



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



Citotoxicidade da associação de agrotóxicos da rizicultura em hepatócitos de *zebrafish*

Thiago de Lucas Silva Goulart

Rio Grande
2014



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



Citotoxicidade da associação de agrotóxicos da rizicultura em hepatócitos de *zebrafish*

Aluno: Thiago de Lucas Silva Goulart

Orientador: Prof^a Dr^a Marta Marques de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande
2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e minhas irmãs por todo o carinho e apoio que têm me dado durante todos esses anos;

Agradeço à minha namorada/noiva/esposa pela compreensão nos meus momentos de ausência, e pelo amor que recebo todos os dias, ou mal humor dependendo do dia;

Agradeço também aos meus sogros pelo apoio e preocupação;

Agradeço imensamente à minha orientadora Marta por todos os ensinamentos que me passou durante esses dois anos, e pela muita, muita, muita paciência que teve comigo nesse período;

Agradeço ao professor Robert Boyle, por toda a ajuda que me deu nessa trajetória, e também pela paciência ao tentar entender o meu português rápido e enrolado (sei que não deve ter sido fácil);

Agradeço também às minhas amigas/irmãs Marcela e Jessica por terem me apoiado, aturado e também ensinado muito durante nosso tempo juntos, seja coletando peixes (e sendo picado por uma aranha) ou macrófitas enraizadas (e acabar encharcado);

Agradeço a todos os amigos que fiz durante essa empreitada;

Enfim, agradeço a todas estas e outras pessoas que, com certeza, levarei no coração pelo resto da vida

RESUMO

No plantio do arroz parte de um corpo d'água (rio, lago, lagoa) é desviado para a irrigação da plantação, e, posteriormente, a água utilizada nas lavouras é devolvida ao rio/lago/lagoa de origem. Assim, seja por lixiviação ou por qualquer outro fator, a água entra em contato com os agrotóxicos que, anteriormente, foram utilizados na plantação, podendo causar danos à qualidade do recurso hídrico e à fauna lacustre, devido à exposição a estes poluentes. O presente trabalho teve por objetivo verificar a citotoxicidade de agrotóxicos (herbicida e inseticida), utilizados na rizicultura no estado do Rio Grande do Sul, em células hepáticas da linhagem ZF-L. A partir da análise de funcionalidade de três alvos celulares diferentes, integridade da membrana celular, estabilidade lisossomal e atividade mitocondrial frente à exposição ao Roundup Transorb[®], ao Furadan 350 SC[®] e à associação destes produtos. Foi analisada ainda, a capacidade de defesa das células, expostas aos poluentes escolhidos, no que diz respeito à atividade de proteínas extrusoras de xenobióticos, assim como à expressão de tais proteínas. A partir dos resultados obtidos foi verificado efeito citotóxico de ambos os agrotóxicos, bem como a mistura destes para todos os alvos verificados, apresentando ainda efeito inibitório à atividade de extrusão de xenobióticos pelas glicoproteínas P (P-gps). Apenas quando expostas ao inseticida e à mistura as células apresentaram um aumento na expressão de glicoproteínas (P-gp). Verificou-se a existência de correlação negativa entre a citotoxicidade apresentada, principalmente na atividade mitocondrial e na integridade lisossomo e a atividade das P-gps. Em conclusão, percebeu-se que as concentrações abaixo do permitido pela legislação brasileira, para os princípios ativos dos agrotóxicos testados, mostraram-se tóxicas para todos os alvos de citotoxicidade testados neste estudo, com exceção da mitocôndria, sugerindo que esta toxicidade apresentada pode ser devido aos surfactantes presentes nas formulações comerciais.

Palavras-chave; citotoxicidade, extrusão de xenobioticos, mistura de agrotóxicos.

ABSTRACT

In rice farming part of a body of water (river, lake, pond) is diverted for irrigation of the plantation, and later the water used for crops is returned to the river / lake / pond of origin. Thus, either by leaching or by any other factor, the water comes into contact with pesticides that previously were used in planting, which may cause damage to the quality of the water resource and the lakeside fauna, due to exposure to these pollutants. This study aimed to verify the cytotoxicity of pesticides (herbicide and insecticide), used in rice cultivation in the state of Rio Grande do Sul, in *zebrafish* liver cells (ZF-L). From the analysis of functionality of three different cellular targets, cell membrane integrity, lysosomal stability and mitochondrial activity after exposure to Roundup Transorb®, Furadan 350 SC® and the association of these products. It was also analyzed the ability of defense in cells exposed to pollutants chosen with regard to the activity of xenobiotic protein extruders as well as the expression of such proteins. From the results it was observed cytotoxic effect from both the pesticide and the mixture observed for all of these targets, yet having an inhibitory effect on the activity of xenobiotics extrusion by P-glycoproteins (P-gps). Only when exposed to the insecticide and the mixture the cells showed increased expression of glycoprotein (P-gp). There was a negative correlation between cytotoxicity appears mainly in the lysosome activity and mitochondrial integrity and activity of P-gps. In conclusion, it was noticed that concentrations below that allowed by law for the active ingredients of the pesticides tested, proved to be toxic to all targets of cytotoxicity tested in this study with the exception of mitochondria, suggesting that this toxicity can be presented due to the surfactants present in commercial formulations.

Key-words: cytotoxicity, xenobiotics extrusion, mixture of pesticides.

Sumário

1- LISTA DE FIGURAS.....	8
2- INTRODUÇÃO GERAL	9
3- OBJETIVOS	16
3.1- OBJETIVO GERAL.....	16
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4- REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	16
5- CAPÍTULO 1.....	23
5.1-RESUMO.....	25
5.2- INTRODUÇÃO.....	26
5.3- METODOLOGIA.....	28
5.3.1- Condições experimentais.....	28
5.3.2- Cultura Celular.....	29
5.3.3- Análise de Citotoxicidade.....	29
5.3.3.1- Integridade da Membrana Celular.....	29
5.3.3.2- Atividade Mitocondrial.....	30
5.3.3.3- Integridade Lisossomal.....	30
5.3.4- Resistência a Múltiplos Xenobióticos.....	31
5.3.4.1- <i>Atividade das proteínas de extrusão de xenobióticos</i>	31
5.3.4.2- <i>Expressão das Glicoproteínas P (Pgps)</i>	31
5.3.4- Análise estatística.....	32
5.4- RESULTADOS.....	32
5.4.1- Citotoxicidade.....	32
5.4.1.1- <i>Roundup Transorb</i> [®]	32
5.4.1.2- <i>Furadan</i> [®]	33
5.4.2- Resistência a Múltiplos Xenobióticos (MXR)-Extrusão de xenobióticos.....	35
5.4.2.1- <i>Roundup Transorb</i> [®]	35
5.4.2.2- <i>Furadan</i> [®]	35
5.4.3- Correlação entre citotoxicidade e atividade de proteínas extrusoras...35	
5.4.4- Mistura dos agrotóxicos.....	36
5.4.4.1- Citotoxicidade.....	36
5.4.4.2- Resistência a Múltiplos Xenobióticos (MXR) Extrusão de xenobióticos.....	38

5.4.4.3- Expressão das Glicoproteínas P (Pgps).....	39
5.5- DISCUSSÃO.....	40
5.6- REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	44
ANEXO.....	48

1-LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....33
Figura 2.....34
Figura 3.....35
Figura 4.....36
Figura 5.....37-38
Figura 6.....39
Figura 7.....40

2- INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos principais e mais importantes alimentos para a nutrição humana, servindo como base alimentar para uma grande parte da população mundial (SOSBAI, 2010). Desde a década passada o Rio Grande Sul (RS) já se apresentava como o maior estado produtor deste cereal (BARRIGOSSI *et al.*, 2004), com uma produção de aproximadamente 60% do mercado nacional, seguido pelo estado de Santa Catarina (9%) (SOSBAI, 2010). Na metade sul do estado o arroz irrigado é a principal atividade econômica, chegando a representar mais de 50% do valor bruto na produção para diversos municípios, gerando assim muitos empregos para a população rural (SOSBAI, 2010).

Tal importância socioeconômica gera a necessidade de certos cuidados para o cultivo e manutenção dessas plantações, portanto são adotadas diversas tecnologias agrícolas, que visam a maximização na produção/qualidade deste cereal, com o mínimo de perdas possível. Para isso os rizicultores têm investido, largamente, no uso de agrotóxicos, como inseticidas e herbicidas, visando o controle de pragas nas plantações.

De acordo com os dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG - 2012), as vendas de agrotóxicos no Brasil aumentaram mais de 72% entre 2006 e 2012. A venda destes produtos movimentou quase US\$ 8,5 bilhões no Brasil em 2011, tornando-o o segundo maior mercado do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos (SINDAG, 2012).

Com relação à natureza da praga combatida, os agrotóxicos são classificados como inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas e/ou raticidas, acaricidas, nematocidas, fumigantes, moluscicidas etc. No plantio de arroz, como em outras plantações, inseticidas e herbicidas tem expressiva utilização, uma vez que estes cultivos são alvo da pressão de herbivoria, causada por insetos fitófagos, e de competição, que pode ser gerada pela presença de outras plantas.

Alguns dos inseticidas mais utilizados e sugeridos na região, para a rizicultura, são os que possuem como princípio ativo o carbofurano (2,3-diidro-2,2-dimetil benzofuran-7-il- metil carbamato), um composto altamente solúvel em água, sendo suscetível à lixiviação e percolação através dos campos agrícolas, podendo ser transportado e contaminar mananciais hídricos superficiais e subterrâneos (LU *et al.*, 2011). No Rio Grande do Sul, o carbofurano foi detectado em diversas regiões do

estado, sendo que a maior concentração média observada foi de 0,52 µg/L na região da planície costeira interna à Lagoa dos Patos (SILVA *et al.*, 2009).

Em animais, o principal mecanismo da ação tóxica do carbofurano, bem como os demais carbamatos, consiste na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), cuja ação é degradar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) (FUKUTO, 1990), esta inibição causa um excesso de acetilcolina na fenda sináptica causando um colapso e paralisia de músculos, sendo fatal quando atinge os envolvidos principalmente na respiração e batimentos cardíacos.

Com relação às formulações comerciais uma das mais utilizadas na região é a marca comercial Furadan 350 SC[®] empregado principalmente do combate ao gorgulho aquático (*Oryzophagus oryzae*). Inseticida este de classificação toxicológica II, e que oferece muito perigo ao meio ambiente (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA, 2013).

Dentre os herbicidas mais utilizados e recomendados, estão aqueles que possuem como ingrediente ativo o glifosato, um herbicida não seletivo utilizado para combater plantas daninhas aquáticas e é usado em diferentes concentrações em culturas ao redor do mundo (ÇAVAŞ E KONEN, 2007), inclusive no Brasil.

Com relação ao mecanismo de ação do glifosato, em vegetais, podemos citar a redução acentuada nos níveis dos aminoácidos aromáticos (EMBRAPA, 2012), além disso, o glifosato reduz a síntese de fitoalexinas, ocorrendo aumento da concentração de nitrato, etileno e outros compostos que aceleram a morte das plantas (GALLI E MONTEZUMA, 2005).

Os herbicidas que possuem o glifosato como princípio ativo são empregados na rizicultura no combate de plantas "daninhas" como o arroz vermelho (*Oryza sativa*) ou o Capim do banhado (*Panicum dichotomiflorum*), dentre estes herbicidas um dos mais utilizados na região é o produto comercial Roundup Transorb[®].

No entanto, embora o produto comercial Roundup Transorb[®] seja utilizado no controle de plantas ditas invasoras, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2013) este herbicida possui alta capacidade tóxica e apresenta também perigo ao Meio Ambiente.

O constante uso de agrotóxicos pode trazer efeitos adversos ao ambiente e aos organismos que podem acabar expostos aos produtos utilizados nas plantações, em especial na cultura do arroz irrigado uma vez que para o plantio do arroz irrigado parte do corpo d'água é desviado para a irrigação da plantação, e posteriormente a

água utilizada nesta lavoura é devolvida ao corpo d'água de origem, por essa razão a rizicultura pode ser considerada responsável por grande parte dos agrotóxicos lançados em corpos d'água (PINHEIRO *et al.*, 2010).

