

Avaliação *in vitro* de alterações em *Lactuca* spp. de *Saccharomyces cerevisiae* na presença de fármacos

In vitro evaluation of *Lactuca* spp. and *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of drugs

Recebido em: 25/11/2016

Aceito em: 15/03/2017

Mayse Rosa CORONETTI; Amerieli Leticia Marquezoti CORTES; Mitaly FRANZEN; Bruna Maki Utsunomiya HOSOI; Gabriel Neves ALVES; Jaqueline NICOLINI; Keller Paulo NICOLINI
Instituto Federal do Paraná- IFPR, Avenida Bento Munhoz da Rocha Neto, S/N. CEP 85555-000. Palmas, Paraná, Brasil. E-mail: keller.nicolini@ifpr.edu.br

ABSTRACT

The presence of emerging contaminants in surface waters was detected in studies conducted by researchers from several countries. In this study, physiological parameters of antibacterial contaminated substrates, nitrofurantoin (NTF), tetracycline hydrochloride (CTC), cephalexin (CEF), amoxicillin (AMX), azithromycin (AZI) and norfloxacin (NOR) were monitored and by analgesics, diclofenac sodium (DFS), dipyron monohydrate (DMH) and diclofenac potassium (DFP) in cultures of *Lactuca* spp. (lettuce) and *Saccharomyces cerevisiae*, *in vitro*. All the evaluated substances caused metabolic and physiological changes in the culture of *Lactuca* spp. studied, changing the germination rate, leaf length, root length and rates of alpha chlorophyll and beta chlorophyll. However only NOR, DFS and DMH cause changes in the inhibitory concentration for the foam production of *S. cerevisiae* in concentrations ≤ 5000 ppm.

Keywords: phytotechnology; pharmacodynamics; *Lactuca sativa*; *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

A presença de contaminantes emergentes em águas de superfície foi detectada em estudos realizados por pesquisadores de vários países. Neste estudo foram monitorados parâmetros fisiológicos de substratos contaminados pelos antibacterianos, nitrofurantoína (NTF), cloridrato de tetraciclina (CTC), cefalexina (CEF), amoxicilina (AMX), azitromicina (AZI) e norfloxacina (NOR) e pelos analgésicos, diclofenaco de sódio (DFS), dipirona monoidratada (DMH) e diclofenaco de potássio (DFP), em culturas de *Lactuca* spp. (alface) e de *Saccharomyces cerevisiae in vitro*. Todas as substâncias avaliadas causam alterações metabólicas e fisiológicas na cultura de *Lactuca* spp., alterando a taxa de germinação, o comprimento de folhas, o comprimento de raízes e as taxas de clorofila alfa e de clorofila beta. No entanto apenas NOR, DFS e DMH causam alterações na concentração inibitória para a produção de espuma de *S. cerevisiae* em concentrações ≤ 5000 ppm.

Palavras-chave: fitotecnica; farmacodinâmica; *Lactuca sativa*; *Saccharomyces cerevisiae*

INTRODUÇÃO

Contaminantes ambientais e seus derivados, classificados como contaminantes emergentes, foram encontrados em águas subterrâneas na Europa, incluindo produtos industriais, agrotóxicos além de antibióticos (1). Antibióticos também foram detectados

em águas residuais de animais confinados (2), outros contaminantes emergentes, em estações de tratamento de água, onde biomarcadores de exposição foram significativamente alterados (3). Um estudo em águas estuarinas da Austrália, próximas à região de coleta de águas pluviais, detectou pesticidas e compostos farmacêuticos, dentre os quais analgésicos (4). Outro

estudo mostrou inúmeros fármacos em efluentes (5) demonstrando a importância da avaliação de possíveis indicadores naturais para monitorar antibacterianos presentes em solos, evitando o desenvolvimento de

bactérias resistentes (6). Os vegetais absorvem água do ambiente com inúmeros nutrientes que podem interagir com a planta que contém inúmeros metabólitos e óleos fixos (7).

