



MATEUS CRISTOFARI GAYER

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO HERBICIDA
SULFENTRAZONE (BORAL 500SC®) EM *Drosophila melanogaster***

Uruguaiiana, RS.
2017

MATEUS CRISTOFARI GAYER

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO HERBICIDA SULFENTRAZONE
(BORAL 500SC®) EM *Drosophila melanogaster***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Ciências da Natureza - Licenciatura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Ciências da Natureza.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roehrs

Uruguaiana, RS.
2017

MATEUS CRISTOFARI GAYER

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO HERBICIDA SULFENTRAZONE
(BORAL 500SC®) EM *Drosophila melanogaster***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Ciências da Natureza - Licenciatura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Ciências da Natureza.

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: ____/____/____
Banca examinadora:

Prof. Dr. Rafael Roehrs
Orientador
Curso de Ciências da Natureza - Licenciatura – UNIPAMPA

Lic. Claudia Alves Ortiz Gularte
PPG Bioquímica - UNIPAMPA

Me. Jefferson de Jesus Soares
PPG Bioquímica - UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, por estarem sempre preocupados comigo e também pelo financiamento (financiamento sim) dessa graduação.
- À minha mana Carine, por estar comigo em todos os momentos, me ajudando a relaxar nos momentos tensos da escrita, fator que influenciou bastante para o atraso da mesma.
- Ao professor Dr. Rafael Roehrs pela amizade, orientação, conselhos e por mostrar-me o caminho, principalmente, quando me refiro a convivência com os colegas. Também, gostaria de agradecer à oportunidade concedida de participar do grupo, onde aprendi muito e tive muitos momentos inesquecíveis.
- Ao pessoal do GIPPE, pelos espaços de descontração, que torna o “trabalho” no laboratório muito mais divertido.
- Aos meus colegas queridos, que sempre tornam as aulas mais suportáveis.
- Ao Jefferson por me aturar, já que estive sempre incomodando, fazendo milhares de perguntas. Ao Matheus, pela imensa, imensa mesmo, ajuda durante a realização desse trabalho. Até ia esquecer, à Mayara também (apesar dela nunca lavar os frascos), por todos os momentos divertidos passados juntos.

RESUMO

O pesticida sulfentrazone é amplamente utilizado na agricultura para o controle pré e pós-emergente e pós-plantio de plantas daninhas que possam prejudicar a produção agrícola. Esse herbicida pertence ao grupo das Aril Triazolonas, tendo como mecanismo de ação a inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (Ppox). Ao inibir essa enzima ele leva ao acúmulo de intermediários, que ao serem expostos à luz solar, geram espécies reativas de oxigênio (ROS, do *inglês reactive oxygen species*) levando a um dano celular, posteriormente morte da célula e do organismo. Essas espécies reativas também são produzidas no metabolismo humano e existem enzimas especializadas em metabolizá-las para evitar danos celulares. Embora ocorra esse sistema de reparo, quando o organismo humano é exposto a certas moléculas endógenas e exógenas, como metais pesados e pesticidas, pode haver uma superprodução das ROS, causando danos celulares. Esses danos são indicados como possíveis causadores de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer. Para avaliar a neurotoxicidade do sulfentrazone, foi utilizado o modelo experimental de *Drosophila melanogaster*, sendo realizados testes locomotores e enzimáticos para a expressão dos efeitos causados por sulfentrazone em sua formulação comercial (Boral 500SC®). Através da taxa de sobrevivência das moscas frente a diferentes concentrações do pesticida (0,1; 0,5 e 1 mM), foi constatado que o pesticida possui uma toxicidade elevada, levando quase a morte total das moscas após quatro dias de exposição. Com os resultados da Geotaxia negativa e dosagem da dopamina, foi possível observar que o sulfentrazone induziu déficit locomotor bem como depleção dos níveis de dopamina. A análise dos marcadores oxidativos (dosagem de ROS e TBARS) não mostraram resultados significativos, deixando em aberto como o herbicida induz diminuição dopaminérgica nas moscas tratadas. Através desse estudo ficou claro que o sulfentrazone induz neurotoxicidade em *D. melanogaster*, mas o mecanismo de neurotoxicidade desse herbicida ainda não está completamente elucidado.

Palavras-chave: Depleção dopaminérgica. Estresse oxidativo. Herbicida. Sulfentrazone. *Drosophila melanogaster*.

ABSTRACT

The sulfentrazone pesticide is widely used in agriculture for pre and post-emerging control and post-planting control of weeds that could adversely affect agricultural production. This herbicide belongs to the group of Aryl Triazolones, having as mechanism of action the inhibition of the enzyme Protoporphyrinogen oxidase (Ppox). By inhibiting this enzyme it leads to the accumulation of intermediates, which, when exposed to sunlight, generate reactive oxygen species (ROS) leading to cellular damage, later death of the cell and organism. These reactive species are also produced in human metabolism and there are enzymes specialized in metabolizing them to prevent cell damage. Although this repair system occurs, when the human organism is exposed to certain endogenous and exogenous molecules, such as heavy metals and pesticides, there may be an overproduction of ROS, causing cellular damage. These damages are indicated as possible causes of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease. To evaluate the neurotoxicity of sulfentrazone, the experimental model of *Drosophila melanogaster* was used, and locomotor and enzymatic tests were performed to express the effects caused by sulfentrazone in its commercial formulation (Boral 500SC®). Through the survival rate of flies exposed to different concentrations of the pesticide (0.1, 0.5 and 1 mM), it was found that the pesticide has a high toxicity, leading to almost total death of the flies after four days of exposure. With the results of negative Geotaxia and dosage of dopamine, it was possible to note that sulfentrazone induced locomotor deficit as well as depletion of dopamine levels. The analysis of oxidative markers (dosing of ROS and TBARS) did not show significant results, leaving open as the herbicide induces dopaminergic decrease in the treated flies. Through this study it became clear that sulfentrazone induces neurotoxicity in *D. melanogaster*, but the mechanism of neurotoxicity of this herbicide is not yet fully elucidated.