Durante o período em que a plantação está inundada água entra em contato com os agrotóxicos que, anteriormente, foram utilizados na plantação, podendo causar danos à qualidade do recurso hídrico e à fauna lacustre, que habita o corpo d'água de origem. Considerando que a contaminação por agrotóxicos pode ocorrer também em áreas adjacentes àquelas onde os produtos foram utilizados (CABRERA *et al.* 2008) estes podem ser levados, através das correntes de água, para outros locais e lá também exercer toxicidade.

Existem estudos que mostram a existência da relação entre patologias desenvolvidas por diferentes organismos aquáticos, de importância econômica, e a poluição do meio aquático (LE MOULLAC e HAFFNER, 2000). Em concordância Ruppert e Barnes (1996) afirmam que se gasta grandes quantias para controlar as pragas, no entanto o uso exagerado de agrotóxicos pode ser perigoso para o ambiente e para a saúde humana.

O herbicida Roundup Transorb[®] pode ser considerado um contaminante que deve ser visado devido à sua alta solubilidade e seu uso extensivo, e ainda a possível exposição de organismos não alvos para este herbicida provoca uma maior preocupação (KREUTZ *et al.*, 2011). Uma vez que, altas concentrações (100 ppb) de glifosato já foram verificadas em áreas adjacentes a plantações muitos dias após a utilização (SILVA *et al.*, 2003), considerando dependendo das condições do recurso hídrico este agrotóxico pode perdurar de 7 até 70 dias aproximadamente no ambiente (GIESY *et al.*, 2000).

Moreno e Colaboradores (2013) evidenciaram também efeitos genotóxicos em peixes (*Prochilodus lineatus*) quando expostos a formulação comercial Roundup Transorb[®]. Outras formulações de glifosato também podem ser associadas a genotoxicidade em peixes (ÇAVAŞ E KONEN, 2007), anfíbios (CLEMENTS *et al.*, 1997) e em células de mamíferos (LIOI *et al.*, 1998) quando expostos a estes produtos.

Embora a ampla utilização de produtos que possuem o glifosato como princípio ativo aconteça devido a seu baixo potencial tóxico, sabe-se que sua formulação comercial Roundup[®] apresenta toxicidade a diferentes organismos

(DUTRA *et al.*,2011; LIOI *et al.*, 1998), segundo Santos e Colaboradores (2005) a formulação comercial Roundup Transorb[®] apresenta-se ainda mais tóxica que a formulação original (Roundup[®]) para organismos não alvo, sendo um dos principais efeitos adversos, tanto para glifosato quanto suas formulações comerciais, a inibição da acetilcolinesterase (GLUSCZAK *et al.*,2007; MODESTO e MARTINEZ, 2010).

Acredita-se que este aumento na toxicidade esteja relacionado aos surfactantes utilizados nestes produtos, pois enquanto a formulação original apresenta como surfactante apenas POEA (POLIOXIDOETILENOAMINA) a formulação *transorb* apresenta, além de POEA, um outro surfactante, não especificado pelo fabricante (HOWE *et al.*, 2004).

No entanto, não só os herbicidas podem representar um risco ao ambiente, mas também os inseticidas, como o Furadan 350 SC[®], pertencente à Classe Ambiental II. Devido à sua elevada solubilidade em água e baixo coeficiente de adsorção, o carbofurano está presente na superfície de escoamento e tem o potencial de se concentrar em lagos, rios e fontes de águas subterrâneas (NICOSIA *et al.*, 1991) além de apresentar grande persistência no ambiente, que pode ser de 30 a 100 dias (BARCELO E HENNION, 1997).

Sobre este poluente Jayatillake e Colaboradores (2011) afirmam que, em determinadas concentrações, o carbofurano causa efeitos adversos em larvas de anfíbios, como perda de mobilidade, alterações histopatológicas e morte.

Dutra e Colaboradores (2011) em um estudo utilizando uma espécie de anfípoda exposta a diferentes concentrações de carbofurano (1µg/L e 10µg/L) obtiveram, entre outros efeitos, queda na atividade Na⁺/K⁺ATPase, e aumento nos níveis de peroxidação lipídica, assim como visto ao exporem estes indivíduos ao herbicida a base de glifosato.

Ao verificarem possíveis efeitos genotóxicos do carbofurano sobre células de mamíferos, Sharma e Colaboradores (2012) obtiveram um efeito de concentração-resposta (diretamente proporcional) em relação à formação de micronúcleos em linfócitos humanos expostos a diferentes concentrações do inseticida.

Estudos retratam também a capacidade do inseticida carbofurano em causar estresse oxidativo em mamíferos (JAISWAL *et al.*, 2013), causar desregulações bioquímicas e comportamentais em peixes (HERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 2011), além de letalidade a diferentes organismos (FISHER *et al.*, 1999; JAYATILLAKE *et al.*, 2011).

Em comparação a sua formulação comercial (Furadan 350 SC), considerada muito perigosa ao ambiente (MAPA, 2013), a ANVISA (2013) classifica o carbofurano como um composto altamente perigoso ao ambiente, o que pode indicar uma toxicidade superior do princípio ativo em relação à formulação comercial, diferente do que ocorre com o glifosato e suas formulações comerciais citadas anteriormente.

Existe ainda a possibilidade dos agrotóxicos utilizados na plantação entrarem em contato, um com o outro, durante o momento em que a plantação está “inundada”, uma vez que existem agrotóxicos que podem perdurar no ambiente por longos períodos de tempo (LONDRES, 2011). Diluídos em água podem, mais facilmente, se misturar e no momento em que esta água é devolvida ao corpo hídrico de origem esta mistura também se torna disponível ao ambiente aquático e aos organismos que nele vivem.

Londres (2011) afirma que a toxicidade das misturas pode não ser equivalente à soma das atividades tóxicas de cada produto. Os produtos podem interagir entre si e produzir efeitos adversos diferentes do que aqueles provocados por cada um dos agrotóxicos em separado podendo acarretar em aumento do efeito tóxico (sinergismo).

No entanto, determinadas combinações de agrotóxicos podem apresentar antagonismo (efeitos menos adversos que aqueles obtidos com os produtos em separado ou até mesmo anulação do efeito). Santos e Martinez (2014) evidenciaram antagonismo entre a mistura dos herbicidas Atrazina[®] e Roundup[®], onde a combinação destes dois produtos resultou em uma diminuição do efeito tóxico, que estes apresentaram separadamente, em relação à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), e no processo de peroxidação lipídica, em uma espécie de bivalve (*Corbicula fluminea*).

Estudos relacionam a utilização de agrotóxicos a consequências adversas em diferentes organismos e não somente aos alvos a que se destinam, tais efeitos manifestam-se desde o nível celular, podendo afetar diferentes tipos de células, sejam elas neurais (RAI e SHARMA, 2007), embrionárias (SCASCITELLI e PACCHIEROTTI, 2003) entre outras. Há ainda um especial destaque com relação a estudos realizados com as células hepáticas, uma vez que estas possuem a função relacionada à detoxificação (DU *et al.*, 2014).

Autores evidenciaram que diferentes tipos de agrotóxicos causam alterações em diferentes compartimentos celulares. Como demonstrado por Sakr e Colaboradores (2002) que, ao analisarem os efeitos do Hostation (inseticida organofosforado) em hepatócitos do peixe *Clarias gariepinus*, verificaram que houve grande vacuolização no citoplasma destas células.

Ainda, com relação à citotoxicidade, podemos citar o trabalho realizado por Akbar e Colaboradores (2012) que, ao exporem células de *Helicoverpa armigera* (lagarta do algodão) ao agrotóxico carbofurano, evidenciaram alteração no funcionamento mitocondrial destas, o que resultou em uma inibição significativa da respiração celular.

Peixoto (2005) ao comparar o ingrediente ativo glifosato e a formulação comercial Roundup[®], verificou efeito citotóxico em células hepáticas isoladas de ratos wistars, quando expostas ao Roundup[®], observando dano a nível mitocondrial, em diferentes funções desta organela, enquanto que quando expostas ao ingrediente ativo sozinho não evidenciou efeito adverso, em relação aos alvos estudados.

Podemos, assim, perceber que existem diversas formas da toxicidade celular se manifestar, podendo afetar o funcionamento de diferentes organelas, e muitas vezes levando à morte celular. No entanto, embora a exposição a agrotóxicos possa causar efeitos nocivos em diferentes funções celulares, algumas destas células podem apresentar também a capacidade de defesa contra estes poluentes.

Dentre estes mecanismos de defesa podemos citar aquele conhecido como Resistência a Múltiplos Xenobióticos (MXR) que atua nas células como forma de proteção contra possíveis ameaças, evitando o acúmulo de determinadas substâncias na célula, transportando-as para fora do meio celular.

O MXR, associado à contaminação de organismos aquáticos por toxinas ou poluentes antropogênicos, é análogo ao mecanismo de resistência a múltiplas drogas (MDR) apresentado por células tumorais de mamíferos que, após certo período, tornam-se mais resistentes a quimioterápicos (BARD, 2000).

Diferentes métodos (toxicológicos, bioquímicos, moleculares, etc.) apontam que o mecanismo MXR resulta, muitas vezes, da atividade da glicoproteína P (Pgp), descrita também no mecanismo de resistência a múltiplas drogas (MDR) em células tumorais (GOTTESMAN e PASTAN, 1993) “bombeando” os possíveis contaminantes para fora da célula. As Pgps são representantes da família de proteínas transportadoras ABC (*ATP Binding Cassete*), proteínas que fazem transporte as

custas de gasto de ATP, sendo que o mecanismo MXR pode envolver várias proteínas do tipo ABC.

As proteínas ABC já foram detectadas em uma variedade de organismos aquáticos incluindo esponjas, mexilhões, ostras e peixes (BARD, 2000). Koehler e Colaboradores (1998) verificaram a expressão destas proteínas no mecanismo MXR em peixes a partir do ensaio de imunocitoquímica, onde Pgp foi encontrada sendo altamente expressa em hepatócitos de *Platichthys flesus*.

Existem também estudos que comprovam que a exposição a certos compostos químicos pode também causar a inibição da atividade dos transportadores ABC e não a ativação, a qual se espera que aconteça (KURELEC, 1995). Definida como quimiossensibilização, esta inibição pode ocorrer, entre outros fatores, na presença de agrotóxicos (KOEHLER *et al*, 1998).

Diversas linhagens celulares oriundas do tecido hepático de peixes tem se mostrado bastante úteis em estudos toxicológicos (EIDE *et al.*, 2014) uma vez que estas células possuem função relacionada com o processo de detoxificação. Uma delas, derivada do *zebrafish* (*Danio rerio*) é denominada ZF-L, descrita inicialmente por Collodi e colaboradores (1992) e detalhada por Gosh e colaboradores (1994).

Um grande interesse na pesquisa com a linhagem ZF-L é decorrente do seu uso para determinação das mutações e identificação de genes funcionalmente importantes (SCHNEIDER *et al*, 2009) sendo utilizada em diferentes estudos toxicológicos (SANDRINI *et al.*, 2009; TENG *et al.*, 2013). Demonstrando ser um excelente modelo para a detecção de capacidade citotóxica e genotóxica de xenobióticos apresentando respostas semelhantes ao que pode ser verificado também em cultura primária (EIDE *et al*, 2014). Além de representar um método de fácil manejo e relativamente barato.

Uma vez que há escassez de estudos que correlacionam estes dois (herbicida e inseticida) ou mais produtos, surge a questão se em conjunto estes poluentes podem causar efeitos ainda mais prejudiciais aos organismos não alvos.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar efeitos citotóxicos em células hepáticas de *zebrafish* em diferentes organelas. Permitindo um maior conhecimento acerca da citotoxicidade causada pela exposição aos agrotóxicos RoundupTransorb[®], Furadan 350 SC[®], à mistura destes produtos e efeitos no mecanismo de defesa celular MXR (inativação/ativação e/ou indução à produção de

proteínas extrusoras), além de verificar a existência de correlação entre a citotoxicidade e a atividade de MXR .

3-OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Verificar efeitos citotóxicos da associação de dois agrotóxicos, utilizados na rizicultura no estado do Rio Grande do Sul, sobre células hepáticas da linhagem ZF-L.

