Oliva et al., 2015).

Florações de cianobactérias representam riscos para a saúde humana e animal, devido à sua capacidade de produção de toxinas e liberação na água (Bittencourt-Oliveira et al., 2014; Carmichael et al., 1997; Cordeiro-Araújo e Bittencourt-Oliveira, 2013). Por exemplo, mortes de seres humanos foram relatadas após diálise de pacientes com água contaminada com microcistinas e cilindrospermopsina no Brasil (Carmichael et al., 2001; Jochinsem et al., 1998). A avaliação de riscos e a caracterização em relação à saúde humana exigem a identificação das vias comuns de exposição, entre as quais o consumo de alimentos contaminados já foi reconhecido como tal (Cox et al., 2003; Hereman e Bittencourt-Oliveira, 2012; Murch et al., 2004).

Uma prática agrícola comum envolve o uso de reservatórios de abastecimento público, rios e lagoas para a irrigação de plantas da agricultura diretamente da fonte de abastecimento, sem tratamento. Entretanto, estas fontes de água superficiais muitas vezes estão contaminadas com cianobactérias e cianotoxinas, que podem bioacumular nos tecidos das plantas (Codd et al., 1999; Crush et al., 2008; Mohamed e Al Shehri, 2009). Isso torna o consumo de culturas

de plantas irrigadas com água contaminada uma via potencialmente perigosa de exposição humana às cianotoxinas, incluindo as microcistinas (Crush et al., 2008; Hereman e Bittencourt-Oliveira, 2012). Como resultado do potencial de bioacumulação de MCs em plantas da agricultura, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que o consumo total diário (TDI) de MC-LR para os seres humanos não deve exceder 0,04 µg por quilograma de peso corporal (WHO, 2011). No entanto, evidências recentes demonstraram que valores acima do limite recomendado de TDI podem ser encontrados em culturas expostas às MCs sob diferentes concentrações ambientalmente relevantes (Crush et al., 2008; Hereman e Bittencourt-Oliveira, 2012).

Até o momento, mais de 80 variantes de MCs já foram identificadas, no entanto, a bioacumulação destes congêneres tem sido pouco investigada. Romero-Oliva et al. (2014) revelaram que a bioacumulação de diferentes variantes de MCs e MC total pode variar em algumas macrófitas aquáticas. Em condições naturais, a água utilizada para a irrigação pode conter vários congêneres de MCs, além de outras cianotoxinas (Corbel et al., 2014; El Khalloufi et al., 2012; Pflugmacher et al., 2007). Além disso, resultados de laboratório mostram que linhagens/espécies de cianobactérias podem produzir mais de uma variante de MCs (Bittencourt-Oliveira, 2003; Puddick et al., 2014).

Isso implica que as culturas de plantas irrigados com cianotoxinas presentes em água contaminada com cianobactérias podem ser expostas a mais de um congêneres de MCs por vez. No entanto, a absorção simultânea e a bioacumulação destes congêneres em vegetais e outras plantas utilizadas na agricultura ainda precisam ser extensivamente estudadas. Isso limita a compreensão das possíveis interações, antagônicas, sinérgicas e/ou aditivas que podem ocorrer entre as toxinas de cianobactérias e seus congêneres em plantas superiores. Portanto, os objetivos do presente estudo foram determinar os efeitos de extratos de cianobactérias contendo diferentes congêneres de MCs sobre os parâmetros fotossintéticos e resposta antioxidativa de alface, bem como a sua bioacumulação nesta planta após a irrigação com água contaminada.

2. Material e Métodos

2.1. Planta utilizada

Para os experimentos foi utilizada a alface (*Lactuca sativa* L.; Vanda cultivar) como planta alvo durante o período de colheita considerado próprio para o consumo humano que é de 50 a 70 dias (Embrapa, 2010). Foram utilizadas mudas comercializadas por produtor local (IBS MUDAS, Rod. Piracicaba-Rio Claro, KM 20). Seis mudas de alface foram retiradas

aleatoriamente e analisadas antes do início do experimento, quanto à presença de microcistinas e todos os testes foram negativos.

2.2. Linhagem de cianobactéria e condições de cultivo

Para a obtenção de extratos brutos de cianobactéria foi utilizada a linhagem de *Microcystis aeruginosa*, BCCUSP232 produtora de microcistinas -LR e -RR (Bittencourt-Oliveira, 2003) pertencente ao “Brazilian Cyanobacteria Collection of the University of São Paulo”. A linhagem foi cultivada em meio ASM-1, pH 7,4 (Gorham et al., 1964) sob condições controladas de luz ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotômetro LI-COR, mod. LI-250, sensor esférico subaquático), fotoperíodo (14:10 h claro:escuro) e temperatura ($22 \pm 1.0^\circ\text{C}$).

2.3. Obtenção dos extratos brutos com microcistinas e quantificação de MC-LR e MC-RR

As biomassas resultantes (extratos brutos) das culturas de *M. aeruginosa* (volume de 150 L) foram centrifugadas, congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas e acondicionadas em freezer a -80°C até o momento da sua utilização. Em tubos de vidro, as massas liofilizadas equivalentes às concentrações de MC-LR e MC-RR utilizadas foram ultrassonicadas (Microson Ultrasonic Cell Disruptor, Misonix, USA) em banho de gelo por 5 min a 15 W e 22,5 kHz para o rompimento das células (com confirmação em microscópio óptico) e liberação das microcistinas.

Para a preparação dos extratos brutos contendo MC-LR e MC-RR, a massa liofilizada e ultrassonicada de *M. aeruginosa* foi eluída em água deionizada esterilizada e obtidas as seguintes concentrações: MC-LR equivalente (0,5; 2,0; 5,0 e $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$), MC-RR equivalente (0,15; 0,5; 1,5 e $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$), MCs totais (MC-LR + MC-RR) (0,65; 2,5; 6,5 e $13,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e controle (0,0 - irrigação sem MCs). Logo após, os extratos resultantes foram congelados a -80°C até o momento da irrigação das culturas de plantas.

A quantificação de MC-LR e MC-RR presentes nos extratos brutos de *M. aeruginosa* foi determinada por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Sequência (LC-MS/MS). Para esta análise foi utilizado o sistema cromatográfico LC-MS/MS com ionização por “eletrospray” (ESI) (Agilent Technologies, Santa Clara CA, EUA), composto pela série de cromatografia líquida 1200, modelo 6420, espectrômetro de massa com triplo quadrupolo (MS/MS). A coluna cromatográfica utilizada foi uma C18 Zorbax Eclipse Plus ($3.0 \times 100 \text{ mm}$, $3.5 \mu\text{m}$, Agilent - USA). As condições de cromatografia líquida e de espectrometria de massas foram realizadas de acordo com Hall (2013).

2.4. Bioacumulação de MC-LR e MC-RR nos tecidos foliares de alface

Mudas de alface não-clonais com 10 dias de crescimento (comercializadas por IBS Mudanças Ltda, Piracicaba-SP) foram transplantadas para vasos com capacidade para 7L, contendo aproximadamente 3,5 kg de substrato para hortaliça à base de casca de *Pinus* e vermiculita (BASAPLANT). Em casa de vegetação, as mudas foram irrigadas com água deionizada (100 mL) durante 30 dias. Durante esse período foi aplicada solução nutritiva (Cordeiro-Araújo et al., 2015) a cada 3 dias.

Para verificar a ocorrência de bioacumulação de MC-LR e MC-RR nos tecidos foliares de alface, a partir do 31º dia após o transplante, iniciou-se a aplicação das soluções com as concentrações de microcistinas durante 15 dias. Foram utilizadas três plantas para cada concentração aplicada ($n=3$). D

Um dia após o término da aplicação das soluções contendo os extratos de cianobactérias (16º dia) as plantas foram coletadas e as folhas foram lavadas com água destilada. Discos foliares de 1 cm de diâmetro (total de 1 g) foram cortados de folhas médias de cada planta, para cada tratamento, pesados em balança de precisão e acondicionadas em freezer -80°C até o momento das análises de microcistinas.

2.5. Trocas gasosas: Taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E) e concentração intercelular de CO_2 (C_i)

A avaliação dos possíveis efeitos causados pelas microcistinas sobre a taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), transpiração do tecido foliar (E) e concentração intercelular de CO_2 (C_i) de alface foi realizada com auxílio de um “Infrared Gas Analyser” (ADC BioScientific, LCpro-SD System Serial No.33509, UK). Foi utilizada uma área foliar de 6,25 cm² (sempre da segunda folha expandida da fronde) para se obter os parâmetros acima. As coletas de dados foram iniciadas às 10 h da manhã. Foi realizada 1 coleta de dados antes da aplicação da microcistina (dia 0) e outras 5 coletas de dados durante o experimento de bioacumulação (1º, 4º, 7º, 9º e 15º dia com as toxinas).

2.6. Proteínas totais e atividade de enzimas antioxidantes

A extração de proteínas totais (PT) para os ensaios de atividade enzimática foi realizada utilizando 0,1 M de tampão fosfato (pH 6,5) contendo 1% (w/v) de polivinil pirrolidona (PVP). Foi adicionado à 300 mg de massa fresca das hortaliças 6 mL do tampão e macerada com nitrogênio líquido em banho com gelo. A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com Bradford (1976) utilizando como padrão albumina de soro bovino (BSA).

A atividade da catalase (CAT) foi mensurada utilizando a sua função peroxidativa (Johansson e Borg, 1988) sendo a leitura realizada em absorvância de 550 nm. A atividade foi expressa em 10^3 nkat/mg de peso fresco (*fresh weight* - FW). A atividade da peroxidase (POD) foi realizada de acordo com Reddy et al. (1995). A mudança na absorvância (430 nm) por minuto foi proporcional à atividade da enzima que foi apresentada em nkat/mgFW. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada de acordo com Misra e Fridovich (1972) com absorvância de 600 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que forneceu uma inibição de 50% da redução do NBT. A atividade da SOD foi apresentada em nkat/mg FW. O ensaio da atividade da glutathione S-transferase (GST) foi realizado através do modelo padrão de substrato 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) de acordo com Habig et al. (1974). A atividade enzimática foi determinada pelo monitoramento da mudança de absorvância em 340 nm. Tal mudança foi diretamente proporcional à atividade da GST que foi apresentada em nkat/mg FW.

2.7. Quantificação de MC-LR e MC-RR equivalentes por LC-MS/MS nos tecidos foliares de alface

A bioacumulação de MC-LR e MC-RR equivalentes foi investigada nos tecidos foliares de alface macerando-se 1 g de massa fresca de folhas de cada planta exposta às diferentes concentrações de microcistinas e controle (irrigação apenas com água destilada) em almofariz com nitrogênio líquido e acrescentados 8 mL de água deionizada. Para a extração das MCs dos tecidos foliares da alface, os extratos obtidos a partir da maceração foram ultrassonicados em tubos de vidro em banho de gelo por 5 minutos para o rompimento das células, o qual foi confirmado através de microscópio óptico. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas por 5 min e o sobrenadante foi filtrado com auxílio de um filtro de seringa de 0,2 μ m de diâmetro de poro (modelo MFS-13).

Para a análise dos congêneres de MCs (MC-LR e MC-RR) foi utilizado o sistema cromatográfico LC-MS/MS com ionização por “eletrospray” (ESI) (Agilent Technologies, Santa Clara CA, EUA). As condições de cromatografia líquida e espectrometria de massas foram realizadas de acordo com Hall (2013).

2.8. Fator de Bioacumulação (BAF)

O Fator de Bioacumulação (BAF) (Arnot e Gobas, 2006) das MCs totais e dos congêneres -RR, -LR foi analisado no tecido foliar de alface utilizando a equação abaixo:

$$BAF_{LR,RR,total} = \frac{MCt_{LR,RR,total}}{MCwt_{LR,RR,total}}$$

Onde:

MCt é a concentração de MCs no tecido foliar; MCwt é a concentração de MCs na água utilizada para a irrigação; LR e RR são variantes de MCs, e total representa as microcistinas totais (MC-LR + MC-RR).

2.9. Análise dos dados

Os dados de atividade enzimática e bioacumulação foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e homogeneidade de Levene. Foi realizado o teste de variância (ANOVA um critério) para verificar diferenças entre os tratamentos no experimento de bioacumulação com extratos brutos de cianobactéria e entre os fatores de bioacumulação (BAF) das variantes de MCs nas folhas. O BAF foi utilizado como uma medição quantitativa e comparativa das concentrações de MC-LR, MC-RR e MCs totais no tecido foliar da alface. Os dados de parâmetros de trocas gasosas foram analisados quanto à homogeneidade através do teste de esfericidade de Mauchly. A análise de variância, ANOVA um critério, foi utilizada para determinar diferenças significativas entre as médias dos parâmetros de trocas gasosas para os diferentes tratamentos com MCs e controle. Quando observadas diferenças significativas, a diferença mínima significativa de Fisher (LSD) foi utilizada para separar as médias. Todos os testes foram realizados com significância de $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Parâmetros de trocas gasosas

Os resultados dos parâmetros de trocas gasosas de folhas de alface após irrigação com água contaminada estão na **Tabela 1**. Em geral, a taxa fotossintética (A) variou de acordo com o tempo de exposição à concentração de microcistinas, aumentando gradualmente do dia 1 ao 15 da fase experimental de contaminação. Além disso, as plantas expostas às MCs apresentaram a taxa fotossintética mais elevada que as plantas controle. De maneira semelhante, condutância estomática (gs), transpiração foliar (E), e concentração intercelular de CO_2 (C_i) foram mais elevadas nas plantas expostas às MCs.

Os resultados de parâmetros de trocas gasosas observados no presente estudo corroboram com os obtidos por Gutiérrez-Praena et al. (2014) que demonstraram que as MCs aumentaram a fixação de carbono em *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomate). Contudo, contrastam com observações realizadas em plantas aquáticas (Weiss et al., 2000; Romero-

Oliva et al., 2015) e plantas da agricultura (Abe et al., 1996; McElhiney et al., 2001; Saqrane et al., 2009), nos quais as MCs foram reportadas por causar efeitos adversos sobre a taxa fotossintética, composição e conteúdo de pigmentos e, conseqüentemente, crescimento. O aumento das taxas fotossintéticas registrados em alface exposta às MCs pode estar relacionado com a necessidade de proteção das plantas, que para tal sintetizam substratos adicionais para a síntese de energia e incorporação na biossíntese de biomoléculas antioxidantes importantes, como enzimas para proteção contra efeitos de ROS produzidas durante situações de estresse. Uma importante observação foi o tempo e concentração dependente dos efeitos das MCs sobre os parâmetros de trocas gasosas em alface. De acordo com Pichardo e Pflugmacher (2011), deve levar-se em consideração que as plantas são capazes de bioacumular as MCs, o que significa que os períodos de exposição devem ser tratados com mais importância na medida do seu efeito sobre o metabolismo e fisiologia do vegetal. Isso pode explicar o porquê dos efeitos mais significativos na taxa fotossintética e outros parâmetros de trocas gasosas serem observados no final dos experimentos.

3.2. Proteínas totais e atividade de enzimas antioxidantes

As concentrações de proteínas totais presentes em folhas de alface aumentaram proporcionalmente às concentrações de MCs aplicadas, exceto para a concentração de 13,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, na qual as proteínas totais decaíram após 15 dias de exposição a valores menores que o controle (**Fig. 1**). Apesar disso, não houve diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos em relação ao controle ($p > 0,05$).

A atividade enzimática antioxidante mostrou que a GST decaiu gradativamente ao aumento da MCs aplicadas (**Fig. 2a**). Por outro lado, as atividades das enzimas SOD, CAT e POD aumentaram gradativamente às concentrações de MCs aplicadas na alface (**Fig. 2b-d**). As enzimas SOD e CAT foram significativamente estimuladas pelas MCs ($p < 0,05$), porém não houve diferença estatística significativa na atividade da POD em relação ao controle ($p > 0,05$).

Uma observação importante no presente estudo foi a diminuição do conteúdo de proteína total de alface exposta à maior concentração de MCs. Uma explicação possível é que várias substâncias bioativas, incluindo as MCs, tem se demonstrado capazes de inibir a síntese proteica em plantas (Marrs, 1996). No entanto, é importante notar que a níveis mais baixos de MCs, a síntese proteica foi estimulada. Sob estas concentrações de MCs, fotoassimilados provavelmente são canalizadas para a biossíntese de proteínas, tais como enzimas antioxidantes importantes, para ajudar a proteger a planta contra os efeitos de ROS (Larkum et al., 2003). Similar aos resultados de proteínas totais, a atividade da GST de alface diminuiu

com o aumento da concentração de MCs. A glutathione-S-transferase é responsável pelo primeiro passo da desintoxicação de MCs em várias plantas aquáticas, conjugando as moléculas ao sulfurhydryl (-SH) de glutathione (GSH) (Pflugmacher et al., 1998, 2001). Isso aumenta a excreção de MCs e outras substâncias tóxicas a partir de plantas. Nestas plantas, a atividade da enzima é geralmente mais elevada durante a biotransformação de MCs para moléculas não tóxicas (Romero-Oliva et al., 2015). Entretanto, no presente estudo, a atividade da GST em plantas de alface foi inibida em presença de extratos brutos de cianobactérias contendo MC-LR e MC-RR. Resultados semelhantes foram relatados para variedades de feijão, cuja atividade da GST foi inibida após a exposição a extratos brutos de cianobactérias contendo MC-LR e também a MC-LR purificada (Pichardo and Pflugmacher, 2011). De acordo com os autores, a infra-regulação (*down-regulation*) da atividade da GST está relacionada com o dano do aparelho oxidativo nas plantas expostas às MCs.

No presente estudo, o aumento nas atividades da CAT, POD e SOD encontrado nas plantas de alface contaminadas com MCs implicou em aumento na produção de ROS. Isto ocorre porque estas enzimas estão diretamente envolvidas na conversão e eliminação de ROS, incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O_2^-), a moléculas não tóxicas (Chen et al., 2004; Cordeiro-Araújo et al., 2015; Ha e Pflugmacher, 2013). Devido ao modo de ação da SOD, a dismutação de O_2^- ao H_2O_2 e O_2 , é possível inferir que o aumento significativo na atividade da enzima, tal como observado no presente estudo, está relacionado com um aumento da produção deste radical. Além disso, o H_2O_2 produzido a partir da dismutação do O_2^- é convertido em O_2 e H_2O por POD e CAT (Gill e Tuteja, 2010). Isto poderia explicar, em parte, o aumento das atividades de POD e CAT registradas no presente estudo. Além disso, a supra-regulação (*up-regulation*) das atividades da POD e CAT pode também estar relacionada com a produção de ROS a partir do aumento das atividades metabólicas, como demonstrado pelo aumento das taxas fotossintéticas e parâmetros de trocas gasosas em alface. Em concordância com os nossos resultados, as atividades de POD e CAT de várias culturas de plantas foram supra-reguladas após a exposição às MCs (Cordeiro-Araújo et al., 2015; El Khalloufi et al., 2013; Pichardo and Pflugmacher, 2011).

3.3. Bioacumulação de MCs

Após 15 dias de irrigação com água contaminada com MCs, houve bioacumulação nos tecidos foliares de alface variando de 6,32 a 15,00 $\mu g Kg^{-1}$, 32,99 a 143,35 $\mu g Kg^{-1}$ e 39,31 a 158,35 $\mu g Kg^{-1}$ de MC-RR, MC-LR e MCs totais, respectivamente (**Tabela 2**). Neste estudo, considerando as menores concentrações de MCs aplicadas (0,5 $\mu g L^{-1}$ e 0,15 $\mu g L^{-1}$ de MC-LR e MC-RR, respectivamente) não houve bioacumulação nos tecidos foliares de alface. O

BCF de MC-LR, MC-RR e MCs totais no tecido foliar variou de acordo com as doses aplicadas (**Tabela 2**). Exceto para a MC-RR, os maiores valores de BAF foram encontrados após a bioacumulação de MCs nas folhas de alface submetidas à irrigação com as concentrações intermediárias ($5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $6,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR e MCs totais, respectivamente) (**Tabela 2**).

As alterações no BAF de microcistinas observadas em alface não foram diretamente proporcionais à exposição às concentrações de MCs. Para a MC-LR e MCs totais, o maior BAF foi observado nas concentrações de exposição intermediárias ($5,0$ e $6,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Isto mostra que as maiores concentrações de exposição nem sempre resulta em maiores valores de BAF, o que poderia explicar porque Crush et al. (2008) obtiveram baixos valores de bioacumulação ($84 \mu\text{g Kg}^{-1}$ MCs) após irrigação de alface por 6 dias com água contaminada ($1700 \mu\text{g L}^{-1}$ MCs). Considerando a utilização de concentrações entre 5 e $13 \mu\text{g L}^{-1}$ MCs, no presente estudo foi registrada maior bioacumulação das toxinas por kg de alface que Crush et al. (2008), após 15 dias de irrigação.

Considerando a quantidade do total de MCs (MC-LR + MC-RR) bioacumuladas em alface, pode-se deduzir que existe um risco de exposição humana a estas toxinas. Por exemplo, um adulto e uma criança pesando 60 e 40 kg, respectivamente, alimentando-se com 40 g (aproximadamente 4 folhas) de alface contaminados com MCs, poderiam ingerir de $1,57$ a $6,33 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de MCs por refeição. Isso corresponderia a $0,03 - 0,09$ e $0,04 - 0,14 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de MCs para o adulto e a criança, respectivamente. Estes valores excedem o limite de ingestão diária total (TDI) de $0,04 \mu\text{g}$ de MCs por Kg^{-1} de massa corporal recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011).

4. Conclusões

A exposição às MCs alterou a fisiologia da alface, de acordo com o aumento da atividade de importantes enzimas antioxidantes e taxas fotossintéticas dessas plantas. Além disso, os resultados mostraram que a irrigação de plantas de alface com água contaminada por MCs constitui um sério risco para a saúde humana, desde que a quantidade de toxinas acumuladas no vegetal e a possibilidade de que a ingestão diária total sejam superiores ao limite recomendado pela OMS. Em geral, o BAF não mostrou uma dependência de concentração de MCs. Nossos resultados apontam para a necessidade de uma legislação que assegure a qualidade da água em termos de concentrações de MCs, e não apenas pelo número de células por mL em corpos d'água utilizados para irrigação de hortaliças.

Agradecimentos

À FAPESP (Processos 2014/01934-0; 2013/11306-3), CNPq (Proc. 470198/2011-7) e FACEPE (Proc. AMD-0186-2.00/13) pelo apoio financeiro e à CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Lista de figuras

Figura 1. Concentração de proteínas totais (PT) presentes em folhas de alface após irrigação com água contaminada com extratos brutos de cianobactérias contendo MC-LR e MC-RR. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$).

Figura 2. Atividade de enzimas antioxidantes em folhas de alface após irrigação por 15 dias com água contaminada com extratos brutos de cianobactérias contendo MC-LR e MC-RR. (a). Glutathione S-transferase – GST; (b). Superóxido dismutase – SOD; (c). Catalase – CAT; (d). Peroxidase – POD.

Tabela 1. Análise das trocas gasosas de folhas de alface após irrigação com água contaminada com extratos brutos de cianobactéria contendo MC-LR e MC-RR. (A). Taxa fotossintética; (*gs*). Condutância estomática. (*E*). Transpiração foliar; (*Ci*). Concentração intercelular de CO₂. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (*n*=6).

Dia de amostragem (MC-LR + MC-RR (µg L ⁻¹))	A (µmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	<i>gs</i> (mmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	<i>E</i> (mmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	<i>Ci</i> (µmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)
Dia 0 (0,65)	2,90 ± 0,36	0,06 ± 0,01	1,85 ± 0,25	205 ± 15
Dia 1 (0,65)	4,18 ± 1,55	0,13 ± 0,06	3,14 ± 0,87	222 ± 19
Dia 4 (0,65)	4,23 ± 2,81	0,19 ± 0,07	3,37 ± 0,84	198 ± 39
Dia 7 (0,65)	4,82 ± 0,68	0,28 ± 0,05	4,79 ± 0,40	227 ± 11
Dia 9 (0,65)	5,28 ± 0,53	0,23 ± 0,08	4,30 ± 0,82	218 ± 11
Dia 15 (0,65)	6,39 ± 0,53	0,32 ± 0,15	4,46 ± 0,92	237 ± 11
Dia 0 (2,5)	3,14 ± 0,25	0,06 ± 0,01	1,84 ± 0,18	200 ± 6
Dia 1 (2,5)	4,46 ± 0,58	0,11 ± 0,03	2,81 ± 0,49	210 ± 11
Dia 4 (2,5)	5,88 ± 1,02	0,28 ± 0,08	4,80 ± 0,67	237 ± 9
Dia 7 (2,5)	5,64 ± 1,01	0,20 ± 0,02	4,26 ± 0,29	225 ± 12
Dia 9 (2,5)	5,29 ± 0,93	0,19 ± 0,03	4,18 ± 0,38	227 ± 4
Dia 15 (2,5)	5,32 ± 0,68	0,20 ± 0,07	3,49 ± 0,78	230 ± 11
Dia 0 (6,5)	3,05 ± 0,29	0,06 ± 0,00	1,84 ± 0,10	202 ± 10
Dia 1 (6,5)	5,10 ± 1,59	0,15 ± 0,05	3,59 ± 0,83	222 ± 13
Dia 4 (6,5)	5,88 ± 1,02	0,28 ± 0,08	4,80 ± 0,67	237 ± 9
Dia 7 (6,5)	4,82 ± 0,46	0,18 ± 0,03	3,98 ± 0,45	231 ± 8
Dia 9 (6,5)	5,30 ± 0,10	0,12 ± 0,01	3,12 ± 0,12	203 ± 4
Dia 15 (6,5)	5,68 ± 0,98	0,13 ± 0,03	4,30 ± 0,91	245 ± 11

Tabela 1. Continuação.