Keywords: Dopaminergic depletion. Oxidative stress. Herbicide. Sulfentrazone. *Drosophila melanogaster*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
2.1) Reagentes e meio de cultivo das moscas.....	9
2.2) Tratamento de exposição ao sulfentrazone.....	10
2.3) Análises <i>in vivo</i>	10
2.4) Análises <i>ex vivo</i>	10
2.5) Análise estatística.....	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
4. CONCLUSÃO.....	16
5. REFERÊNCIAS.....	16
6. PERSPECTIVAS.....	20
7. ANEXO.....	21

Artigo a ser submetido à revista NeuroToxicology.

Avaliação da toxicidade do herbicida sulfentrazone (Boral 500SC®) em *Drosophila melanogaster*¹

Resumo: O pesticida sulfentrazone é amplamente utilizado na agricultura para o controle pré e pós-emergente e pós-plantio de plantas daninhas que possam prejudicar a produção agrícola. Esse herbicida pertence ao grupo das Aril Triazolonas, tendo como mecanismo de ação a inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (Ppox). Ao inibir essa enzima ele leva ao acúmulo de intermediários, que ao serem expostos à luz solar, geram espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) levando a um dano celular, posteriormente morte da célula e do organismo. Essas espécies reativas também são produzidas no metabolismo humano e existem enzimas especializadas em metabolizá-las para evitar danos celulares. Embora ocorra esse sistema de reparo, quando o organismo humano é exposto a certas moléculas endógenas e exógenas, como metais pesados e pesticidas, pode haver uma superprodução das ROS, causando danos celulares. Esses danos são indicados como possíveis causadores de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer. Para avaliar a neurotoxicidade do sulfentrazone, foi utilizado o modelo experimental de *Drosophila melanogaster*, sendo realizados testes locomotores e enzimáticos para a expressão dos efeitos causados por sulfentrazone em sua formulação comercial (Boral 500SC®). Através da taxa de sobrevivência das moscas frente a diferentes concentrações do pesticida (0,1; 0,5 e 1 mM), foi constatado que o pesticida possui uma toxicidade elevada, levando quase a morte total das moscas após quatro dias de exposição. Com os resultados da Geotaxia negativa e dosagem da dopamina, foi possível observar que o sulfentrazone induziu déficit locomotor bem como depleção dos níveis de dopamina. A análise dos marcadores oxidativos (dosagem de ROS e TBARS) não mostraram resultados significativos, deixando em aberto como o herbicida induz diminuição dopaminérgica nas moscas tratadas. Através desse estudo ficou claro que o sulfentrazone induz neurotoxicidade em *D. melanogaster*, mas o mecanismo de neurotoxicidade desse herbicida ainda não está completamente elucidado.

Palavras-chave: Depleção dopaminérgica. Estresse oxidativo. Herbicida. Sulfentrazone. *Drosophila melanogaster*.

1. INTRODUÇÃO

O pesticida sulfentrazone (*N*-[2,4-dichloro-5-[4-(difluoromethyl)-4,5-dihydro-3methyl-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-il]methanesulfonamide) (Figura 1), do grupo químico das Aril Triazolonas (LEUNG et al., 1991), é amplamente utilizado na agricultura mundial para o controle pré e pós-emergente ou pós-plantio de plantas daninhas, tanto mono quanto dicotiledôneas (ROSSI et al., 2005). É aplicado em diversas culturas, como no cultivo de soja, fumo, citros, café e abacaxi. A dosagem utilizada do pesticida varia entre as culturas, de 0,8 a 1,2 litros do produto comercial por hectare (FMC, 2015). Em uma das suas formulações comerciais ele possui uma concentração de 500 g L⁻¹ (Boral 500SC) em forma de suspensão concentrada. Ao ser aplicado nas lavouras, o sulfentrazone possui grande capacidade de ser

¹Após as considerações da banca, o artigo será traduzido para o inglês e revisado, conforme normas da revista.

lixiviado pelas águas da chuva a rios, açudes ou lagos, tendo uma meia vida de 110-280 dias e classificação ambiental Classe II: Altamente Tóxico (PARAÍBA et al., 2003; MARTINEZ et al., 2008).

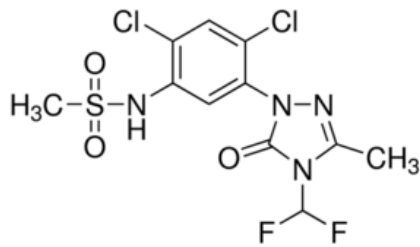


Figura 1: Estrutura química do sulfentrazone (Sigma-Aldrich)

De acordo com Castro e colaboradores (2007), filhotes de ratos ao serem expostos pré-natalmente ao pesticida sulfentrazone, tem seu desenvolvimento neuromotor retardado, mostrando que este herbicida possui efeitos sobre o desenvolvimento neurológico. Outros resultados sobre os efeitos do sulfentrazone mostram que ele pode causar estresse oxidativo em girinos expostos, somado a com desregulação das defesas antioxidantes causadas pelo aumento da temperatura ambiental, isso mostra que, dependendo das condições ambientais, o sulfentrazone tem efeito tóxico, com produção excessiva de ROS (FREITAS et al., 2017).