3.2- Objetivo específico

. Verificar a sensibilidade de diferentes alvos celulares (membrana celular, lisossomo e mitocôndria) à exposição ao herbicida Roundup Transorb , ao inseticida Furadan 350 SC[®] e à associação dos dois agrotóxicos;

. Apontar o teste mais sensível a estes xenobióticos;

. Analisar a capacidade de defesa da célula no que diz respeito à atividade de proteínas extrusoras de xenobióticos, assim como à expressão de tais proteínas, nas diferentes condições experimentais;

. Avaliar a correlação entre a citotoxicidade e a capacidade de defesa das células no que diz respeito a atividade de proteínas extrusoras de xenobióticos diante às condições de contaminação de interesse.

4- REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL

AKBAR, S. M. D.; SHARMA H. C.; JAYALAKSHMI, S .K.; SREERAMULU, K. **Methylparathion- and carbofuran induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in *Helicoverpa armigera* (Noctuidae: Lepidoptera)**. Pesticide Biochemistry and Physiology, V. 103: P. 31-37. 2012.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitaria. SAI: Sistema de informações sobre agrotóxicos.. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d96d0d804e09c76a9a32bbc09d49251b/C06+%E2%80%93+carbofurano.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 13 de dezembro de 2013.

BARCELO, D; HENNION, M. C. **Trace determination of pesticides and their degradation products in water**. Amsterdam: Elsevier, v19. 1997.

BARD, S. M. **Multixenobiotic resistance as a cellular defence mechanism in aquatic organisms.** Aquatic Toxicology, v. 48: p.357-389. 2000.

BARRIGOSI, J.; LANNA, A.C.; FERREIRA, E. **Agrotóxicos no Cultivo do Arroz no Brasil: análise do consumo e medidas para reduzir o impacto ambiental negativo.** EMBRAPA, 2004.

CABRERA, L.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E.G. **Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do estado do RS.** Quimica Nova, v. 31: p. 1982-1986. 2008.

ÇAVALO, T.; KONEN, S. **Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay.** Mutagenesis, v. 22: p.263-268. 2007.

CLEMENTS, C.; RALPH, S.; PETRAS, M. **Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet),** Environmental and Molecular Mutagenesis, v.29: p.277-288. 1997.

COLLODI, P.; KAMEI, Y.; ERNST, T.; MIRANDA, C.; BUHLER, D.R.; BARNES, D.W., **Culture of cells from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo and adult tissues.** Cellular Biology Toxicology. v.8: p.43-61. 1992.

DU, Y; WANG, J; JIA, J; SONG, N; XIANG, C; XU, J; HOU, Z; SU, X; LIU, B; JIANG, T; ZHAO, D; SUN, Y; SHU, J; GUO, Q; YIN, M; SUN, D; LU, S; SHI, Y; **DENG, H. Human Hepatocytes with Drug Metabolic Function Induced from Fibroblasts by Lineage Reprogramming.** Cell Stem Cell, v.14: p. 394-403. 2014.

DUTRA, B. K.; FERNANDES, F. A.; FAILACE, D. M.; OLIVEIRA, G. T. **Effect of Roundup (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae).** Ecotoxicology, v.20: p. 255-263. 2011.

EIDE, M; RUSTEN, M; MALE, R; JENSEN, K. H. M; GOSKOYR, A. **A characterization of the ZFL cell line and primary hepatocytes *in vitro* liver**

cell models for the zebrafish (Daniorerio). Aquatic Toxicology, v.147: p.7-17. 2014.

EMBRAPA. Disponível em http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/336.pdf : acesso em 18 de maio de 2014.

FISHER, S. J.; GALINAT, G. F; BROWN, M. L. **Acute Toxicity of Carbofuran to Adult and Juvenile Flathead Chubs.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 63: p. 385 – 391. 1999.

FUKUTO, T. R.. **Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides.** Environmental Health Perspective. V.87, p.245–254. 1990.

GALLI, A. J. B., MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura.** ACADCOM Gráfica e Editora Ltda, Santo André, São Paulo. 2005.

GIESY, J. P; DOBSON, S.; SOLOMON, K.R. **Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide.** Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. v. 167: P. 35 – 120. 2000.

GLUSCZAK, L; MIRON, D.S; MORAES, B. S; SIMÕES, R.R; SCHETINGER, R.C; MORSCH, V.M; LORO, V.L. **Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*).** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. v. 146: p. 519-524. 2007

GHOSH, C., ZHOU, Y. L., COLLODI, P. **Derivation and characterization of a zebrafish liver-cell line.** Cellular Biology. Toxicology. V.10: p, 167–176. 1994.

GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. **Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.** Annual Review of Biochemistry, v. 62: p. 385-427. 1993.

HERNÁNDEZ-MORENO, D; PÉREZ-LÓPEZ, M; SOLER F. **Effects of carbofuran on the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Study of biomarkers and behaviour alterations.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.74. p. 1905–1912. 2011.

HOWE, C. M.; BERRILL, M.; PAULI, D.B.; HELBING, C.C.; WERR, K.; VELDHOFEN, N. **Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species.** *Environmental Toxicology Chemistry*. v. 23: p. 1928-1938. 2004.

JAISSWAL, S. K; SIDDIQI, N. J.; SHARMA, B. **Carbofuran Induced Oxidative Stress in Rat Heart: Ameliorative Effect of Vitamin C.** Hindawi Publishing Corporation, v. 2013: p.1-10. 2013.

JAYATILLAKE, B. A. D. M. C.; WIJESINGHE, M. R , RATNASOORIYA, W. D.; LAKRAJ; G. P. **Toxic effects of Carbofuran on *Duttaphrynus Melanostictus* Larvae.** *International Journal of Environmental Sciences*, v.2: p. 1060 – 1070. 2011.

KOEHLER, A.; LAURITZEN, B.; BAHNS, S.; GEORGE, S. G.; FÖRLIN, L.; VAN NOORDEN, C. J. F. **Clonal adaptation of cancer cells in flatfish liver to environmental contamination by changes in expression in P-gp related MXR, CYP450, GST-A and G6PDH activity.** *Marine Environmental Research*. v.46: p.141 – 145. 1998.

KREUTZ L. C.; BARCELLOS L. J. G.; VALLE S. F.; SILVA T. O.; ANZILIERO D.; DOS SANTOS E. D.; PIVATO M.; ZANATTA R. **Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate.** *Fish & Shellfish Immunology*, v. 30: p. 51-57. 2011.

KURELEC, B. **Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences.** *The Science of the Total Environment*, v.171: p. 197-204. 1995.

LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. **Environmental factors affecting immune responses in Crustacea.** *Aquaculture*, v. 191: p.121–131. 2000.

LIOI, M .B.; SCARFI, M. R.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; ZENI, O.; DI BERARDINO,D.; URSINI, M.V. **Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro.** Mutation Research, v.403: p.13-20. .1998.

LONDRES, F. **AGROTÓXICOS NO BRASIL: um guia para ação em defesa da vida.** AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa. 2011.

LU, L. A.; MA, Y. S.; KUMAR, M.; LIN, J. G. **Photochemical degradation of carbofuran and elucidation os removal mechanism.** Chemhistry Engenery. Journal. V.166: p.150-156. 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em <http://agrofit.agricultura.gov.br/>: acesso em: 24 de julho de 2014.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. **Rondup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish Prochilodus lineatus.** Chemosphere, v. 78: p. 294 – 299. 2010.

MORENO, N.C.; SOFIA, S.H.; MARTINEZ, C.B.R. **Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb(®) and its active ingredient glyphosate on the fish Prochiloduslineatus.** Environmental toxicologyandpharmacology. v. 37: p.448–454. 2014.

NICOSIA, S.; CARR, N.; GONZALES, D. A.; ORR, M. K. **Off Field Movement and Dissipation of Soil Incorporated Carbofuran from Three Commercial Rice Fields.** Journal of Environmental Quality. v 20: p. 532-539. 1991.

PEIXOTO F. **Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation,** Chemosphere. v.61: p.1115-1122. 2005.

PINHEIRO, A., SILVA, M. R., KRAISCH, R. **Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC.** Rega, v.7: p.17-26. 2010.

RAI, D. K.; SHARMA, B. **Carbofuran-induced oxidative stress in mammalian brain.**Molecular Biotechnology, v.37: p.66-71. 2007.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. Roca, v. 6. 1996.

SANDRINI, J. Z.; BIANCHINI, A.; TRINDADE, G.S.; NERY, L.E.M.; MARINS, L.F.F. **Reactiveoxygen species generation and expression of DNA repair-related genes aftercopper exposure in zebrafish (Danio rerio) ZFL cells**. Aquatic Toxicology. v.95: p,285–291. 2009.

SAKR, S. A.; HANAFY, S. M; EL-DOSOUKIY, N. I. **Histopathological, histochemicaland Physiological studies on the effect of the Insecticide "hostathion" on the liver of the Catfish Clariasgariepinus**. Aquatic Biology & Fish, v.1: p. 263-267. 2002.

SANTOS, A. A; RANZANI-PAIVA, M. J. T; FELIZARDO, N. N; RODRIGUES, E. L. **Análise histopatológica de fígado de tilápia-do-nilo, Oreochromisniloticus, criada em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil**. Boletim do Instituto de Pesca, v.30: p.141–145. 2005.

SANTOS, K.C; MARTINEZ, C.B.R. **Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup®, alone and in combination, on the Asian clam Corbiculaflumine**. Ecotoxicology and Environmental Safety. v.100: p.7–14. 2014

SCASCITELLI, M.; PACCHIEROTTI, F. **Effects of lindane on oocyte maturation and preimplantation embryonic development in the mouse**. Reproductive Toxicology, v.17: p.299-303. 2003.

SCHNEIDER, A.C.R.; SANTOS, J.L.D.; PORAWSKI M; SHAEFER, P.G; SANTOS, J.L.S; SILVEIRA, T.R. **Implementação de um novo modelo de experimentação animal- Zebrafish**. Revista HPCA, v.29: p.100–103. 2009.

SHARMA, R. K; RAI, D. K; SHARMA, B. **In-vitro carbofuran induced micronucleus formation in human blood lymphocytes**. Cellularand Molecular Biology, v.58: p.128–133. . 2012.

SILVA, D. R.O, AVILA, L.A., AGOSTINETTO, D. MAGRO, T. D., OLIVEIRA, ZANELLA, R., NOLDIN, J. A. **Monitoramento de agrotóxicos em águas**

superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. Ciencia Rural. v.39: p.2383-2389. 2009

SILVA, M. D.; PERALBA, M. C. R.; MATTOS, M. L. T., . **Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio Passo do Pilão.** Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v.13, p.19-28. 2003.

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. **Uso de defensivos é intensificado no Brasil.** Disponível em: http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2278. Acesso em: 9 de junho de 2014.

SOSBAI. **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil.** Sosbai. 2010.

TENG, Q., EKMAN, D. R., HUANG, W., COLLETTE, T. W. **Impacts of 17alpha-ethynylestradiol exposure on metabolite profiles of zebrafish (Danio rerio) livercells.** Aquatic Toxicology. v.130–131, p.184–191. 2013.

5- CAPÍTULO 1

Citotoxicidade da associação dos agrotóxicos Roundup Transorb[®]
e Furadan 350 SC[®] em células da linhagem ZF-L

(Manuscrito a ser submetido para a revista Toxicology *in vitro*)

Citotoxicidade da associação dos agrotóxicos Roundup Transorb[®]
e Furadan 350 SC[®] em células da linhagem ZF-L

Goulart, T.L.S.^a, Boyle, R.T.^b Souza, M.M^{a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos
Continental, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande / RS,
Brazil

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG,
Rio Grande / RS, Brazil

^b Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG,
Rio Grande / RS, Brazil

Corresponding author: Marta Marques de Souza

Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Instituto de Ciências Biológicas

Av. Itália km 8 – Campus Carreiros

96.203-900 – Rio Grande – RS – Brazil

E-mail: martasouza@furg.br

5.1- RESUMO

O presente estudo teve por objetivo verificar a citotoxicidade de agrotóxicos, utilizados na rizicultura em células da linhagem ZF-L. A partir da análise de três alvos celulares (integridade da membrana celular, atividade mitocondrial e estabilidade lisossomal) em células expostas a concentrações de Roundup Transorb[®] (67,7 µg/L, 135,4 µg/L e 270,8 µg/L), de Furadan 350 SC[®] (0,1 µg/L, 0,05 µg/L e 0,02 µg/L) e à associação destes produtos. Foi analisada, a capacidade de defesa das células no que diz respeito à atividade de proteínas extrusoras de xenobióticos, assim como à expressão de tais proteínas. Foi verificado efeito citotóxico de ambos os agrotóxicos, bem como da mistura sobre todos os alvos verificados, apresentando ainda efeito inibitório à atividade de extrusão de xenobióticos. Quando expostas ao inseticida e à mistura, foi verificado um aumento na expressão de glicoproteínas P (P-gps). Verificou-se ainda existência de correlação negativa entre a citotoxicidade apresentada, principalmente na atividade mitocondrial e na integridade lisossomal e a atividade das P-gps. Percebeu-se que as concentrações abaixo do permitido pela legislação brasileira, mostraram-se tóxicas para todos os alvos de citotoxicidade testados neste estudo, com exceção da mitocôndria, sugerindo que esta toxicidade apresentada pode ser devido aos surfactantes presentes nas formulações comerciais.