Dia de amostragem (MC-LR + MC-RR ($\mu\text{g L}^{-1}$))	<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	<i>gs</i> ($\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	<i>E</i> ($\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	<i>Ci</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
Dia 0 (13,0)	$2,99 \pm 0,36$	$0,05 \pm 0,01$	$1,66 \pm 0,24$	194 ± 20
Dia 1 (13,0)	$4,76 \pm 0,53$	$0,12 \pm 0,02$	$3,06 \pm 0,45$	209 ± 23
Dia 4 (13,0)	$5,26 \pm 0,56$	$0,16 \pm 0,02$	$3,68 \pm 0,18$	225 ± 8
Dia 7 (13,0)	$5,69 \pm 0,78$	$0,15 \pm 0,02$	$3,56 \pm 0,29$	212 ± 6
Dia 9 (13,0)	$5,99 \pm 0,95$	$0,13 \pm 0,02$	$3,25 \pm 0,34$	196 ± 23
Dia 15 (13,0)	$5,08 \pm 0,26$	$0,23 \pm 0,03$	$3,81 \pm 0,30$	241 ± 7
Dia 0 (controle)	$3,17 \pm 0,44$	$0,07 \pm 0,01$	$2,01 \pm 0,51$	206 ± 25
Dia 1 (controle)	$3,12 \pm 0,67$	$0,09 \pm 0,02$	$2,23 \pm 0,36$	202 ± 31
Dia 4 (controle)	$3,01 \pm 0,76$	$0,18 \pm 0,03$	$3,02 \pm 0,31$	151 ± 9
Dia 7 (controle)	$2,88 \pm 0,76$	$0,14 \pm 0,02$	$2,85 \pm 0,30$	193 ± 9
Dia 9 (controle)	$3,54 \pm 0,27$	$0,14 \pm 0,02$	$2,88 \pm 0,32$	171 ± 10
Dia 15 (controle)	$3,79 \pm 0,33$	$0,11 \pm 0,03$	$2,51 \pm 0,35$	226 ± 7

Tabela 2. Bioacumulação e Fator de Bioacumulação (BAF) de variantes de microcistinas (MCs) em alface após irrigação com água contaminada com extratos brutos de cianobactéria contendo MC-LR e MC-RR. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$).

Tratamento	MCs aplicadas ($\mu\text{g L}^{-1}$)			MCs no tecido foliar ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)			BAF de MCs		
	MC-LR	MC-RR	Total	MC-LR	MC-RR	Total	MC-LR	MC-RR	Total
1	0,50	0,15	0,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	2,00	0,50	2,50	$32,99 \pm 5,23$	$6,32 \pm 0,13$	$39,31 \pm 5,32$	$16,50 \pm 2,61$	$12,65 \pm 0,26$	$15,73 \pm 2,13$
3	5,00	1,50	6,50	$103,24 \pm 13,09$	$10,14 \pm 1,34$	$113,38 \pm 14,10$	$20,65 \pm 2,62$	$6,76 \pm 0,89$	$17,44 \pm 2,17$
4	10,00	3,00	13,00	$143,35 \pm 12,19$	$15,00 \pm 1,78$	$158,35 \pm 10,41$	$14,34 \pm 1,22$	$5,00 \pm 0,59$	$12,18 \pm 0,80$
Controle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

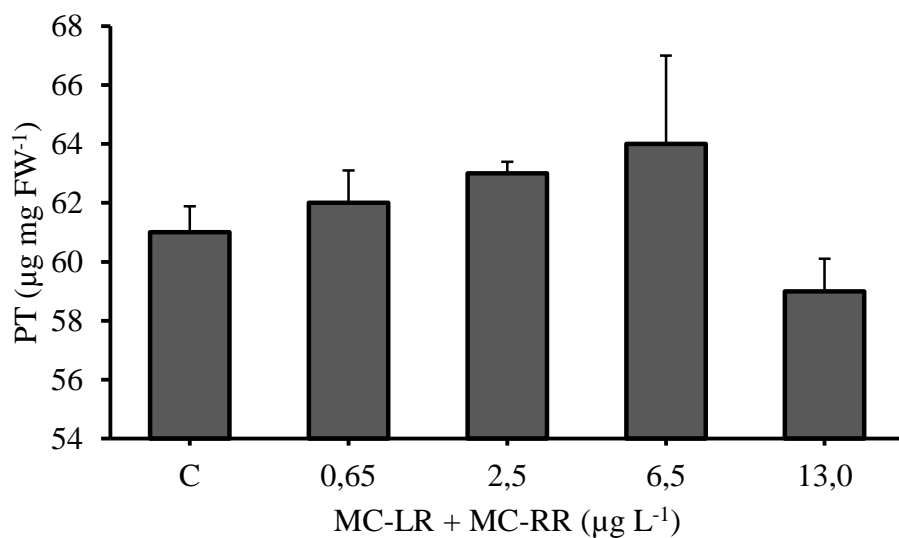


Figura 1. Concentração de proteínas totais (PT) presentes em folhas de alface após irrigação com água contaminada com extratos brutos de cianobactérias contendo MC-LR e MC-RR. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$).

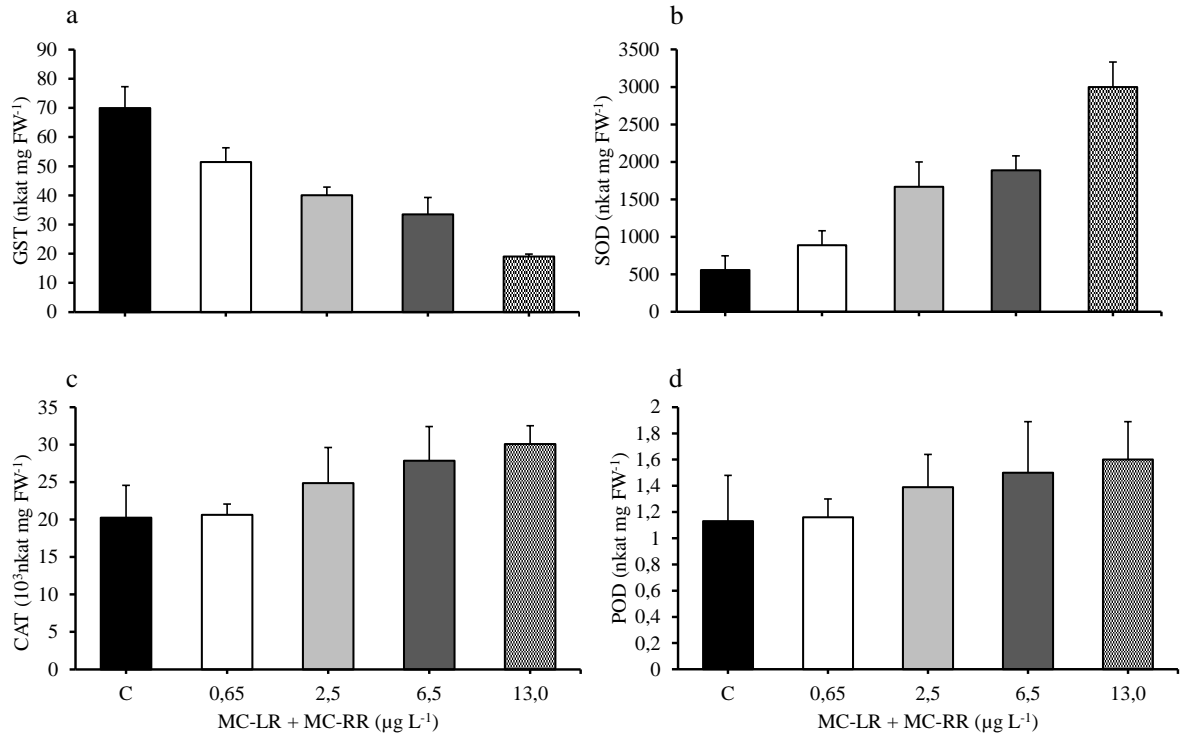


Figura 2. Atividade de enzimas antioxidantes em folhas de alface após irrigação por 15 dias com água contaminada com extratos brutos de cianobactérias contendo MC-LR e MC-RR. (a). Glutationa S-transferase – GST; (b). Superóxido dismutase – SOD; (c). Catalase – CAT; (d). Peroxidase – POD.

Referências

- Abe, T., Lawson, T., Weyers, J.D.B., Codd, G.A., 1996. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytol.* 133, 651-658.
- Arnot, J.A., Gobas, F.A.P.C., 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals and aquatic organisms. *Environ. Rev.* 14, 257-297.
- Babica, P., Blaha, L., Marsalek, B., 2006. Exploring the natural role of microcystins - A review of effects on photoautotrophic organisms. *J. Phycol.* 42, 9-20.
- Bittencourt-Oliveira, M.C., 2003. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. *Harmful Algae* 2, 51-60.
- Bittencourt-Oliveira, M.C., Piccin-Santos, V., Moura, A.N., Aragão-Tavares, N.K.C., Cordeiro-Araújo, M.K., 2014. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 86, 297-309.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Chem.* 72, 243-254.
- Carmichael, W.W., 1997. The cyanotoxins. In: *Advances in Botanical Research*, v.27 (Callow J, ed). London: Academic Press, p.211-256.
- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 109, 663e668.
- Chen, J., Song, L., Dai, J., Gan, N., Liu, Z., 2004. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon* 43, 393-400.
- Codd, G.A., Metcalf, J.S., Beattie, K.A., 1999. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 37, 1181-1185.
- Corbel S., Mougin C., Bouaich N., 2014. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* 96, 1-15.
- Cordeiro-Araújo, M.K., Bittencourt-Oliveira, M.C., 2013. Active release of microcystins controlled by an endogenous rhythm in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Phycol. Res.* 61, 1-6.

- Cordeiro-Araújo, M.K., Chia, M.A., Hereman, T.C., Sasaki, F.F., Bittencourt-Oliveira, M.C., 2015. Selective membrane permeability and peroxidase activity response of lettuce and arugula irrigated with cyanobacterial-contaminated water. *Environ. Earth Sci.*
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J. 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 13.380-13.383.
- Crush, J.R., Briggs, L.R., Sprosen, J.M., Nichols, S.N., 2008. Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. *Environ. Toxicol.* 23, 246-252.
- El Khalloufi F., El Ghazali I., Saqrane S., Oufdou K., Vasconcelos V., Oudra B., 2012. Phytotoxic effects of a natural bloom extract containing microcystins on *Lycopersicon esculentum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79, 199-205.
- El Khalloufi, F., Oufdou, K., Lahrouni, M., Faghire, M., Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Vasconcelos, V., Oudra, B., 2013. Physiological and antioxidant responses of *Medicago sativa* rhizobia symbiosis to cyanobacterial toxins (microcystins) exposure. *Toxicon*, 76,167-177.
- Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Catálogo brasileiro de hortaliças: saiba como plantar e aproveitar 50 das espécies mais comercializadas no país. Brasília (DF), 2010, pp.60.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909e930.
- Gorham, P.R., Mclachlan, J., Hammer, U.T., Kim. W.K., 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verh. Internat. Verein. Theor. Angew. Limnol.* 15, 796-804.
- Gutiérrez-Praena, D., Campos, A., Azevedo, J., Neves, J., Freitas, M., Guzmán-Guillén, R., Cameán, A.M., Renaut, J., Vasconcelos, V., 2014. Exposure of *Lycopersicon esculentum* to microcystin-LR: Effects in the leaf proteome and toxin translocation from water to leaves and fruits. *Toxins* 6, 1837-1854.
- Ha, M.H., Pflugmacher, S., 2013. Time-dependent alterations in growth, photosynthetic pigments and enzymatic defense systems of submerged *Ceratophyllum demersum* during exposure to the cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a. *Aquat. Toxicol.* 138–139, 26–34.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.

- Hall, T., 2013. Monitoring for microcystins in raw water supplies reservoirs using the Agilent 6410 triple quadrupole LC/MS. Application Note. Wessex Water Bath, UK.
- Hereman, T.C., Bittencourt-Oliveira, M.C., 2012. Bioaccumulation of microcystins in lettuce. *J. Phycol.* 48, 1535-1537.
- Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguer, M., Van der Lin-den, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A., 2001. *Climate Change 2011: The Scientific Basis*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 881.
- International Panel on Climate Change – IPCC., 2007. *Climate Change 2007: Synthesis Report*. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment. Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri, R.K. and Reisinger, A. (Eds)]. IPCC, Geneva, Switzerland: 104 pp.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., AN, J., Cardo, D., Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, M.B.C., Melo-Filho, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V., Azevedo, S.M.F.O., Jarvis, W.R., 1998. Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 36, 873-878.
- Johansson, L.H., Borg, L.A., 1988. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal. Biochem.* 174, 331-336.
- Kozdęba, M., Borowczyk, J., Zimoląg, E., Wasylewski, M., Dziga, D., Madeja, Z. & Drukala, J. (2014). Microcystin-LR affects properties of human epidermal skin cells crucial for regenerative processes. *Toxicon*, 80, 38-46.
- Larkum, A.W.D., Douglas, S.E., Raven, J.A., 2003. *Photosynthesis in algae*. Kluwer, Dordrecht Netherlands, p. 479.
- Marrs, K.A., 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 127–158.
- Máthé, C., M-Hamvas, M., Vasas, G; Surányi, G., Bácsi, I., Beyer, D., Tóth, S., Tímár, M., Borbély, G., 2007. Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, induces growth inhibition and histological alterations in common reed (*Phragmites australis*) plants regenerated from embryogenic calli. *New Phytologist* 176, 824–835.
- McElhiney, J., Lawton, L.A., Leifert, C., 2001. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon*, 39, 1411-1420.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The generation of superoxide radical antioxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 247, 6960-6962.

- Mohamed, Z.A., Al Shehri, A.M., 2009. Microcystins in groundwater wells and their accumulation in vegetable plants irrigated with contaminated waters in Saudi Arabia. *J. Hazard. Mater.* 172, 310-315.
- Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., 2004. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101,12228–12231, 2004.
- Paerl, H.W., Huisman, J., 2008. Blooms like it hot. *Science* 320(5872), 57–58.
- Peuthert, A., Chakrabarti, S., Pflugmacher, S., 2007. Uptake of Microcystins-LR and -LF (Cyanobacterial Toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). *Environ. Toxicol.* 22, 436-442.
- Pichardo, S., Pflugmacher, S., 2011. Study of the antioxidant response of several bean variants to irrigation with water containing MC-LR and cyanobacterial crude extract. *Environ. Toxicol.*
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 527-533.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Beattie, K.A., Krause, E., Steinberg, C.E.W., Codd, G., 2001. Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent plant *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex. Steud. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 846–852.
- Pflugmacher, S., Aulhorn, M., Grimm, B., 2007. Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants. *New Phytol.* 175, 482-489.
- Puddick, J., Prinsep, M.R., Wood, S.A., Kaufononga, S.A.F., Cary, S.C., Hamilton, D.P., 2014. High levels of structural diversity observed in microcystins from *Microcystis* CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. *Mar. Drugs* 12, 5372-5395.
- Reddy, J.K., Suga, T., Mannaerts, G.P., Lazarow, P.B., Subramani, S., 1995. Peroxisomes: biology and role in toxicology and disease. *New York: Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804, 1–795.
- Romero-Oliva CS, Contardo-Jara V, Block T, Pflugmacher S. 2014. Accumulation of microcystin congeners in different aquatic plants and crops – A case study from lake Amatitlán, Guatemala. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 102: 121-128.
- Romero-Oliva, C.S., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., 2015. Antioxidative response of the three macrophytes *Ceratophyllum demersum*, *Egeria densa*, and *Hydrilla verticillata* to a

- time dependent exposure of cell-free crude extracts containing three microcystins from cyanobacterial blooms of Lake Amatitlán, Guatemala. *Aquat. Toxicol.* 163, 130-139..
- Saqrane, S., El ghazali, I., Ouahid, Y., El Hassni, M., El Hadrami, I., Bouarab, L., Del Campo, F.F., Oudra B., Vasconcelos V., 2007. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. *Aquat. Toxicol.* 83, 284–294.
- Saqrane, S., Ouahid, Y., Ghazali, Y., Oudra, B., Bouarab, L., Campo, F.F., 2009. Physiological changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* cultivars, caused by irrigation with water contaminated with microcystins: A laboratory experimental approach. *Toxicon* 53,786-796.
- Weiss, J., Liebert, H., Braunne, W., 2000. Influence of microcystins - RR on growth and photosynthetic capacity of the duckweed *Lemna minor*. *J. Appl. Bot.* 74, 100-105.
- World Health Organization - WHO. 2011. Cyanobacterial toxins: microcystin-LR. Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, 4th ED, geneva, pp.518.

Manuscrito III: Submetido à revista:



Cinética da bioacumulação e depuração de microcistina-LR em alface e rúcula:

Resposta antioxidativa e os riscos para a saúde humana

Micheline Kézia Cordeiro-Araújo^{1,2}, Mathias Ahii Chia², João Dias de Toledo Arruda-Neto^{3,4},
Valdemar Luiz Tornisielo⁵, Franz Zirena Vilca⁵, Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R.
Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-030, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, São Dimas, CEP 13418-900, Piracicaba, SP,
Brasil.

³Instituto de Física, Universidade de São Paulo, Rua do Matão Travessa R Nr.187, CEP
05508-090 Cidade Universitária, SP, Brasil.

⁴CEPESq/Unifitalo – Italy-Brazilian University Center, Avenida João Dias, 2046, CEP
04724-003, São Paulo, SP, Brasil.

⁵Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Av. Centenário, 303,
CEP 13400-970, Piracicaba, SP, Brasil.

*Autor para correspondência: mbitt@usp.br

RESUMO

A microcistina-LR (MC-LR) é uma das variantes mais tóxicas e comuns dentre as microcistinas (MCs) encontradas em diferentes ecossistemas aquáticos. Pouco se conhece sobre a possibilidade de recuperação de plantas da agricultura contaminadas com MC-LR ou qualquer outra variante de MCs, bem como o que acontece nos processos fisiológicos. Os objetivos do presente estudo foram determinar (1) atividades de enzimas antioxidantes no tecido foliar de alface e rúcula, (2) bioacumulação e depuração de microcistina-LR (MC-LR) (1, 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) e (3) ingestão diária total (ToDI) de MC-LR com base na quantidade acumulada nos tecidos foliares, após irrigação com água contaminada e não contaminada. As atividades da catalase, peroxidase, glutathione S-transferase e superóxido dismutase aumentaram durante a fase de bioacumulação, mas geralmente diminuíram durante a fase de depuração. A MC-LR acumulou apenas em alface (32,45 a 101,09 $\mu\text{g Kg}^{-1}$). Da concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ mais de 25% da MC-LR bioacumulada ficou retida no tecido foliar após 7 dias de irrigação com água não contaminada. Além disso, o cálculo da ingestão diária total da toxina para um adulto pesando 60 kg e uma criança pesando 40 kg excedeu o limite de ingestão diária tolerável (0,04 $\mu\text{g Kg}^{-1}$) recomendados pela Organização Mundial de Saúde. O modelo cinético *one-compartment* foi utilizado para a análise dos dados de bioacumulação e depuração de MC-LR em alface. A bioacumulação foi linearmente proporcional às concentrações de toxina aplicadas, aumentando com o tempo, e apresentando saturação para 30 dias de exposição contínua. Por outro lado, a depuração da toxina foi menos eficiente em concentrações de exposição mais elevadas. O cálculo de meia vida biológica da toxina em alface foi de 2,9 e 3,7 dias a partir dos tratamentos de 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR, respectivamente.

Palavras-chave: Cianotoxina, Desintoxicação, Estresse oxidativo, Hortaliças, MC-LR

1. Introdução

As cianobactérias são procariotos fotossintetizantes que ocorrem nos ecossistemas aquáticos naturais e artificiais (Sivonen e Jones, 1999; Chia et al., 2009a). Esses organismos produzem uma variedade de toxinas incluindo anatoxinas, cilindrospermopsinas, saxitoxinas e microcistinas, que representam sérios riscos para o meio ambiente e a saúde pública (Carmichael et al., 1993; Kozdęba et al., 2014). Microcistinas (MCs) são hepaptapeptídios cíclicos produzidos por meio de sintases não ribossomais de peptídios (Tillett et al., 2000). Tais cianotoxinas são potentes inibidoras de proteínas fosfatases 1 e 2A em plantas e animais (Mackintosh et al., 1990). As MCs causam estresse oxidativo em plantas (Pflugmacher et al., 2007) e alteram as atividades de enzimas antioxidantes importantes incluindo a superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) e peroxidase (POD) (Babica et al., 2006; Cordeiro-Araújo et al., 2015). Além disso, as MCs podem inibir a germinação, o crescimento, o teor de pigmentos, a fotossíntese e a plasticidade da membrana plasmática em plantas (M-Hamvas et al., 2003; Gehringer et al., 2003; Chen et al., 2004, Järvenpää et al., 2007; Pflugmacher et al., 2007; Cordeiro-Araújo et al., 2015).

Em mamíferos, as MCs alteram os citoesqueletos de hepatócitos, induzem à hemorragia intra-hepática e insuficiência hepática (Eriksson et al., 1990; Yoshida et al., 1997). Além disso, a exposição crônica às MCs tem sido associada a sérios danos para a saúde humana, tais como câncer no fígado e colo-retal (Carmichael e Falconer, 1993; Falconer e Humpage, 1996; Sivonen e Jones 1999; Zegura e Sedmak, 2003). Casos de morte de seres humanos foram reportados após tratamento de pacientes de hemodiálise expostos a água contaminada com MCs no Brasil (Carmichael et al., 2001). Isso faz com que a avaliação de potenciais vias de exposição, riscos para a saúde pública e a caracterização das cianotoxinas sejam uma prioridade. Diversos estudos têm demonstrado que a bioacumulação de MCs em vertebrados e invertebrados aquáticos, representam um risco significativo para a saúde humana se esses animais forem consumidos (Ibelings e Chorus, 2007; Ettoumi et al., 2011; Corbel et al., 2014). Além disso, uma série de estudos relataram a acumulação de MC-LR no fitoplâncton e macrófitas aquáticas (Pflugmacher et al., 2001; Mitrovic et al., 2005; Mohamed, 2008).

Fontes de abastecimento de água para a agricultura, tais como rios, lagos e reservatórios, muitas vezes estão contaminadas com cianobactérias e podem conter concentrações elevadas de MCs (Chia et al., 2009b; Orihel et al., 2012; Singh et al., 2015). Plantas terrestres podem tornar-se expostas e bioacumular MCs via irrigação com água contaminada por cianobactérias e cianotoxinas (Peuthert et al., 2007; Crush et al., 2008; Chen

et al., 2012; Kittler et al., 2012; Hereman e Bittencourt-Oliveira, 2012). Em resposta à ameaça representada por esta via de exposição pelas MCs (Codd et al., 1999; Peuthert et al., 2007; Chen et al., 2012; Hereman e Bittencourt-Oliveira, 2012; Maejima et al., 2014; Gutiérrez-Praena et al., 2014), a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda um limite de ingestão diária total para humanos (TDI) de $0,04 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso corporal por dia.

Apesar de estudos recentes mostrarem que as MCs podem ser retidas nos tecidos de plantas terrestres, pouco se sabe sobre a sua bioacumulação e depuração nesses vegetais. Dessa forma, novos estudos são necessários para entender a absorção e o destino das MCs por plantas alimentícias, e sua persistência em vegetais (Corbel et al., 2014). Até o momento, estudos de bioacumulação revelaram que é necessária informação adicional sobre a dinâmica de absorção e acumulação de cianotoxinas, translocação e metabolismo em plantas (Gutiérrez-Praena et al., 2014). Estudos cinéticos de bioacumulação e depuração de cianotoxinas em plantas fornecem uma importante ferramenta para o cálculo de sua persistência em tecidos vegetais, bem como o tempo necessário para recuperar vegetais contaminados.

A alface (*Lactuca sativa* L.) e a rúcula (*Eruca sativa* Mill.) são vegetais cujas folhas são amplamente consumidas em todo o mundo (McMichael, 1994), sendo importante para a saúde pública o estudo da bioacumulação e depuração de MCs em suas folhas. Os objetivos do presente estudo foram determinar (1) atividades de enzimas antioxidantes no tecido foliar de alface e rúcula, (2) bioacumulação e depuração de microcistina-LR (MC-LR) e (3) ingestão diária total (ToDI) de MC-LR com base na quantidade acumulada nos tecidos foliares, após irrigação com água contaminada e não contaminada.

2. Materiais e Métodos

2.1. Vegetais

Mudas de alface (*Lactuca sativa* L.; cultivar Vanda) e rúcula (*Eruca sativa* Mill.; cultivar Folha Larga) com 10 dias de crescimento foram adquiridas a partir da IBS MUDAS (Piracicaba-Rio Claro, Brasil) e utilizadas nos experimentos de bioacumulação e depuração. Os experimentos foram realizados durante as fases de desenvolvimento apropriadas para o consumo humano (período de colheita). Estas fases ocorrem geralmente entre 50 e 70 dias para a alface, e 40 e 60 dias para rúcula. Antes do início dos experimentos, seis mudas de cada espécie foram escolhidas aleatoriamente e analisadas quanto a presença de MCs, utilizando o método de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em sequência (LC-MS/MS) para confirmar a ausência de MC-LR nas plantas.

2.2. Bioacumulação e depuração de MC-LR em alface e rúcula

Plantas de alface e rúcula com 10 dias de crescimento foram transplantadas para vasos com capacidade de 7 L, contendo aproximadamente 3,5 Kg de substrato a base de casca de *Pinus* e vermiculita. As plantas foram mantidas em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 10:14 h (luz:escuro) em casa de vegetação na Universidade de São Paulo, Brasil.

Plantas de alface e rúcula foram irrigadas diariamente com 100 mL de água destilada por 30 e 20 dias, respectivamente. Durante a irrigação, uma solução nutritiva contendo nitrato de cálcio, nitrato de potássio, sulfato de magnésio, ácido bórico, fosfato monoamônico, ferro e coquetel de micronutrientes (Cordeiro-Araújo et al., 2015) foi aplicada nas plantas a cada 3 dias. Trinta (30) e 20 dias após o transplante das plantas de alface e rúcula, respectivamente, iniciou-se a fase experimental de bioacumulação. Durante esta fase, as plantas foram irrigadas por 7 dias com água contendo diferentes concentrações de MC-LR (1,0; 5,0 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$) e controle (água sem MC-LR). Microcistina-LR purificada (grau de pureza $> 95\%$) foi obtida da ABRAXIS (LCC, USA). A aplicação da toxina nas folhas das plantas foi realizada manualmente utilizando frascos Erlenmeyers de 150 mL de capacidade contendo 100 mL de água contaminada, permitindo que excesso escorresse para o substrato. As plantas não receberam qualquer defensivo agrícola (como pesticidas) contra pragas durante todo o período de cultivo.