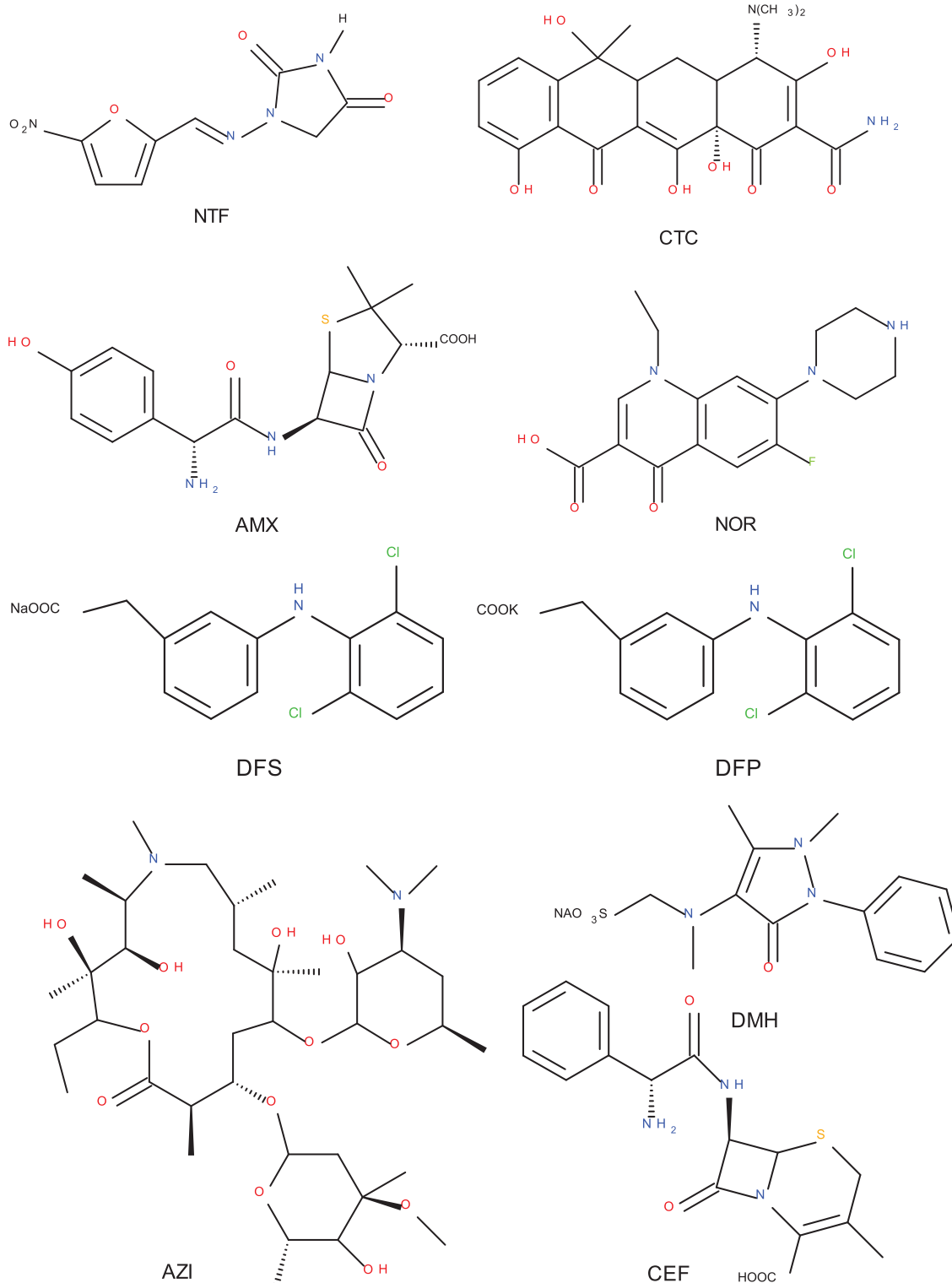


Figura 1. nitrofurantoína (NTF), cloridrato de tetraciclina (CTC), cefalexina (CEF), amoxicilina (AMX), azitromicina (AZI) e norfloxacina (NOR) e dos analgésicos, diclofenaco de sódio (DFS), dipirona monoidratada (DMH) e diclofenaco de potássio (DFP).

Diversos pesquisadores descreveram que há bioacumulação de fármacos (5, 8-22) e estudos indicaram a redução da taxa de germinação de *Lactuca sativa* L. na presença de alumínio (23), menor crescimento da parte aérea na presença de cádmio (24), alteração dos metabólitos em alface cultivada na presença de KNO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e ureia (25), fechamento dos estômatos, peroxidação lipídica, danos às membranas, aumento da atividade enzimática, acúmulo de ácido ascórbico e acúmulo de prolina na presença de boro (B) e cloreto de sódio (NaCl) (26), acúmulo de cádmio (Cd), níquel (Ni) e cobalto (Co) em caules e raízes, redução dos parâmetros de área foliar, massa fresca e massa seca da parte aérea e raízes e ainda redução no teor de pigmentos fotossintéticos (27). Também foi observado que biomarcadores lipídicos de folhas de *Lactuca serriola* são alterados em solos de aterros metalúrgicos, na presença de Ni e Cr, facilitando diagnósticos precoces de contaminação do solo (28).