Palavras-chave: Glicoproteína P, agrotóxicos, mitocôndria, lisossomo, membrana plasmática.

5.2- INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos principais e mais importantes alimentos para a nutrição humana, servindo como base alimentar para uma grande parte da população mundial (SOSBAI, 2010). No Brasil, desde a década passada o Rio Grande do Sul (RS) já se apresentava como o maior estado produtor de arroz (BARRIGOSI *et al.*, 2004). Na metade sul do estado o arroz irrigado é a principal atividade econômica, chegando a representar mais de 50% do valor bruto na produção para diversos municípios, gerando assim muitos empregos para a população rural (SOSBAI, 2010).

Considerando a importância socioeconômica que este cultivo tem para a região os rizicultores têm investido, largamente, no uso de agrotóxicos, como inseticidas e herbicidas, visando o controle de pragas nas plantações. No entanto de acordo com os dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG - 2012), as vendas de agrotóxicos no Brasil aumentaram mais de 72% entre 2006 e 2012. A venda destes produtos movimentou quase US\$ 8,5 bilhões no Brasil em 2011, tornando-o o segundo maior mercado do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos (SINDAG, 2012).

O constante uso de agrotóxicos pode trazer efeitos adversos ao ambiente e aos organismos que podem acabar expostos aos produtos utilizados nas plantações, em especial na cultura do arroz irrigado uma vez que para o plantio parte do corpo d'água é desviado para a irrigação da plantação, e posteriormente a água utilizada nesta lavoura é devolvida ao corpo d'água de origem, por essa razão a rizicultura pode ser considerada responsável por grande parte dos agrotóxicos lançados em corpos d'água (PINHEIRO *et al.*, 2010).

Dentre os herbicidas mais utilizados e recomendados para a rizicultura, estão aqueles que possuem o glifosato como ingrediente ativo, um herbicida não seletivo utilizado para combater plantas daninhas aquáticas e é usado em diferentes culturas ao redor do mundo (ÇAVAS e KONEN, 2007) sendo um deles o produto comercializado pela companhia Monsanto, o Roundup Transorb[®].

Embora estudos tenham indicado a baixa toxicidade do glifosato (PEIXOTO, 2005; HOWE *et al.*, 2004), existem estudos que relacionam formulações comerciais do herbicida glifosato a efeitos adversos em organismos não-alvos, principalmente

relacionados a inibição da acetilcolinesterase (GLUSCZAK et al., 2007; MODESTO e MARTINEZ, 2010), acredita-se que este aumento na toxicidade esteja relacionado aos surfactantes presentes nas formulações comerciais, em especial o Roundup Transob[®] que apresenta uma mistura de surfactantes (POEA e outro surfactante não especificado pelo fabricante- HOWE *et al*, 2004) e mostra-se mais tóxica que outras formulações de glifosato (SANTOS et al., 2005).

Dentre os inseticidas mais frequentemente encontrados na cultura do arroz irrigado, está o inseticida carbofurano (2,3-diidro-2,2-dimetil benzofuran-7-il- metil carbamato) um composto altamente solúvel em água, sendo suscetível à lixiviação e percolação através dos campos agrícolas, podendo ser transportado e contaminar mananciais hídricos superficiais e subterrâneos (LU *et al.*, 2011), em animais, o principal mecanismo da ação tóxica do carbofurano, consiste na inibição da enzima acetilcolinesterase (FUKUTO, 1990), tendo como formulação, entre outras, a marca comercial Furadan 350 SC[®].

Em comparação a sua formulação comercial (Furadan 350 SC[®]), considerada muito perigosa ao ambiente (MAPA, 2013), a ANVISA (2013) classifica o carbofurano como um composto altamente perigoso ao ambiente, o que pode indicar uma toxicidade superior do princípio ativo em relação à formulação comercial, diferente do que ocorre com o glifosato e suas formulações comerciais citadas anteriormente.

Existe ainda a possibilidade de estes poluentes entrarem em contato, um com o outro, durante o momento em que a plantação está “inundada”, uma vez que existem agrotóxicos que podem perdurar no ambiente por longos períodos de tempo e a toxicidade das misturas pode não ser equivalente à soma das atividades tóxicas de cada produto em separado (LONDRES, 2011). Os produtos podem interagir entre si e produzir efeitos adversos diferentes que podem ser mais ou menos graves do que aqueles provocados separadamente por cada um dos produtos.

Embora a exposição a diferentes agrotóxicos possa causar efeitos nocivos em diferentes células/funções celulares, algumas destas células podem apresentar também a capacidade de defesa contra estes poluentes. Dentre estes mecanismos de defesa podemos citar a Resistência a Múltiplos Xenobioticos (MXR) e atua nas células como forma de proteção contra possíveis ameaças, “bombeando” os possíveis contaminantes para fora da célula. As Pgps são representantes da família de proteínas

transportadoras ABC (*ATP Binding Cassete*), proteínas que fazem transporte a custa de gasto de ATP.

Considerando estes fatores, o objetivo do presente estudo foi verificar efeitos a nível celular em células hepáticas de *zebrafish* (*Danio rerio*) expostas ao herbicida Roundup Transorb[®], ao inseticida Furadan 350 SC[®] e a mistura destes agrotóxicos, a partir de diferentes alvos celulares. Além de permitir um maior conhecimento acerca da citotoxicidade causada pela exposição aos agrotóxicos Roundup Transorb[®], Furadan 350 SC[®], à mistura destes produtos e efeitos no mecanismo de defesa celular (inativação/ativação e/ou indução à produção de proteínas extrusoras) além de verificar a existência de correlação entre a citotoxicidade apresentada e o MXR.

5.3- METODOLOGIA

5.3.1 Condições experimentais

As concentrações dos agrotóxicos escolhidos, Roundup Transorb[®] (48% - glifosato) e Furadan 350 SC[®] (35% - carbofurano), foram definidas tendo como base respectivamente as concentrações de seus princípios ativos estabelecidas pelo CONAMA (na resolução nº 357 de 2005) para águas de classe I e II, 65 µg/L para glifosato e 0,02 µg/L para carbaril. Como não há limite definido para o carbofurano, foi utilizada a concentração limite estabelecida para o carbaril, pelo fato de também pertencer ao mesmo grupo que o carbofurano (carbamatos).

Inicialmente foram escolhidas para cada contaminante três concentrações, sendo uma abaixo da estabelecida pelo CONAMA (0,5 vezes) a própria concentração permitida e a terceira, uma concentração acima (2 vezes). Portanto foram feitas diluições dos produtos comerciais com base em seus princípios ativos, a partir destas as três concentrações utilizadas para o Roundup Transorb foram 270,8 µg/L (130 µg/L-glifosato), 135,4 µg/L (65 µg/L-glifosato) e 67,7 µg/L (32,5 µg/L-glifosato) e para o inseticida Furadan 350 SC foram 0,1 µg/L (0,04 µg/L- carbofurano) 0,05 µg/L (0,02 µg/L- carbofurano) e 0,02 µg/L (0,01 µg/L- carbofurano). As concentrações utilizadas para a mistura dos poluentes foram escolhidas a partir dos resultados dos ensaios de citotoxicidade obtidos com as concentrações dos agrotóxicos separadamente.

Para evitar quaisquer interações, entre os agrotóxicos e os compostos presentes no meio de cultura, que pudessem comprometer/alterar os resultados obtidos, os experimentos, tanto com os agrotóxicos em separado quanto em conjunto,

foram realizados em uma solução salina (em mM: 112,6 NaCl; 1,81 CaCl₂; 1,89 KCl; 2,38 NaHCO₃ -pH 7,0).

Em experimentos realizados em nosso laboratório foi verificado que, nesta solução salina, as células hepáticas de *zebrafish* mantiveram sua viabilidade, em relação à atividade mitocondrial, pelo tempo de no mínimo seis horas, que foi então, o tempo de exposição adotado neste trabalho.

5.3.2- Cultura Celular

Para o presente estudo foram utilizadas culturas estabelecidas de hepatócitos de *zebrafish* (ZFL), obtidas da Coleção Americana – *American Type culture collection* (ATCC) e depositadas no Banco de Células do Rio de Janeiro - UFRJ, mantidas em garrafas de cultura a uma temperatura de 28 °C, em meio RPMI 1640 (Sigma, Aldrich), suplementado com soro fetal bovino (10%), antibiótico (penicilina e estreptomicina) e antimicótico (1%). As células eram repicadas uma ou duas vezes por semana. Para a montagem de placas, para experimento, a viabilidade das células era verificada, através do método de exclusão do corante azul de tripan (0,08%), e somente dava-se prosseguimento ao procedimento quando a viabilidade das células se mostrava superior à 95%.

Para cada experimento as células eram preparadas à concentração de 3×10^5 células/ml em placas de 24 ou 96 poços (dependendo do ensaio), e com antecedência de 48 horas para garantir que as células estariam aderidas à placa no momento do experimento, para cada ensaio eram utilizados de 3 a 5 poços por condição experimental e 4 placas independentes.

5.3.3 Análise de Citotoxicidade

5.3.3.1- Integridade da Membrana Celular

Para verificar a integridade da membrana plasmática das células foi realizado o teste de exclusão do corante Azul de Tripan (0,08%), onde células que são permeáveis ao corante tornam-se azuis, evidenciando o comprometimento de sua membrana plasmática. As células, em placas de 24 poços, eram expostas as condições experimentais desejadas durante seis horas, após este período estas eram centrifugadas (5 min. 680g) e as placas eram então levadas ao microscópio.

Para verificar a viabilidade celular foi utilizada a análise de imagens para contagem de células viáveis/inviáveis. Antes da captura de cada imagem era adicionado o corante azul de tripan em cada poço, na concentração final de 0,08 %.

As células foram observadas através do microscópio de epi-fluorescência (Olympus IX81) acoplado à câmera DP72 para obtenção de imagens. Estas posteriormente foram analisadas com o auxílio do *freeware NIH IMAGEJ* (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Com o auxílio do programa as células eram classificadas, como “tipo 1” (viáveis) e “tipo 2” (inviáveis) e então contadas, cada célula em seu determinado grupo. Os dados obtidos eram então transformados para porcentagem para posterior interpretação.

5.3.3.2- Atividade Mitocondrial

Após a exposição, as células, em placas de 96 poços, eram centrifugadas (5min. 680g) e acrescidas de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromidethiazolyl blue) na concentração final de 0,5mg/mL, as células eram então incubadas em estufa a temperatura de 28°C em situação de escuro, por três horas –para a formação de cristais de formazan devido à atividade das enzimas succinato desidrogenase, envolvidas no processo de respiração celular (quanto maior a atividade destas enzimas mais cristais são formados).

Após a incubação as células foram centrifugadas novamente, o sobrenadante era então retirado e adicionados, a cada poço, 100 µL de DMSO (Dimetil Sulfoxido-solvente orgânico) para solubilização dos cristais formados. Posteriormente as placas eram levadas à leitora de microplaca e lidas por espectrofotometria (490 nm). Os dados obtidos a partir desta análise eram transformados para porcentagem de viabilidade.