Esse composto tem como mecanismo de ação, nas plantas, a inibição da Protoporfirinogênio oxidase (Ppox) fazendo com que ocorra a acumulação, no interior das células, de intermediários da formação da porfirina IX (GRICHAR et al., 2006). Os intermediários acumulados, na presença de luz e oxigênio, iniciam processos de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), que são responsáveis pela peroxidação dos lipídios da membrana celular, causando a morte da célula e extravazamento do citoplasma para o meio extracelular (FERREIRA et al., 2005).

No metabolismo animal, o aparecimento de ROS é um processo comum do metabolismo do oxigênio, tendo enzimas responsáveis por livrar o organismo de possíveis danos que essas espécies poderão causar ao organismo. Algumas moléculas exógenas, metais pesados e pesticidas, podem levar a uma superprodução de ROS, ocasionando estresse oxidativo, que gera danos aos constituintes celulares. Esses danos podem afetar a viabilidade celular, chegando até a morte das células afetadas (BERLETT e STADTMAN, 1997). Os ROS podem acarretar genotoxicidade, que leva a mutações e deficiências na duplicação celular, como no caso do sulfentrazone, onde um estudo utilizando *Allium cepa*, com concentrações de 0.06, 0.6 e 1.2 g L⁻¹, mostrou o seu efeito tóxico ao DNA (BIANCHI et al., 2016). Estudos relacionam a produção excessiva de ROS com manifestação de algumas doenças neurodegenerativas, pois Castro e colaboradores (2007) afirmam que o Sistema

Nervoso Central (SNC) pode ser afetado mais facilmente por compostos tóxicos e pelo estresse oxidativo do que outras áreas do corpo. Isso fica explícito na doença de Parkinson (PD) e a doença de Alzheimer (AD), uma vez que as mesmas ocorrerem devido ao ataque aos neurônios pelo estresse oxidativo levando à morte das células no SNC (JENNER, 2003; MARKESBERY, 1997; PATRICÒ, 2008).

Por ser um organismo com alta semelhança genética com humanos, a *Drosophila melanogaster* é muito utilizada para avaliar a toxicidade de diversas contaminantes ambientais. Dependendo das rotas metabólicas que o xenobiótico em estudo age, podem ocorrer manifestações de sintomas semelhantes às doenças humanas. Por exemplo, a exposição à rotenona e ao manganês, pode gerar sintomas semelhantes aos observados nos pacientes que possuem a Doença de Parkinson, como bradicinesia e problemas locomotores. Alguns estudos com *D. melanogaster* mostram que isso ocorre devido a depleção dopaminérgica através da geração de estresse oxidativo que alguns compostos causam. Desta forma, a *D. melanogaster* permite não só a avaliação da toxicidade, mas também quais mecanismos bioquímicos que estão relacionados com a toxicidade do composto em estudo. (SUDATI et al., 2013; ARAUJO et al., 2015; SIDIQUE et al., 2016; BIANCHINI et al., 2016).

Devido à ampla utilização do pesticida sulfentrazone na agricultura, poucas pesquisas envolvendo a toxicidade do mesmo em animais e por sua alta persistência no ambiente existe a necessidade de estudos que busquem mostrar possíveis efeitos metabólicos provocados pela exposição e intoxicação ao pesticida. Com isso, o presente estudo visa avaliar a toxicidade e possíveis efeitos metabólicos do pesticida sulfentrazone, em sua formulação comercial (Boral 500 SC®), utilizando como modelo experimental *D. melanogaster*. Será realizado um teste locomotor (Geotaxia negativa) para avaliar possível dano neurolocomotor com subsequente dosagem de dopamina e da atividade da enzima AchE para estimar a rota de dano que o pesticida causa nas moscas. Para avaliar se os danos oxidativos estão envolvidos, serão realizados testes de marcadores de estresse oxidativo através da dosagem de ROS e TBARS, bem como a dosagem da GST para estimar uma possível rota de detoxificação do herbicida.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1) Materiais e meio de cultivo das moscas

A dopamina (DA) foi adquirida a partir da Sigma (St. Louis, MO, USA). Os outros reagentes químicos eram produtos comerciais obtidos na maior pureza disponível.

Drosophila melanogaster do tipo selvagem (cepa de Harwich) foi obtida do National Stock Center (Bowling Green, Ohio, EUA). As moscas foram mantidas por 5 dias numa incubadora com temperatura controlada de 27 °C sob um ciclo claro/escuro de 12 h, alimentadas em meio padrão (1% de farinha de milho m/v; 1% de fermento de cerveja m/v, 1% m/v de germe de trigo 2% m/v de sacarose, 1% m/v de leite em pó, 0,08% m/v de nipagin) até serem transferidas para os meios de tratamento.

2.2) Tratamento de exposição ao sulfentrazone

D. melanogaster (ambos os sexos) com idade de 1-5 dias foram divididas em quatro grupos de 20 moscas cada: (1) controle, (2) SUL 0,1 mM, (3) SUL 0,5 mM, (4) SUL 1 mM. As moscas foram expostas a uma dieta contendo o SUL por 4 dias. A dieta durante o tratamento consistiu em 1% m/v de sacarose, 1% m/v de leite em pó, 2% m/v de ágar.

2.3) Análises *in vivo*

2.3.1) Curva de Sobrevivência:

A taxa de sobrevivência foi avaliada contando diariamente o número de moscas mortas até o final do período experimental (4 dias). Os resultados foram expressos em porcentagem de moscas vivas por frasco de tratamento, que foram feitos sempre em triplicatas.