Foram detectados calicivírus em folhas de *Lactuca sativa* cultivada em solos contaminados por esse tipo de vírus, não descartando a possibilidade de contaminação viral pelo alface (29). O objetivo deste artigo foi monitorar parâmetros fisiológicos em culturas de *Lactuca* spp. e as concentrações inibitórias da espuma de *Saccharomyces cerevisiae* in vitro de substratos contaminados pelos antibacterianos nitrofurantoína (NTF), cloridrato de tetraciclina (CTC), cefalexina (CEF), amoxicilina (AMX), azitromicina (AZI) e norfloxacin (NOR) e dos analgésicos, diclofenaco de sódio (DFS), dipirona monoidratada (DMH) e diclofenaco de potássio (DFP) (Figura 1).

MATERIAL E MÉTODOS

Meios de cultura para *Lactuca* spp. Os meios de cultura foram preparados a partir do substrato comercial Agro Cerro, que tem em sua composição, casca de *Pinus*, vermiculita e cinzas. Ao todo foram preparados 10 meios de cultura. Na cultura controle havia apenas o substrato comercial, e a partir do substrato comercial foram preparados outros 9 meios de cultura pela adição dos antibacterianos NTF (1.000 ppm), CTC (1.000 ppm), CEF (1.000 ppm), AMX (1.000 ppm), AZI (100 ppm) e NOR (1.000 ppm) e dos analgésicos, DFS (100 ppm), DMH (100 ppm) e DFP (100 ppm) (30, 31).

Em cada meio de cultura foram semeadas 60 sementes de *Lactuca* spp. A taxa de germinação relativa (TGR) foi calculada na unidade porcentagem ao 8º dia (32, 33). Ao 21º dia de cultivo, foram realizadas as ava-

liações dos parâmetros fisiológicos relativos, referentes a cultura controle, que continha apenas substrato comercial, quanto: a) Ao comprimento das folhas relativo (CFR) (34); b) Ao comprimento das raízes relativo (CRR) (35); e c) As taxas das clorofilas (36) relativas α (CaR) e β (C β R) in vitro, para culturas de *Lactuca* spp. Para os parâmetros fisiológicos CFR e CRR, foi usada, como referência, a escala em centímetros e para os parâmetros CaR e C β R, a escala em $\mu\text{g/g}$ de massa verde de folhas.

Para a extração das clorofilas α e β foram seguidos os seguintes procedimentos: folhas do vegetal (100 mg), foram resfriadas a 0 °C por 15 min. Em seguida foram adicionados 3 mL de propanona 80 % para a maceração do material. Após a maceração, o material foi filtrado, em papel filtro previamente umedecido com propanona 80 %, e o volume foi completado para 5 mL. O extrato foi centrifugado por 5 min e transferido para uma cubeta. As absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro UV-BASIC, em 646,8 e 663,2 nm e a partir das equações 1 e 2 (36) foram calculadas as taxas de Ca e C β .

$$C_{\alpha} = (12,25 \cdot A_{663,2} - 2,79 \cdot A_{646,8}) \cdot \frac{V}{m}$$

Equação 1

$$C_{\beta} = (21,5 \cdot A_{646,8} - 5,10 \cdot A_{663,2}) \cdot \frac{V}{m}$$

Equação 2

Onde:

$A_{646,8}$ e $A_{663,2}$ = absorbâncias nos respectivos comprimentos de onda de 646,8 e 663,2 nm

V = volume do extrato em propanona 80 %

m = massa de folhas macerada.

A contaminação dos meios de cultura foi realizada pela adição do fármaco micronizado no estado sólido ao substrato antes do plantio, nas concentrações de 100 e de 1000 ppm. Para as triplicatas dos testes, foram utilizados 300 g de substrato e 20 sementes de *Lactuca* spp. em cada amostra. As taxas de clorofila α (CaR) e β (C β R) relativas ao meio de cultura sem os fármacos teve como referência a escala em micrograma das clorofilas α e β por grama de massa verde de folhas de *Lactuca* spp. ($\mu\text{g.g/MF}$).

Avaliação da inibição da produção de espuma de *Saccharomyces cerevisiae*. Também foram avaliadas as concentrações inibitórias para 70 % (CI_{70}) e para 50 % (CI_{50}) da produção de espuma de *Saccharomyces cerevisiae* (37, 38), na presença dos antibacterianos NTF, CTC, CEF, AMX, AZI e NOR e dos analgésicos, DFS, DMH e DFP, após 20 minutos.