5.3.3.3- Integridade lisossomal

Para esta análise foi utilizado o ensaio de retenção de vermelho neutro (2-amino-3-metil 7dimetil-amino-cloreto de fenazina), para isso as células, em placas de 96 poços – após o tratamento experimental- eram centrifugadas (5min. 680g) e as soluções experimentais retiradas. A partir daí eram então adicionados 200 µL de solução de vermelho neutro (40µg/mL) e as células incubadas em estufa a temperatura de 28°C em situação de escuro, por três horas. Passadas as três horas as amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante retirado e adicionados formaldeído (0,5% v/v) em CaCl₂ durante cinco minutos. Após, o sobrenadante era

retirado e 100 μ L de álcool ácido (1% de ácido acético em 50% de álcool etílico) eram adicionados a cada poço, as células eram então levadas à leitora de microplaca para leitura de absorbância (550nm). Os dados obtidos a partir desta análise eram transformados para porcentagem de viabilidade e então calculados tomando o controle como 100%.

5.3.4- Resistência a Multixenobióticos

5.3.4.1- Atividade das proteínas de extrusão de xenobióticos

A atividade das proteínas ABC responsáveis pelo mecanismo MXR foi avaliada a partir do ensaio de acúmulo do fluorescente “Rodamina B” (substrato de proteínas ABC).

Para este ensaio as células (em placas de 24 poços) expostas às condições experimentais pelo período de seis horas eram lavadas com a salina, para a remoção de resquícios de poluentes/células mortas, e então incubadas em Rodamina B (10 μ mol) durante duas horas. Após este período as células foram mais uma vez lavadas, para a retirada do fluorescente que não havia sido absorvido pelas mesmas, e então levadas para análise.

A fluorescência foi avaliada através de imagens, obtidas com o auxílio do microscópio de epi-fluorescência Olympus IX81 (com excitação de 570nm e emissão 680nm), posteriormente estas imagens foram analisadas com o auxílio do *freeware NIH IMAGEJ*. Para isso, no programa, as imagens foram convertidas para 8 *bits* (escalas de cinza) cada célula presente no campo era selecionada, individualmente, e a intensidade média era verificada, quanto maior a média maior o acúmulo de rodamina no interior da célula e conseqüentemente menor a atividade das proteínas.

5.3.4.2- Expressão das Glicoproteínas P (Pgps)

A técnica de imunocitoquímica foi empregada para medida indireta da quantidade de P-gp nas células, como uma das principais proteínas ABC responsáveis pela defesa celular. Para tal as células, em placas de 24 poços, foram fixadas em formaldeído (4%) e marcadas com anticorpo monoclonal C219 (contra P-gp) (SIGNE- COVANCE) e posteriormente com o anticorpo secundário fluorescente TRITC (Sigma, Aldrich) que se liga ao anticorpo primário (Rocha e Souza, 2012).

A fluorescência, também foi avaliada através de imagens, obtidas com o auxílio do microscópio de epi-fluorescência Olympus IX81 (com excitação de 570nm e emissão 680nm), e estas imagens foram analisadas com o auxílio do

freeware *NIH IMAGEJ*. Assim como na análise anterior, neste ensaio as imagens eram convertidas para 8 *bits*, cada célula era selecionada, individualmente, e a intensidade média de fluorescência era verificada. No entanto, neste caso, uma maior média de fluorescência indica uma maior quantidade de proteínas presentes.

5.3.5- Análise estatística

Para todos os resultados foram calculados média e erro padrão da média ($X \pm SE$), para confecção de gráficos. Os resultados foram submetidos à ANOVA (análise de variância de um fator), seguida do *post hoc* de *Tuckey* com grau de significância de $p \leq 0,05$. Para a verificação de correlação utilizamos a análise de correlação linear.

5.4- Resultados

5.4.1-Citotoxicidade

5.4.1.1- Roundup Transorb[®]

Foi verificada uma queda significativa ($p < 0,001$, $n = 9$) na integridade da membrana plasmática na menor concentração utilizada ($67,7 \mu\text{g/L} - 94 \pm 0,7\%$). Houve uma queda ainda maior da viabilidade na concentração de $135,4 \mu\text{g/L}$ ($90,2 \pm 0,6\%$), mantendo-se na concentração mais alta utilizada ($270,8 \mu\text{g/L} - 89,8 \pm 0,9\%$) (fig. 1A).

Foi possível verificar uma queda significativa na atividade mitocondrial das células, a partir da concentração estabelecida pelo CONAMA ($135,4 \mu\text{g/L} - 85 \pm 3,9\%$), não havendo aumento significativo do efeito nas células com o aumento da concentração deste produto ($p < 0,001$, $n = 18$) (fig. 1B).

Com relação à integridade lisossomal, houve uma diminuição significativa ($p < 0,001$, $n = 18$) a partir da menor concentração utilizada para o herbicida ($67,7 \mu\text{g/L} - 76 \pm 2,4\%$). O efeito causado pela concentração intermediária ($135,4 \mu\text{g/L} - 75,7 \pm 3,8\%$) não diferiu estatisticamente ($p = 1$) daquele causado pela menor concentração utilizada. Em contrapartida foi verificada queda na viabilidade destas organelas causado pela maior concentração ($270,8 \mu\text{g/L}$) que mostrou-se superior às aquelas verificadas em concentrações inferiores ($58,6 \pm 3,5\%$) (fig. 1C).

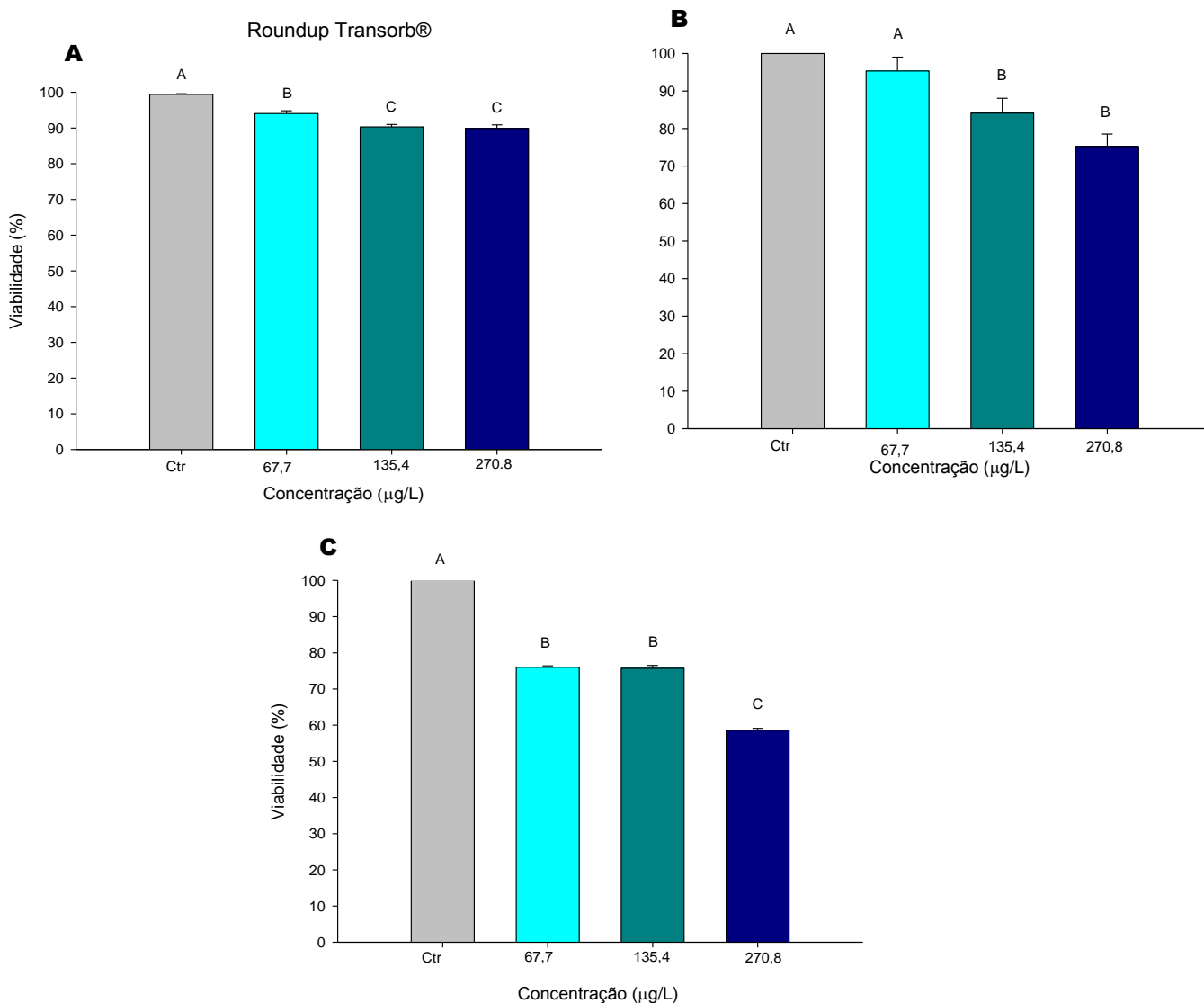


Figura 1: Valores médio (\pm SE) da viabilidade de membrana plasmática (A), Atividade mitocondrial (B) Integridade lisossomal (C) expressas em porcentagem (%) em relação às concentrações ($\mu\text{g/L}$) utilizadas para o Roundup Transorb®. Letras distintas indicam diferença significativa entre médias ($p < 0,05$).

5.4.1.2- Furadan 350 SC®

Com relação à integridade da membrana plasmática em células expostas ao inseticida, foi possível perceber que, em relação ao controle (100%), as três concentrações utilizadas ($0,02\mu\text{g/L} - 88,7 \pm 1,3\%$; $0,05 \mu\text{g/L} - 85,7 \pm 1,6\%$; $0,1 \mu\text{g/L} - 83,8 \pm 1,2\%$) demonstraram citotoxicidade significativa ($p > 0,001$, $n = 9$), causando queda na viabilidade celular (fig.2A).

Com relação a formação de cristais de formazan, as células expostas ao Furadan 350 SC®, apresentaram efeito adverso significativo ($p < 0,001$, $n = 18$) apenas

na concentração de 0,1 µg/L ($77\% \pm 2,4\%$), havendo uma diminuição da formação destes cristas (fig.2B).

Os resultados obtidos a partir da análise de integridade lisossomal, demonstram um efeito bastante acentuado ($p < 0,001$, $n = 20$) desde a concentração de 0,02µg/L havendo uma queda na viabilidade para $62 \pm 1,2\%$. Este efeito mostra-se ainda maior nas concentrações de 0,05µg/L ($49 \pm 1,2\%$) e 0,1µg/L ($38 \pm 2,5\%$) (fig. 2C).