O experimento de depuração foi realizado com as plantas de alface e rúcula anteriormente expostas à MC-LR, sob as mesmas condições descritas no experimento de bioacumulação. Após o experimento de bioacumulação, as plantas de alface e rúcula contaminadas com MC-LR foram irrigadas com água não contaminada (água destilada) durante 7 dias. Isso representou a fase experimental de depuração. As amostras foram coletadas nos dias 1, 4 e 7 de bioacumulação e depuração. Todos os experimentos e análises foram realizados em triplicata ($n = 3$). Para cada amostra, discos foliares de 1 cm de diâmetro foram recortados com auxílio de um vazador. Os discos foram pesados, utilizado 1 g de peso fresco (FW) de cada amostra e congelados a -80°C até o momento da análise da MC-LR. O período total de cultivo, incluindo os experimentos de bioacumulação e depuração foi de 55 e 45 dias para a alface e a rúcula, respectivamente.

2.3. Espécies reativas de oxigênio: produção interna de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O conteúdo intracelular de H_2O_2 foi extraído macerando-se 300 mg de folha de cada planta em nitrogênio líquido. Em seguida, o pó resultante foi homogeneizado em 3 mL de

tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5). O material homogeneizado foi centrifugado a 10,000 g em temperatura de 0 °C por 10 min, e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação do H₂O₂. Para a análise da produção intracelular de H₂O₂ foi utilizado o procedimento descrito por Jana e Choudhuri (1982). A mistura da reação continha 400 µL de sobrenadante e 133 µL de cloreto de titanium a 0,1% em H₂SO₄ a 20% (v/v). Um minuto após a incubação, a densidade óptica da mistura foi medida no comprimento de onda 410 nm, e o coeficiente de extinção de 0,28 L mmol⁻¹ cm⁻¹ foi utilizado para quantificar o conteúdo de H₂O₂ (µmol/mg).

2.4. Atividade de enzimas antioxidantes

A extração de proteínas totais (PT) para os ensaios de atividade enzimática foi realizada utilizando tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5) contendo 1% de polivinil pirrolidona (PVP) (w/v). À 300 mg de massa fresca das hortaliças foi adicionado 6 mL do tampão e macerada com nitrogênio líquido em banho de gelo. A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com Bradford (1976) utilizando como padrão albumina de soro bovino (BSA).

A atividade da catalase (CAT) de amostras das hortaliças foi realizada utilizando a sua função peroxidativa (Johansson e Borg, 1988). Para tanto, 250 µL de tampão fosfato de potássio (25 mM, pH 7,0) foi incubado com 250 µL de metanol e 50 µL de peróxido de hidrogênio (0,27% v/v). A reação foi iniciada pela adição de 500 µL da amostra enzimática em uma incubadora *shaker* (temperatura de 20 °C) com agitação contínua. Após 20 minutos, a reação foi parada pela adição de 250 µL de hidróxido de potássio 7,8 M. Logo em seguida foram adicionados 500 µL de *purpald* 34,2 mM (4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol) em 480 mM de HCl, e a reação mista incubada por 10 minutos na incubadora *shaker* com agitação contínua. A adição de 250 µL de periodato de potássio 65,2 mM que foi lida em 550 nm de comprimento de onda. Uma unidade (U) de CAT foi definida como quantidade de enzima que causou a formação de 200 µM de formaldeído sob as condições de ensaio especificadas acima. A atividade da CAT foi expressa em 10³ nkat/mg de peso fresco (*fresh weight* - FW).

A atividade da peroxidase (POD) foi realizada de acordo com Reddy et al. (1995). Para tanto, 3 mL de solução de pirogalol (0,05 M em 0,1 M de tampão fosfato, pH 6,5) e 0,5 mL de H₂O₂ a 1% foram misturados em uma cubeta, sendo a reação iniciada pela adição de 0,05 mL do extrato enzimático. A mudança na absorbância por min foi proporcional à atividade da enzima. A atividade da POD foi apresentada em nkat/mgFW.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi analisada espectrofotometricamente de acordo com Misra e Fridovich (1972). O meio de incubação conteve um volume final de 3 mL, dos quais foram constituídos por tampão fosfato de potássio 6,7 mM (pH 7,8), metionina 45 µM, riboflavina 0,53 mM e NBT 84 µM. A quantidade de homogenato adicionado ao meio de incubação foi mantida abaixo de uma unidade de enzima suficiente para garantir a precisão. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que forneceu uma inibição de 50% da redução do NBT. A atividade da SOD foi apresentada em nkat/mg FW.

O ensaio da atividade da glutathione S-transferase (GST) foi realizado através do modelo padrão de substrato 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (Habig et al., 1974). A ação foi iniciada pela adição de 100 µL de extrato enzimático a 2 mL de reação mista contendo 3,6 mM de glutathione reduzida e 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno em 0,1 M de tampão fosfato de potássio (pH 6,5). A atividade enzimática foi determinada pelo monitoramento da mudança de absorvância em 340 nm de comprimento de onda. A mudança de absorvância foi diretamente proporcional à atividade da GST. A atividade foi apresentada em nkat/mg FW.

2.5. Quantificação de MC-LR nos tecidos foliares de alface e rúcula por LC-MS/MS

A bioacumulação e depuração de MC-LR nos tecidos foliares de alface e rúcula foram investigados pelo método LC-MS/MS. A extração da toxina foi realizada macerando-se, em nitrogênio líquido, 1 g de massa fresca das folhas dos vegetais obtidos a partir de diferentes experimentos (bioacumulação e depuração) até que se transformassem em pó. As amostras foram re-suspensas em água desionizada e sonicadas (15 W e 22,5 KHz, Microson Ultrasonic Cell Disruptor, Misonix, New York, USA) em banho de gelo por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 5 min e o sobrenadante foi filtrado utilizando-se membrana filtrante (DISMIC-13, PTFE) de 0,2 µm de diâmetro de poro (Advantec, Shibuya-ku, Tokyo, Japan). Os filtrados foram então usados para quantificação da MC-LR.

A quantificação da MC-LR foi determinada por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Sequência (LC-MS/MS). Para esta análise foi utilizado o sistema cromatográfico LC-MS/MS com ionização por “eletrospray” (ESI) (Agilent Technologies, Santa Clara CA, EUA), composto pela série de cromatografia líquida 1200, modelo 6420, espectrômetro de massa com triplo quadrupolo (MS/MS). A coluna cromatográfica utilizada foi uma C18 Zorbax Eclipse Plus (3.0 × 100 mm, 3.5 µm, Agilent - USA). As condições de cromatografia líquida e espectrometria de massas foram realizadas de acordo com Hall (2013).

O fator de bioacumulação (BAF) para a MC-LR em alface foi calculado para as diferentes datas de amostragem, utilizando a equação dada abaixo:

$$BAF = MCLR_t / MCLR_{wt} \quad (1)$$

Onde: $MCLR_t$ é o total de MC-LR detectado no tecido foliar de alface, enquanto que a $MCLR_{wt}$ é o total de MC-LR na água.

2.6. Modelo cinético “one-compartment” para a análise da MC-LR

Os resultados experimentais foram expressos como concentração do contaminante, que representa μg de MC-LR por Kg de plantas contaminadas (alface e rúcula), em função do tempo t (days) e C_f ($\mu\text{g}/\text{Kg}$).

Para t de 0 a 7 dias, as plantas foram expostas a (irrigadas com) água contendo MC-LR nas concentrações de 5 e 10 μg por Kg (ou litro) de água, C_w . Para $t > 7$ dias, a exposição à toxina foi interrompida.

Neste estudo foi considerado todo o vegetal como um único compartimento, como no modelo “simple first-order one-compartment” (Gorsuch et al., 1991). Neste caso, a taxa de concentração do contaminante dC_f/dt ($\mu\text{g}/\text{Kg.d}$), isto é, a quantidade de MC-LR (μg) por Kg de vegetais por dia, é dada por $0 < t < 8\text{d}$ por uma equação que descreve o acúmulo e a depuração da toxina, que é:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_u \cdot C_w - k_d \cdot C_f \quad (2)$$

Onde os coeficientes cinéticos k_u (dia^{-1}) e k_d (dia^{-1}) estão associados aos processos de acúmulo e depuração, respectivamente. Eles expressam a “eficiência” do processo correspondente.

Na eq. 2 observou-se que,

$$k_u \cdot C_w \equiv R_u \quad (\mu\text{g}/\text{Kg.d}) \quad (2A)$$

representa a taxa de acúmulo, isto é, a quantidade de MC-LR (μg) transferida para cada kg de alface por dia, e que

$$k_d \cdot C_f \equiv R_d \text{ (}\mu\text{g/Kg.d)} \quad (2B)$$

representa a taxa de depuração, isto é, a quantidade de MC-LR (μg) eliminada por cada Kg de alface por dia.

Com esta notação a eq. 2 é simplesmente

$$\frac{dC_f}{dt} = R_u - R_d \quad (3)$$

que representa o processo de entrada e saída diária, onde dC_f/dt é a taxa de equilíbrio. Enquanto R_u é uma constante, R_d é uma função do tempo.

A solução formal da equação (2) é (de acordo com Lassey, 1980):

$$C_f(t) = \exp[-k_d \cdot t] \int_0^t (k_u \cdot C_w) \cdot \exp(k_d \cdot t') dt' \quad (4)$$

Desde que $k_u \cdot C_w$ é constante, o seguinte é obtido:

$$C_f(t) = \frac{k_u \cdot C_w}{k_d} \cdot [1 - \exp(-k_d \cdot t)] \quad (5)$$

Em caso de prolongamento, a exposição crônica diária para MC-LR ($t > 30$ dias) a saturação é atingida porque:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} C_f(t) = C_{sat} = \frac{k_u \cdot C_w}{k_d} = \frac{R_u}{k_d} \quad (6)$$

C_{sat} , o limite de saturação, é consequência do equilíbrio entre o acúmulo e liberação.

No entanto, em $t > 7$ d as plantas contaminadas com MC-LR (alface) foram irrigadas com água não contaminada por 7 dias, implicando, assim, $R_u = 0$ neste período de tempo.

Portanto, a eq. 2 agora é:

$$\frac{dC_f}{dt}(t) = -k_d \cdot C_f \quad (7)$$

Cuja solução trivial é:

$$C_f(t) = C_f(t_0) \cdot \exp[-k_d \cdot (t - t_0)] \quad (8)$$

No presente estudo, o início do processo de depuração foi $T_0 = 7d$. Neste sentido, $C_f(t_0)$ é a concentração de MC-LR no início desta fase. Útil neste contexto é a meia vida de depuração, que é dada por:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_d \quad (9)$$

Finalmente, a ingestão diária total (ToDI) da MC-LR pelo consumo de 40 g de alface por um adulto pesando 60 Kg ou 10 g por uma criança pesando 25 Kg foi calculada com base na quantidade da toxina bioacumulada no vegetal durante a exposição e na fase experimental de depuração utilizando a equação abaixo:

$$ToDI_{alface} = \frac{MCLR_{40g^{-1}ou\ 10g^{-1}}}{BM_{adulto\ ou\ criança}} \quad (10)$$

Onde: $MCLR_{40g^{-1}ou\ 10g^{-1}}$ é a quantidade de MC-LR acumulada em 40 g ou 10 g de alface, e $BM_{adulto\ ou\ criança}$ é o peso corpóreo de um adulto (60 Kg) ou uma criança (25 Kg).

2.7. Análise estatística

Os dados obtidos a partir dos diferentes experimentos foram submetidos às análises de normalidade e homogeneidade utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Levene's, respectivamente. Diferenças significativas entre os tratamentos nos experimentos de bioacumulação e depuração foram determinadas utilizando o "Student T-test". Além disso, as diferenças significativas nas atividade das enzimas antioxidantes foram determinadas por meio de análise de variância. O teste "Holm-Sidak posthoc" foi utilizado para separar médias

significativamente diferentes. Todas as análises foram realizadas a 5% de nível de significância ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Proteínas totais, produção interna de H_2O_2 e atividade de enzimas antioxidantes

A concentração de proteínas totais de alface e rúcula decaíram em função da exposição às concentrações e tempo de exposição à MC-LR (Figura 1a-b). No entanto, na fase de depuração, o conteúdo de proteínas totais aumentou em algumas plantas expostas à MC-LR. Em alface e rúcula, a produção interna de H_2O_2 aumentou de maneira dependente das concentrações e do tempo de exposição, durante o experimento de bioacumulação (Figura 1c-d). Na fase de depuração em plantas de alface, o H_2O_2 interno variou consideravelmente a partir do dia 1 até o dia 7, aumentando na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ MC-LR, mas diminuindo nas concentrações de 5 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR (Figura 1c). Por outro lado em rúcula, em geral houve uma redução no H_2O_2 interno para todas as concentrações de MC-LR (Figura 1d).

As atividades da GST, SOD, POD e CAT, em ambos os vegetais, foram super-reguladas pelas concentrações de MC-LR durante a fase de bioacumulação (Figuras 1e-f, 2a-f). Na fase de depuração, as atividades enzimáticas, geralmente, foram mais baixas nos tratamentos de 1 e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR. Em contraste, no tratamento de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR, as atividade da maioria das enzimas não apresentaram redução significativa na fase de depuração.

3.2. Biocinética (bioacumulação e depuração) da MC-LR em alface e rúcula

O BAF da MC-LR em folhas de alface nos primeiros 4 dias foi geralmente mais elevado no tratamento de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ do que $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Eq. 1; Figura 3). Contudo, no 7º dia do experimento de bioacumulação o BAF não foi significativamente diferente entre os dois tratamentos. O BAF não foi calculado para a rúcula porque a MC-LR não foi detectada nesse vegetal durante o experimento de bioacumulação. A alface acumulou rapidamente a MC-LR já no 1º dia de exposição da fase de bioacumulação (Figura 4). A quantidade de toxina encontrada no tecido foliar aumentou à medida que aumentaram as concentrações de exposição. A constante de bioacumulação foi de 8,79 e $14,52 \mu\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para os tratamentos de 5 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR, respectivamente. A taxa de bioacumulação de MC-LR em alface foi significativamente diferente ($p < 0,05$) às concentrações de exposição.

Após 7 dias de irrigação com água não contaminada (destilada), o conteúdo de MC-LR nas folhas foi de 1,7% e 25,96% dos valores iniciais bioacumulados para os tratamentos de 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR, respectivamente (Figura 4).

São mostrados na Figura 4 os resultados experimentais de Cf e a concentração de MC-LR em alface em função do tempo. A combinação das equações 5 e 8 a todo o conjunto de dados (0 - 15 dias), para as duas concentrações de exposição (CW igual a 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$), forneceu os coeficientes cinéticos k_u e k_d (Tabela 2).

O período de depuração de MC-LR para alface em todas as concentrações investigadas, geralmente, foi maior que 7 dias (Figura 4). Os valores da constante da taxa de depuração (k_d) foram 0,24 e 0,19 dia^{-1} para os tratamentos de 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR, respectivamente. A taxa de depuração foi significativamente maior ($p < 0.05$) em plantas de alface previamente expostas a MC-LR em concentrações de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ que em 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 1). Alterações nas concentrações durante a irrigação com água não contaminada mostraram que a meia-vida biológica da MC-LR em alface foi de 2,87 e 3,68 dias para os tratamentos de 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR, respectivamente (Tabela 1).

As taxas derivadas de acúmulo e depuração, R_u e R_d (Eqs. 2A e 2B), a concentração de saturação, C_{sat} (Eq. 5) estão na Tabela 2.

3.3. ToDI de MC-LR a partir do consumo de alface contaminada

Os valores de ToDI variaram de 0,002 a 0,02 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para o tratamento de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,029 a 0,07 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para o tratamento de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para um adulto e uma criança durante a fase de bioacumulação (Tabela 3). Os valores foram geralmente mais baixos durante a fase de depuração que na fase de bioacumulação para ambas as concentrações de exposição de MC-LR. Além disso, no 7º dia de depuração devido aos valores bioacumulados de MC-LR serem muito baixos (0,03 $\mu\text{g 40 g}^{-1}$ e 0,002 $\mu\text{g 10 g}^{-1}$) no tecido foliar de alface no tratamento de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, os níveis de ToDI foram abaixo da detecção, enquanto que para o tratamento de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR, os valores foram de 0,02 e 0,008 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para um adulto e uma criança, respectivamente (Tabela 3).

4. Discussão

4.1. Proteínas totais, produção interna de H_2O_2 e atividade de enzimas antioxidantes

A síntese de proteínas em plantas pode ser inibida por diferentes substâncias xenobióticas incluindo as MCs (Marrs, 1996; Chia et al., 2015), o que possivelmente explica a redução concentração-dependente no conteúdo total de proteínas observada em alface e rúcula

após exposição à MC-LR. Espécies reativas de oxigênio (ROS) (exemplo: H_2O_2) são produzidas durante o metabolismo normal das plantas e seus níveis são regulamentados por enzimas específicas. No entanto, substâncias tóxicas são capazes de aumentar a produção de ROS para níveis que podem provocar danos oxidativos nas plantas (Mittler, 2002; Del Río et al., 2006). Portanto, as elevadas concentrações nos níveis internos de H_2O_2 em alface e rúcula expostas à MC-LR são indicativo de alta produção de ROS (Ha e Pflugmacher, 2013) e estresse oxidativo nestes vegetais. Curiosamente, a irrigação das hortaliças com água não contaminada não restaurou completamente os níveis de H_2O_2 aos obtidos nos controles, indicando a necessidade de um período maior de irrigação para que ocorra tal reestabelecimento.

A fim de combater o estresse oxidativo causado por substâncias tóxicas, plantas desenvolveram um sistema de defesa antioxidante eficaz, o qual inclui a supra-regulação de enzimas importantes para eliminar ou converter ROS em formas não-tóxicas (Chen et al., 2004). As enzimas CAT, POD e SOD estão diretamente envolvidas na conversão e eliminação de ROS, tais como H_2O_2 e superóxido (O_2^-) a moléculas não-tóxicas, incluindo a água (Chen et al., 2004; Ha e Pflugmacher, 2013). Isto explica as mais elevadas atividades de SOD, POD e CAT observadas com o aumento da produção de H_2O_2 em alface e rúcula. Estes resultados estão de acordo com os relatados para a alface exposta a MCs (Eraslan et al., 2007). O aumento da atividade da GST em ambos os vegetais durante a fase de bioacumulação, e a diminuição durante a fase de depuração, implica que esta enzima desempenhou um papel importante na desintoxicação da MC-LR. Há evidências de que MCs formam conjugados com glutathione (GSH) por meio de um processo químico que é catalisado pela glutathione-S-transferase (GST) (Pflugmacher et al., 1998; Setliková e Wiegand, 2009; Buratti et al., 2013).

4.2. Modelo biocinético – bioacumulação, saturação e depuração

Considerando cada vegetal como organismo por inteiro, a bioacumulação pode ser descrita com base no que eles consistem em diferentes compartimentos cinéticos. Esses compartimentos podem ou não representar unidades fisiológicas, dependendo do modelo (Adams e Chapman, 2007). Neste estudo, o enfoque foi a folha de alface como um compartimento, porque é a parte consumida por seres humanos. Este modelo de um compartimento (*one-compartment*) é importante para descrever a relação entre a exposição biodinâmica e o acúmulo de compostos xenobióticos, especialmente se absorções de veiculação hídrica puderem ser contabilizadas separadamente (Adams e Chapman, 2007). No

entanto, a capacidade de absorção e acumulação de substâncias xenobióticas varia entre diferentes espécies de plantas (Peuthert et al., 2007; Crush et al., 2008). Isto pode significar que a rúcula é capaz de prevenir a bioacumulação de MC-LR, enquanto o oposto ocorre em alface. A falta de acúmulo da toxina em rúcula implica que provavelmente foi depurada, quimicamente modificada ou desintoxicada metabolicamente pelo vegetal em alguma outra forma que impediu a sua detecção por LC-MS/MS.

A contaminação de plantas da agricultura por água contaminada com cianotoxinas tem levantado várias questões de saúde pública, principalmente por causa de seu potencial de bioacumulação (Cox et al., 2003). Nossos resultados reforçam os de outros estudos sobre a bioacumulação de MCs em alface (Crush et al., 2008; Hereman e Bittencourt-Oliveira, 2012). O potencial de bioacumulação de MC-LR em alface mostrou uma concentração de bioacumulação dependente de MC-LR no vegetal, exceto para o dia 7, quando o BAF não foi significativamente diferente entre as duas concentrações de toxina utilizadas no presente estudo. Tal feito difere do pressuposto de que o BAF é independente das concentrações de exposição, o que significa que os valores deverão permanecer constantes (Adam e Chapman, 2007).

Em concordância com os resultados encontrados no presente estudo, Hereman e Bittencourt-Oliveira (2012), Romero-Oliva et al. (2014) e Liang e Wang (2014) observaram que as taxas de absorção e bioacumulação de MCs foram concentração-dependente em plantas aquáticas e plantas da agricultura no período de 7 a 15 dias de exposição. Especificamente, Hereman e Bittencourt-Oliveira (2012) reportaram uma bioacumulação de 16,8 e 177,8 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de MCs, após irrigação com 6,23 e 12,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MCs, respectivamente. Estes valores são similares aos obtidos no presente estudo (51,20 e 101,09 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de MC-LR) após exposição a 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR, respectivamente. Apesar de irrigação por 5 dias com 1700 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MCs, uma concentração de quase 200 vezes mais elevada do que as utilizadas no presente estudo, Crush et al. (2008) obtiveram 84 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de MCs, que é menor do que os valores acumulados após exposição às concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR.

Estas concentrações e bioacumulação tempo-dependente da MC-LR pode ocorrer porque, assim como outros compostos orgânicos, ela é absorvida principalmente via difusão passiva através das membranas das plantas (Adams e Chapman, 2007). No entanto, o mecanismo exato ainda não foi completamente compreendido em plantas (Hudnell 2008), porém um estudo recente mostrou que a permeabilidade da membrana plasmática de alface e rúcula é afetada por MCs (Cordeiro-Araújo et al., 2015), o que talvez explique porque a maior

concentração de MC-LR resultou em maior absorção e acumulação da toxina. Em concordância com os resultados do presente estudo, Gutiérrez-Praena et al. (2014) observaram que houve absorção de MC-LR em *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomate), no entanto não detectaram a presença da toxina em folhas e frutos após 2 semanas de exposição.

Entretanto, no presente estudo, para períodos prolongados de exposição às concentrações de MC-LR observadas no compartimento de bioacumulação (neste caso, folhas de alface) estes tendem à saturação. Uma simples visualização na Figura 4 sugere a possibilidade de que a concentração de C_f assintoticamente satura a C_{sat} , como previsto pelo modelo cinético “one-compartment” aqui proposto (Eqs. 5 e 6) – Os cálculos resultantes estão na Tabela 2. É interessante notar que as concentrações saturantes são diretamente proporcionais à exposição, C_w , desde que C_{sat} para exposição a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR é aproximadamente duas vezes para a exposição de $5 \mu\text{g/L}$ ($146,8$ e $64,4 \mu\text{g Kg}^{-1}$, respectivamente – Tabela 2). Para folhas de alface, a saturação seria alcançada quando $t \geq 30$ dias, ou seja, para uma exposição ininterrupta durante 30 dias.

Os resultados do presente estudo mostraram, pela primeira vez, que é possível recuperar plantas de alface contaminadas com MC-LR, uma vez que houve uma redução significativa na concentração da toxina ao longo do tempo, quando o vegetal passou a ser irrigado com água não contaminada. O mecanismo de depuração de substâncias xenobióticas incluindo a MC-LR difere entre plantas (Hédouin et al., 2008; Romero-Oliva et al., 2014), o que poderia ser o motivo para a falta de bioacumulação em rúcula, enquanto que a alface eliminou gradualmente a toxina acumulada ao longo do tempo. Similar aos resultados obtidos neste estudo com alface, Romero-Oliva et al. (2014) observaram uma depuração de 30% em *Hydrilla verticillata* L. expostas a uma concentração inicial de MCs de $90 \mu\text{g L}^{-1}$ por 7 dias. De acordo com Liang e Wang (2014), a diminuição na concentração de MCs em diferentes partes de arroz (*Oryza sativa* L.) incluindo as folhas foi devido a um efeito de diluição impulsionado pelo aumento do crescimento e biomassa. No entanto, estes estudos não mostraram a acumulação e depuração de MCs em partes comestíveis de plantas ou vegetais agrícolas. Como foi referido anteriormente, a depuração de MC-LR em alface também pode estar relacionada tanto com o seu metabolismo através de biotransformação pela GST usando GSH (Gutiérrez-Praena et al., 2014) quanto pela sua inacessibilidade para quantificação, como resultado da sua ligação a outras biomoléculas tais como proteínas fosfatases (Suchy e Berry, 2012). Isto é suportado pela supra-regulação da atividade da GST encontrada no presente estudo.

É importante ressaltar que a persistência da toxina após 7 dias de irrigação com água não contaminada em alface previamente exposta a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR também poderia ser explicada pelo aumento das taxas de bioacumulação e redução das taxas de depuração observadas com o aumento das concentrações de exposição (Tabela 1). Além disso, a quantidade de um contaminante em um sistema que se depura exponencialmente pode ser considerada nula após o transcurso de um tempo igual a 10 meias-vidas (Hobbie e Roth 2007). Baseado nestas informações, no presente estudo o bioacumulado de MC-LR em plantas de alface expostas por 7 dias às concentrações de 5 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ precisaria de aproximadamente 29 e 37 dias, respectivamente, de irrigação com água não contaminada para eliminar completamente a toxina dos vegetais. Assim, no caso da alface que precisa de 50 a 70 dias para atingir o período de colheita, a recuperação do vegetal contaminado não será possível se o contaminante (MC-LR) não for detectado nos primeiros 30 dias após a plantação. Esses resultados são muito preocupantes sabendo-se que este é um vegetal amplamente consumido em todo o mundo, e que concentrações de MCs superiores a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ por muitas vezes são detectadas nos corpos d'água (Orihel et al., 2012; Singh et al., 2015).