Os meios de cultura para *Saccharomyces cerevisiae* foram preparados utilizando 1,5 g de *Saccharomyces cerevisiae*; 0,3 g de cloreto de sódio (NaCl); 3,0 g de sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁); 9,0 g de carboidrato de origem vegetal (CH₂O); 60 g de água a 40 °C; massas micronizadas dos fármacos (37, 39) para preparar os meios de cultura nas concentrações de 0, 10, 50, 100, 500, 1000 e 5000 ppm. A altura da espuma foi determinada com uma régua na unidade milímetros (mm), sendo as concentrações inibitórias calculadas por regressão linear.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de germinação relativa a cultura de *Lactuca* spp. controle (TGR) foi maior que 1,0, tendo como referência a escala em centímetros (cm) para os antibacterianos CTC, NOR e AMX e para os analgésicos DFP, DFS, DMH. A presença destes fármacos influenciou positivamente o desenvolvimento de *Lactuca* spp., um gênero potencialmente acumulador de fármacos (17, 40, 41), onde a presença do analgésico DFP promoveu a maior variação de TGR, na ordem de 1,4 (Figura 2).

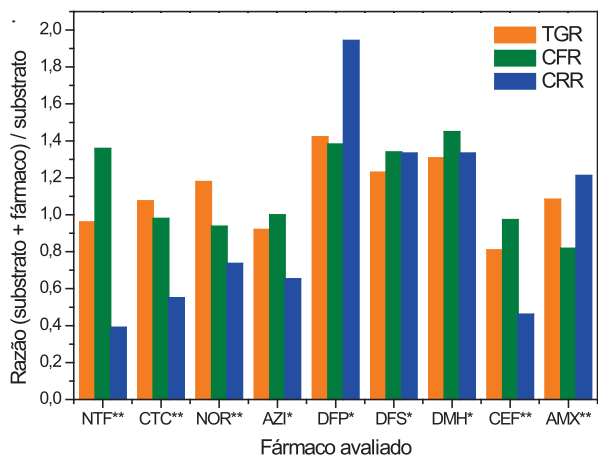


Figura 2. Razão entre os parâmetros fisiológicos taxa de germinação relativa (TGR), comprimento relativo da folha (CFR), comprimento relativo da raiz (CRR) de *Lactuca* spp. Cultivada em substratos na presença e na ausência dos antibacterianos, nitrofurantoína (NTF), cloridrato de tetraciclina (CTC), cefalexina (CEF), amoxicilina (AMX), azitromicina (AZI) e norfloxacina (NOR) e dos analgésicos, diclofenaco de sódio (DFS), dipirona monoidratada (DMH) e diclofenaco de potássio (DFP). * Concentração = 100 ppm. ** Concentração = 1000 ppm.

No entanto, o comprimento relativo das folhas (CFR) foi maior do que 1,0 para as amostras cultivadas na presença do antibacteriano NTF e dos analgésicos DFP, DFS e DMH. O maior CFR foi verificado para plantas na presença do analgésico DFP, na ordem de 1,3. As plantas apresentaram comprimento das raízes relativo (CRR) maiores que 1,0, quando cultivadas na presença do antibacterino AMX e dos analgésicos DFP, DFS

e DMH, sendo o maior CRR observado para a amostra cultivada na presença de DFP, e o diclofenaco encontrado em plantas de *Lactuca sativa* em quantidades de até 19 µg/kg (42) de massa seca de planta, o que equivale a 19 ppb. Estes resultados indicam que a presença de fármacos, que são contaminantes emergentes, nem sempre altera os parâmetros TGR, CFR e CRR para *Lactuca*, apesar de alterações morfológicas em plantas na presença de antibacterianos ocorrerem em outros gêneros de plantas (43, 44). Valores relativos maiores que 1,0 em substratos contaminados indica a tolerância de *Lactuca* spp. para os fármacos estudados. Razões com valores $\geq 1,0$ indicam que o fármaco não prejudica o desenvolvimento da cultura de *Lactuca* spp.; e razões com valores $< 1,0$ indicam que o fármaco prejudica o desenvolvimento da cultura de *Lactuca*.

Culturas de *Lactuca sativa* ao 20º dia de cultivo na presença de 5 ppm de enrofloxacinina apresentaram CRR menores que 1,0 (45). Culturas de alface irrigadas com águas contaminadas pelos antibacterianos NTF, CTC, CEF, AMX, AZI e NOR e pelos analgésicos DFS, DMH e DFP, podem conter estas substâncias (46), uma vez que a alface se mostra tolerante a substratos contaminados por estes fármacos.

Animais e insetos, ao consumirem as folhas da alface, podem levar essas substâncias adiante (47). Geralmente os seres humanos têm por hábito lavar as folhas de alface com hipoclorito de sódio e água filtrada (48), sendo possível a ingestão de tais contaminantes também através da água (49); no entanto essas substâncias podem ser absorvidas pelas plantas (50) e transformadas biologicamente (51).