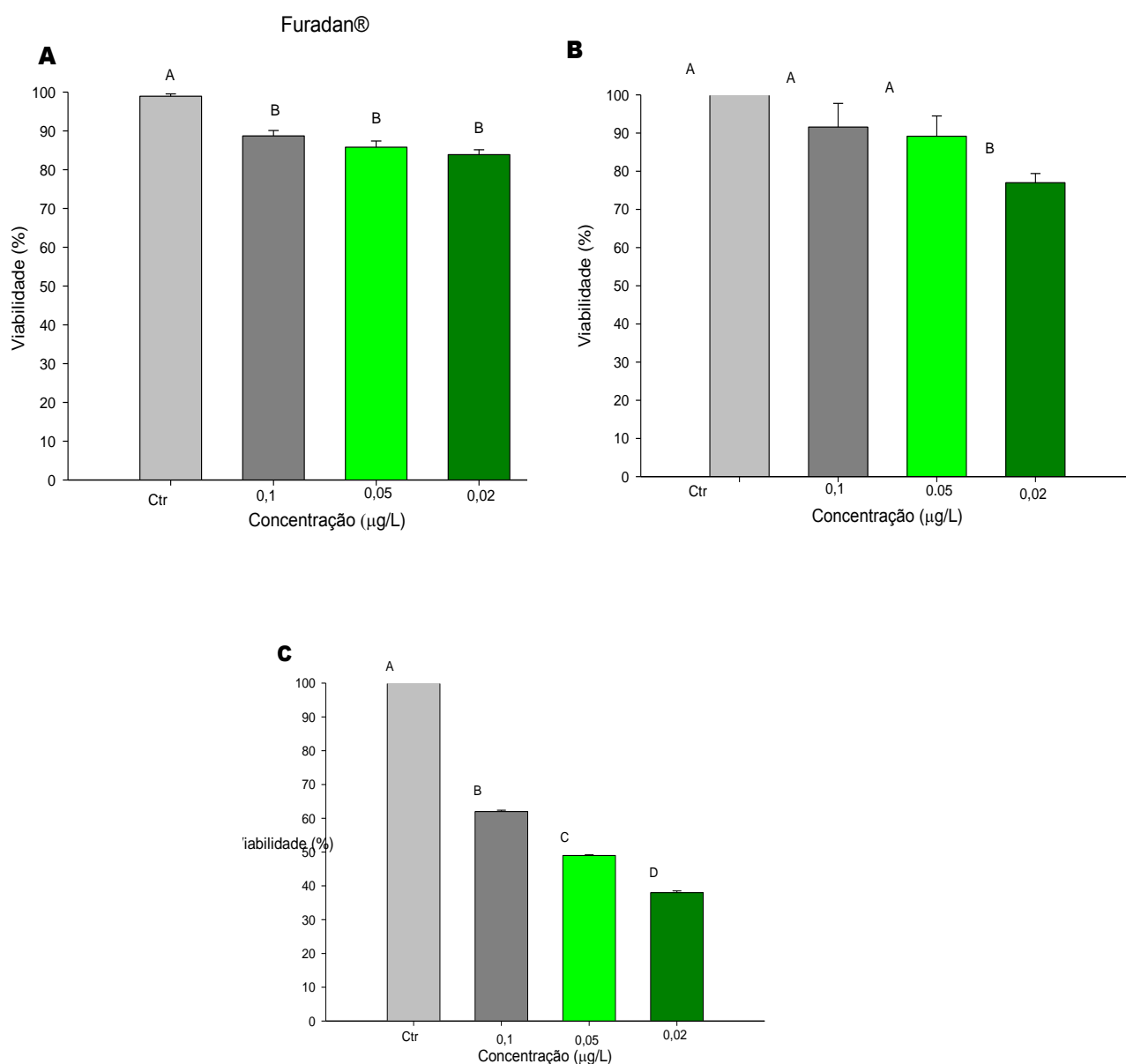


Figura 2: Valores médio (\pm SE) da viabilidade de membrana plasmática (A), Formação de cristais de formazan (B) Integridade lisossomal (C) expressa em porcentagem (%) em relação às concentrações (µg/L) utilizadas para o Furadan 350 SC. Letras distintas indicam diferença significativa entre médias ($p < 0,05$).

5.4.2- Resistência a Múltiplos Xenobióticos (MXR)

5.4.2.1- Atividade das proteínas de extrusão de xenobióticos

5.4.2.1.1-Roundup Transorb®

Em células expostas ao herbicida Roundup Transorb® houve uma inibição significativa ($p < 0,001$, $n = 9$) na atividade das proteínas extrusoras, na concentração de 67,7 $\mu\text{g/L}$ que demonstrou uma inibição de 25% em relação ao controle (100%), não divergindo ($p > 0,18$), do obtido ao expor as células à concentração de 135,4 $\mu\text{g/L}$. Na maior concentração utilizada para o herbicida (270,8 $\mu\text{g/L}$) percebeu-se uma inibição ainda maior da atividade de proteínas extrusoras (42,6%) (fig.3).

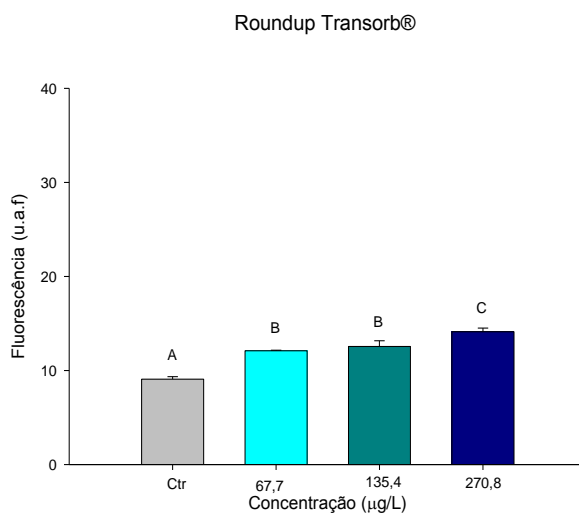


Figura 3: Fluorescência (u.a.f- unidade arbitrária de fluorescência) média (\pm SE) indicando acúmulo de rodamina, em relação às concentrações de RoundupTransorb®. Letras distintas indicam diferença significativa entre médias ($p < 0,05$).

5.4.2.1.2- Furadan 350 SC®

Quando expostas ao inseticida, verificou-se uma inibição de 45,5% ($p < 0,001$; $n = 9$) na menor concentração utilizada (0,02 $\mu\text{g/L}$) em relação ao controle (100%) havendo uma inibição significativamente superior na atividade das Pgps nas concentrações de 0,05 $\mu\text{g/L}$ (64,4%) e 0,1 $\mu\text{g/L}$ (114,3%) (fig.4).

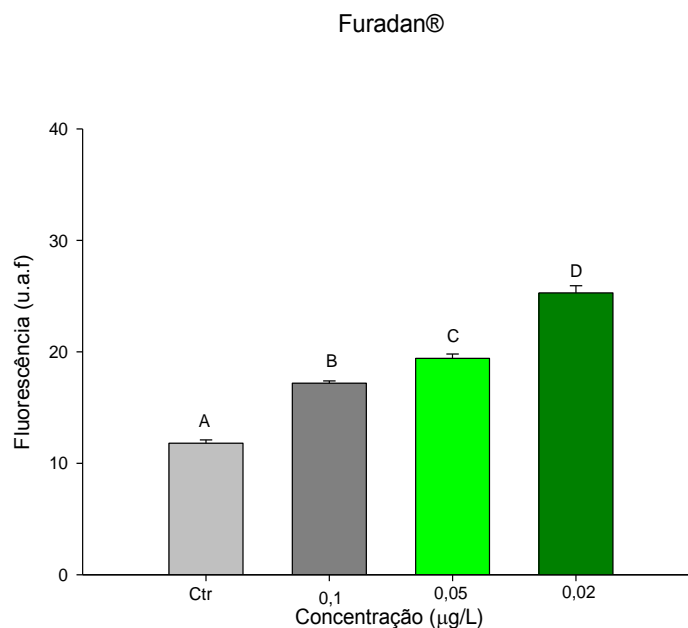


Figura 4: Fluorescência (u.a.f- unidade arbitraria de fluorescência) média (\pm SE) indicando acúmulo de rodamina, em relação às concentrações de Furadan 350 SC®. Letras distintas indicam diferença significativa entre médias ($p < 0,05$).

5.4.2.2- *Correlação entre citotoxicidade e atividade de proteínas extrusoras*

Foi analisada a correlação entre a toxicidade exercida pelos poluentes testados e a atividade de proteínas extrusoras. Onde, com relação ao Roundup Transorb®, verificou-se correlação negativa para todos os alvos testados (Viabilidade de membrana plasmática: -0,90; Atividade mitocondrial: -0,95; Integridade lisossomal: -0,99).

Verificou-se também correlação negativa entre a citotoxicidade apresentada e a atividade das P-gps, para todos os alvos (Viabilidade de membrana plasmática: -0,89; Atividade mitocondrial: -0,97; Integridade lisossomal: -0,97) quando as células foram expostas ao inseticida Furadan 350 SC®.

5.4.3- *Mistura dos agrotóxicos*

5.4.3.1- *Citotoxicidade*

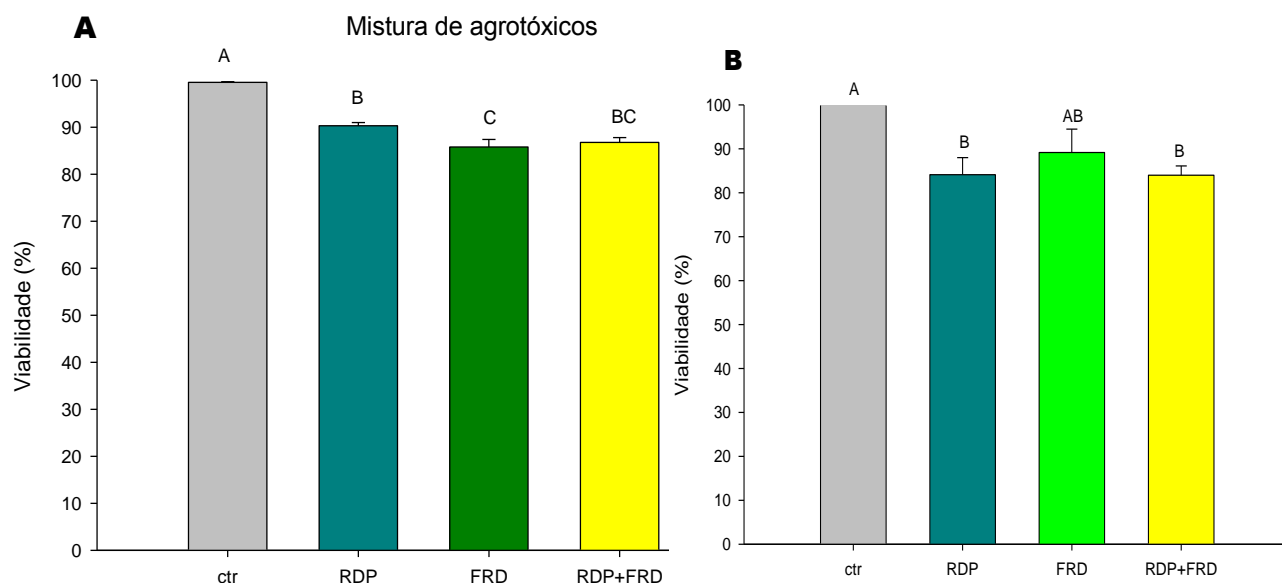
Considerando o fato de a concentração mediana para ambos os agrotóxicos terem se mostrado, em quase todos os resultados, citotóxicas e com base em seus

princípios ativos (concentrações estabelecidas pelo CONAMA) se tratarem de concentrações teoricamente seguras, estas foram escolhidas para a mistura.

Os efeitos da mistura na integridade da membrana plasmática mostraram-se significativos ($p < 0,001$, $n = 9$) em relação ao controle (100%) havendo uma queda na viabilidade celular para $86,7 \pm 1,9\%$, no entanto a mistura não demonstrou diferença significativa em relação aos produtos em separado (fig.5A).

Com relação à formação de cristais de formazan, a mistura dos agrotóxicos mostrou-se tão tóxica quanto a eles em separado (não havendo diferença estatística significativa entre eles, $p > 0,89$; $n = 18$), causando efeito em relação ao controle, apresentando uma menor formação de cristais ($84 \pm 2,1\%$ - fig.5B).

Através da análise da integridade lisossomal, foi possível verificar que em relação ao herbicida, não houve diferença significativa ($p > 0,89$) para a mistura. Em contrapartida a queda na integridade desta organela, obtida com o inseticida em separado ($49 \pm 1,2\%$) mostrou-se superior ao obtido com a mistura ($75 \pm 3,8\%$) (fig.5C).



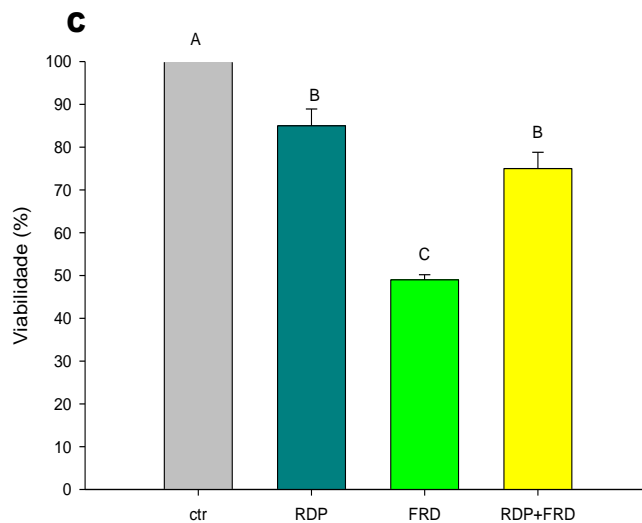


Figura 5: Valores médio (\pm SE) da viabilidade de membrana plasmática (A), formação de cristais de formazan (B), Integridade lisossomal (C) expressas em porcentagem (%) em relação ao Roundup Transorb[®] (RDP), ao Furadan 350 SC[®] (FRD) e à mistura dos agrotóxicos (RDP + FRD). Letras distintas indicam diferença significativa entre médias ($p < 0,05$).