4.3. Contaminação de MC-LR em alface: potencial implicações para a saúde humana

O consumo de plantas da agricultura contaminadas com MCs tem sido reconhecido como uma rota de exposição humana (Corbel et al., 2014). Os resultados deste estudo mostraram que a bioacumulação de MC-LR em tecidos foliares de alface representa um elevado risco de intoxicação humana a partir do consumo de vegetais contaminados, quando as concentrações de exposição estão dentro da faixa aqui investigada. De fato, os valores de ingestão diária calculada para o consumo de aproximadamente 4 folhas de alface (40 g) foram significativamente mais elevados que o TDI recomendado pela OMS para o peso corporal de um adulto e uma criança (WHO, 2011). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores relatados em alface que variaram de 0,33 a $7,11 \mu\text{g}$ de MCs por refeição, o que representa de 0,005 a $0,118 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso corporal (Hereman e Bittencourt-Oliveira, 2012). No presente estudo, mesmo após a interrupção da irrigação com água contaminada, concentrações significativas da toxina foram detectadas nos tecidos foliares de alface previamente exposta a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR. Entretanto, ao final da fase experimental de depuração, na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ os valores de ToDI da MC-LR por peso corporal foram geralmente mais baixos que o limite de TDI recomendado pela OMS.

5. Conclusões

Os resultados mostraram que a MC-LR alterou a atividade de enzimas antioxidantes de alface e rúcula durante a bioacumulação e depuração da toxina. A interpretação dos dados de alface em razão da biocinética indica que em concentrações de exposição mais elevadas de MC-LR, tanto a bioacumulação quanto a depuração são menos eficientes. A bioacumulação de MC-LR em alface é linearmente proporcional à concentração desta toxina e de forma dependente do tempo, mas monotonicamente saturando-se para 30 dias de exposição contínua. Além disso, a depuração da toxina na alface é menos eficiente em concentrações de exposição mais elevadas, como revelado pela meia-vida calculada na alface ($t_{1/2}$) de 2,9 e 3,7 dias a partir dos tratamentos de 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR, respectivamente. De acordo com o critério de 10 meias-vidas, seriam necessários 29 e 37 dias de irrigação com água não contaminada, respectivamente, para eliminar a toxina do vegetal, mostrando pela primeira vez que é possível recuperar plantas de alface contaminadas com MC-LR.

O consumo de plantas de alface contaminadas com MC-LR representa um elevado risco de intoxicação humana. O teor de toxinas em 4 folhas de alface (40 g), consumidas diariamente, poderia ser significativamente maior do que o limite TDI estabelecido pela OMS por massa corporal de um adulto.

Não foram encontrados níveis detectáveis de MC-LR na rúcula, sugerindo que, apesar da alface gradualmente eliminar as toxinas acumuladas ao longo do tempo, em rúcula é possível que isso ocorra de imediato, o que reforça o conceito de que os mecanismos de depuração de substâncias xenobióticas incluindo a MC-LR diferem entre plantas.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela FAPESP (Proc. 2014/01934-0 e 2013/11306-3), FACEPE (AMD-0186-2.00/13), CNPq (Proc. 303407/2014-0) e CAPES.

Tabela 1. Coeficientes cinéticos para os experimentos de bioacumulação e depuração de MC-LR em modelo *first-order one-compartment*. k_d é a constante da taxa de depuração (dia^{-1}); k_u é a constante da taxa de bioacumulação ($\mu\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$); $t_{1/2}$ é a meia-vida biológica (dias); r^2 é o coeficiente de determinação de análise de regressão. Valores entre parêntesis representam o desvio padrão para $n=3$.

Coeficientes cinéticos	Concentração de exposição ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	5	10	Controle
k_u	8,79 (3,43)	14,52 (1,48)	0
r^2_{ku}	0,87	0,98	0
k_d	0,24 (0,10)	0,19 (0,07)	0
r^2_{kd}	0,88	0,84	0
$t_{1/2}$	2,87	3,68	0

Tabela 2. Parâmetros calculados a partir dos coeficientes cinéticos para bioacumulação e depuração – C_w ($\mu\text{g L}^{-1}$), concentração de MC-LR na água de irrigação. C_{sat} ($\mu\text{g Kg}^{-1}$), limite de saturação da concentração da toxina (eq. 6). R_U ($\mu\text{g Kg}^{-1}\text{d}^{-1}$), taxa de acúmulo (Eq. 2A). R_d ($\mu\text{g Kg}^{-1}\text{d}^{-1}$), taxa de depuração (eq. 2B). Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$).

Coeficientes cinéticos	Concentração de exposição ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	5	10	Controle
C_w ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
C_{sat} ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) ⁽¹⁾	64,40 \pm 15,30	146,80 \pm 22,40	0
R_U ($\mu\text{g/Kg d}^{-1}$) ⁽²⁾	15,45 \pm 5,44	27,90 \pm 4,32	0
R_d ($\mu\text{g/Kg d}^{-1}$) ⁽³⁾	7,43 \pm 2,60	10,67 \pm 2,79	0
Rd (t = 12 d)	5,35 \pm 2,72	7,23 \pm 3,15	0
Rd (t = 15 d)	2,42 \pm 1,57	3,71 \pm 1,22	0

(1) $t \geq 30$ d

(2) t: 0-7 d

(3) t = 8 d

Tabela 3. Estimativa da ingestão diária total (ToDI) baseada na concentração de MC-LR detectada no tecido foliar de alface. Suposição para o consumo de aproximadamente 40 g de alface por dia por um adulto pesando 60 Kg e 10 g por uma criança pesando 25 Kg. BIO é o período experimental de bioacumulação; DEP é o período experimental de depuração; DI é a ingestão diária. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n=3$). Valores em negrito são aqueles que ultrapassaram o limite de ingestão diária total de $0,04 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso corporal d^{-1} recomendado pela OMS.

Ingestão diária de MC-LR após consume de 40 g ou 10 g de folhas de alface									
Tempo de exposição	Irrigação com MC-LR ($5 \mu\text{g L}^{-1}$)				Irrigação com MC-LR ($10 \mu\text{g L}^{-1}$)				
	ToDI alface		ToDI/Adulto	ToDI/Criança	ToDI alface		ToDI/Adulto	ToDI/Criança	
	$\mu\text{g } 40 \text{ g}^{-1}$	$\mu\text{g } 10 \text{ g}^{-1}$	$\mu\text{g Kg}^{-1}$		$\mu\text{g } 40 \text{ g}^{-1}$	$\mu\text{g } 10 \text{ g}^{-1}$	$\mu\text{g Kg}^{-1}$		
Dia 1 - BIO	$1,30 \pm 0,10$	$0,32 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,002$	$0,013 \pm 0,001$	$2,94 \pm 0,59$	$0,74 \pm 0,15$	$0,05 \pm 0,010$	$0,029 \pm 0,009$	
Dia 4 - BIO	$1,59 \pm 0,09$	$0,40 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,001$	$0,016 \pm 0,001$	$3,83 \pm 0,11$	$0,96 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,002$	$0,038 \pm 0,002$	
Dia 7 - BIO	$2,05 \pm 0,21$	$0,51 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,003$	$0,020 \pm 0,002$	$4,04 \pm 0,08$	$1,01 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,001$	$0,040 \pm 0,001$	
Dia 1 - DEP	$1,24 \pm 0,16$	$0,31 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,003$	$0,012 \pm 0,002$	$2,25 \pm 0,08$	$0,56 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,001$	$0,022 \pm 0,001$	
Dia 4 - DEP	$0,89 \pm 0,14$	$0,22 \pm 0,03$	$0,01 \pm 0,002$	$0,009 \pm 0,001$	$1,44 \pm 0,10$	$0,38 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,002$	$0,015 \pm 0,001$	
Dia 7 - DEP	$0,03 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,002$	0,00	0,00	$1,05 \pm 0,23$	$0,20 \pm 0,06$	$0,02 \pm 0,004$	$0,008 \pm 0,002$	

Lista de figuras

Figura 1. Proteínas totas (PT) de alface (a) e rúcula (b), produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) de alface (c) e rúcula (d) e atividade de catalase (CAT) de alface (e) e rúcula (f), durante bioacumulação e depuração de MC-LR. As barras de erro representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$).

Figura 2. Atividade de enzimas antioxidantes no tecido foliar de alface e rúcula durante bioacumulação e depuração de MC-LR. Atividade da peroxidase (POD) em alface (a) e rúcula (b), atividade da superóxido dismutase (SOD) em alface (c) e rúcula (d), e atividade da glutathione S-transferase (GST) em alface (e) e rúcula (f). As barras de erro representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$).

Figura 3. Fator de bioacumulação de MC-LR em plantas de alface após exposição com água contaminada. (*). Média do BAF não significativamente diferente entre os dois tratamentos no dia de amostragem. As barras de erro representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$).

Figura 4. Bioacumulação e depuração de MC-LR em folhas de alface expostas às concentrações de $5 \mu g L^{-1}$ e $10 \mu g L^{-1}$ por 7 dias. O experimento de depuração foi realizado por irrigação das plantas com água destilada (não contaminada com MC-LR). As barras de erro representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$).

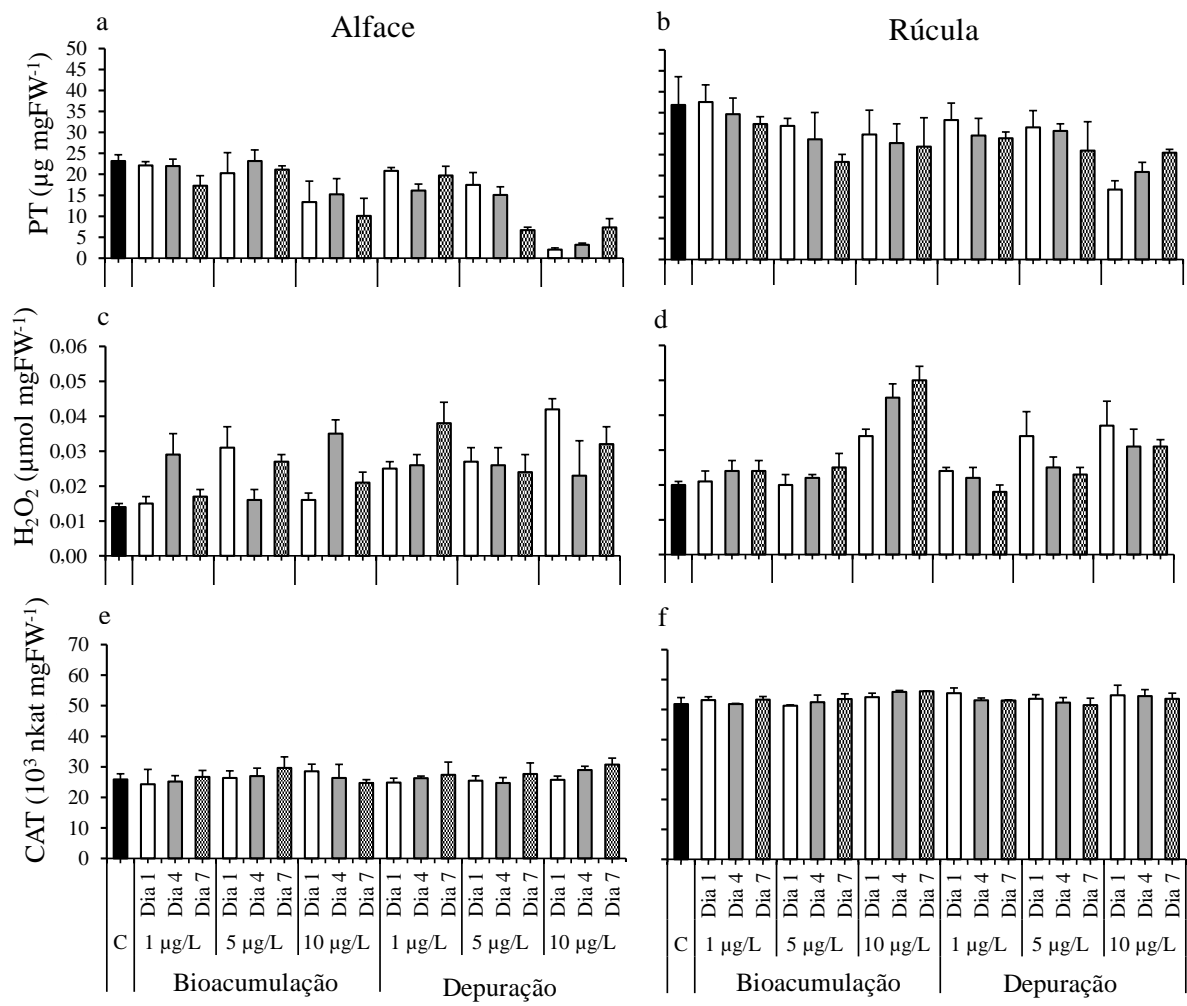


Figura 1. Proteínas totas (PT) de alfaca (a) e rúcula (b), produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) de alfaca (c) e rúcula (d) e atividade de catalase (CAT) de alfaca (e) e rúcula (f), durante bioacumulação e depuração de MC-LR. As barras de erro representam a média ± desvio padrão (*n* = 3).

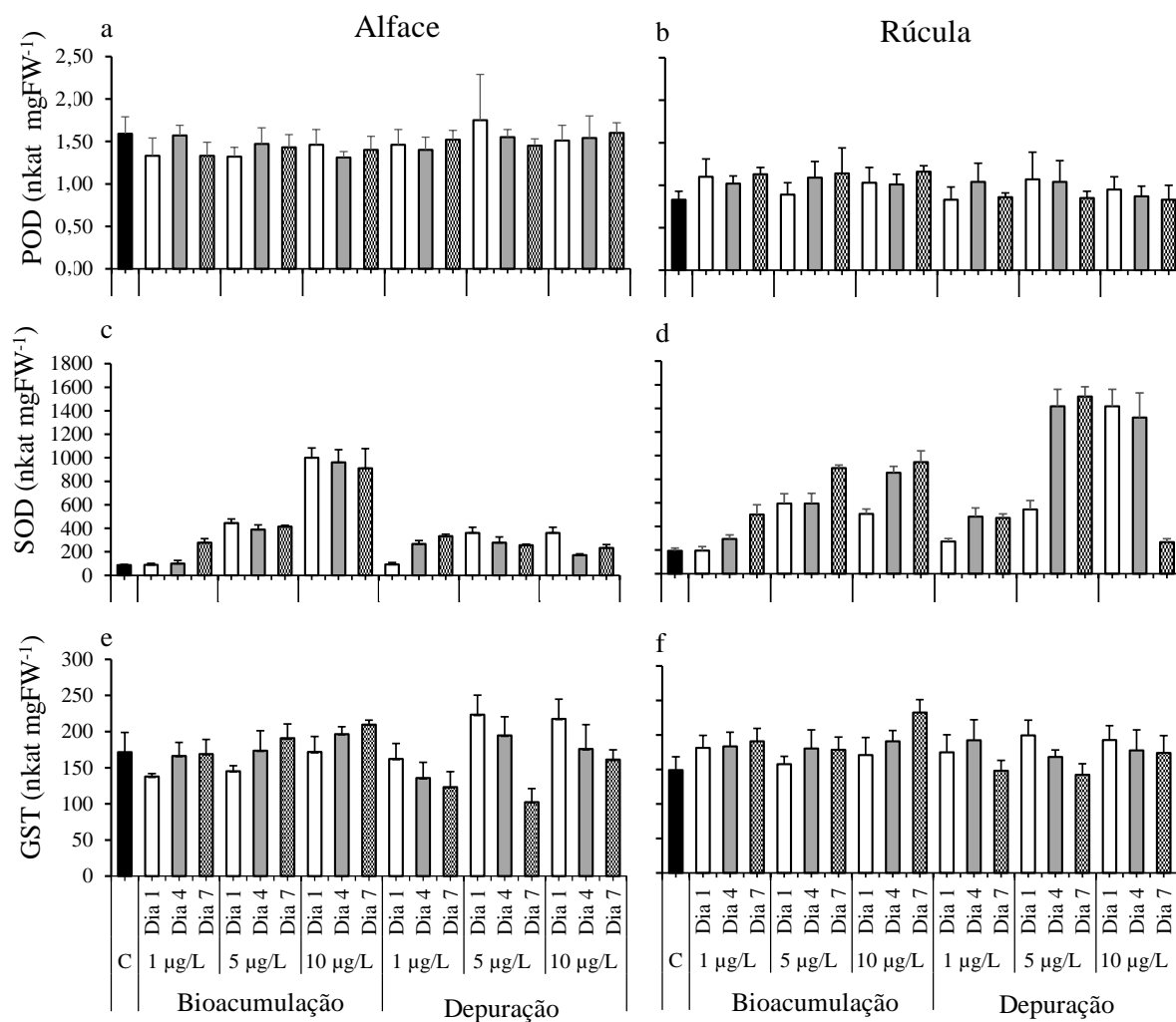


Figura 2. Atividade de enzimas antioxidantes no tecido foliar de alface e rúcula durante bioacumulação e depuração de MC-LR. Atividade da peroxidase (POD) em alface (a) e rúcula (b), atividade da superóxido dismutase (SOD) em alface (c) e rúcula (d), e atividade da glutathiona S-transferase (GST) em alface (e) e rúcula (f). As barras de erro representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$).

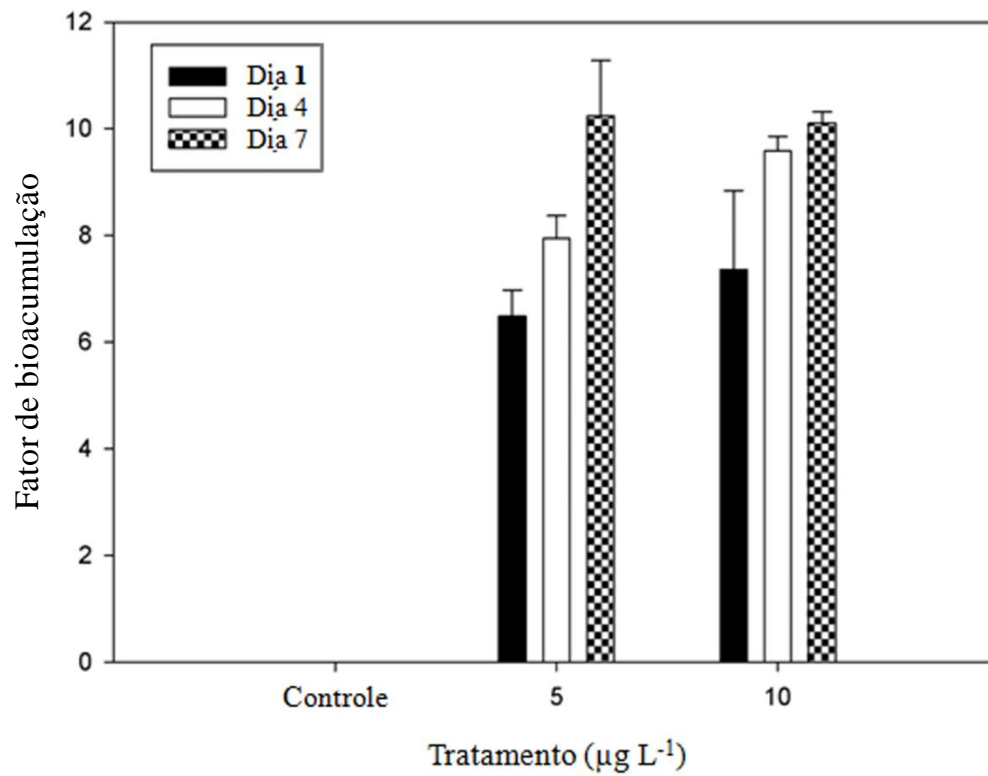


Figura 3. Fator de bioacumulação de MC-LR em plantas de alface após exposição com água contaminada. As barras de erro representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$).

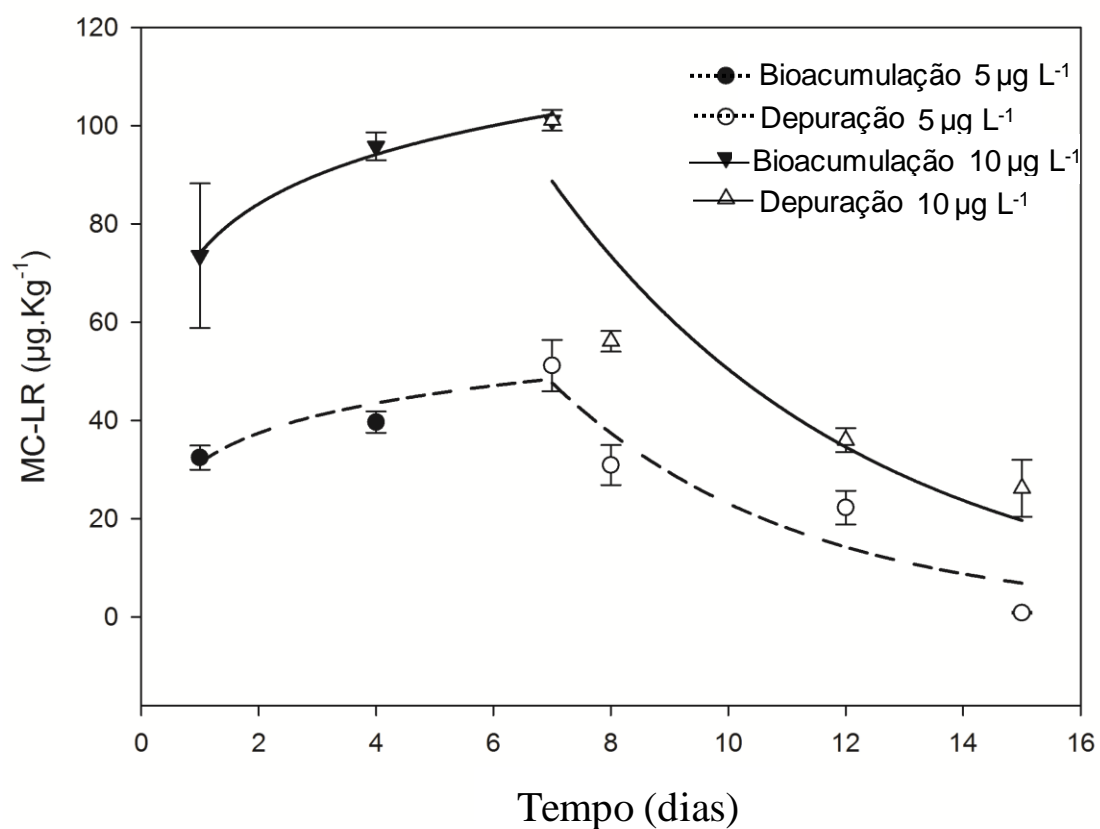


Figura 4. Bioacumulação e depuração de MC-LR em folhas de alface expostas às concentrações de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ por 7 dias. O experimento de depuração foi realizado por irrigação das plantas com água destilada (não contaminada com MC-LR). As barras de erro representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$).

Referências

- Adams WJ, Chapman PM. 2007. Assessing the hazard of metals and inorganic metal substances in aquatic and terrestrial systems. CRC Press, Florida, 184 pp.
- Babica P, Bláha L, Marsalek B. 2006. Exploring the natural role of microcystins – A review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology* 42, 9-20.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Chemistry* 72, 243-254.
- Buratti FM, Scardala S, Funari E, Testai E. 2013. The conjugation of microcystin-RR by human recombinant GSTs and hepatic cytosol. *Toxicology Letters* 219, 231-238.
- Carmichael WW, Falconer IR. 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: Falconer IR, Ed. *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. London, UK: Academic Press, 187–209.
- Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* 109, 663e668.
- Chen J, Song L, Dai J, Gan N, Liu Z. 2004. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon* 43, 393-400.
- Chen J, Han FX, Wang F, Zhang H, Shi Z. 2012. Accumulation and phytotoxicity of microcystin-LR in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 76, 193–199.
- Chia AM, Oniye SJ, Ladan Z, Lado Z, Pila AE, Inekwe VU, Mmerole JU. 2009a. A survey for the presence of microcystins in aquaculture ponds in Zaria, Northern-Nigeria: possible public health implication. *African Journal of Biotechnology* 8, 6282-6289.
- Chia AM, Abolude DS, Ladan Z, Akanbi O, Kalaboms A. 2009b. The presence of microcystins in aquatic ecosystems in Northern Nigeria: Zaria as a case study. *Research Journal of Environmental Toxicology* 3, 170-178.
- Chia AM, Chimdirim PK, Japhet WS. 2015. Lead induced antioxidant response and phenotypic plasticity of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) de Brebisson under different nitrogen conditions. *Journal of Applied Phycology* 27, 293-302.
- Codd GA, Metcalf JS, Beattie KA. 1999. Retention of *Microcystis aeruginosa* and

- microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 37, 1181–1185.
- Corbel S, Mougín C, Bouaicha N. 2014 Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* 96, 1-15.
- Cordeiro-Araújo MK, Chia AM, Hereman TC, Sasaki FF, Bittencourt-Oliveira MC. 2015. Selective membrane permeability and peroxidase activity response of lettuce and arugula irrigated with cyanobacterial-contaminated water. *Environmental Earth Sciences* 74, 1547-1553.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J. 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100, 13.380-13.383.
- Crush JR, Briggs LR, Sprosen JM, Nichols SN. 2008. Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. *Environmental Toxicology* 23, 246–252.
- Del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB. 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* 141, 330-335.
- Eraslan F, Inal A, Savasturk O, Gunes A. 2007. Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturae* 114, 5-10.
- Eriksson JE, Gronberg L, Nygard S, Slotte JP, Meriluoto JAO. 1990. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochemical et Biophysica Acta* 1025, 60-66.
- Ettoumi A, El Khalloufi F, El Ghazali I, Oudra B, Amrani A, Nasri H, Bouaicha N. 2011. Bioaccumulation of cyanobacterial toxins in aquatic organisms and its consequences for public health. In: Kattel G, Ed. *Zooplankton and Phytoplankton: Types, Characteristics and Ecology*. New York: Nova Science Publishers Inc., 1–34.
- Falconer IR, Humpage AR. 1996. Tumour promotion by cyanobacterial toxins. *Phycologia* 35, 74-79.
- Gehring MM, Kewada V, Coates N, Downing TG. 2003. The use of *Lepidium sativum* in a plant bioassay system for the detection of microcystin-LR. *Toxicon* 41, 871-876.
- Gutiérrez-Praena D, Campos A, Azevedo J, Neves J, Freitas M, Guzmán-Guillén R, Cameán AM, Renaut J, Vasconcelos V. 2014. Exposure of *Lycopersicon esculentum* to

- microcystin-LR: effects in the leaf proteome and toxin translocation from water to leaves and fruits. *Toxins* 6, 1837-1854.
- Gorsuch JW, Lowe WR, Lewis MA, Wang W. 1991. *Plants for toxicity assessment: second volume*. Philadelphia: ASTM, 1-401.
- Ha MH, Pflugmacher S. 2013. Phytotoxic effects of the cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a: morphological, physiological and biochemical responses in aquatic macrophyte, *Ceratophyllum demersum*. *Toxicon* 70, 1-8.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130–7139.
- Hall T. 2013. Monitoring for microcystins in raw water supplies reservoirs using the Agilent 6410 triple quadrupole LC/MS. Application Note. Wessex Water Bath, UK.
- Hédouin L, Bustamante P, Fichez R, Warnau M. 2008. The tropical brown alga *Lobophora variegata* as a bioindicator of mining contamination in the New Caledonia lagoon: A field transplantation study. *Marine Environment Research* 66, 438-444.
- Hereman TC, Bittencourt-Oliveira MC. 2012. Bioaccumulation of microcystins in lettuce. *Journal of Phycology* 48, 1535-1537.
- Hobbie RK, Roth BJ. 2007. Intermediate Physics for Medicine and Biology. In: *Biological Physics Series*, third edition (chapter 2). New York: Springer Science, Business Media, LLC, 616 p.
- Hudnell HK. 2008. Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. New York: Springer Science & Business Media, 974 p.
- Ibelings BW, Chorus I. 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: a review. *Environmental Pollution* 150, 177–192.
- Jana S, Choudhuri MA. 1982. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. *Aquatic Botany* 12, 345-354.
- Järvenpää S, Lundberg-Niinistö C, Spoof L, Sjövall O, Tyystjärvi E, Meriluoto J. 2007. Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography–mass spectrometry. *Toxicon* 49, 865-874.
- Johansson LH, Borg LA. 1988. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochemistry* 174, 331–336.
- Kittler K, Schreiner M, Krumbein A, Manzei S, Koch M, Rohn S, Maul R. 2012. Uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in Brassica vegetables. *Food Chemistry* 133, 875-879.