2.3.2) Geotaxia negativa:

A habilidade locomotora das moscas foi verificada com um teste de geotaxia negativa como descrito anteriormente por Feany e Bender (2000) e modificado por Sudati et al. (2013). Em suma, as moscas, com dois dias de tratamento, foram anestesiadas no gelo e colocadas em uma coluna de vidro vertical (comprimento: 10 cm, diâmetro: 1,5 cm, de 10 a 16 moscas/coluna). Após a recuperação da exposição ao frio (aproximadamente 15 min), as moscas foram batidas suavemente no fundo da coluna. As moscas que atingiram o topo da coluna (6,5 cm) em até 8 s foram contadas separadamente, isso foi repetido seis vezes para cada *n* dos grupos. Os resultados foram expressos em número de moscas na parte superior (*n*_{top}) como porcentagem do número total de moscas (*n*_{tot}). Cerca de 10-16 moscas por grupo (de cada experimento independente) foram incluídas para os dados da geotaxia negativa. Esse valor representa a média (como %) de três experimentos independentes.

2.4) Análises *ex vivo*

2.4.1) Atividade da glutationa-S-transferase (GST):

O ensaio da atividade da GST foi realizado de acordo com o procedimento de utilização do 1-cloro-2- 4-dinitrobenzeno (CDNB). Dez moscas de cada grupo foram homogeneizadas e centrifugadas a 4.000 rpm durante 30 min a 4 °C. A solução foi preparada (tampão Kpi 0,25 M/EDTA (2,5 mM, pH 7,0), água destilada e GSH 100 mM), na amostra e no sobrenadante foi adicionado CDNB 50 mM e a leitura foi realizada em 340 nm. A dosagem da atividade da GST foi realizada em triplicata para cada grupo e os resultados foram expressos em % da média dos controles após a correção pelo teor de proteína.

2.4.2) Atividade da acetilcolinesterase (AChE):

A atividade da acetilcolinesterase foi determinada de acordo com o método de Ellmann et al. (1961). Dez moscas de cada grupo foram homogeneizadas e centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min a 4 °C. Preparou-se o meio reacional contendo: tampão Kpi 0,25 M, pH 8,0 e ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB 5 mM), sendo adicionado ao sobrenadante da solução da amostra, acetiltiocolina 7,25 mM (2,1 mg/ml) A leitura foi realizada em 412 nm. A atividade enzimática foi expressa em % da média dos controles após a correção pelo teor de proteína.

2.4.3) Dosagem de ROS:

Para a quantificação das espécies reativas de oxigênio, um total de 20 moscas foram anestesiadas em gelo e homogeneizadas em 1 ml de tampão Tris 10 mM, pH 7,4. O homogeneizado foi centrifugado a 1000 rpm durante 5 min a 4 °C e o sobrenadante foi removido para quantificação do ensaio de oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA), como índice geral de estresse oxidativo de acordo com o protocolo de Pérez-Severiano et al. (2004). A emissão de fluorescência de DCF resultante da oxidação de DCF-DA foi monitorada após uma hora em 485 nm e 530 nm. Os resultados foram expressos em % da média dos controles após a correção pelo teor de proteína.

2.4.4) Peroxidação lipídica:

A peroxidação lipídica foi avaliada de acordo com Ohkawa et al. (1979) com algumas modificações. Em resumo, uma alíquota de 100 µL de homogeneizado foi incubada por 1 h em banho de água a 37 °C. Em seguida, as amostras foram incubadas a 100 °C durante 120 minutos em meio ácido contendo 0,6% de TBA. Após o passo de ebulição, adicionou-se SDS a 8,1%. O produto da reação foi medido a 532 nm e os resultados foram expressos em % da média dos controles após a correção pelo teor de proteína.

2.4.5) Determinação de proteína:

O teor de proteína foi determinado como descrito anteriormente por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (ASB) como padrão.

2.4.6) Análise dos níveis de dopamina por HPLC-DAD:

Posteriormente ao tratamento, 30 moscas por grupo (em triplicata) foram acondicionadas no ultra-freezer a $-68\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) com posterior agitação mecânica, ciclo repetido duas vezes, para a separação da cabeça. As cabeças foram homogeneizadas em solução contendo NaCl 0,09% (385 μL) e HCl 0,5 M (15 μL). Após, centrifugação a 10000 rpm durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, o sobrenadante foi filtrado através de filtros de seringa (PTFE hidrofóbico, 0,22 μm) para imediata análise. O sistema de HPLC YL9100 consistiu em um degaseificador de vácuo e bomba quaternária conectada a uma coluna de fase reversa (Synergi 4 μ Fusion-RP 80 \AA 250 \times 4,60 mm, Phenomenex) acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD). As amostras (20 μL) foram injetadas no sistema HPLC por um dispositivo de injeção automática. A fase móvel foi constituída de metanol e água ultrapura (12,5:87,5 v/v) ajustada para pH 3 com ácido fosfórico e fluxo de 0,8 mL/min (MELLO-CARPES et al., 2016). A faixa linear da curva analítica foi de 0,1 a 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (0,1; 0,5; 1; 5 e 10) com cada ponto da curva representando a média de 5 repetições. O coeficiente de regressão linear foi de 0,9998 com equação da reta $y = 490,9x - 56,074$. A detecção por DAD foi em 198 nm, e os resultados foram expressos em mg de dopamina por mg de cabeça de mosca.