5.4.4- Mistura dos Agrotóxicos

5.4.4.1- Resistência a Múltiplos Xenobióticos (MXR)

5.4.4.1.1- Atividade das proteínas de extrusão de xenobióticos

Com relação às células expostas a mistura dos poluentes estudados, verificou-se inibição significativa de 69,6 % em relação ao controle ($p < 0,001$, $n = 9$). Esta inibição mostrou-se superior àquela demonstrada em células expostas ao herbicida Roundup Transorb[®] e, ao mesmo tempo, inferior à inibição verificada em células expostas ao inseticida Furadan 350 SC[®] (101,2%) (fig.6).

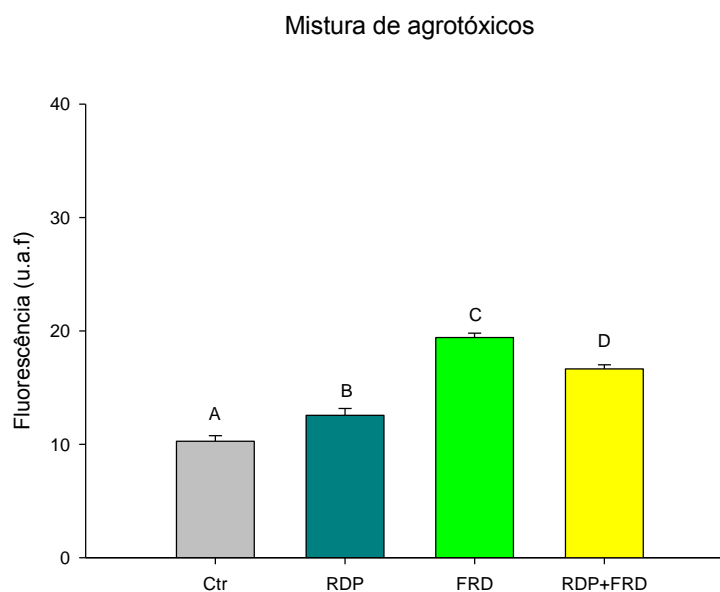


Figura 6: Fluorescência (u.a.f- unidade arbitraria de fluorescência) média (\pm SE) indicando acúmulo de rodamina, em relação ao Roundup Transorb[®] (RDP), ao Furadan 350 SC[®] (FRD) e à mistura dos agrotóxicos (RDP + FRD). Letras distintas indicam diferença significativa entre médias ($p < 0,05$).

5.4.4.1.2- Expressão das Glicoproteínas P (Pgps)

A partir do ensaio de imunocitoquímica foi verificado que em relação ao controle, a exposição tanto aos poluentes em conjunto (com expressão 26,1 % superior ao controle), quanto o inseticida em separado (53,8% superior), induziram significativamente ($p < 0,001$, $n = 9$) a expressão de proteínas p-gp, enquanto o herbicida Roundup Transorb[®] isolado, na concentração, não demonstrou diferença significativa em relação ao controle ($p = 1$) (fig.7)

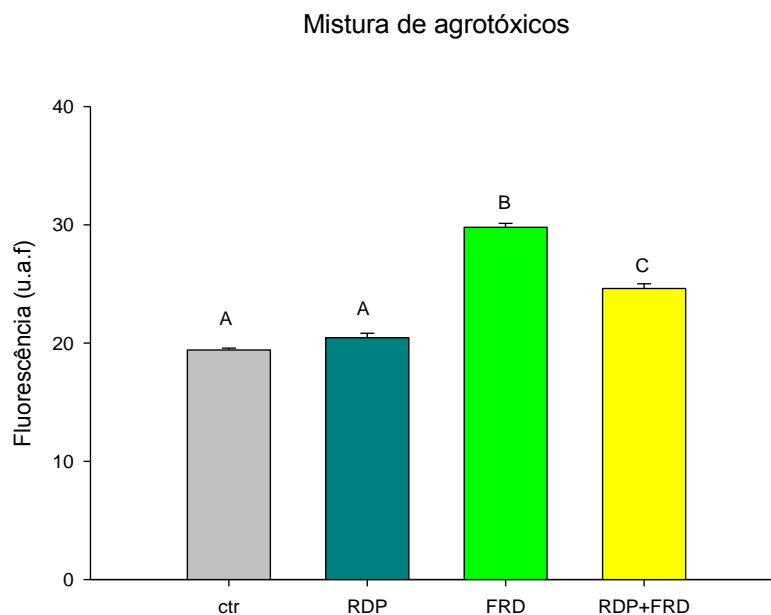


Figura 7: Fluorescência (u.a.f- unidade arbitrária de fluorescência) média(\pm SE) indicando expressão de glicoproteína (Pgp) durante exposição ao Roundup Transorb[®] (RDP), ao Furadan 350 SC[®] (FRD) e à mistura dos agrotóxicos (RDP + FRD). Letras distintas indicam diferença significativa entre médias ($p < 0,05$)

5.5- Discussão

Neste estudo foram verificados os efeitos do herbicida Roundup Transorb[®] e do inseticida Furadan 350 SC[®], tanto isoladamente quanto combinados, sobre diferentes alvos celulares (membrana plasmática, mitocôndria, lisossomo) de células da linhagem ZF-L. Bem como a correlação entre a citotoxicidade, apresentada na presença destes poluentes, com a atividade de proteínas extrusoras de xenobióticos do mecanismo MXR.

Foi verificado que todas as concentrações testadas, tanto para o herbicida quanto para o inseticida causaram diminuição significativa na viabilidade da membrana plasmática destas células, o que indica comprometimento na permeabilidade da membrana. Sendo que a capacidade de causar aumento na permeabilidade da membrana celular já foi descrito tanto para o carbofurano, por Gupta e Colaboradores (1994) em células hepáticas de mamíferos, quanto para outra formulação de glifosato (Roundup), por Martinez e Colaboradores (2007) em células mononucleares sanguíneas. Considerando a função desta estrutura é possível dizer que seu comprometimento leva à perda da manutenção do compartimento

intracelular e torna mais suscetível a entrada de xenobióticos no meio intracelular, o que pode gerar danos a outras estruturas/organelas na célula e não somente à membrana plasmática.

Em células expostas ao Roundup transorb® houve uma diminuição na formação de cristais de formazan o que pode indicar uma inibição na atividade mitocondrial, principalmente no que diz respeito à atividade da enzima succinato desidrogenase. Autores relatam ainda efeitos adversos causados pela exposição a formulações a base de glifosato, em relação à mitocôndria, tais como redução da capacidade transmembrana, inibição na síntese de ATP (PEIXOTO, 2005; SAMSEL e SENEFF, 2013) e diminuição na atividade respiratória (MARTINEZ *et al.*, 2007).

Houve também uma diminuição na formação de cristais de formazan (menor atividade da enzima succinato desidrogenase) em células expostas ao Furadan 350 SC® na maior concentração testada (0,1µg/L). Resultado que contrasta com o que foi verificado por Bakthavathsalam e Srinivasa (1982) que ao exporem células hepáticas do peixe *Anabastes tudineus* ao inseticida Furadan® verificaram predominante aumento da atividade da enzima succinato desidrogenase na concentração de 560µg/L. No entanto, apesar do aumento predominante, durante as primeiras seis horas de exposição estes autores verificaram diminuição significativa na atividade destas enzimas, o que se assemelha ao que foi visto neste estudo, considerando que o tempo de exposição adotado foi o mesmo no qual a redução da atividade mitocondrial foi verificada. Acredita-se que o aumento na atividade desta organela esteja relacionado a uma ação compensatória da célula frente à exposição ao poluente, uma vez que os autores Bakthavathsalam e Srinivasa (1982) vêem este aumento na atividade mitocondrial como uma tentativa da célula de superar a toxicidade causada pelo inseticida.

Percebe-se que o inseticida Furadan 350 SC®, assim como o herbicida RoundupTransorb®, apresentam efeito tóxico a diferentes alvos celulares mesmo nas menores concentrações testadas, como verificado na viabilidade da membrana plasmática e integridade lisossomal. Embora em relação à atividade mitocondrial de células expostas ao inseticida, as duas menores concentrações não tenham apresentado toxicidade significativa, o que reforça a necessidade da análise de diferentes alvos, uma vez que determinada concentração não apresente efeito tóxico a determinado alvo, não necessariamente significa que esta concentração não apresente toxicidade a outro alvo.

Considerando o efeito acentuado causado na integridade lisossomal pela exposição tanto ao Roundup Transorb[®] quanto ao Furadan 350 SC[®], esta organela pode ser considerada como a mais sensível a estes poluentes, uma vez que a partir das menores concentrações testadas é possível verificar uma diminuição significativa na integridade lisossomal destas células (25% e 38% respectivamente). Considerando que uma diminuição na quantidade de lisossomos viáveis pode tornar a célula mais vulnerável à toxicidade de xenobióticos, uma vez que esta organela funciona também como uma forma de proteção da célula contra o acúmulo de contaminantes em seu interior.

Com relação à atividade de proteínas ABC, percebemos que quando expostas ao herbicida Roundup Transorb[®] e ao inseticida Furadan 350 SC[®], isoladamente, as células apresentaram um acúmulo do fluorescente maior que o da condição controle, ou seja, houve uma inibição na atividade de extrusão por essas proteínas. Esta inibição mostrou uma alta correlação negativa com todos os ensaios de citotoxicidade avaliados, principalmente com a diminuição da integridade lisossomal (RDP: -0,99; FRD: -0,97) e a formação de cristais de formazan (atividade mitocondrial) (RDP: -0,95; FRD: -0,97).

A forte correlação negativa apresentada entre a integridade lisossomal e o acúmulo do fluorescente Rodamina B pode estar relacionado ao fato de os lisossomos serem organelas que estão intimamente ligadas a processos de degradação e endocitose (SCHWAKE *et al.*, 2013) apresentando em sua membrana proteínas ABC que auxiliam nestes processos (FUKUDA, 1991). Sendo portanto, organelas que auxiliam na proteção da célula ao retirar produtos indesejados (organelas envelhecidas, xenobióticos), agindo de forma semelhante às proteínas envolvidas no MXR pois em suma agem evitando o acúmulo de poluentes/contaminantes no meio intracelular.

Considerando a produção de ATP uma das principais funções mitocondriais conhecidas (KRAUSS, 2001) e a necessidade das proteínas ABC por ATP para seu funcionamento (KURELEC *et al.*, 2000), existe a possibilidade de a diminuição na atividade mitocondrial das células, se apresentar também como um fator que contribui para a inibição da atividade extrusora das proteínas ABC. Heales e Colaboradores (1999) afirmam que deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial levam à diminuição da síntese de ATP, considerando que em nossos resultados a exposição aos agrotóxicos testados causou uma diminuição

na formação de cristais de formazan, indicando uma diminuição na atividade de enzimas envolvidas no processo de respiração celular (succinato desidrogenase), sendo que esta diminuição também pode levar à inviabilidade/morte celular (ANKARCRONA *et al.*,1995).

A capacidade de diminuir a formação de ATP, já foi verificada no inseticida carbofurano em larvas de *Helicoverpa armigera* (AKBAR *et al.*, 2014), e na formulação comercial Roundup® em células hepáticas de rato (PEIXOTO, 2005). Sustentando assim os resultados da análise da atividade mitocondrial e também a possível redução de ATP decorrente desta, refletindo na inibição das proteínas ABC.

A mistura dos agrotóxicos apresentou efeito tóxico em relação à viabilidade da membrana plasmática e a atividade mitocondrial, não diferindo dos efeitos observados nos agrotóxicos em separado, mantendo a queda em ambos os casos quando comparados ao controle. Contudo, quando a citotoxicidade foi avaliada com base na integridade lisossomal, foi possível perceber que a mistura demonstrou a mesma citotoxicidade que a obtida com o herbicida em separado, mas se mostrou menos tóxica que o inseticida isolado. Sugerindo um efeito antagonista da mistura em relação ao inseticida, o que pode indicar que o efeito tóxico nesta organela deve-se principalmente ao Furadan 350 SC®.