- Kozdęba M, Borowczyk J, Zimoląg E, Wasylewski M, Dziga D, Madeja Z, Drukala J. 2014. Microcystin-LR affects properties of human epidermal skin cells crucial for regenerative processes. *Toxicon* 80, 38-46.
- Lassey KR. 1980. The usage of transfer coefficients to describe radionuclide transport from a cow's diet to its milk. *Health Physics*, 39, 321-325.
- Liang C, Wang W. 2014. Response and recovery of rice (*Oryza sativa*) seedlings to irrigation with microcystin-contaminated water. *Environmental Earth Sciences* doi: 10.1007/s12665-014-3746-z.
- Maejima K, Muraoka T, Park H-D. 2014. Accumulation and inhibitory effects of microcystin on the growth of rice and broccoli. *Korean Journal of Ecology and Environment* 47, 19-30.
- M-Hamvas M, Mathé C, Molnár E, Vasas G, Grigorszky I, Borbely G. 2003. Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L. seedlings. *Aquatic Toxicology* 62, 1-9.
- Mackintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 264, 187-192.
- Marrs KA. 1996. The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 47, 127-58.
- McMichael P. 1994. The global restructuring of agro-food systems. New York: Cornell University Press, 303 p.
- Misra HP, Fridovich I. 1972. The generation of superoxide radical and autoxidation of haemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 247, 6960-6962.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405-410.
- Mitrovic SM, Allis O, Furey A, James KJ. 2005. Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 345-352.
- Mohamed ZA. 2008. Polysaccharides as a protective response against microcystin induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 17, 504-516.

- Orihel DM, Bird DF, Brylinsky M, et al. 2012. High microcystin concentrations occur only at low nitrogen-to-phosphorus ratios in nutrient-rich Canadian lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 69, 1457-1462.
- Peuthert A, Chakrabarti S, Pflugmacher S. 2007. Uptake of microcystins-LR and -LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). *Environmental Toxicology* 22, 436–442.
- Pflugmacher S, Ame V, Wiegand C, Steinberg C. 2001. Cyanobacterial toxins and endotoxins: their origin and their ecophysiological effects in aquatic organisms. *Wasser und Boden* 53, 15–20.
- Pflugmacher S, Wiegand C, Oberemm A, Beattie KA, Krause E, Codd GA, Steinberg CE. 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta* 1425, 527-533.
- Pflugmacher S, Aulhorn M, Grimm B. 2007. Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants. *New Phytologist* 175, 482-489.
- Reddy JK, Suga T, Mannaerts GP, Lazarow PB, Subramani S. 1995. Peroxisomes: biology and role in toxicology and disease. *New York: Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804, 1–795.
- Romero-Oliva CS, Contardo-Jara V, Block T, Pflugmacher S. 2014. Accumulation of microcystin congeners in different aquatic plants and crops – A case study from lake Amatitlán, Guatemala. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 102, 121–128.
- Setliková I, Wiegand C. 2009. Hepatic and branchial glutathione S-transferases of two fish species: Substrate specificity and biotransformation of microcystin-LR. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 149, 515-523.
- Sivonen K, Jones G. 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J. eds. *Toxic cyanobacteria in water: A guide to the Public Health Consequences, Monitoring and Management*. London: J.E and FN Spon, pp. 41-111.
- Singh S, Rai PK, Chau R, Ravi AK, Neilan BA, Asthana RK. 2015. Temporal variations in microcystin-producing cells and microcystin concentrations in two fresh water ponds. *Water Research* 69, 131-142.
- Suchy P, Berry J. 2012. Detection of total microcystin in fish tissues based on Lemieux oxidation and recovery of 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutanoic acid (MMPB) by

- solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC/MS).
International Journal of Environmental Analytical Chemistry 92, 1443-1456.
- Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Döhren H, Börner T, Neilan BA. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. Chemistry and Biology 7, 753–764.
- World Health Organization - WHO. 2011. Cyanobacterial toxins: microcystin-LR. Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, 4th ED, geneva, pp.518.
- Yoshida T, Makita Y, Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, Sekijima M, Tamaru SI, Ueno Y. 1997. Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. Natural Toxins 5, 91-95.
- Zegura B, Sedmak B, Filipic M. 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. Toxicol 41, 41-48.

Manuscrito IV: A ser submetido à revista:



Cilindrospermopsina em alface e rúcula: Acumulação, depuração e os riscos para a saúde humana

Micheline Kézia Cordeiro-Araújo^{1,2}, Mathias Ahii Chia², João Dias de Toledo Arruda-Neto³, Valdemar Luis Tornisielo⁴, Franz Zirena Vilca⁴, Renato José Reis Molica⁵, Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-030, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, São Dimas, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

³Instituto de Física, Universidade de São Paulo, Rua do Matão Travessa R Nr.187, CEP 05508-090 Cidade Universitária, SP, Brasil.

⁴Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Av. Centenário, 303, CEP 13400-970, Piracicaba, SP, Brasil.

5. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Unidade Acadêmica de Garanhuns Av. Bom Pastor S/N, CEP 55292-270, Garanhuns, PE, Brasil.

***Autor para correspondência:** mbitt@usp.br

Abreviações: CYN, Cilindrospermopsina; GST, glutathione S-transferase; POD, peroxidase; CAT, catalase; SOD, superóxido dismutase; H₂O₂, peróxido de hidrogênio; ROS, espécies reativas de oxigênio; LC-MS/MS, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em sequência.

RESUMO

A cilindrospermopsina (CYN) é uma importante toxina produzida por cianobactérias que pode entrar na dieta alimentar humana através do consumo de plantas contaminadas. O objetivo desse estudo foi investigar plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) e rúcula (*Eruca sativa* Mill.) quanto à biocinética da acumulação e depuração de CYN nos tecidos foliares, bem como os efeitos desta toxina sobre o estresse oxidativo nas hortaliças após irrigação com água contaminada. A CYN acumulou de 3,78 a 8,29 µg/Kg em alface e de 5,50 a 11,49 µg/Kg em rúcula. Para a análise cinética da CYN nos períodos de acumulação e depuração nas plantas foi utilizado o modelo *one-compartment kinetic*. De maneira geral, a acumulação ocorreu de forma linear nos tecidos foliares, porém com valores maiores verificados para as menores concentrações aplicadas. Por outro lado, quanto maior a concentração de CYN aplicada, menor a taxa de depuração. As atividades das enzimas catalase, peroxidase, glutathione S-transferase e superóxido dismutase, de maneira geral, aumentaram durante a fase de acumulação e diminuíram durante a depuração da toxina nos vegetais. A formação interna de H₂O₂ em alface e rúcula, geralmente, aumentou de forma dependente do tempo e das concentrações aplicadas em relação ao controle no período de acumulação e reduziu no período de depuração. Pela primeira vez, o tempo de meia vida biológica da CYN no tecido foliar de hortaliças de amplo consumo humano foi analisado e suas consequências apresentadas.

Palavras-chave: Cianotoxinas, Cinética, Contaminação alimentar, Hortaliças, Resposta antioxidante.

1. Introdução

As cianobactérias possuem o potencial de sintetizar diversos metabólitos secundários que apresentam atividades tóxicas ou inibitórias, tornando-se um risco para a saúde humana e animal (Codd et al., 1999a; Metcalf et al., 2004). Dentre alguns desses metabólitos está a cilindrospermopsina (CYN), uma toxina de cianobactérias (cianotoxina) cuja estrutura consiste em um grupo guanidino tricíclico ligado a uma uracila por uma ponte de carbono hidroxilado (Welker, 2008). Em ambientes aquáticos, tais como reservatórios de abastecimento público, lagos, açudes e rios, a ocorrência de florações de cianobactérias pode aumentar as concentrações de cianotoxinas na água, seja pela liberação natural pelas células ou morte celular (Cordeiro-Araújo e Bittencourt-Oliveira, 2013).

Anteriormente, a exposição humana à CYN era atribuída, principalmente, ao contato direto com a toxina, por exemplo, através da prática de natação e esportes aquáticos ou pela utilização de água potável contaminada (Kittler et al., 2012). Entretanto, nos últimos anos, várias cianotoxinas foram investigadas por sua capacidade de entrar na cadeia alimentar humana através do consumo de alimentos advindos de água doce (Saker et al., 2004; Mohamed e Hussein, 2006; Ibelings e Chorus, 2007) ou até mesmo de plantas irrigadas com água contendo estes metabólitos (Codd et al., 1999b; Crush et al., 2008; Mohamed e Al Shehri, 2009; Prieto et al., 2011; Kittler et al., 2012; Hereman e Bittencourt-Oliveira, 2012; Gutiérrez-Praena et al., 2013, 2014). No Brasil, a resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, estabeleceu o nível de padrão de qualidade da água doce destinada à irrigação de hortaliças que o valor máximo de densidade de cianobactérias nesses ambientes deve ser de 20.000 a 50.000 cel/mL (Brasil, 2005). No entanto, a água utilizada para a irrigação de plantas da agricultura diretamente das fontes de abastecimento, sem tratamento prévio, pode representar uma rota importante de contaminação.

Em mamíferos, os efeitos provocados pelo contato com a CYN têm se mostrado genotóxicos e carcinogênicos em estudos com ratos em sistemas *in vitro* (Falconer e Humpage, 2006), demonstrando inibição da síntese da glutatona e proteínas em geral (Runnegar et al., 1994, 1995). Extratos brutos de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju injetados ou administrados por via oral nestes mamíferos podem induzir sintomas patológicos nos rins, baço, timo e coração (Sivonen e Jones, 1999). Entretanto, o alvo principal da CYN em mamíferos é o fígado e em menor escala, os rins e, por isso, é considerada uma hepatotoxina (Falconer et al., 1999; Welker, 2008).

Estudos sobre os efeitos da CYN em plantas são escassos e o que geralmente se observa é, no caso da toxina presente em extratos brutos de cianobactérias, estresse fisiológico e oxidativo (Prieto et al., 2011). Todavia, com a cilindrospermopsina purificada tem se observado além de captação da toxina de 10 % a 21 % nos tecidos foliares após irrigação pela raiz (Kittler et al., 2012), estímulo e inibição na formação de raízes laterais, inibição da diferenciação do xilema em raízes e folhas e alterações na divisão celular (Máthé et al., 2013), além de estresse oxidativo e alterações no conteúdo mineral (Freitas et al., 2015). Além disso, estudos têm demonstrado que uma vez em contato com as plantas, a CYN apresenta diversos efeitos danosos sobre o seu desenvolvimento e atividade enzimática (Metcalf et al., 2004; Bayer et al., 2009; Kinnear, 2010; Máthé et al., 2013; Corbel et al., 2014; Freitas et al., 2015).

Uma vez contaminadas com cianotoxinas, as plantas tendem a aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que pode resultar em danos oxidativos às suas células (Peuthert et al., 2007). Todavia, os vegetais apresentam vias de desintoxicação através de atividades de enzimas antioxidantes como a peroxidase (POD), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) que estão diretamente envolvidas na conversão e eliminação de ROS a moléculas não tóxicas (Chen et al., 2004; Ha e Pflugmacher, 2013) e glutathione S-transferase (GST) que é considerada como um dos primeiros passos da rota de desintoxicação (Pflugmacher et al., 1998).

Estudos sobre o período necessário para se eliminar totalmente tais toxinas do organismo têm sido realizados principalmente em animais aquáticos, em eventos conhecidos por depuração, por estarem naturalmente em contato com as cianotoxinas e bioacumularem em seus tecidos (Ozawa et al., 2003; Soares et al., 2004; Mohamed e Hussein, 2006; Smith e Haney, 2006; Deblois et al., 2008; Garcia et al., 2010). Entretanto, do nosso conhecimento, até o momento não existem estudos sobre o período de depuração de CYN em plantas após acumulação dessa toxina em vegetais da agricultura irrigados com água contaminada. Nesse sentido, estudos sobre desintoxicação de CYN nesses vegetais poderiam auxiliar no esclarecimento sobre o porquê da acumulação ocorrer em diferentes níveis, dependendo da espécie de planta estudada, e da variante de toxina utilizada.

Baseado nessas informações, o objetivo deste estudo foi investigar a alface (*Lactuca sativa* L.) família Asteraceae, e rúcula (*Eruca sativa* Mill.) família Brassicaceae, hortaliças de amplo consumo humano em todo o mundo, quanto à biocinética da acumulação e depuração de CYN purificada nos tecidos foliares, bem como os efeitos desta toxina sobre o estresse oxidativo após irrigação com água contaminada. A hipótese deste estudo é que as plantas de alface e rúcula acumulam CYN após irrigação com água contaminada.

2. Material e Métodos

2.1. Plantas utilizadas

Alface (*Lactuca sativa* L.; cultivar Vanda) e rúcula (*Eruca sativa* Mill.; cultivar Folha Larga) foram obtidas através da IBS MUDAS (Piracicaba-Rio Claro, Brasil) e utilizadas nos experimentos de acumulação e depuração. Os experimentos foram realizados durante as fases de desenvolvimento apropriadas para o consumo humano (período de colheita). Estas fases ocorrem geralmente entre 50 e 70 dias para a alface, e 40 e 60 dias para rúcula. Antes do início dos experimentos, seis mudas de cada espécie foram escolhidas aleatoriamente e analisadas quanto a presença de CYN, utilizando métodos de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em sequência (LC-MS/MS) para confirmar a ausência da toxina nas plantas.

2.2. Acumulação e depuração de CYN em alface e rúcula

Plantas de alface e rúcula com 10 dias de crescimento foram transplantadas para vasos com capacidade de 7 L contendo aproximadamente 3,5 Kg substrato a base de casca de *Pinus* e vermiculita. As plantas foram mantidas em temperatura de 25 ± 2 °C, irradiância aproximada de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 10:14 h (luz:escuro) em casa de vegetação na Universidade de São Paulo, Brasil.

As plantas de alface e rúcula foram irrigadas diariamente com 100 mL com água destilada por 30 e 20 dias, respectivamente. Durante a irrigação, uma solução nutritiva contendo nitrato de cálcio, nitrato de potássio, sulfato de magnésio, ácido bórico, fosfato monoamônico, ferro e coquetel de micronutrientes (Cordeiro-Araújo et al., 2015) foi aplicada nas plantas a cada 3 dias. Trinta (30) e 20 dias após o transplante das plantas de alface e rúcula, respectivamente, iniciou-se a fase experimental de acumulação. Durante esta fase foram aplicadas nas plantas diferentes concentrações de CYN purificada (grau de pureza > 95%, ABRAXIS, LCC, USA) (0,0; 3,0; 5,0 e 10 $\mu\text{g/L}$) durante 7 dias (3 plantas por tratamento). A aplicação da toxina nas folhas das plantas foi realizada manualmente utilizando frascos Erlenmeyers de 150 mL de capacidade contendo 100 mL de água contaminada, permitindo que excesso escorresse para o substrato.

O experimento de depuração foi realizado com as plantas de alface e rúcula anteriormente expostas à CYN, sob as mesmas condições descritas no experimento de acumulação. Após o experimento de acumulação, as plantas de alface e rúcula contaminadas com CYN foram irrigadas com água não contaminada (água destilada) durante 7 dias. Isso representou a fase experimental de depuração. As amostras foram coletadas nos dias 1, 4 e 7

de acumulação e depuração. Todos os experimentos e análises foram realizados em triplicata ($n = 3$). Para cada amostra, discos foliares de 1 cm de diâmetro foram recortados de folhas medianas evitando-se as nervuras centrais com auxílio de um vazador. Os discos foram pesados e utilizado 1 g de peso fresco (FW) de cada amostra e congelados a -80°C até o momento da análise da CYN. O período total de cultivo, incluindo os experimentos de acumulação e depuração foi de 55 e 45 dias para a alface e a rúcula, respectivamente.

2.3. Análise por LC-MS/MS de CYN nos tecidos foliares de alface e rúcula

A acumulação e depuração de CYN nos tecidos foliares de alface e rúcula foram investigadas pelo método de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em sequência (LC-MS/MS). A extração da toxina foi realizada de acordo com Hereman e Bittencourt-Oliveira (2012). Brevemente, 1 g de massa fresca (previamente congelada) de folhas dos vegetais obtidos a partir dos diferentes experimentos de acumulação e depuração foi macerada em nitrogênio líquido até que se transformasse em pó. As amostras foram resuspensas em água desionizada e sonicadas (15 W e 22,5 KHz, Microson Ultrasonic Cell Disruptor, Misonix, New York, USA) em banho de gelo por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 5 min e o sobrenadante foi filtrado utilizando-se de membrana filtrante (DISMIC-13, PTFE) de 0,2 μm de diâmetro de poro (Advantec, Shibuya-ku, Tokyo, Japan). Os filtrados foram utilizados para a quantificação da CYN.

A quantificação da CYN foi determinada por LC-MS/MS. Para esta análise foi utilizado o sistema cromatográfico LC-MS/MS com ionização por “eletrospray” (ESI) (Agilent Technologies, Santa Clara CA, EUA), composto pela série de cromatografia líquida 1200, modelo 6410, espectrômetro de massa com triplo quadrupolo (MS/MS). A coluna utilizada foi uma C18 Zorbax Eclipse Plus (2.1×150 mm, 3,5 μm , Agilent - USA). As condições de cromatografia líquida foram: temperatura da coluna = 30°C ; volume de injeção = 20 μL ; fluxo = 0,2 mL/min; tempo de corrida = 5 min; fase móvel: A = 1 % metanol em água + 5mM acetato de amônio e B = 60 % de metanol em água + 5mM acetato de amônio. As condições do MS foram: temperatura gasosa = 300°C ; fluxo gasoso = 10 mL/min; pressão do nebulizador = 40 psi; voltagem $V_{\text{cap}} = 4000\text{v}$. O *processor ion* da CYN foi 416 tendo como íons produto 194 e 176. O tempo de saída foi de 2.6 min.

2.4. Espécies reativas de oxigênio: produção interna de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O conteúdo intracelular de H_2O_2 foi extraído macerando-se 300 mg de folha de cada planta em nitrogênio líquido. Em seguida, o pó resultante foi homogeneizado em 3 mL de

tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5). O material homogeneizado foi centrifugado a 10,000 g em temperatura de 0 °C por 10 min, e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação do H₂O₂. A análise da produção intracelular de H₂O₂ foi realizada de acordo com Jana e Choudhuri (1982). A mistura da reação conteve 400 µL de sobrenadante e 133 µL de cloreto de titanium a 0,1% em H₂SO₄ a 20% (v/v). Um minuto após a incubação, a densidade óptica da mistura foi medida no comprimento de onda 410 nm, e utilizado o coeficiente de extinção de 0,28 L mmol⁻¹ cm⁻¹ para quantificar o conteúdo de H₂O₂ (µmol/mg).

2.5. Atividade de enzimas antioxidantes

Para a extração de proteínas totais (PT) dos ensaios de atividade enzimática utilizou-se tampão fosfato 0,1 M (pH=6,5) contendo 1% de polivinil pirrolidona (PVP) (w/v). À 300 mg de massa fresca das hortaliças foi adicionado 6 mL do tampão e macerada com nitrogênio líquido em banho de gelo. A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com Bradford (1976) utilizando como padrão albumina de soro bovino (BSA).

A atividade da catalase (CAT) de amostras das hortaliças foi realizada utilizando a sua função peroxidativa (Johansson e Borg, 1988). Para tanto, 250 µL de tampão fosfato de potássio (25 mM, pH 7,0) foi incubado com 250 µL de metanol e 50 µL de peróxido de hidrogênio (0,27% v/v). A reação foi iniciada pela adição de 500 µL da amostra enzimática em uma incubadora “shaker” (temperatura de 20 °C) com agitação contínua. Após 20 minutos, a reação foi parada pela adição de 250 µL de hidróxido de potássio 7,8 M. Logo em seguida foram adicionados 500 µL de “purpald” 34,2 mM (4-Amino-3-hydrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazol) em 480 mM de HCl, e a reação mista incubada por 10 minutos na incubadora “shaker” com agitação contínua. A adição de 250 µL de periodato de potássio 65,2 mM produziu uma coloração roxa que foi lida em espectrofotômetro a 550 nm. Uma unidade (U) de CAT foi definida como quantidade de enzima que causou a formação de 200 µM de formaldeído sob as condições de ensaio especificadas acima. A atividade da CAT foi expressa em nkat/mg de peso fresco (FW).

A atividade da peroxidase (POD) foi analisada de acordo com Reddy et al. (1995). Para tanto, 3 mL de solução de pirogallol (0,05 M em 0,1 M de tampão fosfato, pH 6,5) e 0,5 mL de H₂O₂ a 1% foram misturados em uma cubeta, sendo a reação iniciada pela adição de 0,05 mL do extrato enzimático. A mudança na absorbância por minuto foi proporcional à atividade da enzima. A atividade da POD foi apresentada em nkat/mgFW.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada espectrofotometricamente de acordo com Misra e Fridovich (1972). O meio de incubação conteve um volume final de 3

mL, dos quais foram constituídos por tampão fosfato de potássio 6,7 mM (pH 7,8), metionina 45 µM, riboflavina 0,53 mM e NBT 84 µM. A quantidade de homogenato adicionado ao meio de incubação foi mantida abaixo de uma unidade de enzima suficiente para garantir a precisão. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que forneceu uma inibição de 50% da redução do NBT. A atividade da SOD foi apresentada em nkat/mg FW.

O ensaio da atividade da glutathione S-transferase (GST) foi realizado através do modelo padrão de substrato 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (Habig et al., 1974). A ação foi iniciada pela adição de 100 µL de extrato enzimático a 2 mL de reação mista contendo 3,6 mM de glutathione reduzida e 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno em 0,1 M de tampão fosfato de potássio (pH 6,5). A atividade enzimática foi determinada pelo monitoramento da mudança de absorbância em 340 nm de comprimento de onda. A mudança de absorbância foi diretamente proporcional à atividade da GST. A atividade foi apresentada em nkat/mg FW.

2.6. Coeficientes biocinéticos da CYN

A constante da taxa de acumulação, depuração e meia-vida biológica da CYN foi calculada utilizando um *simple first-order one compartment model* (Gorsuch et al., 1991). A equação que descreve a acumulação e depuração da toxina é dada abaixo:

$$dC_f/dt = k_u C_w - k_d C_f \quad (1)$$

onde: k_u ($\mu\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) é a constante da taxa de acumulação, k_d (day^{-1}) é a constante da taxa de depuração, C_w ($\mu\text{g L}^{-1}$) é a concentração de MC-LR na água, e C_f é a concentração de CYN no tecido foliar.

Após irrigação dos vegetais por 7 dias com água destilada, a constante da taxa de depuração k_d foi derivada a partir do declive da equação de depuração “first-order”:

$$dC_f/dt = -k_d C_f \quad (2)$$

A integrada da equação (3) forneceu:

$$\ln C_f(t) = \ln C_f(0) - k_d t, \quad (3)$$

onde: $C_f(t)$ é a concentração da toxina no tecido foliar no tempo t , $C_f(0)$ é a concentração de CYN no início da fase de depuração, e t é o tempo (dia).

$$t_{1/2} = \ln 2/k_d \quad (4)$$

2.7. Análise dos dados

Os dados experimentais foram submetidos às análises de normalidade e homogeneidade utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Levene's, respectivamente. Diferenças significativas entre os tratamentos nos experimentos de acumulação e depuração foram determinadas utilizando o "Student T-test". Além disso, as diferenças significativas na atividade das enzimas antioxidantes foram determinadas por meio de análise de variância (ANOVA dois critérios). O teste "Holm-Sidak posthoc" foi utilizado para separar médias significativamente diferentes. Todas as análises foram realizadas a 5% de significância ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Acumulação de CYN em alface e rúcula

Os resultados de acumulação de CYN no tecido foliar de alface mostraram que para a menor concentração experimental utilizada (3 $\mu\text{g/L}$) houve um padrão de aumento no acúmulo da toxina do 1º ao 7º dia (5,72 a 8,29 $\mu\text{g/Kg}$) (Figura 1a). Contudo, este padrão não se repetiu para as concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/L}$, nas quais houve um decréscimo gradual nos tecidos foliares do do 1º ao 7º dia (6,02 a 4,19 $\mu\text{g/Kg}$ e 3,92 a 3,78 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente) (Figura 1a). De maneira geral, nos tecidos foliares de alface, quanto maior a dose aplicada menor a concentração acumulada no vegetal. Dessa forma, houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos e o tempo de aplicação da toxina ($p < 0,05$).