Tabela 1. Atividade biológica em termos de concentrações inibitórias para 70 % (CI₇₀) e para 50 % (CI₅₀) da produção de espuma de *Saccharomyces cerevisiae* in vitro dos antibacterianos, nitrofurantoína (NTF), cloridrato de tetraciclina (CTC), cefalexina (CEF), amoxicilina (AMX), azitromicina (AZI) e norfloxacina (NOR) e dos analgésicos, diclofenaco de sódio (DFS), dipirona monoidratada (DMH) e diclofenaco de potássio (DFP).

Fármaco	CI ₇₀ (ppm)	CI ₅₀ (ppm)	R ²
NTF	> 5000	> 5000	N/D
CTC	> 5000	> 5000	N/D
NOR	445	2690	0,97
AZI	> 5000	> 5000	N/D
DFP	1588	2610	0,98
DFS	> 5000	> 5000	N/D
DMH	479	2690	0,58
CEF	> 5000	> 5000	N/D
AMX	> 5000	> 5000	N/D

N/D: R² não determinado.

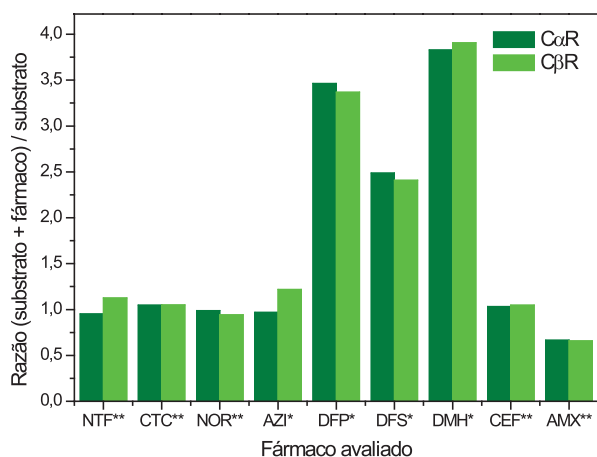


Figura 3. Razão entre os parâmetros fisiológicos taxa de clorofila alfa relativa (CaR), taxa de clorofila beta relativa (CbR) de *Lactuca* spp. Cultivada em substratos na presença e na ausência dos antibacterianos, nitrofurantoína (NTF), cloridrato de tetraciclina (CTC), cefalexina (CEF), amoxicilina (AMX), azitromicina (AZI) e norfloxacina (NOR) e dos analgésicos, diclofenaco de sódio (DFS), dipirona monoidratada (DMH) e diclofenaco de potássio (DFP). * Concentração dos fármacos adicionados de 100 ppm. ** Concentração do fármacos adicionados de 1000 ppm.

Com relação às concentrações inibitórias para o desenvolvimento de *Saccharomyces cerevisiae* (CI_{70} e CI_{50}), na Tabela 1, as maiores CI_{70} e CI_{50} ocorreram para o antibacteriano NOR e para os analgésicos DFP e DMH.

Na análise dos parâmetros fisiológicos TGR, CFR, CRR apresentados na Figura 2 e das taxas de clorofila α relativa (CaR) e de clorofila β relativa (CbR), observadas na Figura 3, as menores CI_{70} e CI_{50} das estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, um modelo eucariota (52), para as amostras cultivadas na presença de DFP e DMH, estão associadas a TGR, CFR, CRR, CaR e CbR maiores que 1,0A presen-

ça de DFP e DMH prejudicou o desenvolvimento de *Saccharomyces cerevisiae* e favoreceu o desenvolvimento de *Lactuca* spp. nas condições estudadas. No entanto, as menores CI_{70} e CI_{50} para NOR, ou seja, inibição em concentrações menores, estavam associadas a CFR, CRR, CaR e CbR menores que 1,0, indicando que a presença de NOR prejudicou o desenvolvimento de *Lactuca* spp. e de *Saccharomyces cerevisiae* nas condições estudadas. A TGR da amostra contaminada com NOR apresentou valores maiores que 1,0, promovendo a germinação. A estrutura de NOR apresenta semelhanças estruturais (grupos C=O, COOH), com as giberelinas (53), hormônios vegetais associados à quebra da dormência de sementes (54).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que marcadores biológicos nem sempre são alterados na presença dos antibacterianos NTF, CTC, CEF, AMX, AZI e NOR, e dos analgésicos, DFS, DMH e DFP, que são contaminantes emergentes. Nos ensaios, *Saccharomyces cerevisiae*, considerado um modelo eucariota, não apresentaram a produção de espuma alterada para o antibacteriano NOR e para os analgésicos, DFS, DMH e DFP, em concentrações ≤ 5000 ppm. Estudos estão sendo realizados para entender melhor o comportamento de modelos biológicos frente potenciais contaminantes ambientais.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do CNPq (PIBIC/CNPq), ao Programa de Bolsas de Iniciação Científica da Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