Sobre a atividade das proteínas ABC, as células expostas à mistura apresentaram uma inibição superior ao obtido com o Roundup Transorb® isolado e ao mesmo tempo inferior ao obtido com o inseticida em separado. Nesta análise a mistura passou a ter um efeito intermediário aos observados pelos agrotóxicos separadamente, podendo ser considerada como uma relação de sinergismo em relação ao Roundup Transorb® e de antagonismo em relação ao inseticida.

Kurelec (1995) define substâncias capazes de causar inibição a atividade das proteínas extrusoras de xenobióticos com quimiossensibilizadores, sendo consideradas substâncias que devem ser visadas, uma vez que podem bloquear mecanismos de defesa básicos das células. Portanto podemos classificar os agrotóxicos testados neste estudo, assim como sua mistura, como quimiossensibilizadores, pois estes apresentaram efeito inibitório à atividade das proteínas ABC.

Foi avaliada ainda a expressão de proteínas P-gps, principal representante dos transportadores ABC, nas células expostas ao Roundup Transorb®, ao Furadan 350 SC® e à mistura dos agrotóxicos, onde verificamos aumento significativo nessa

expressão apenas quando as células estavam expostas ao inseticida em separado e à mistura.

A expressão de P-gps pode ser alterada por diferentes fatores, as células podem aumentar a expressão das proteínas numa tentativa de responder com atividade mais efetivamente à presença de xenobióticos (BARD *et al.* 2002), assim evitando que estes xenobióticos causem efeitos adversos à célula. No entanto, como verificado no presente estudo, mesmo com o aumento na expressão de proteínas ainda assim houve efeito citotóxico apresentado pelos agrotóxicos testados, devido à inibição da atividade destas proteínas. O efeito quimiossensibilizante dos agrotóxicos parece ter sido o estímulo para o aumento da expressão da Pgp, pois a inibição causada pela exposição ao inseticida e à mistura, onde a inibição pelo inseticida é mais alta e da mistura intermediária, reflete-se no resultado da expressão de Pgps. Enquanto que a inibição pela exposição ao Roundup Transorb (a mais baixa verificada) parece não ter sido estímulo o bastante para uma maior expressão destas proteínas.

Considerado os princípios ativos dos agrotóxicos testados (Roundup Transorb[®]-glifosato e Furadan 350 SC[®]-carbofurano), percebe-se que as concentrações abaixo do permitido pela legislação brasileira, mostraram-se tóxicas para todos os alvos de citotoxicidade testados neste estudo, com exceção da mitocôndria. O que sugere que esta toxicidade apresentada, diante de concentrações supostamente seguras, pode ser devido aos surfactantes presentes nas formulações comerciais. Indicando a necessidade de estudos que comparem estes agrotóxicos e seus princípios ativos a partir de diferentes alvos/organismos, para um maior conhecimento acerca de seu potencial tóxico sejam isolados ou em conjunto.

5.6- REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

AKBAR, S. M. D.; SHARMA H. C.; JAYALAKSHMI, S .K.; SREERAMULU, K. **Methylparathion- and carbofuran induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in *Helicoverpa armigera* (Noctuidae: Lepidoptera).** Pesticide Biochemistry and Physiology, V. 103: P. 31-37. 2012.

ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J.M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, A.S.; NICOTERA, P. **Glutamate-induced neuronal**

death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, v.15: p. 961-973. 1995.

BAKTHAVATHSALAM, R; SRINIVASA, Y.R. **Impact of Furadan on the Succinate Dehydrogenase Activity of an Air-breathing Fish, *Anabas testudineus* (Bloch).** *Indian National Science Academy*. V. 49: p.9-14. 1983.

BARD, S. M; BELLO, S. M; HAHN, M. E; STEGEMAN, J. J. **Expression of P-glycoprotein in killifish (*Fundulus heteroclitus*) exposed to environmental xenobiotics.** *Aquatic Toxicology*, V.59 p. 237-251. 2002.

BARRIGOSI, J.; LANNA, A.C.; FERREIRA, E. **Agrotóxicos no Cultivo do Arroz no Brasil: análise do consumo e medidas para reduzir o impacto ambiental negativo.** EMBRAPA, 2004.

ÇAVAŞ, T.; KONEN, S. **Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay.** *Mutagenesis*, v. 22: p.263-268. 2007.

FUKUTO, T. R.. **Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides.** *Environmental Health Perspective*. V.87, p.245–254. 1990

FUKUDA, M. **Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intra cellular trafficking.** *The Journal of Biological Chemistry*, v.266: p.21327 – 21330. 1991.

GLUSCZAK, L; MIRON, D.S; MORAES, B. S; SIMÕES, R.R; SCHETINGER, R.C; MORSCH, V.M; LORO, V.L. **Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*).** *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. v. 146: p. 519-524. 2007.

GUPTA, R.C.; GOAD, J.T.; KADEL, W.L. **In vivo acute effects of carbofuran on protein, lipid, and lipoproteins in rat liver and serum.** *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 42: p.451-462. 1994.

HEALES, S. J.; BOLAÑOS, J. P.; STEWART, V. C.; BROOKES, P. S.; LAND, J. M.; CLARK, J. B. **Nitric oxide, mitochondria and neurological disease.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1410: p. 215–228. 1999.

HOWE, C. M.; BERRILL, M.; PAULI, D.B.; HELBING, C.C.; WERR, K.; VELDHOFEN, N. **Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species.** *Environmental Toxicology Chemistry*. v. 23: p. 1928-1938. 2004.

KRAUSS, S. **Mitochondria: Structure and role in respiration.** *Encyclopedia Of Life Sciences*, Nature publishing group, 1ed. 2001.

KURELEC, B. **Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences.** *The Science of the Total Environment*, v.171: p. 197-204. 1995.

KURELEC, B; SMITAL, T; PIVČEVIĆ, B; EUFEMIA, N; EPEL, D. **Multixenobiotic Resistance, P-Glycoprotein, and Chemosensitizers.** *Ecotoxicology*, v.9: p.307-327. 2000.

LONDRES, F. **AGROTÓXICOS NO BRASIL: um guia para ação em defesa da vida.** AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 1 ed. 2011.

LU, L. A.; MA, Y. S.; KUMAR, M.; LIN, J. G. **Photochemical degradation of carbofuran and elucidation of the removal mechanism.** *Chemistry Engineering Journal*. V.166: p.150-156. 2011.

MARTINEZ, A.; REYES, I.; REYES, N. **Citotoxicidade do glifosato em células mononucleares de sangue periférica humana.** *Biomédica*, v.27: p. 594-604. 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em <http://agrofit.agricultura.gov.br/>: acesso em: 24 de julho de 2014.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. **Rondup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*.** *Chemosphere*, v. 78: p. 294 – 299. 2010.

PEIXOTO F. **Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation**, Chemosphere. v.61: p.1115-1122. 2005.

PINHEIRO, A., SILVA, M. R., KRAISCH, R. **Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC**. Rega, v.7: p.17-26. 2010.

SAMSEL, A; SENEFF, S. **Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases**. Entropy, v.15, p.1416–1463. 2013.

SANTOS, J. B.; FERREIRA, E. A.; KASUYA, M. C. M., SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. O. **Tolerance of *Brady rhizobium* strains to glyphosate formulations**. Crop Protection, v.24: p.543–547. 2005.

SCHWAKE, M; SCHRODER, B; SAFTIG, P. **Lysosomal Membrane Proteins and Their Central Role in Physiology**. Trafic, v.14: p.739 – 48. 2013.

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. **Uso de defensivos é intensificado no Brasil**. Disponível em: http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2278. Acesso em: 9 de junho de 2014.

SOSBAI. **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Sosbai, 28ed. . 2010.

ANEXO

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

[ppyw-gfa-banner.gif](#) your paper your way

INTRODUCTION

Types of paper

The Journal's main purpose will be the publication of papers reporting and interpreting original toxicological research involving the application or development of in vitro techniques. Brief Communications (2,500 word limit) documenting important new findings warranting expeditious publication will also be considered, as will concise interpretative Reviews of toxicological topics of contemporary significance. Letters to the Editor will be limited to comments on contributions already published in the Journal; if a letter is accepted, a response (for simultaneous publication) will be invited from the authors of the original contribution. *Toxicology in Vitro* also welcomes Correspondence from the scientific community, especially as they relate to Hot Topics and Debates. These are handled directly by the Editor-in-Chief and may be accompanied by responses.



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**

Toxicology in Vitro follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission:

1. All third-party financial support for the work in the submitted manuscript.
2. All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript.
3. All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission.
4. Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported.
5. Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued).
6. Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work.

As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information will be acknowledged at publication in a Transparency Document. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org>. The form for conflict of interest disclosure can be downloaded [here](#), or at http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (if this link does not display properly in your browser, please right-click the link and select "Save Target As..." or "Save Link as..." from the popup menu.)

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/postingpolicy>), 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

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, 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. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. *After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles
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 reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights
As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

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 paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. All sources of funding should be declared as an acknowledgment at the end of the text. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy. Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you

will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

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 their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)

- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to 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-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

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.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$2200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

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

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 source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.
<http://ees.elsevier.com/tiv>

Questions about submission may be directed to the appropriate editor.
Americas and Canada: daniel.acosta@uc.edu
Europe: b.blaauboer@uu.nl
All other areas of the world: daniel.dietrich@uni-konstanz.de

Revised

versions

The medium of submission for revised papers is electronic, through the Elsevier website (<http://ees.elsevier.com/tiv>). Figures should be submitted as original high quality files of a standard graphics program. Revised versions should be returned within 3 months of the first date of decision. Failure to do so will result in any resubmission being treated as a new version and will therefore carry a new date of receipt.

Referees

The Editors require submissions by the authors of the names and addresses of 4 potential reviewers for this submission. The institutional address and e-mail address are required. At least 2 of the referees should be from a different country to the corresponding author's. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.



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 lay-out 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 the text of your paper is double-spaced– 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.

Manuscript

Format

Manuscripts should be written in clear and concise English; incomprehensible submissions will be returned to authors for revision. All pages must be numbered, including the Title Page, which should carry the title of the paper, the surnames and initials of the authors, and the names and address of the institutions where the work was done (with the affiliation of each author clearly indicated). Titles consisting of declarative or interrogative sentences are not acceptable. Please do not add line numbering to your source file as this will be added automatically by the EES system upon building of the PDF.

Introduction

Introduction: A concise and clear statement on the background, purposes and significance of the work.

Material and methods

Materials and Methods: A detailed description of the experimental design and of any new or improved methods. Well-established methods and techniques may be identified by reference only.

Results

Results: Presented concisely with the aid of tables or figures where appropriate. Duplication between this section and the Discussion must be avoided.

Discussion

Discussion: A succinct interpretation of the data. Extensive literature reviews and highly speculative comments are discouraged.

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.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Each author's academic or professional qualifications should also be listed. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case 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 telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **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

Abstract: A self-contained summary of the objectives, results and significance of the study, not exceeding 200 words. Uninformative sentences such as "the significance of the results is discussed" are not acceptable.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. 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 also 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 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, or, maximum 20 words 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

Abbreviations should be used sparingly. 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

Acknowledgements: Providing recognition of sources of funding and donations of materials, and including any thanks the authors may wish to accord for advisory, technical or other assistance, since authorship should be limited to those who have made a major contribution to the study and to the preparation of the paper. Authors are advised to obtain approval for the wording of any acknowledgement from those whose help is noted.

Nomenclature

The metric system is the standard for all measurements. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, wherever possible, with the aid of CAS Registry and EC numbers.

Database

linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click 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.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors 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. Do not include footnotes in the Reference list.

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

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 on the Web (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 on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

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

Tables should be intelligible without reference to the text and should be planned to fit the page size of the Journal. The same data may not be reproduced in both a table and a figure. Each table must have a title and on each column there should be a heading that clearly identifies the data therein. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

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.

Reference

management

software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, 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 which is described below.

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.

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 50 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

data

Elsevier accepts electronic supplementary material to 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. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect:<http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

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
- Telephone

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 Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

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.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 9 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. 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. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. 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. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

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](http://www.sciencedirect.com). 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>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book'

service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).