2.5) Análise estatística

Os gráficos foram criados usando o programa GraphPad Prisma 6.0. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett, considerando significativos os valores com $p < 0,001$. Para análise dos dados cromatográficos foi utilizado regressão linear.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, para verificar os efeitos do sulfentrazone, fez-se a sobrevivência da *Drosophila melanogaster* expostas a esse composto. A taxa de sobrevivência demonstrada na Figura 2 mostra que o sulfentrazone possuiu efeito tóxico sobre a *D. melanogaster*, isso é evidenciado pela crescente e significativa mortalidade das moscas com o aumento da

concentração do herbicida. A mortalidade é mais acentuada a partir do dia 2 de tratamento, onde cerca de 50% das moscas morrem nas concentrações de 0,5 e 1 mM, chegando quase à mortalidade total ao final dos quatro dias de tratamento nessas concentrações. O sulfentrazone se mostrou bastante tóxico em um período menor que os encontrados com outros agentes neurotóxicos, como a rotenona, que só atingiu essa mortalidade com sete dias de exposição (concentrações de 0,25, 0,5 e 1 mM), e o paraquat, que apresentou toxicidade ao ponto da morte das moscas tão elevada também aos quatro dias de tratamento, mas em concentrações bem mais elevadas (10, 20 e 40 mM) que as utilizadas no presente trabalho (HOSAMANI, 2009; JIMENEZ DEL-RIO, 2010). A partir disso, os testes locomotores e enzimáticos foram realizados com dois dias de tratamento, pois nesse dia a mortalidade das moscas não era tão elevada.

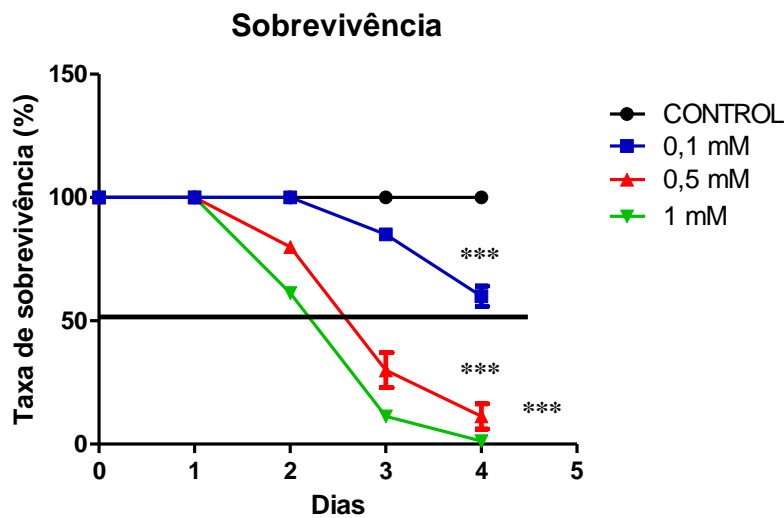


Figura 2: Taxa de sobrevivência das moscas expostas as três concentrações (0,1, 0,5 e 1 mM) de sulfentrazone em sua formulação comercial (Boral 500SC®), com três tratamentos independentes para cada concentração e para o controle. Significância determinada pela análise de uma via (ANOVA), seguido de pós-teste de Dunnett. *Significância em relação ao controle ($p < 0,001$).

A Figura 3a representa os resultados da geotaxia negativa que demonstrou o dano locomotor causado pelo sulfentrazone. Os resultados mostram que a porcentagem de moscas que conseguiam alcançar o topo no tempo estipulado era menor conforme a concentração do herbicida aumenta isso demonstra que o sulfentrazone possui efeito neurotóxico sobre a *D. melanogaster*. Em um estudo utilizando o paraquat (BONILLA-RAMIREZ, 2013), conhecido agente neurodegenerativo, foram encontrados resultados semelhantes aos do presente estudo, em relação à incapacidade das moscas em alcançar o topo, evidenciando o dano locomotor causado pelo herbicida sulfentrazone. O paraquat induz o déficit locomotor por gerar superprodução de radicais livres e, conseqüentemente, perda neuronal na substância negra,

onde estão os neurônios dopaminérgicos, ocasionando sintomas da doença de Parkinson (MORETTO e COLOSIO, 2011).

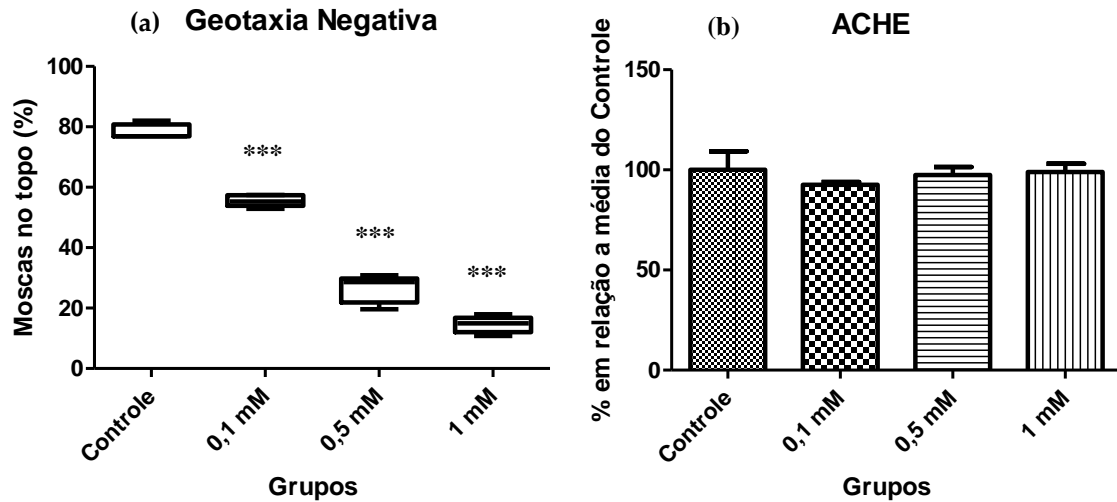


Figura 3: (a) resultados obtidos com dois dias de tratamento de exposição ao sulfentrazone (Boral 500SC®) realizado separadamente em triplicata para cada grupo; (b) dosagem da atividade da enzima AchE com dois dias de tratamento, realizados em triplicata, resultados expressos em porcentagem da atividade da enzima em relação a média obtida dos controles, resultados corrigidos pela dosagem de proteína. Significância determinada pela análise de uma via (ANOVA), seguido de pós-teste de Dunnett. *Significância em relação ao controle ($p < 0,001$).