Por outro lado, em rúcula, houve aumento gradual de acúmulo da CYN nos tecidos foliares de acordo com o tempo para todas as concentrações aplicadas (Figura 1b). Entretanto, quanto maior a dose aplicada menor a concentração acumulada no vegetal, na qual para a concentração de 3 $\mu\text{g/L}$ do dia 1 ao dia 7 o acúmulo variou de 7,38 a 11,49 $\mu\text{g/Kg}$, de 5,70 a 10,41 $\mu\text{g/Kg}$ para 5 $\mu\text{g/L}$ e 5,50 a 9,47 $\mu\text{g/Kg}$ para a concentração aplicada de 10 $\mu\text{g/Kg}$ (Figura 1b). Em rúcula houve interação significativa entre o tempo de aplicação da toxina e os tratamentos utilizados ($p < 0,05$).

Em geral, a análise cinética da CYN nos tecidos foliares da alface mostrou que a constante da taxa de acumulação (ku) da toxina variou de -0,08 a 1,63 (Tabela 1), enquanto que para a rúcula foi de 1,76 a 2,11 (Tabela 1).

3.2. Depuração de CYN em alface e rúcula

A depuração da CYN no tecido foliar de alface variou de acordo com os tratamentos aplicados. Após irrigação das plantas com a concentração de 3 $\mu\text{g/L}$, observou-se que do último dia de acumulação para o último dia do experimento de depuração a toxina apresentou depuração total de 60,68 % (Figura 1a). Porém, desse total depurado, 52,96 % ocorreu nas primeiras 24 h, mantendo-se estável durante o restante do experimento de depuração. Dessa forma, do dia 1 até o dia 7 houve depuração de apenas 16,44 % (Figura 1a). Para o tratamento de 5 $\mu\text{g/L}$, observou-se que do último dia de acumulação para o último dia de depuração a CYN apresentou depuração total de 22,91 %, sendo que desse total depurado, 30,91 % ocorreu nas primeiras 24 h (Figura 1a). Durante o período de depuração desta concentração aplicada do dia 1 ao dia 7 houve um aumento de 10,62 % da CYN nas folhas de alface. Já para o tratamento de 10 $\mu\text{g/L}$, houve depuração total de 18,52 %. Desse total depurado, 14,29 % ocorreu nas primeiras 24 h e do dia 1 ao dia 7 apenas 4,94 % da CYN foi depurado (Figura 1a). Confirmando este resultado, não houve diferença significativa do dia 1 ao dia 7 de depuração ($p>0,05$). Além disso, em geral, quanto maior a concentração de CYN aplicada, menor a degradação da toxina no tecido foliar, conseqüentemente, maior a retenção da toxina.

Na rúcula, a depuração da CYN no tecido foliar também variou de acordo com os tratamentos e, de forma semelhante à alface, quanto maior a concentração de CYN aplicada, menor foi a degradação da toxina no tecido foliar. Do último dia de acumulação para o último dia do experimento de depuração, após irrigação das plantas com os diferentes tratamentos houve depuração total nos tecidos foliares de 47 % (após irrigação com 3 $\mu\text{g/L}$), 46,21 % (5 $\mu\text{g/L}$) e 27,67 % (10 $\mu\text{g/L}$) (Figura 1b). Do total depurado, 31,68 % (após irrigação com 3 $\mu\text{g/L}$), 39,77 % (5 $\mu\text{g/L}$) e 2,11 % (10 $\mu\text{g/L}$) ocorreram nas primeiras 24 h do experimento de depuração (Figura 1b). Em rúcula houve diferenças significativas entre o tempo de aplicação da toxina e os diferentes tratamentos ($p<0,05$).

A constante da taxa de depuração (kd) da CYN nos tecidos foliares da alface variou de $<0,001$ a 0,02 e a meia vida biológica ($t_{1/2}$) de 34,66 a >1000 dias (Tabela 1). No caso da rúcula o kd variou de 0,01 a 0,06 e a $t_{1/2}$ de 11,55 a 69,31 dias (Tabela 1).

3.3. Proteínas totais, formação interna de H₂O₂ e atividades de enzimas antioxidantes

As concentrações de proteínas totais de alface e rúcula, de maneira geral, declinaram em relação ao controle em função da exposição à CYN (Figura 2a-b). Entretanto, no último dia da fase experimental de depuração, enquanto que na alface havia uma recuperação nas concentrações de proteínas totais (Figura 2a), na rúcula o declínio acentuou-se (Figura 2b). A formação interna de H₂O₂ em alface e rúcula, geralmente, aumentou de forma dependente do tempo e das concentrações aplicadas em relação ao controle no período de acumulação (Figura 2c-d). Durante a fase de depuração, de maneira geral, ocorreu uma inversão na formação interna de H₂O₂, na qual do dia 1 ao 7 houve aumento gradual para as plantas irrigadas com o tratamento de 3 µg/L e redução para os tratamentos de 5 e 10 µg/L, respectivamente (Figura 2c-d).

As atividades de CAT, POD e SOD em ambos os vegetais foram geralmente reguladas em resposta ao aumento gradual das concentrações de CYN ao longo do tempo durante os experimentos de acumulação (Figura 2e-f; figura 3a-d). Em contraste, durante o período de depuração houve variação na atividade destas enzimas, as quais apresentaram, em sua maioria, redução gradual do dia 1 ao dia 7 de experimento (Figura 2e-f; figura 3a-d). A atividade da GST em alface durante o experimento de acumulação, com exceção da concentração de 10 µg/L do dia 7, apresentou redução gradual do dia 1 ao dia 7 (Figura 3e), mantendo-se o mesmo padrão no período de depuração, exceto para a concentração de 10 µg/L do dia 4 (Figura 3e). Já em rúcula, para as concentrações de 3 e 5 µg/L as maiores atividades da GST foram observadas no início do experimento de acumulação, em contraste com a concentração de 10 µg/L, a qual apresentou maior atividade no dia 7 (Figura 3f). Na fase de depuração, exceto para a concentração de 3 µg/L, houve tendência de aumento na atividade da enzima do dia 1 ao dia 7 (Figura 3f).

4. Discussão

4.1. Acumulação e depuração de CYN em alface e rúcula

Plantas de alface e rúcula apresentaram um padrão de acúmulo concentração-dependente durante a fase experimental de acumulação. Kittler et al. (2012) após irrigação de *Brassica* com concentrações de CYN variando de 18 a 35 µg/L observaram uma significativa captação nas folhas após irrigação pela raiz (10 a 21% do total aplicado). Isso reforça que plantas irrigadas com água contaminada com CYN podem representar uma fonte significativa desta toxina na cadeia alimentar. Neste estudo avaliamos o tempo de depuração de CYN em

alface e rúcula e demonstramos que a toxina persistiu no tecido foliar após 7 dias da última irrigação com a toxina.

A CYN é uma importante inibidora de síntese proteica, porém o seu exato mecanismo de ação ainda não é elucidado e até o momento, existe pouca informação disponível sobre a sua estabilidade e degradação (Welker, 2008). Em plantas de alface e rúcula, as menores concentrações aplicadas (3 e 5 µg/L) foram as responsáveis pelas maiores taxas de acúmulo nos tecidos foliares (Figura 1 a-b). Interessantemente, durante os experimentos de depuração da toxina nas hortaliças, verificou-se que de maneira geral do total depurado a maior parte ocorreu nas primeiras 24 h (Figura 1 a-b). Após esse período houve uma reduzida taxa de depuração prolongando significativamente o tempo de retenção da toxina nestes vegetais. Isso pode significar que a CYN uma vez acumulada nos tecidos das plantas apresenta uma alta afinidade pela matriz vegetal, resultados esses que corroboram com as variações nas atividades enzimáticas e respostas antioxidantes observadas.

Sabendo-se que a quantidade de um contaminante num sistema que se depura exponencialmente pode ser considerada nula após um transcurso de 10 meias vidas (Hobbie e Roth, 2007) e, baseando-se no cálculo do tempo de meia vida biológica da CYN nos tecidos foliares de alface e rúcula (Tabela 1), este estudo demonstrou que em tempo hábil de colheita dessas hortaliças (40 - 60 dias para a rúcula e 50 - 70 dias para a alface) não seria possível eliminar a toxina dos tecidos foliares. Isso significa que uma vez contaminadas com CYN, as plantas de alface e rúcula caso consumidas, seriam uma importante fonte de contaminação alimentar humana por esta hepatotoxina. Assumindo que uma pessoa adulta consome diariamente por refeição aproximadamente 40 g de hortaliças, esta poderia consumir de 0,157 a 0,332 µg de CYN em 40 g de alface e/ou 0,220 a 0,460 µg de CYN em 40 g de rúcula (Tabela 2). No Brasil, a resolução 357 do CONAMA (Brasil, 2005) que adverte quanto ao limite máximo de células de cianobactérias na água de abastecimento público (20.000 cel/mL) é seguida pelos órgãos responsáveis pelo manejo e fiscalização de qualidade da água. Contudo, não existe qualquer tipo de fiscalização ou regimento sobre a análise quanto a presença de cianotoxinas na água utilizada para a irrigação de plantas da agricultura ou análise dos vegetais quanto à presença dessas toxinas em seus tecidos.

4.2. Proteínas totais, formação interna de H₂O₂ e atividades de enzimas antioxidantes

Plantas vasculares podem apresentar respostas diferenciadas de estímulo ou inibição em relação à síntese proteica e crescimento, quando em contato com substâncias xenobióticas como as cianotoxinas (Marrs et al., 1996; Metcalf et al., 2004 Freitas et al., 2015; Garda et al.,

2015). Tais diferenciações poderiam explicar os efeitos inibitórios observados no conteúdo de proteínas totais tanto em alface quanto em rúcula, após irrigação com CYN (Figura 2a-b). De acordo com Metcalf et al. (2004), em plantas de *Nicotiana tabacum* cv Samsun NN, a irrigação com 5 a 1000 µg/mL de CYN inibiu a germinação de pólen e síntese proteica. Contudo, segundo estes autores, embora a CYN tenha inibido a incorporação de ¹⁴C-leucina na proteína das plantas, isso não significa necessariamente que a inibição da germinação de pólen pela toxina seja um resultado direto da inibição da síntese de proteínas. Substâncias xenobióticas podem ocasionar estresse oxidativo em plantas, que por sua vez alteram a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como medidas para o reestabelecimento do equilíbrio celular (Mittler, 2002). As ROS são produzidas durante o metabolismo normal das plantas, sendo responsáveis por danos oxidativos e, conseqüentemente, por estresse nesses organismos (Del Río et al., 2006). As alterações na sua produção são reguladas por algumas enzimas envolvidas no sistema de desintoxicação (Chen et al., 2004; Saqrane et al., 2007; Cordeiro-Araújo et al., 2015). Nesse sentido, os aumentos na formação interna de H₂O₂ durante o período de acumulação de CYN em alface e rúcula são indicativos do aumento da produção de ROS (Figura 2c-d). Conseqüentemente, a redução observada durante o período de depuração de CYN nestas plantas indicou a busca pelo reestabelecimento do equilíbrio celular mediante estresse (Figura 2c-d).

Para impedir os danos de estresse oxidativo ocasionados por substâncias xenobióticas, plantas apresentam um sistema de defesa antioxidante, que inclui a regulação de algumas enzimas importantes que podem converter as ROS em formas menos tóxicas e possíveis de serem eliminadas mais facilmente (Chen et al., 2004). Enzimas como SOD, CAT e POD estão envolvidas na conversão e eliminação de espécies reativas de oxigênio como H₂O₂ a moléculas não tóxicas como H₂O (Chen et al., 2004; Ha e Pflugmacher, 2013). Isto poderia explicar as variações observadas nas atividades de SOD, CAT e POD durante o período de acumulação e depuração de CYN em alface e rúcula, concomitante às variações na formação interna de H₂O₂.

A GST é uma proteína predominantemente expressa no citosol, onde as suas funções catalíticas incluem a conjugação e resultam na desintoxicação de herbicidas, redução de hidroperóxidos orgânicos formados durante o estresse oxidativo, etc (Dixon et al., 2002). Para a microcistina-LR (MC-LR), outra hepatoxina, há evidências de que esta formaria conjugados com a glutathione (GSH) através de processos químicos catalisados pela GST, a qual estaria envolvida no processo de biotransformação da MC-LR (Pflugmacher et al., 1998). Em estudo sobre os efeitos de CYN e MCs sobre o estresse oxidativo em plantas de alface, Freitas et al.

(2015) observaram que tanto folhas quanto raízes das plantas apresentaram aumento na atividade da GST após exposição a estas toxinas isoladas (CYN ou MCs) ou misturadas (CYN/MCs). De forma similar, Prieto et al. (2011) ao avaliarem os efeitos da CYN sobre a resposta antioxidante em plantas de arroz demonstraram que esta toxina pode aumentar o estresse oxidativo nessas plantas elevando as atividades da GST e da glutathione peroxidase (GPx). No entanto, no presente estudo, os resultados com CYN indicaram que em alface e rúcula a atividade da GST foi inicialmente inibida durante o período de acumulação, estimulada no final deste período (dia 7) e novamente estimulada durante a fase de depuração da toxina. Isso poderia implicar que a GST não esteve inicialmente envolvida na biotransformação da CYN em conjugados menos tóxicos, ou que as concentrações utilizadas inibiram a sua atividade recuperando-se apenas no final do experimento. Uma vez que a inibição da GST não ocorreu de forma homogênea nos experimentos de acumulação, e que houve aumento da atividade desta enzima durante o experimento de depuração, isso aponta para a necessidade de mais estudos sobre a biotransformação e desintoxicação da CYN em plantas.

5. Conclusão

A irrigação de plantas da agricultura com água contaminada com CYN representa riscos consideráveis para a saúde alimentar humana, uma vez que ficou comprovada a capacidade de acumulação da toxina nos tecidos foliares das hortaliças investigadas. Além disso, o período necessário para desintoxicação das plantas caso a contaminação fosse descoberta durante o plantio ultrapassaria o período de colheita, tornando-se inviável a sua recuperação. Isso reforça a necessidade de políticas públicas que fiscalizem as águas destinadas à irrigação de plantas da agricultura. Baseado nos nossos resultados, se a água utilizada para a irrigação de plantas da agricultura contiver CYN em concentrações que geralmente são encontradas nestes ambientes pode haver contaminação destes vegetais e consequentes riscos para a saúde humana. Além disso, a CYN induz respostas ao estresse oxidativo em plantas de alface e rúcula.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela FAPESP (Proc. 2014/01934-0 e 2013/11306-3), FACEPE (AMD-0186-2.00/13), CNPq (Proc. 303407/2014-0) e CAPES.

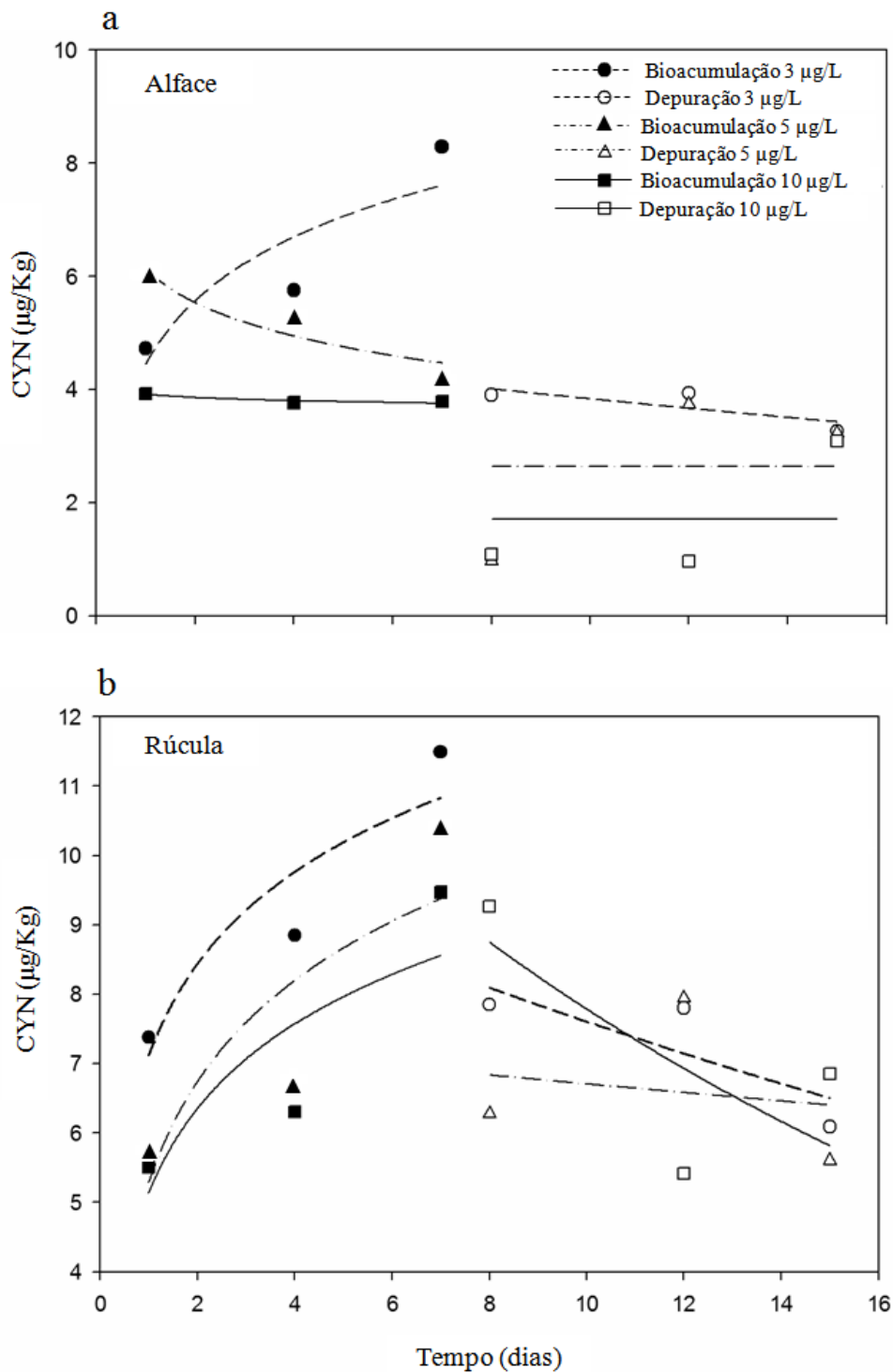


Figura 1. Acumulação e depuração de CYN em folhas de alface (a) e rúcula (b) expostas às concentrações de 3, 5 e 10 $\mu\text{g/L}$ por 7 dias. O experimento de depuração foi realizado por irrigação das plantas com água destilada (não contaminada com CYN). As barras de erro representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$).

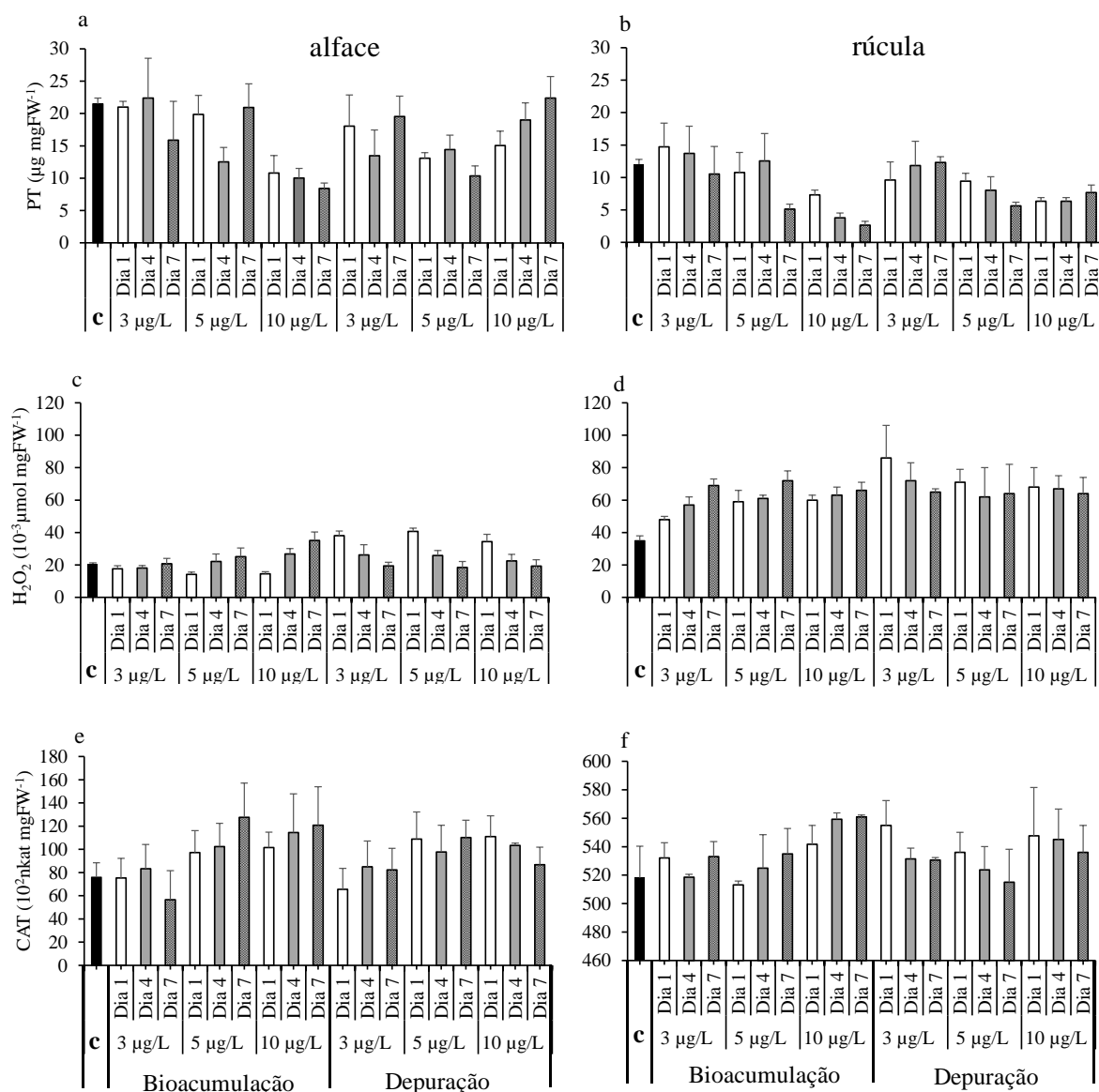


Figura 2. Proteínas totais (PT) de alfaca (a) e rúcula (b), produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) de alfaca (c) e rúcula (d) e atividade de catalase (CAT) de alfaca (e) e rúcula (f), durante acumulação e depuração de CYN; (C) controle. As barras de erro representam a média ± desvio padrão (*n* = 3).

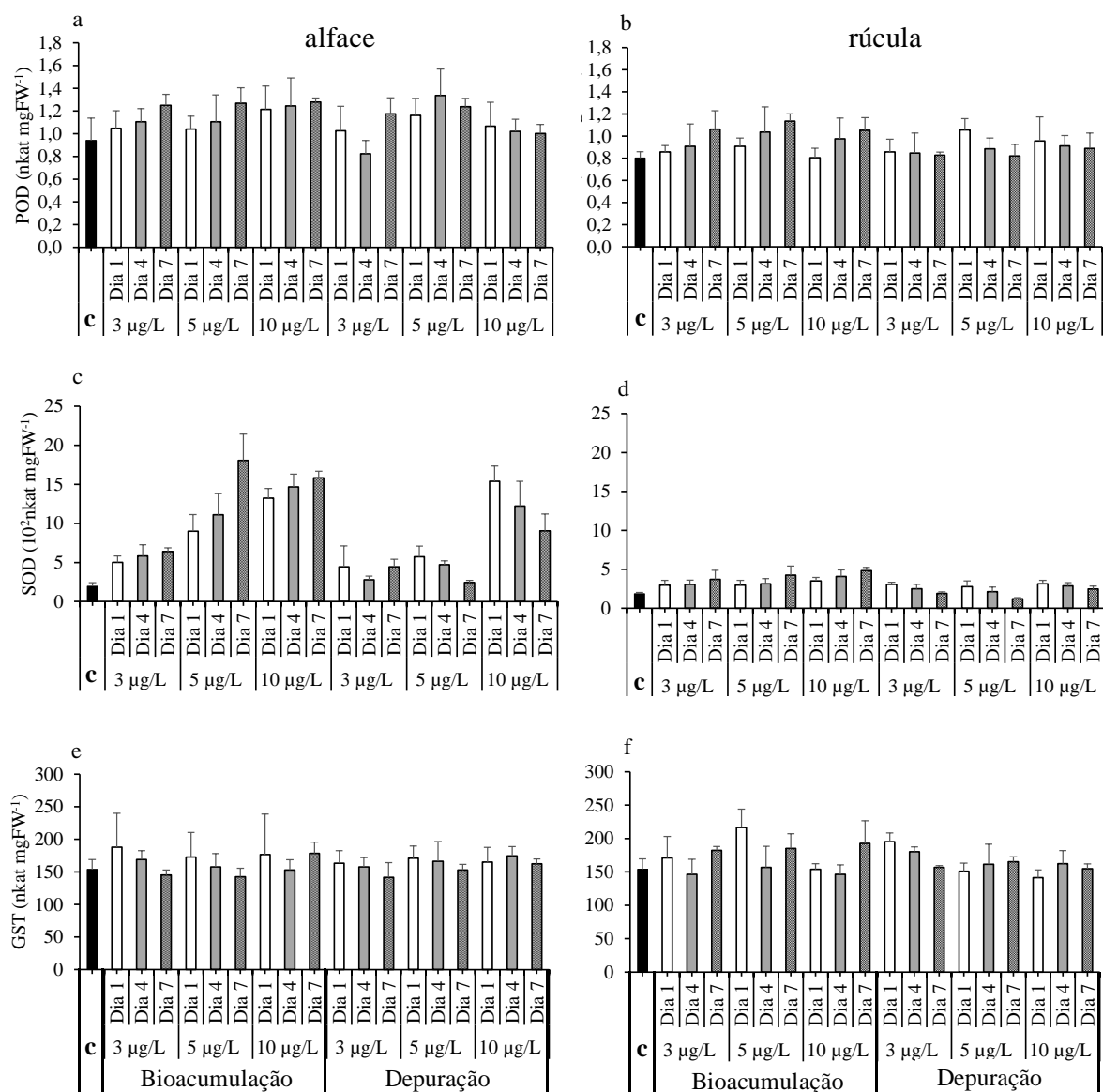


Figura 3. Atividade de enzimas antioxidantes no tecido foliar de alface e rúcula durante acumulação e depuração de CYN. Atividade da peroxidase (POD) em alface (a) e rúcula (b); Atividade da superóxido dismutase (SOD) em alface (c) e rúcula (d); Atividade da glutaciona S-transferase (GST) em alface (e) e rúcula (f); (C) controle. As barras de erro representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$).