- Lopez B, Ollivier P, Togola A, Baran N, Ghestem J-P. Screening of French groundwater for regulated and emerging contaminants. *Sci. Total Environ.* 2015; 518–519(-):562-573. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.01.110.
- Liu W, Zhao C, Zhang Y, Lu S, Liu J, Xi R. Preparation of polyclonal antibodies to a derivative of 1-aminohydantoin (AHD) and development of an indirect competitive ELISA for the detection of nitrofurantoin residue in water. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55(17):6829-6834. DOI: 10.1021/jf070620k.
- Jasinska EJ, Goss GG, Gillis PL, Van Der Kraak GJ, Matsumoto J, de Souza Machado AA, Giacomini M, Moon TW, Massarsky A, Gagné F, Servos MR, Wilson J, Sultana T, Metcalfe CD. Assessment of biomarkers for contaminants of emerging concern on aquatic organisms downstream of a municipal wastewater discharge. *Sci. Total Environ.* 2015; 530–531(-):140-153. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.05.080.
- Birch GF, Drage DS, Thompson K, Eaglesham G, Mueller JF. Emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, a food additive and pesticides) in waters of Sydney estuary, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* 2015; 97(1–2):56-66. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2015.06.038.
- Evgenidou EN, Konstantinou IK, Lambropoulou DA. Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review. *Sci. Total Environ.* 2015; 505(-):905-926. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.10.021.
- Drury B, Scott J, Rosi-Marshall EJ, Kelly JJ. Triclosan Exposure Increases Triclosan Resistance and Influences Taxonomic Composition of Benthic Bacterial Communities. *Environ. Sci. Technol.* 2013; 47(15):8923-8930. DOI: 10.1021/es401919k.
- Santos Junior ADF, Oliveira LC, Da Silva Guedes A, Mota MD, Magalhaes HIF. Atividade antioxidante e tóxica de extratos de cascas do fruto de *Nephelium lappaceum* L. (Sapindaceae), comercializados em Salvador, Bahia, Brasil. *Infarma-Cienc. Farm.* 2016; 28(3):173-178. DOI: 10.14450/2318-9312.v28.e3.a2016.pp173-178.
- Du B, Haddad SP, Scott WC, Chambliss CK, Brooks BW. Pharmaceutical bioaccumulation by periphyton and snails in an effluent-dependent stream during an extreme drought. *Chemosphere.* 2015; 119(-):927-934. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.08.044.
- Corcoll N, Casellas M, Huerta B, Guasch H, Acuña V, Rodríguez-Mozaz S, Serra-Compte A, Barceló D, Sabater S. Effects of flow intermittency and pharmaceutical exposure on the structure and metabolism of stream biofilms. *Sci. Total Environ.* 2015; 503-504(-):159-170. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.093.
- Qi W, Singer H, Berg M, Muller B, Pernet-Coudrier B, Liu H, Qu J. Elimination of polar micropollutants and anthropogenic markers by wastewater treatment in Beijing, China. *Chemosphere.* 2015; 119(-):1054-1061. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.09.027.
- Guo R, Chen J. Application of alga-activated sludge combined system (AASCS) as a novel treatment to remove cephalosporins. *Chem. Eng. J.* 2015; 260:550-556. DOI: 10.1016/j.cej.2014.09.053.
- Pereira AMPT, Silva LJG, Meisel LM, Lino CM, Pena A. Environmental impact of pharmaceuticals from Portuguese wastewaters: geographical and seasonal occurrence, removal and risk assessment. *Environ. Res.* 2015; 136:108-119. DOI: 10.1016/j.envres.2014.09.041.
- Leston S, Nebot C, Nunes M, Cepeda A, Pardo MÁ, Ramos F. Sulfathiazole: Analytical methods for quantification in seawater and macroalgae. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2015; 39:77-84. DOI: 10.1016/j.etap.2014.11.007.
- Prosser RS, Sibley PK. Human health risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in plant tissue due to biosolids and manure amendments, and wastewater irrigation. *Environ. Int.* 2015; 75:223-233. DOI: 10.1016/j.envint.2014.11.020.
- Aguirre-Martínez GV, Owuor MA, Garrido-Pérez C, Salamanca MJ, Del Valls TA, Martín-Díaz ML. Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. *Chemosphere.* 2015; 120:75-85. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.05.087.
- Diniz MS, Salgado R, Pereira VJ, Carvalho G, Oehmen A, Reis MAM, Noronha JP. Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis byproducts in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* 2015; 505:282-289. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.09.103.
- Schmidt W, Redshaw CH. Evaluation of biological endpoints in crop plants after exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Implications for phytotoxicological assessment of novel contaminants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015; 112:212-222. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.11.008.
- Kumar R, Chhikara BS. Organometallic assemblies: π -electron delocalization, μ -bridging spacers, flexibility, lipophilic nature, bio-accessibility, bioavailability, intracellular trafficking pathways and antimicrobial assimilation. *J. Organomet. Chem.* 2015; 776:64-76. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2014.11.001.
- Kuzmanovic M, Ginebreda A, Petrovic M, Barceló D. Risk assessment based prioritization of 200 organic micropollutants in 4 Iberian rivers. *Sci. Total Environ.* 2015; 503-504:289-299. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.056.