Inicialmente suspeitamos de duas rotas para a neurotoxicidade do pesticida que promove esse deficit locomotor: (1) alterações na atividade da enzima acetilcolinesterase e (2) depleção dopaminérgica. A enzima acetilcolinesterase (AchE) é responsável pela degradação da acetilcolina, neurotransmissor envolvido na transmissão de informações neuromusculares. Com a inibição dessa enzima, há o aumento dos níveis de acetilcolina na fenda sináptica e rápida dessensibilização dos receptores colinérgicos, assim ocorre o bloqueio da transmissão neuromuscular (BEAR et al., 2007). A Figura 3b demonstra os resultados da dosagem dessa enzima, sendo evidenciado que não houve alterações do perfil enzimático, ficando explícito que o dano locomotor ocorre por outra via não relacionado com a inibição da ACHE, que é a via de toxicidade de alguns pesticidas (XING et al., 2010; TOPAL et al., 2017). A segunda hipótese se mostrou a verdadeira causadora do deficit locomotor, onde os níveis de dopamina dosados na cabeça das moscas foram menores com as crescentes concentrações do herbicida sulfentrazone (Figura 4a), exceto na concentração de 1 mM, que apresentou os mesmos níveis de dopamina presentes nas amostras expostas a concentração de 0,5 mM.

A atividade da enzima glutathione *S*-transferase (GST) (Figura 4b), responsável pela detoxificação de xenobióticos, apresentou aumento crescente com a elevação das concentrações do sulfentrazone, isso evidencia a rota metabólica de detoxificação desse herbicida. Em um estudo, a atividade da GST foi dosada em um modelo de moscas

transgênicas com DP, nessas moscas, a atividade da enzima estava aumentada, mostrando que a GST também está envolvida nas defesas antioxidantes e possui uma super expressão com o desenvolvimento do Parkinson (SIDDIQUE et al., 2016).

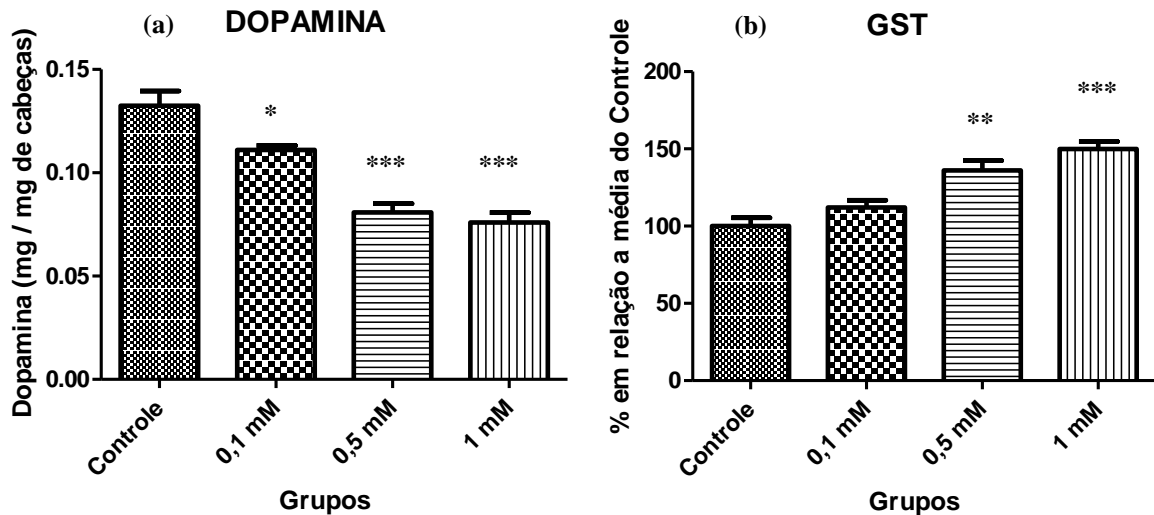


Figura 4: (a) resultados da análise da concentração de dopamina nas cabeças das moscas, corrigidos pelo peso de 30 cabeças; (b) dosagem da atividade da enzima GST corrigido pela dosagem de proteínas, resultados expressos em porcentagem da média dos controles. Significância determinada pela análise de uma via (ANOVA), seguido de pós-teste de Dunnett. *Significância em relação ao controle ($p < 0,001$).

Com a depleção dopaminérgica, acreditávamos que a possível rota de diminuição seria através da superprodução de ROS que levaria a morte dos neurônios dopaminérgicos, assim como ocorre na DP, ou ainda, utilizando o exemplo do paraquat, que induz esses mesmos sintomas dessa doença (MORETTO e COLOSIO, 2011; XU et al., 2017). Os resultados da dosagem de ROS (Figura 5a) e do TBARS (Figura 5b) não demonstram a superprodução dessas espécies reativas, nem de danos associados a essas moléculas. Acreditamos então, que os resultados sem significância para esses marcadores de estresse oxidativo podem ser relacionados ao fato de que, para as dosagens, foram utilizadas as moscas inteiras e não só as cabeças, fator que pode ter afetado “diluindo” os resultados, que poderiam ser mais significativos se tivessem sido utilizadas apenas as cabeças das moscas, uma vez que o possível dano causado pelo sulfentrazone se localize no SNC. Esses resultados estão em desacordo com outro trabalho utilizando o sulfentrazone, que avalia a produção de ROS em duas espécies de girinos, nesse trabalho, foi demonstrado que a exposição ao pesticida causa a superprodução de ROS e que com elevação da temperatura ambiente o perfil enzimático antioxidante também é alterado (FREITAS et al., 2017). Deve-se levar em consideração que os girinos possuem uma exposição diferente a das moscas, já que o pesticida entra em contato com esses animais, principalmente, por via cutânea, já nas moscas a exposição é

principalmente digestiva. Isso acarreta em diferentes concentrações biodisponíveis no organismo do animal em questão.