Tabela 1 – Coeficientes cinéticos do modelo “First-order one compartment” para a determinação da acumulação e depuração de CYN no tecido foliar de alface e rúcula. Constante da taxa de depuração (k_d). Constante da taxa de acumulação (k_u). Meia vida biológica ($t_{1/2}$). Coeficiente de determinação da análise de regressão (r^2). Valores entre parênteses representam o desvio padrão ($n=3$).

Coeficientes cinéticos	Concentração de exposição ($\mu\text{g/L}$)					
	Alface			Rúcula		
	3	5	10	3	5	10
k_u	1,63(0,84)	-0,86(0,34)	-0,08(0,03)	1,91(0,82)	2,11(1,28)	1,76(1,14)
r^2_{ku}	0,79	0,86	0,85	0,85	0,73	0,71
k_d	0,02(0,02)	<0,001(0,16)	<0,001(0,20)	0,03(0,02)	0,01(0,05)	0,06(0,05)
r^2_{kd}	0,62	<0,001	<0,001	0,67	0,04	0,52
$t_{1/2}$	34,66	>1000	>1000	23,1	69,31	11,55

Tabela 2. Estimativa de ingestão diária de CYN por seres humanos calculada baseado no acúmulo da toxina detectada nos tecidos foliares de alface e rúcula, assumindo o consumo diário de 40 g de cada hortaliça. (BIO) Fase experimental de acumulação. (DEP) Fase experimental de depuração. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n=3$).

Tempo de exposição	Ingestão diária de CYN após consumo de 40 g de alface ou rúcula					
	Irrigação de alface com CYN ($\mu\text{g/L}$)			Irrigação de rúcula com CYN ($\mu\text{g/L}$)		
	3	5	10	3	5	10
Acúmulo em μg a cada 40 g^{-1} de consumo diário						
Dia 1 - BIO	$0,189 \pm 0,046$	$0,241 \pm 0,025$	$0,157 \pm 0,032$	$0,295 \pm 0,032$	$0,228 \pm 0,004$	$0,220 \pm 0,006$
Dia 4 - BIO	$0,230 \pm 0,058$	$0,213 \pm 0,024$	$0,150 \pm 0,013$	$0,354 \pm 0,022$	$0,270 \pm 0,010$	$0,252 \pm 0,019$
Dia 7 - BIO	$0,332 \pm 0,076$	$0,168 \pm 0,002$	$0,151 \pm 0,010$	$0,460 \pm 0,068$	$0,416 \pm 0,046$	$0,379 \pm 0,063$
Dia 1 - DEP	$0,156 \pm 0,026$	$0,117 \pm 0,036$	$0,130 \pm 0,036$	$0,314 \pm 0,080$	$0,251 \pm 0,029$	$0,371 \pm 0,012$
Dia 4 - DEP	$0,157 \pm 0,024$	$0,149 \pm 0,037$	$0,116 \pm 0,028$	$0,312 \pm 0,040$	$0,318 \pm 0,057$	$0,216 \pm 0,010$
Dia 7 - DEP	$0,130 \pm 0,022$	$0,129 \pm 0,007$	$0,123 \pm 0,020$	$0,244 \pm 0,050$	$0,224 \pm 0,046$	$0,274 \pm 0,019$

Referências

- Beyer, D., Surányi, G., Vasas, G., Roszik, J., Erdodi, F., M-Hamvas, M., Bácsi, I., Bátor, R., Serfozo, Z., Szigeti, Z.M., Vereb, G., Demeter, Z., Gonda, S., Máthé, C., 2009. Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured in vitro. *Toxicon* 54, 440-449.
- Bibo, L., Yan, G., Bangding, X., Jiantong, L., Yongding, L., 2008. A laboratory study on risk assessment of microcystin-RR in cropland. *J. Environ. Manage.* 86, 566-574.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Chem.* 72, 243-254.
- Brasil, Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, 2005. Resolução 357: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. pp.58-63.
- Chen, J., Song, L., Dai, J., Gan, N., Liu, Z., 2004. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon* 43, 393-400.
- Codd, G.A., Bell, S.G., Kaya, K., Ward, C.J., Beattie, K.A., Metcalf, J.S., 1999a. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *Eur. J. Phycol.* 34, 405-415.
- Codd, G.A., Metcalf, J.S., Beattie, K.A., 1999b. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 37, 1181-1185.
- Corbel, S., Mougin, C., Bouaïcha, N., 2014. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* 96, 1–15.
- Cordeiro-Araújo, M.K., Bittencourt-Oliveira, M.C., 2013. Active release of microcystins controlled by an endogenous rhythm in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Phycol. Res.* 61, 1-6.
- Cordeiro-Araújo, M.K., Chia, A.M., Hereman, T.C., Sasaki, F.F., Bittencourt-Oliveira, M.C., 2015. Selective membrane permeability and peroxidase activity response of lettuce and arugula irrigated with cyanobacterial-contaminated water. *Environ. Earth Sci.* 74, 1547-1553.
- Crush, J.R., Briggs, L.R., Sprosen, J.M., Nichols, S.N., 2008. Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. *Environ. Toxicol.* 23, 246-252.

- Deblois, C.P., Aranda-Rodriguez, R., Giani, A., Bird, D.F., 2008. Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. *Toxicon* 51, 435-448.
- Del Río, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., Barroso, J.B., 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol.* 141, 330-335.
- Dixon, D.P., Laphorn, A., Edwards, R., 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* 3, 3004.1-3004.10.
- Falconer, I.R., Hardy, S.J., Humpage, A.R., Frosco, S.M., Tozer, G.J., Hawkins, P.R., 1999. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. *Environ. Toxicol.* 14, 143-150.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2006. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsins. *Environ. Toxicol.* 21, 299-304.
- Freitas, M., Azevedo, J., Pinto, E., Neves J., Campos, A., Vasconcelos, V., 2015. Effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin and a microcystin-LR/cylindrospermopsin mixture on growth, oxidative stress and mineral content in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116, 59-67.
- Garcia, A.C., Bargu, S., Dash, P., Rabalais, N.N., Sutor, M., Morrison, W., Walker, N.D., 2010. Evaluating the potential risk of microcystins to blue crab (*Callinectes sapidus*) fisheries and human health in a eutrophic estuary. *Harmful Algae* 9, 134-143.
- Garda, T., Riba, M., Vasas, G., Beyer, D., M-Hamvas, M., Hajdu, G., Tandor, I., Mathe, C., 2015. Cytotoxic effects of cylindrospermopsin in mitotic and non-mitotic *Vicia faba* cells. *Chemosphere* 120, 145–153.
- Gorsuch, J.W., Lowe, W.R., Lewis, M.A., Wang, W., 1991. Plants for toxicity assessment: second volume. Philadelphia: ASTM.
- Gutiérrez-Praena, D., Jos, A., Pichardo, S., Moreno, I.M., Cameán, A.M., 2013. Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. *Food Chem. Toxicol.* 53, 139-152.
- Gutiérrez-Praena, D., Campos, A., Azevedo, J., Neves, J., Freitas, M., Guzmán-Guillén, R., Cameán, A.M., Renaut, J., Vasconcelos, V., 2014. Exposure of *Lycopersicon esculentum* to microcystin-LR: effects in the leaf proteome and toxin translocation from water to leaves and fruits. *Toxins* 6, 1837-1854.

- Ha, M.H., Pflugmacher, S., 2013. Phytotoxic effects of the cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a: morphological, physiological and biochemical responses in aquatic macrophyte, *Ceratophyllum demersum*. *Toxicon* 70, 1-8.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hajiboland, R., Hasani, B.D., 2007. Effect of Cu and Mn toxicity on chlorophyll fluorescence and gas exchange in rice and sunflower under different light intensities. *J. Stress Physiol. Biochem.* 3, 4-17.
- Hereman, T.C., Bittencourt-Oliveira, M.C., 2012. Bioaccumulation of microcystins in lettuce. *J. Phycol.* 48, 1535-1537.
- Hobbie, R.K., Roth, B.J., 2007. Intermediate Physics for Medicine and Biology, in Biological Physics Series, third edition. Springer Science, Business Media, LLC, New York.
- Ibelings, B.W., Chorus, I., 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environ. Pollut.* 150, 177-192.
- Jana, S., Choudhuri, M.A., 1982. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. *Aquat. Bot.* 12, 345-354.
- Johansson, L.H., Borg, L.A., 1988. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal. Biochem.* 174, 331-336.
- Jüttner, F., Lüthi, H., 2008. Topology and enhanced toxicity of bound microcystins in *Microcystis* PCC 7806. *Toxicon* 51, 388-397.
- Kinnear, S., 2010. Cylindrospermopsin: A decade of progress on bioaccumulation research. *Mar. Drugs* 8, 542-564.
- Kittler, K., Schreiner, M., Krumbein, A., Manzei, S., Koch, M., Rohn, S., Maul, R., 2012. Uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in *Brassica* vegetables. *Food Chem.* 133, 875-879.
- Marrs, K.A., 1996. The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 127-158.
- Máthé, C., Vasas, G., Borbély, G., Erdődi, F., Beyer, D., Kiss, A., Surányi, G., Gonda, S., Jámbrik, K., M-Hamvas, M., 2013. Histological, cytological and biochemical alterations induced by microcystin-LR and cylindrospermopsin in white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Acta Biol. Hung.* 64, 71-85.

- Metcalf, J.S., Barakate, A., Codd, G.A., 2004. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS Microbiology Letters* 235, 125-129.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The generation of superoxide radical antioxidant of haemoglobin. *J. Biol. Chem.* 247, 6960-6962.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.
- Mohamed, Z.A., Hussein, A.A., 2006. Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: A laboratory study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 424-429.
- Mohamed, Z.A., Shehri, A.M.A., 2009. Microcystins in groundwater wells and their accumulation in vegetable plants irrigated with contaminated waters in Saudi Arabia. *J. Hazard. Mater.* 172, 310-315.
- Ozawa, K., Yokoyama, A., Ishikawa, K., Kumagai, M., Watanabe, M.F., Park, H., 2003. Accumulation and depuration of microcystin produced by the cyanobacterium *Microcystis* in a freshwater snail. *Limnology* 4, 131-138.
- Peuthert, A., Chakrabarti, S., Pflugmacher, S., 2007. Uptake of Microcystins-LR and -LF (Cyanobacterial Toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). *Environ. Toxicol.* 22, 436-442.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 527-533.
- Phelan, R.R., Downing, T.G., 2014. The localization of exogenous microcystin LR taken up by a non-microcystin producing cyanobacterium. *Toxicon* 89, 87-90.
- Prieto, A., Campos, A., Cameán, A., Vasconcelos, V., 2011. Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1973-1980.
- Reddy, J.K., Suga, T., Mannaerts, G.P., Lazarow, P.B., Subramani, S., (eds). (1995). *Peroxisomes: biology and role in toxicology and disease*. New York: Ann. N. Y. Acad. Sci. 804, 1-795.

- Runnegar, M.T.C., Kong, S.M., Zhong, Y.Z., Ge, J.L., Lu, S.C., 1994. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 201, 235-241.
- Runnegar, M.T.C., Kong, S.M., Zhong, Y.Z., Lu, S.C., 1995. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49, 219-225.
- Saker, M.L., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Vasconcelos, V.M., 2004. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicon* 43, 185-194.
- Saqrane, S., Ghazali, I.E., Ouahid, Y., Hassni, M.E., Hadrami, I.E., Bouarab, L., del Campo, F.F., Oudra, B., Vasconcelos, V., 2007. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. *Aquat. Toxicol.* 83, 284-294.
- Saqrane, S., Ouahid, Y., El Ghazali, I.E., Oudra, B., Bouarab, L., del Campo, F.F., 2009. Physiological changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* cultivars, caused by irrigation with water contaminated with microcystins: A laboratory experimental approach. *Toxicon* 53, 786-796.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins, in: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic cyanobacteria in water: A guide to the Public Health Consequences, Monitoring and Management*. J.E and FN Spon, London, pp.41-111.
- Smith, J.L., Haney, J.F., 2006. Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon* 48, 580-589.
- Soares, R.M., Magalhães, V.F., Azevedo, S.M.F.O., 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 70, 1-10.
- Welker, M., 2008. Cyanobacterial hepatotoxins: chemistry, biosynthesis, and occurrence, in: Botana, L.M. (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology and detection*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Florida, pp. 825-844.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Água contaminada com extratos brutos de cianobactérias produtoras de microcistinas (MC-LR e MC-RR) ou não produtoras pode ocasionar toxicidade em plantas da agricultura. Isso se deve ao fato de que cianobactérias produzem, além de cianotoxinas, uma gama de compostos aleloquímicos com função desconhecida. Contudo, os efeitos provocados em plantas por extratos brutos de cianobactérias produtoras de microcistinas acentuam-se em relação aos extratos de não produtoras. Tais efeitos foram avaliados e confirmados através de alterações fisiológicas como estresse oxidativo, parâmetros de trocas gasosas e permeabilidade seletiva da membrana plasmática, além de bioacumulação nos tecidos foliares de alface.

Em relação às cianotoxinas purificadas (MC-LR e CYN), de acordo com as concentrações utilizadas neste estudo (1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$), além de efeitos fitotóxicos foram observados eventos de bioacumulação e depuração das toxinas nos tecidos foliares de alface e rúcula. A MC-LR acumulou apenas em alface, porém com valores que ultrapassaram o limite de ingestão diária total (TDI) recomendada pela Organização Mundial de Saúde para seres humanos (0,04 μg de MC-LR por Kg de peso corporal/dia). Com os dados de MC-LR obtidos durante os períodos de acúmulo e depuração foi possível calcular, pela primeira vez, a meia vida biológica ($t_{1/2}$) da toxina no tecido foliar da hortaliça, bem como determinar o período necessário para recuperar uma plantação contaminada e o período de saturação da molécula após exposição prolongada. Já a CYN acumulou tanto em alface como em rúcula e baseado no modelo cinético da toxina nos tecidos foliares das plantas, não seria possível recuperar uma plantação contaminada. Apesar disso, não existe uma recomendação de limite de ingestão diária total desta cianotoxina para seres humanos.

No Brasil, a atual legislação que estabelece os limites máximos de densidades de cianobactérias na água utilizada para a irrigação de hortaliças (20.000 a 50.00 células/mL - Resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, 2005), não garante a segurança para a irrigação das plantas, uma vez que a produção de cianotoxinas nem sempre é proporcional ao aumento da densidade celular. Dessa forma, há necessidade que sejam observadas concentrações de MC e CYN na água utilizada para a irrigação de culturas de plantas, e não apenas densidades celulares, nas revisões futuras das legislações brasileiras sobre a qualidade da água e seus usos.

ANEXO I

(Parâmetros de trocas gasosas dos experimentos com MC-LR e CYN purificadas)

Tabela 1. Taxa fotossintética (*A*), condutância estomática (*gs*), transpiração foliar (*E*) e concentração intercelular de CO₂ (*Ci*) de folhas de alface e rúcula durante bioacumulação e depuração de MC-LR. (BIO). Fase experimental de bioacumulação. (DEP). Fase experimental de depuração. Resultados são apresentados como média ± desvio padrão (*n* = 6).

Dia de amostragem (Tratamento)	<i>A</i> (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)		<i>gs</i> (mmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)		<i>E</i> (mmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)		<i>Ci</i> (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	
	Alface	Rúcula	Alface	Rúcula	Alface	Rúcula	Alface	Rúcula
Controle (Dia 0)	3,31 ± 0,54	8,27 ± 0,44	0,09 ± 0,02	0,26 ± 0,02	2,09 ± 0,38	4,12 ± 0,08	214,83 ± 17,12	211,33 ± 7,03
Controle (Dia 1 - BIO)	3,37 ± 0,54	8,47 ± 0,24	0,08 ± 0,01	0,51 ± 0,05	2,21 ± 0,17	5,20 ± 0,08	197,50 ± 4,81	225,17 ± 4,36
Controle (Dia 4 - BIO)	3,67 ± 0,31	9,82 ± 0,23	0,06 ± 0,01	0,47 ± 0,04	1,85 ± 0,18	4,77 ± 0,19	182,50 ± 16,21	228,17 ± 5,08
Controle (Dia 7 - BIO)	3,49 ± 0,60	8,62 ± 0,69	0,11 ± 0,04	0,15 ± 0,01	2,84 ± 0,63	3,23 ± 0,09	229,50 ± 8,26	174,17 ± 11,48
Controle (Dia 1 - DEP)	3,55 ± 0,31	9,29 ± 0,18	0,08 ± 0,00	0,20 ± 0,01	2,34 ± 0,08	3,71 ± 0,20	210,83 ± 5,00	189,00 ± 5,06
Controle (Dia 4 - DEP)	3,60 ± 0,40	8,65 ± 0,35	0,10 ± 0,01	0,23 ± 0,09	2,74 ± 0,13	3,87 ± 0,91	221,67 ± 9,65	205,33 ± 12,04
Controle (Dia 7 - DEP)	3,61 ± 0,52	7,43 ± 0,22	0,21 ± 0,07	0,36 ± 0,02	3,37 ± 0,75	4,31 ± 0,07	202,00 ± 22,35	250,33 ± 2,66
Dia 0 (1 μg L ⁻¹)	3,77 ± 0,55	8,05 ± 0,82	0,09 ± 0,01	0,27 ± 0,03	2,35 ± 0,33	4,07 ± 0,23	212,17 ± 12,84	213,00 ± 6,68
Dia 1 - BIO (1 μg L⁻¹)	3,25 ± 0,19	8,41 ± 0,27	0,10 ± 0,02	0,46 ± 0,05	2,60 ± 0,47	5,19 ± 0,05	211,67 ± 29,96	227,33 ± 1,51
Dia 4 - BIO (1 μg L⁻¹)	3,79 ± 0,58	7,49 ± 0,30	0,14 ± 0,02	0,47 ± 0,05	3,40 ± 0,23	4,62 ± 0,21	233,83 ± 10,65	245,83 ± 5,04
Dia 7 - BIO (1 μg L⁻¹)	5,41 ± 0,63	7,11 ± 0,43	0,24 ± 0,06	0,16 ± 0,01	4,50 ± 0,68	2,90 ± 0,12	235,00 ± 12,49	203,83 ± 15,45
Dia 1 - DEP (1 μg L ⁻¹)	4,93 ± 0,50	11,07 ± 0,14	0,12 ± 0,01	0,28 ± 0,01	3,02 ± 0,24	4,76 ± 0,25	207, 83 ± 5,83	203,33 ± 4,63
Dia 4 - DEP (1 μg L ⁻¹)	4,85 ± 0,23	10,20 ± 0,91	0,11 ± 0,01	0,29 ± 0,03	2,92 ± 0,17	4,90 ± 0,06	205,50 ± 2,88	203,50 ± 9,03
Dia 7 - DEP (1 μg L ⁻¹)	3,78 ± 0,93	8,00 ± 0,70	0,19 ± 0,02	0,35 ± 0,04	3,43 ± 0,23	4,34 ± 0,14	236,50 ± 13,97	236,17 ± 7,05

Tabela 1. Continuação.

Dia de amostragem (Tratamento)	A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)		g_s ($\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)		E ($\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		C_i ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	
	Alface	Rúcula	Alface	Rúcula	(Tratamento)	Alface	Rúcula	Alface
Dia 0 ($5 \mu\text{g L}^{-1}$)	$3,80 \pm 0,50$	$8,34 \pm 0,46$	$0,09 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,02$	$2,15 \pm 0,46$	$4,03 \pm 0,24$	$193,50 \pm 30,97$	$213,83 \pm 7,47$
Dia 1 - BIO ($5 \mu\text{g L}^{-1}$)	$3,65 \pm 0,40$	$8,44 \pm 0,22$	$0,09 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,04$	$2,48 \pm 0,32$	$5,18 \pm 0,07$	$214,50 \pm 25,56$	$224,83 \pm 4,79$
Dia 4 - BIO ($5 \mu\text{g L}^{-1}$)	$3,32 \pm 0,37$	$6,44 \pm 0,36$	$0,10 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,02$	$2,71 \pm 0,13$	$4,67 \pm 0,22$	$224,67 \pm 5,47$	$247,33 \pm 3,50$
Dia 7 - BIO ($5 \mu\text{g L}^{-1}$)	$5,57 \pm 0,42$	$5,36 \pm 0,32$	$0,23 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,01$	$4,45 \pm 0,38$	$2,43 \pm 0,11$	$233,50 \pm 7,66$	$202,33 \pm 26,23$
Dia 1 - DEP ($5 \mu\text{g L}^{-1}$)	$5,44 \pm 0,67$	$11,35 \pm 0,42$	$0,17 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,02$	$3,89 \pm 0,46$	$4,80 \pm 0,19$	$223,17 \pm 3,71$	$198,17 \pm 6,15$
Dia 4 - DEP ($5 \mu\text{g L}^{-1}$)	$4,37 \pm 0,48$	$9,89 \pm 0,54$	$0,10 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,05$	$2,72 \pm 0,22$	$4,85 \pm 0,48$	$207,50 \pm 3,67$	$210,00 \pm 16,85$
Dia 0 ($10 \mu\text{g L}^{-1}$)	$3,41 \pm 0,39$	$8,29 \pm 0,48$	$0,08 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,03$	$2,16 \pm 0,24$	$3,98 \pm 0,20$	$211,00 \pm 29,18$	$210,67 \pm 8,96$
Dia 1 - BIO ($10 \mu\text{g L}^{-1}$)	$3,24 \pm 0,41$	$8,32 \pm 0,28$	$0,08 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,02$	$2,25 \pm 0,32$	$5,14 \pm 0,09$	$206,50 \pm 27,03$	$226,00 \pm 4,56$
Dia 4 - BIO ($10 \mu\text{g L}^{-1}$)	$3,35 \pm 0,47$	$6,93 \pm 0,50$	$0,09 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,02$	$2,53 \pm 0,33$	$4,66 \pm 0,17$	$219,33 \pm 7,55$	$241,83 \pm 5,00$
Dia 7 - BIO ($10 \mu\text{g L}^{-1}$)	$5,75 \pm 1,03$	$6,64 \pm 0,66$	$0,17 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,01$	$3,75 \pm 0,41$	$2,72 \pm 0,19$	$218,83 \pm 11,30$	$201,33 \pm 8,62$
Dia 1 - DEP ($10 \mu\text{g L}^{-1}$)	$4,86 \pm 0,25$	$11,22 \pm 0,41$	$0,15 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,03$	$3,54 \pm 0,08$	$4,90 \pm 0,03$	$221,50 \pm 2,25$	$204,00 \pm 6,78$
Dia 4 - DEP ($10 \mu\text{g L}^{-1}$)	$4,34 \pm 0,13$	$9,03 \pm 0,80$	$0,10 \pm 0,00$	$0,29 \pm 0,01$	$2,69 \pm 0,10$	$4,86 \pm 0,04$	$206,67 \pm 2,66$	$207,67 \pm 12,37$
Dia 7 - DEP ($10 \mu\text{g L}^{-1}$)	$3,73 \pm 0,45$	$8,85 \pm 0,81$	$0,14 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,03$	$2,86 \pm 0,20$	$4,53 \pm 0,13$	$233,00 \pm 8,27$	$229,67 \pm 5,09$

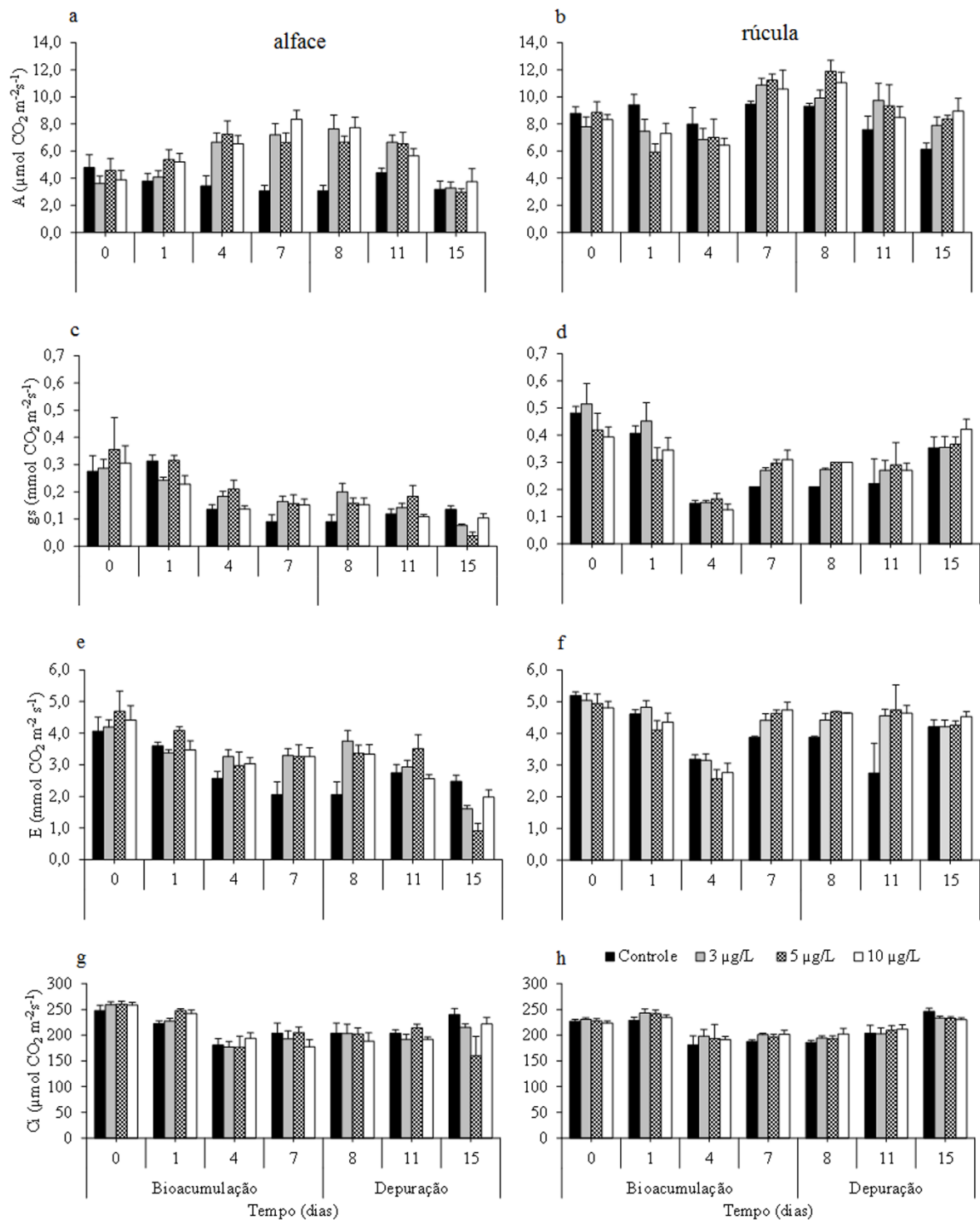


Figura 1. Parâmetros de trocas gasosas no do tecido foliar de alface e rúcula durante bioacumulação e depuração de CYN. Taxa fotossintética (A) em alface (a) e rúcula (b); Condutância estomática (g_s) em alface (c) e rúcula (d); Transpiração foliar (E) em alface (e) e rúcula (f); Concentração intercelular de CO_2 (C_i) de folhas de alface (g) e rúcula (h) durante bioacumulação e depuração de CYN. Controle (C). Resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 6$).