20. Zenobio JE, Sanchez BC, Leet JK, Archuleta LC, Sepulveda MS. Presence and effects of pharmaceutical and personal care products on the Baca National Wildlife Refuge, Colorado. *Chemosphere*. 2015; 120:750-755. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.10.050.
21. Enick OV, Moore MM. Assessing the assessments: Pharmaceuticals in the environment. *Environ. Impact Assess. Rev.* 2007; 27(8):707-729. DOI: 10.1016/j.eiar.2007.01.001.
22. Dalla Bona M, Zounková R, Merlanti R, Blaha L, De Liguoro M. Effects of enrofloxacin, ciprofloxacin, and trimethoprim on two generations of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015; 113:152-158. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.11.018.
23. Silva P, Matos M. Assessment of the impact of Aluminum on germination, early growth and free proline content in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2016; 131:151-156. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.05.014.
24. Monteiro MS, Santos C, Soares AMVM, Mann RM. Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2009; 72(3):811-818. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.08.002.
25. Flores P, López A, Fenoll J, Hellín P, Kelly S. Classification of organic and conventional sweet peppers and lettuce using a combination of isotopic and bio-markers with multivariate analysis. *J. Food Compos. Anal.* 2013; 31(2):217-225. DOI: 10.1016/j.jfca.2013.05.015.
26. Eraslan F, Inal A, Savasturk O, Gunes A. Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. *Sci. Hortic.* 2007; 114(1):5-10. DOI: 10.1016/j.scienta.2007.05.002.
27. Hashem HA, Hassanein RA, El-Deep MH, Shouman AI. Irrigation with industrial wastewater activates antioxidant system and osmoprotectant accumulation in lettuce, turnip and tomato plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2013; 95:144-152. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.05.030.
28. Le Guédard M, Faure O, Bessoule J-J. Soundness of in situ lipid biomarker analysis: Early effect of heavy metals on leaf fatty acid composition of *Lactuca serriola*. *Environ. Exp. Bot.* 2012; 76:54-59. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2011.10.009.
29. Urbanucci A, Myrnel M, Berg I, von Bonsdorff CH, Maunula L. Potential internalisation of caliciviruses in lettuce. *Int. J. Food Microbiol.* 2009; 135(2):175-178. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.036.
30. Brasil. Farmacopeia Brasileira. ANVISA, 2010;
31. Commission BP. B Pharmacopeia. London, 2013.
32. Shipley B, Parent M. Germination responses of 64 wetland species in relation to seed size, minimum time to reproduction and seedling relative growth rate. *Functional Ecology*, 1991; 5(1):111-118. DOI: 10.2307/2389561.
33. Lamb DT, Ming H, Megharaj M, Naidu R. Relative tolerance of a range of Australian native plant species and lettuce to copper, zinc, cadmium, and lead. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2010; 59(3):424-432. DOI: 10.1007/s00244-010-9481-x.
34. Dai Z-C, Wang X-Y, Qi S-S, Cai H-H, Sun J-F, Huang P, Du D-L. Effects of leaf litter on inter-specific competitive ability of the invasive plant *Wedelia trilobata*. *Ecol. Res.*, 2016; 31(3):367-374. DOI: 10.1007/s11284-016-1344-0.
35. De Bruin W, Kritzinger Q, Bornman M, Korsten L. Nonylphenol, an industrial endocrine disrupter chemical, affects root hair growth, shoot length and root length of germinating cos lettuce (*Lactuca sativa*). *Seed Sci. Technol.*, 2016; 44(1):43-52. DOI: 10.15258/sst.2016.44.1.12.
36. Lichtenthaler HK, Lester Packer RD. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 1987; 148(-):350-382. DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
37. Kethireddy V, Oey I, Jowett T, Bremer P. Critical analysis of the Minimum Non Inhibitory Concentration (MNIC) method in quantifying sub-lethal injury in *Saccharomyces cerevisiae* cells exposed to either thermal or pulsed electric field treatments. *Int. J. Food Microbiol.*, 2016; 233:73-80. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.008.
38. Sánchez-Rubio M, Taboada-Rodríguez A, Cava-Roda R, López-Gómez A, Marín-Iniesta F. Combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil to inactivate *Saccharomyces cerevisiae* in natural orange and pomegranate juices. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2016; 73(9):140-146. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.06.005.
39. Hosoi BMU, Ramos EKKD, Nicolini J, Nicolini KP. Uso de indicadores biológicos na avaliação de materiais pirolisados em baixas temperaturas. XXIII Encontro de Química da Região Sul, 2016.
40. Fabbris EZ, Nicolini KP. Detecção de progesterona em tecidos vegetais de *Lactuca sp.* por espectroscopia de UV. *Rev Mundi Saúde e Biológicas*, 2016; 1(2):8. DOI: 10.21575/25254766msb2016vol1n2254.
41. Hyland KC, Blaine AC, Dickenson ERV, Higgins CP. Accumulation of contaminants of emerging concern in food crops—part 1: Edible strawberries and lettuce grown in reclaimed water. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2015; 34(10):2213-2221. DOI: 10.1002/etc.3066.
42. Bartrons M, Peñuelas J. Pharmaceuticals and Personal-Care Products in Plants. *Pharmaceuticals and Personal-Care Products in Plants*, 2017; 22(3):194-203. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.12.010.
43. Michelini L, Meggio F, Rocca NL, Ferro S, Ghisi R. Accumulation and Effects of Sulfadimethoxine in *Salix Fragilis* L. *Plants: A Preliminary Study to Phytoremediation Purposes*. *Int. J. Phytorem.*, 2012; 14(4):388-402. DOI: 10.1080/15226514.2011.620654.