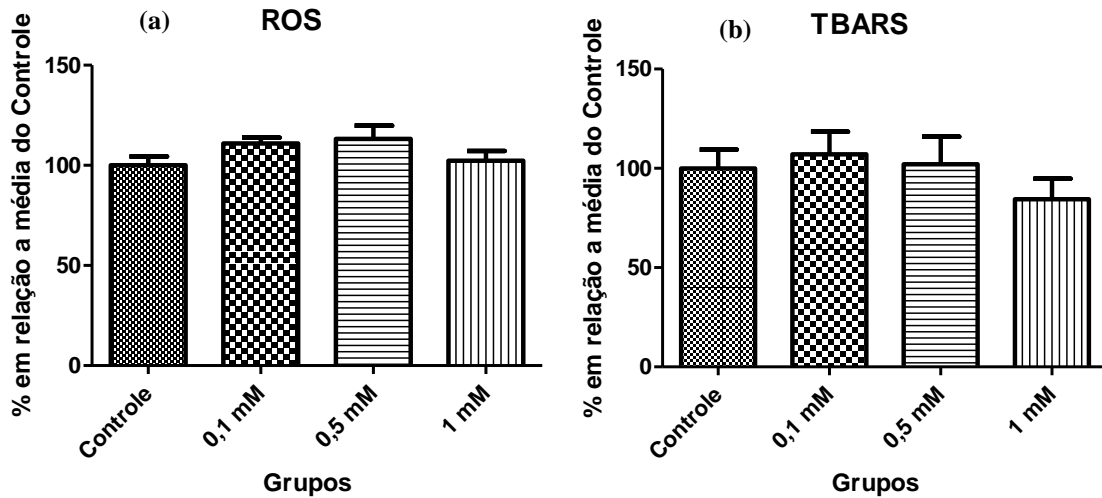


Figura 5: (a) dosagem de ROS utilizando as moscas com dois dias de tratamento, resultados expressos em % da média dos controles após a correção pelo teor de proteína; (b) dosagem do TBARS utilizando as moscas com dois dias de tratamento, resultados expressos em % da média dos controles após a correção pelo teor de proteína. Significância determinada pela análise de uma via (ANOVA), seguido de pós-teste de Dunnett. *Significância em relação ao controle ($p < 0,001$).

4. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados apresentados aqui indicam que o sulfentrazone em sua formulação comercial (Boral 500SC®) provoca neurotoxicidade em *D. melanogaster*. Isso ficou evidente pelos resultados obtidos a partir da Geotaxia Negativa e pela análise dos níveis de dopamina nas cabeças das moscas. Esses dados sugerem que o herbicida induz um déficit neurolocomotor pela diminuição da dopamina, mas ainda não ficou claro como o composto age para a diminuição desse neurotransmissor. A hipótese inicial, da superprodução de ROS, não foi confirmada pelos testes de marcadores de estresse oxidativo. No entanto, os resultados do presente estudo confirmam a utilidade de *D. melanogaster* como modelo para investigar os efeitos gerados pela exposição a esse herbicida. De qualquer forma, o (s) mecanismo (s) preciso (s) pelo qual o sulfentrazone gera dano neurolocomotor em *D. melanogaster* precisa ser melhor investigado.

5. REFERÊNCIAS

Araujo, S.M., Paula, M.T., Poetini, M.R., Meichtry, L., Bortolotto, V.C., Zarzecki, M.S., Jesse, C.R., Prigol, M., 2015. Effectiveness of γ -oryzanol in reducing neuromotor

deficits, dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease induced by rotenone. *NeuroToxicology*. 51, 96-105.

Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A., 2007. *Neuroscience: exploring the brain*, third ed. Lippincott Williams & Wilkins.

Berlett, B., Stadtman, E.R., 1997. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316.

Bianchi, J., Fernandes, T.C.C., Marin-Morales, M.A., 2016. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. *Chemosphere*. 144, 475–483.

Bianchini, M.C., Gularte, C.O., Escoto, D.F., Pereira, G., Gayer, M.C., Roehrs, R., Soares, F.A., Puntel R.L., 2016. *Peumus boldus* (Boldo) aqueous extract present better protective effect than Boldine against manganese-induced toxicity in *D. Melanogaster*. *Neurochem. Res.* 41, 2699–2707.

Bonilla-Ramirez, L., Jimenez-Del-Rio, M., Velez-Pardo, C., 2013. Low doses of paraquat and polyphenols prolong life span and locomotor activity in knock-down parkin *Drosophila melanogaster* exposed to oxidative stress stimuli: Implication in autosomal recessive juvenile Parkinsonism. *Gene*. 512, 355–363.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Castro, V.L.S.S., Destefani, C.R., Diniz, C., Poli, P., 2007. Evaluation of neurodevelopmental effects on rats exposed prenatally to sulfentrazone. *NeuroToxicology*. 28, 1249–1259.

Ellmann, G.E., Courtney, K.D., Anderson, V., 1961. A new calorimetric determination of acetyl cholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.

Feany, M.B., Bender, W.W., 2000. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*. 404, 394–398.

Ferreira, F.A., Silva, A.A., Ferreira, L.R., 2005. Mecanismo de ação de herbicidas. V Congresso Brasileiro do Algodão. http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/336.pdf. (acessado em 19.06.17).