ANEXO II

NORMAS PARA AUTORES - ENVIRONMENTAL EARTH SCIENCES

Impact Factor: 1.765

Aims and scope

Presents papers on all aspects of interactions between humans, ecosystems and the earth
Aims to improve and remediate the environment as habitat for life on earth

Environmental Earth Sciences is an international multidisciplinary journal concerned with all aspects of interactions between humans, ecosystems and the earth. Coverage includes water and soil contamination; environmental problems associated with transportation; geological processes affecting biosystems and people; remediation of man-made or geological hazards; environmental problems associated with mining and abstraction activities for industrial minerals, coal and ores as well as for oil and gas, water and energy; environmental impacts of exploration and recultivation; impacts of hazardous facilities and activities; land use management; management of environmental data and information in data banks and information systems.

Through dissemination of knowledge on techniques, methods, approaches and experiences, the journal aims to improve and remediate the environment as habitat for life on earth.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Manuscript Processing

To submit manuscripts to Environmental Earth Sciences, go to website: <http://www.editorialmanager.com/enge> and upload all manuscript files. Files will automatically be converted to pdf format in the final process.

Authors who do not already have an account with EES will be asked to create a short user profile and given a unique password.

Manuscripts received are verified for formatting and topical focus and then submitted through the standard peer review process for scientific publishing. Times for review and consideration will vary. Calendar reminders will be sent to all parties to keep the review process on schedule.

It is very important that authors take the time to thoroughly review for grammar and spelling before submitting manuscripts. Please have a native English speaker provide a courtesy reading prior to submittal.

Papers should consist of no more than 7500 words and generally should contain no more than 8 figures.

If the study relates to a particular site or geographical location, please mention the geographical name including country in the paper title.

Please select 4 to 6 keywords from the subject classification list which can be used for indexing purposes.

Manuscripts should be submitted in Word. Use formal English. Do not use I, me, we, you.

Reviewers and editors may provide feedback in the form of comments and concerns to the author. Such information may should not be considered as personal criticism; it is part of the process of assuring that the best possible standards for scientific publishing are upheld.

When papers are accepted for publication, authors are provided a final proof directly from Springer. Please review this final proof document very thoroughly. Once published online, no further modifications will be possible.

Thank you for considering Environmental Earth Sciences.

Policy on Intellectual Dishonesty and Plagiarism

As a leading international scientific journal, the staff of Environmental Earth Sciences is deeply committed to the practice of intellectual honesty in all dealings. Infractions against generally acceptable standards for research and publication of results are taken very seriously.

Such infractions may include:

- Fabrication – the falsification of research or exaggeration or misrepresentation of data.
- Tampering – altering original data or documents or interfering with the examination of the same.
- Plagiarism – representing the thoughts, words, ideas, discoveries or data of another as one’s own original work. Plagiarism includes copying the work or part of the work of another, either published or unpublished, without giving a proper reference or citation.

Upon receiving report of a suspected offense of intellectual dishonesty, the editorial staff will commence an investigation within 30 days and make every attempt to conclude its findings within 60 days.

If after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted personally and given an opportunity to address the issue.

The author's failure to make satisfactory remedy or explanation may result in implementation of any or all of the following measures:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, an official disclaimer announcing that Environmental Earth Sciences is unable to support the research contained herein because of questions of plagiarism may be placed online next to the article.
- The author may be barred from publishing the results of any future studies in Environmental Earth Sciences.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325-329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [ISSN LTWA](#)

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Upon acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- [Springer Open Choice](#)

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License..

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

ANEXO III

NORMAS PARA AUTORES - ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY -

IMPACT FACTOR . 2014: 2.762 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015
ABSTRACTING AND INDEXING . MEDLINE® SIIC Data Bases

DESCRIPTION .

Ecotoxicology and Environmental Safety focuses on integrated mechanistic research related to short and long-term pathways and interactions of substances and chemical mixtures in environmental systems and subsystems on their bioavailability, and assimilation in organisms, as well as biological responses of these organisms, and damage mechanisms (endocrine disruption, genotoxicity); and on their subsequent fate in the environment, food chain, including humans. Novel technologies, techniques, and methods such as biomarkers, biosensors and bioanalytical systems, bioremediation methods, QSARs and QSPRs, advanced high performance computational methods, models, and their applications in obtaining and processing interdisciplinary ecotoxicological information are also addressed in the journal. We welcome the applied outcome of complex ecotoxicological research such as developing the science-based Environmental Quality Criteria (EQC), standard toxicity tests, techniques, and methods for ecotoxicological evaluation of the environment, as well as developing ecotoxicologically proven methods and technologies for prevention, interception, and remediation of human-induced damage to ecosystems. Emphasis is placed on ecological animal models rather than laboratory based rodent studies; The above scope of the journal is aimed at providing science-based tools for sustainably managing the environment through risk assessment, risk characterization, risk prediction, and risk management. The journal publishes regular research articles, and review articles.

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Ecotoxicology and Environmental Safety focuses on integrated mechanistic research related to short and long-term pathways and interactions of toxic substances and chemical mixtures in environmental systems with emphasis on their bioavailability, assimilation and metabolism in target organisms as well as biological responses of these organisms, and damage mechanisms (endocrine disruption, genotoxicity); fates of toxicants in the food chain, including exposures in humans are considered. The journal prefers interdisciplinary studies of environmental chemistry and toxicology describing environmental fate and biological fate of pollutants, novel analytical technologies, techniques, and methods such as biomedical photonic technologies, biomarkers, biosensors, bioanalytical systems, QSARs, QSPRs, advanced high-performance computational methods, models, and their applications in obtaining and processing ecotoxicological information. We welcome the applied outcome of complex ecotoxicological research such as developing the science-based Environmental Quality Criteria (EQC), standard toxicity tests, techniques, and methods for ecotoxicological evaluation of the environment, as well as developing ecotoxicologically proven methods and technologies for prevention, interception, and remediation of human-induced damage to ecosystems. The above scope of the journal is aimed at providing science-based tools for sustainably managing the environment through risk assessment, risk characterization, risk prediction, and risk management. Emphasis will be placed on ecotoxicological animal model studies (rather than rodent models) as well as field studies (rather than controlled laboratory investigations) dealing with fate and effects of pollutants. In dose-response studies, nominal exposure concentrations of substances not proved by measurements are in general not accepted in EESA, and such manuscripts are being rejected outright. In other words, in experiments dealing with animal exposures, the exposure regimen/concentrations should be environmentally relevant. Types of paper The journal publishes regular research articles. Regular research articles must not exceed 8,000 words. Word limit here is for text only. In principle the number of tables and figures should not collectively exceed six. Any exceptions should require approval from editors. Review articles are welcome, but authors are requested to contact the editors for prior approval. Authors may provide supporting information (for manuscripts exceeding the recommended length), and this material will be made available online.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing Ethical statement concerning human and animal subjects is mandatory. For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>. Conflict of interest All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing. Submission declaration and verification Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>. Changes to authorship Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of

authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum. Copyright Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>. For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>). Author rights As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>. Role of the funding source You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Funding body agreements and policies Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Open access This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access • Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution Subscription • Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>). • No open access publication fee payable by authors. Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses: Creative Commons Attribution (CC BY) Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation. Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is USD 2500, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>. Green open access Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and begins from the publication date of the issue your article appears in. This journal has an embargo period of 24 months. Language and language services Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information. The values reported on research papers should be limited to 3 significant figures, unless required otherwise. Ppm or ppb are not accepted and this should be presented as mg/kg or g/kg. Centrifugation speed should be presented in x g, not rpm. Submission Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail. Submit your article Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/ees/>. If you have difficulty with your submission or any other questions, please contact the Editorial Office: Ecotoxicology and Environmental Safety Editorial Office 525 B Street, Suite 1800 San Diego, CA 92101-4495, 6 Telephone: (619) 699-6297 Fax: (619) 699-6850 E-mail: ees2@elsevier.com Referees All submitted manuscripts must include a list of five suggested reviewers. Please include the names and contact information (including email addresses) for 5 reviewer suggestions. Typically three of these should be from countries other than those of the authors. Please note that this is a mandatory element of your submission and the Editorial Office cannot locate reviewers on your behalf. If you are unable to suggest potential experts in the field, please refer to your references for possible reviewers. Additional information Each manuscript should be accompanied by a letter outlining the basic findings of the paper and their significance.

PREPARATION NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or

some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately. References There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. Formatting requirements There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections. Please ensure your paper has consecutive line numbering - this is an essential peer review requirement. Figures and tables embedded in text Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use double spacing. All pages must be numbered, beginning with the abstract. All lines must be numbered, preferably continuously throughout the entire manuscript. Use of word processing software Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. Article structure 7 Subdivision - numbered sections Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Introduction State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Material and methods Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. It is mandatory to give formal assurance that any study involving humans or experimental animals were conducted in accordance with national and institutional guidelines for the protection of human subjects and animal welfare. No manuscript will be considered unless this information is supplied. Theory/calculation A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis. Results/Discussion Results should be clear and concise. Discussion should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Conclusions The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section. Appendices If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc. Essential title page information • Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. • Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author. • Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author. • Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. Abstract A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. Graphical abstract Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum 8 of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service. Highlights Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples. Keywords Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. Abbreviations Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Acknowledgements Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g.,

providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.). Units Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Specially please note, the values reported on research papers should be limited to 3 significant figures, unless required otherwise. ppm or ppb are not accepted and this should be presented as mg/kg or g/kg. Centrifugation speed should be presented in x g, not rpm. Math formulae Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). Footnotes Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Artwork Electronic artwork General points • Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. • Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier. • Number the illustrations according to their sequence in the text. • Use a logical naming convention for your artwork files. • Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image. • For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage. • Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. 9 Formats Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. Please do not: • Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low. • Supply files that are too low in resolution. • Submit graphics that are disproportionately large for the content. Color artwork Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Figure captions Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. Text graphics Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork. Tables Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules. References Citation in text Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication. All citations in the text should refer to: Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication; Two authors: both authors' names and the year of publication; Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown' Reference links Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged. Web references As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. References in a special issue Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue. Reference management software Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/downloads/styles>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style. If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/ecotoxicology-and-environmental-safety> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>. Reference formatting There are no strict requirements on reference formatting at

submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples: Reference style References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. Examples: Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59. Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc.*, New York, pp. 281-304. Journal abbreviations source Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>. Video data Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content. AudioSlides The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper. Supplementary material Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Database linking Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases. Interactive plots This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. For instructions please go to <http://www.elsevier.com/interactiveplots>. Submission checklist The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. Ensure that the following items are present: One author has been designated as the corresponding author with contact details: • E-mail address • Full postal address All necessary files have been uploaded, and contain: • Keywords • All figure captions • All tables (including title, description, footnotes) Further considerations • Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' • All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa • Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet) Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white • Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. AFTER ACCEPTANCE Use of the Digital Object Identifier The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059> When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change. Online proof correction Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed.

ANEXO IV

NORMAS PARA AUTORES – ENVIRONMENTAL POLLUTION

Impact Factor: 4.143

© Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

DESCRIPTION

Ecotoxicology and Environmental Safety focuses on integrated mechanistic research related to short and long-term pathways and interactions of substances and chemical mixtures in environmental systems and subsystems on their bioavailability, and assimilation in organisms, as well as biological responses of these organisms, and damage mechanisms (endocrine disruption, genotoxicity); and on their subsequent fate in the environment, food chain, including humans. Novel technologies, techniques, and methods such as biomarkers, biosensors and bioanalytical systems, bioremediation methods, QSARs and QSPRs, advanced high performance computational methods, models, and their applications in obtaining and processing interdisciplinary ecotoxicological information are also addressed in the journal. We welcome the applied outcome of complex ecotoxicological research such as developing the science-based Environmental Quality Criteria (EQC), standard toxicity tests, techniques, and methods for ecotoxicological evaluation of the environment, as well as developing ecotoxicologically proven methods and technologies for prevention, interception, and remediation of human-induced damage to ecosystems. Emphasis is placed on ecological animal models rather than laboratory based rodent studies; The above scope of the journal is aimed at providing science-based tools for sustainably managing the environment through risk assessment, risk characterization, risk prediction, and risk management. The journal publishes regular research articles, and review articles.

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION Ecotoxicology and Environmental Safety focuses on integrated mechanistic research related to short and long-term pathways and interactions of toxic substances and chemical mixtures in environmental systems with emphasis on their bioavailability, assimilation and metabolism in target organisms as well as biological responses of these organisms, and damage mechanisms (endocrine disruption, genotoxicity); fates of toxicants in the food chain, including exposures in humans are considered. The journal prefers interdisciplinary studies of environmental chemistry and toxicology describing environmental fate and biological fate of pollutants, novel analytical technologies, techniques, and methods such as biomedical photonic technologies, biomarkers, biosensors, bioanalytical systems, QSARs, QSPRs, advanced high-performance computational methods, models, and their applications in obtaining and processing ecotoxicological information. We welcome the applied outcome of complex ecotoxicological research such as developing the science-based Environmental Quality Criteria (EQC), standard toxicity tests, techniques, and methods for ecotoxicological evaluation of the environment, as well as developing ecotoxicologically proven methods and technologies for prevention, interception, and remediation of human-induced damage to ecosystems. The above scope of the journal is aimed at providing science-based tools for sustainably managing the environment through risk assessment, risk characterization, risk prediction, and risk management. Emphasis will be placed on ecotoxicological animal model studies (rather than rodent models) as well as field studies (rather than controlled laboratory investigations) dealing with fate and effects of pollutants. In dose-response studies, nominal exposure concentrations of substances not proved by measurements are in general not accepted in EESA, and such manuscripts are being rejected outright. In other words, in experiments dealing with animal exposures, the exposure regimen/concentrations should be environmentally relevant. Types of paper The journal publishes regular research articles. Regular research articles must not exceed 8,000 words. Word limit here is for text only. In principle the number of tables and figures should not collectively exceed six. Any exceptions should require approval from editors. Review articles are welcome, but authors are requested to contact the editors for prior approval. Authors may provide supporting information (for manuscripts exceeding the recommended length), and this material will be made available online.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing Ethical statement concerning human and animal subjects is mandatory. For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>. **Conflict of interest** All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing. **Submission declaration and verification** Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>. **Changes to authorship** Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of

authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum. Copyright Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>. For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>). Author rights As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>. Role of the funding source You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Funding body agreements and policies Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Open access This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access • Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse • An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution Subscription • Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>). • No open access publication fee payable by authors. Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses: Creative Commons Attribution (CC BY) Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation. Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is USD 2500, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>. Green open access Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and begins from the publication date of the issue your article appears in. This journal has an embargo period of 24 months. Language and language services Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information. The values reported on research papers should be limited to 3 significant figures, unless required otherwise. Ppm or ppb are not accepted and this should be presented as mg/kg or g/kg. Centrifugation speed should be presented in x g, not rpm. Submission Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail. Submit your article Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/ees/>. If you have difficulty with your submission or any other questions, please contact the Editorial Office: Ecotoxicology and Environmental Safety Editorial Office 525 B Street, Suite 1800 San Diego, CA 92101-4495, USA Telephone: (619) 699-6297 Fax: (619) 699-6850 E-mail: ees2@elsevier.com Referees All submitted manuscripts must include a list of five suggested reviewers. Please include the names and contact information (including email addresses) for 5 reviewer suggestions. Typically three of these should be from countries other than those of the authors. Please note that this is a mandatory element of your submission and the Editorial Office cannot locate reviewers on your behalf. If you are unable to suggest potential experts in the field, please refer to your references for possible reviewers. Additional information Each manuscript should be accompanied by a letter outlining the basic findings of the paper and their significance.

PREPARATION NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or

some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately. References There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. Formatting requirements There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections. Please ensure your paper has consecutive line numbering - this is an essential peer review requirement. Figures and tables embedded in text Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use double spacing. All pages must be numbered, beginning with the abstract. All lines must be numbered, preferably continuously throughout the entire manuscript. Use of word processing software Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. Article structure Subdivision - numbered sections Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Introduction State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Material and methods Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. It is mandatory to give formal assurance that any study involving humans or experimental animals were conducted in accordance with national and institutional guidelines for the protection of human subjects and animal welfare. No manuscript will be considered unless this information is supplied. Theory/calculation A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis. Results/Discussion Results should be clear and concise. Discussion should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Conclusions The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section. Appendices If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc. Essential title page information • Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. • Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author. • Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author. • Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. Abstract A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. Graphical abstract Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service. Highlights Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples. Keywords Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. Abbreviations Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Acknowledgements Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on

the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Specially please note, the values reported on research papers should be limited to 3 significant figures, unless required otherwise. ppm or ppb are not accepted and this should be presented as mg/kg or g/kg. Centrifugation speed should be presented in x g, not rpm.

Math formulae Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

- EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
- TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
- TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
- TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

Tables Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication. All citations in the text should refer to:

- Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
- Two authors: both authors' names and the year of publication;
- Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...' Reference links Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please AUTHOR note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged. Web references As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. References in a special issue Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/downloads/styles>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style. If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/ecotoxicology-and-environmental-safety> When preparing your manuscript, you will then be able to select this

style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

REFERENCE FORMATTING

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples: Reference style References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. Examples: Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59. Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304. Journal abbreviations source Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>. Video data Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content. AudioSlides The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper. Supplementary material Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Database linking Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases. Interactive plots This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. For instructions please go to <http://www.elsevier.com/interactiveplots>. Submission checklist The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. Ensure that the following items are present: One author has been designated as the corresponding author with contact details: • E-mail address • Full postal address All necessary files have been uploaded, and contain: • Keywords • All figure captions • All tables (including title, description, footnotes) Further considerations • All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa • Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet) Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white • Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

ANEXO V

NORMAS PARA AUTORES - CHEMOSPHERE

IMPACT FACTOR: 3.340

© Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

DESCRIPTION.

Chemosphere is an international journal designed for the publication of original communications as well as review articles. Chemosphere, as a multidisciplinary journal, offers maximum dissemination of investigations related to all aspects of environmental science. Chemosphere will publish:

- Original communications describing important new discoveries or further developments in important fields of investigation related to the environment and human health
- Reviews, mainly of new developing areas of environmental science
- Special, themed issues on relevant topics.

The following sections and subject fields are included: Persistent Organic Pollutants and Dioxins This section is devoted to all scientific aspects of persistent organic pollutants, including monitoring studies in the environment, ecosystem, and people; environmental chemistry; toxicology; epidemiologic investigations; risk assessment; and processes that generate these pollutants and measures to reduce their emissions or concentrations in the environment. Organic pollutants targeted in this section can be of natural or synthetic origin but must be persistent in the environment or in organisms. Although the term "persistent" is somewhat subjective, with such definition, halogenated organic chemicals are of primary interest. Only studies that are of significance to an international audience and include a statistically representative population, sites of particular global interest, or lend themselves to interpretation at the global level should be submitted. Environmental Chemistry This section will publish manuscripts dealing with fundamental processes in the environment that are related to dispersion, degradation and alteration of inorganic and organic contaminants of environmental concern focussed on the dynamics of contaminants in environmental compartments such as water, soil/sediment, and air and their interactions with biosphere. Specific topics of interest include:

- Environmental fate studies including transport, biodegradation, bio-accumulation and/or deposition as well as atmospheric (photo)chemical processes, hydrolysis, adsorption/desorption
- Transformation and mineralisation of chemicals e.g. by bio- and photodegradation, redoxprocesses and hydrolysis, bio-accumulation and/or deposition as well as atmospheric (photo)chemical processes, hydrolysis, adsorption/desorption
- Soil and water chemistry focussed on interaction, degradation and speciation aspects of environmental contaminants
- Novel environmental analytical methods including case studies
- Phytoremediation employing new strategies, findings or interpretations of general interest
- Development and application of environmental modelling and quantitative structure-activity relationships to study fate and environmental dynamics
- Monitoring studies presenting new strategies, report of novel contaminants, findings or interpretations of general interest for an international readership. Monitoring studies based on standard methodology, and of regional importance, are not considered. Studies dealing only with nutrients in agricultural ecosystems are not considered.

Environmental Toxicology and Risk Assessment The Section on Environmental Toxicology and Risk Assessment covers all aspects of toxicology, i.e., the science of adverse effects of chemicals and toxic substances on living organisms including humans, and the scientific assessment of the risk that such adverse effects may occur. Issues that would be appropriate for consideration include:

- Adverse effects of chemicals and toxic substances in environmental, aquatic and terrestrial, organisms
- Similar studies in experimental organisms (under laboratory conditions)
- Epidemiological studies on effects of chemicals in humans
- Biochemical studies related to mechanisms of adverse effects
- Toxicokinetics and metabolic studies on chemicals related to adverse effects
- Development and validation of testing methods based on living organisms or biological materials
- Biomonitoring of chemicals related to adverse effects
- Occupational chemical hazards and exposure. Not considered are, e.g., studies which report only concentrations of chemicals in the environment, living organisms, food, other materials etc., or on techniques of remediation of environmental pollution, or on biochemical effects of chemicals non-relevant to toxicology.

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Submission of Papers All manuscripts should be submitted electronically through Elsevier Editorial System (EES) which can be accessed at <http://ees.elsevier.com/chem>. During submission papers should be marked for the attention of a subject Editor or the relevant section, if possible. Failure to provide this information will significantly delay processing of the manuscript.

Types of article Chemosphere accepts Research Papers, Review Papers, Short Communications, Letters to the Editor, Replies and Discussion Papers. Please note that papers with a routine nature and lacking originality, novelty and uniqueness will not be accepted for publication. A Short Communication should be of significant scientific merit (a novel finding that warrants immediate publication).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossRef <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>. Changes to authorship Authors are expected to consider carefully the list and

order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

ARTICLE TRANSFER SERVICE

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>. Copyright Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>. For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>). Author rights As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>. Role of the funding source You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Funding body agreements and policies Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Open access This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access • Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse • An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution Subscription • Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>). • No open access publication fee payable by authors. Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses: Creative Commons Attribution (CC BY) Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation. Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is USD 2750, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>. Green open access Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and begins from the publication date of the issue your article appears in. This journal has an embargo period of 24 months. Language (usage and editing services) Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information. Submission Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail. Referees With the submitted manuscript authors are requested to provide full contact details of six potential reviewers including institutional email addresses ONLY (No yahoo, gmail, Hotmail.com address, etc.). The suggested reviewers should not be from the same institution as the author, Chemosphere Editors or Editorial Board members. Not more than two should come from the same

country as the author. It should also be avoided to suggest referees that are living in a different country but have the same nationality as the author.

PREPARATION NEW SUBMISSION

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately. It would be very helpful to the Editors if you provide your highlights in this document. As with any new submission, YPYW requires continuous line numbering.

REFERENCES

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. Formatting requirements There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections. Please ensure your paper has consecutive line numbering - this is an essential peer review requirement. Figures and tables embedded in text Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. REVISED SUBMISSIONS Use of word processing software Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

ARTICLE STRUCTURE

Please see our Important instructions for Authors submitting to The Science of Environmental Toxicology Section Subdivision - numbered sections Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Introduction State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Material and methods Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Theory/calculation A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis. Results Results should be clear and concise. Discussion This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

CONCLUSIONS

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section. Appendices If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc. Essential title page information • Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. • Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author. • Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author. • Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. Abstract A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. Graphical abstract Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be

submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service. Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples. Keywords Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. Abbreviations Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

ACKNOWLEDGEMENTS

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

NOMENCLATURE AND UNITS

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information. Math formulae Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). Footnotes Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Artwork Electronic artwork General points • Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. • Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier. • Number the illustrations according to their sequence in the text. • Use a logical naming convention for your artwork files. • Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image. • For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage. • Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. Formats Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. Please do not: • Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low. • Supply files that are too low in resolution. • Submit graphics that are disproportionately large for the content. Color artwork Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication. Reference links Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and

PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged. References in a special issue Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue. Reference management software Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/downloads/styles>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style. If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/chemosphere> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>. Reference formatting There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples: Reference style Text: All citations in the text should refer to: 1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication; 2. Two authors: both authors' names and the year of publication; 3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown' List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. Examples: Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304. Journal abbreviations source Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059> When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Offprints The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>).