44. Xie X, Zhou Q, Lin D, Guo J, Bao Y. Toxic effect of tetracycline exposure on growth, antioxidative and genetic indices of wheat (*Triticum aestivum L.*). *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2011; 18(4):566-575. DOI: 10.1007/s11356-010-0398-8.
45. Migliore L, Cozzolino S, Fiori M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere*, 2003; 52(7):1233-1244. DOI: 10.1016/S0045-6535(03)00272-8.
46. Hurtado C, Domínguez C, Pérez-Babace L, Cañameras N, Comas J, Bayona JM. Estimate of uptake and translocation of emerging organic contaminants from irrigation water concentration in lettuce grown under controlled conditions. *J. Hazard. Mater.*, 2016; 305:139-148. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2015.11.039.
47. Mishra A, Pang H, Buchanan RL, Schaffner DW, Pradhan AK. Development of a system model to understand the role of animal feces as a route of contamination of leafy greens before harvest. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016; DOI: 10.1128/AEM.02775-16.
48. Woldetsadik D, Drechsel P, Keraita B, Itanna F, Erko B, Gebrekidan H. Microbiological quality of lettuce (*Lactuca sativa*) irrigated with wastewater in Addis Ababa, Ethiopia and effect of green salads washing methods. *Int J Food Contam*, 2017; 4(1):3. DOI: 10.1186/s40550-017-0048-8.
49. Rasool A, Xiao T, Farooqi A, Shafeeque M, Liu Y, Kamran MA, Katsoyiannis IA, Eqani SAMAS. Quality of tube well water intended for irrigation and human consumption with special emphasis on arsenic contamination at the area of Punjab, Pakistan. *Environ. Geochem. Health*, 2016; 1-17. DOI: 10.1007/s10653-016-9855-8.
50. Azanu D, Mortey C, Darko G, Weisser JJ, Styriahave B, Abaidoo RC. Uptake of antibiotics from irrigation water by plants. *Chemosphere*, 2016; 157:107-114. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.05.035.
51. Alvarino T, Nastold P, Suarez S, Omil F, Corvini PFX, Bouju H. Role of biotransformation, sorption and mineralization of ¹⁴C-labelled sulfamethoxazole under different redox conditions. *Sci. Total Environ.*, 2016; 542(Part A):706-715. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.10.140.
52. Williamson DH, Maroudas NG, Wilkie D. Induction of the cytoplasmic petite mutation in *Saccharomyces cerevisiae* by the antibacterial antibiotics erythromycin and chloramphenicol. *Mol. and Gen. Genet. MGG*, 1971; 111(3):209-223. DOI: 10.1007/bf00433106.
53. Leitão AL, Enguita FJ. Gibberellins in *Penicillium* strains: Challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. *Microbiol. Res.*, 2016; 183(2):8-18. DOI: 10.1016/j.micres.2015.11.004.
54. Bewley JD. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 1997; 9(7):1055-1066. DOI: 10.1105/tpc.9.7.1055.