FMC, 2015. Portfólio BULA rev. RevA16 - 29/09/15. <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/boral500sc.pdf>. (acessado em 21.06.17).

Freitas, J.S., Teresa, F.B., Almeida, E.A., 2017. Influence of temperature on the antioxidant responses and lipid peroxidation of two species of tadpoles (*Rhinella schneideri* and *Physalaemus nattereri*) exposed to the herbicide sulfentrazone (Boral 500SC®). *Comp. Biochem. Physiol. C*. 197, 32–44.

Grichar, W.J., Besler, B.A., Dotray, P.A., 2006. Weed control and peanut (*Arachis hypogaea*) response to sulfentrazone. *Crop Prot.* 25, 753–757.

Hosamani, R., 2009. Neuroprotective efficacy of *Bacopa monnieri* against rotenone induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *NeuroToxicology.* 30, 977–985.

Jenner, P., 2003. Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Ann. Neurol.* 53, 26-38.

Jimenez del-rio, M., Martinez, C., Pardo, C.V., 2010. The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat. *Neuroch hem.* 35, 227–238.

Leung, L.Y., Lyga, J.W., Robinson, R.A., 1991. Metabolism and distribution of the experimental triazolone herbicide F6285. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1509–1514.

Markesbery, W.R., 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 134–147.

Martinez, C.O., Silva, C.M.M.S., Fay, F.E., Maia, A.H.E., Abakerli, R.B., Durrant, L.R., 2008. Degradation of the herbicide sulfentrazone in a Brazilian Typic Hapludox soil. *Soil Biol. Biochem.* 40, 879–886.

Mello-Carpes, P.B., Vargas, L.S., Gayer, M.C., Roehrs, R., Izquierdo, I., 2016. Hippocampal noradrenergic activation is necessary for object recognition memory consolidation and can promote BDNF increase and memory persistence. *Neurobiol. Learn. Mem.* 127, 84–92.

Moretto, A., Colosio, C., 2011. Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: The example of Parkinson's disease. *NeuroToxicology.* 32, 383–391.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95, 351–358.

Paraíba, L.C., Cerdeira, A. L., Silva da, E.F., Martins, J.S., Coutinho, H.L.C., 2003. Evaluation of soil temperature effect on the herbicide leaching potential into groundwater in the Brazilian cerrado. *Chemosphere.* 53, 1087–1095.

Patricò, D., 2008. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 609-615.

Pérez-Severiano, F., Santamaria, A., Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O.N., Rios, C., Segovia, J., 2004. Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity, in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Neurochem.* 29, 729–733.

Rossi, C.V.S., Salgado, T.P., Alves, P.L.C.A., Júnior, J.M., 2005. Mobilidade do sulfentrazone no perfil de classes de solos. *Revista Brasileira de Herbicidas.* 4, 65-77,.

Siddique, Y.H., Naz, F., Jyoti, S., Ali, F., Fatima, A., Rahul, Khanam, S., 2016. Protective effect of Geraniol on the transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 43, 225–231.

Sudati, J.H., Vieira, F.A., Pavin, S.S., Dias, G.R., Seeger, R.L., Golombieski, R., Athayde, M.L., Soares, F.A., Rocha, J.B., Barbosa, N.V., 2013. *Valeriana officinalis* attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *NeuroToxicology*. 37, 118–126.

Topal, A., Alak, G., Ozkaraca, M., Yeltekin, A.C., Comaklı, S., Acıl, A., Kokturk, M., Atamanalp, M., 2017. Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*. 175, 186-191.

Xing, H., Wang, J., Li, J., Fan, Z., Wang, M., Xu, S., 2010. Effects of atrazine and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and Carboxylesterase in brain and muscle of common carp. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30, 26-30.

Xu, M.Y., Wang, P., Sun, Y. J., Yang, L., Wu, Y. J., 2017. Joint toxicity of chlorpyrifos and cadmium on the oxidative stress and mitochondrial damage in neuronal cells. *Food Chem. Toxicol.* 103, 246-252.

6. PERSPECTIVAS

Para poder descrever com mais precisão a rota de neurotoxicidade pelo qual o sulfentrazone age, mais testes precisam ser realizados. Para isso:

- serão dosados os marcadores de estresse oxidativo nas cabeças das moscas, já que a depleção dopaminérgica ocorre no SNC;
- realizar testes para avaliar a viabilidade celular e mitocondrial para poder descrever se o sulfentrazone, assim como na DP, causa a morte dos neurônios dopaminérgicos, já que os níveis de dopamina, nas moscas tratadas, estavam menores do que o controle;
- realizar testes para descrever se a diminuição da dopamina ocorre por interferência do sulfentrazone em sua síntese ou em sua degradação.

ANEXO

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.

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. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final.

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.

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 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.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

• *Title.* Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• *Author names and affiliations.* Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a 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 the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

• *Present/permanent address.* If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did

the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times 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. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

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.

Acknowledgements

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

Nomenclature and units

Nomenclature. For styling of isotope, enzyme, and biochemical nomenclature, consult the Information for Authors of the Archives of Biochemistry and Biophysics.

Units and Abbreviations. Units will be in general accordance with the International System (SI) as adopted by the 11th General Conference on Weights and Measures. Note that the abbreviations for a unit are never followed by a full stop, e.g. 10g/L, 5 pmol, 2mM. Do not use full stops in abbreviations with capital letters, e.g. DNA. For case abbreviations use

full stops, e.g. i.v.,s.c. All other words to be abbreviated should be written in full when they appear in the text and be followed by the abbreviation in parentheses.

Math formulae

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

Footnotes

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

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

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.

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.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials.