



**Desarrollo y validación de un método
multitoxina para la determinación
simultánea de Microcistinas y
Cilindrospermopsina en lechuga
(*Lactuca sativa*)**



JOSEFINA MARÍA GARCÍA PÉREZ

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Trabajo fin Grado

Grado en Farmacia

**Desarrollo y validación de un método
multitoxina para la determinación
simultánea de Microcistinas y
Cilindrospermopsina en lechuga
(*Lactuca sativa*)**

JOSEFINA MARÍA GARCÍA PÉREZ

Facultad de Farmacia, Sevilla

Julio de 2018

Dpto. Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal

Área de Toxicología

Tutoras:

Dra. Ana María Cameán Fernández

Dra. Remedios Guzmán Guillén

Trabajo Fin de Grado Experimental

1. RESUMEN

Las cianobacterias son organismos acuáticos capaces de producir metabolitos tóxicos conocidos como cianotoxinas, entre las que se encuentran las microcistinas (MCs) y la cilindrospermopsina (CYN), conocidas por tener efectos nocivos sobre la salud de animales y humanos. Ambas pueden acumularse en vegetales si éstos son regados con agua contaminada, siendo una de las vías por las que se puede entrar en contacto con ellas, de ahí la importancia de desarrollar y validar un método que permita la detección simultánea de ambas. El método propuesto se basa en la extracción y purificación de las toxinas (CYN, MC-LR, MC-RR y MC-YR) usando cartuchos de carbono 18 (C18) y carbono grafitizado (PGC) conectados en serie y la posterior cuantificación de las mismas mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a un detector de masas en tándem (UPLC-MS/MS). El método ha sido validado obteniendo resultados satisfactorios: demostró ser lineal en todo el rango de concentraciones ensayadas (0.2-75 µg/L) y presentó valores de LOD entre 0.06-0.42 y de LOC entre 0.16-0.91 µg/L, según la toxina, correspondiendo los valores más bajos a la MC-LR. Las recuperaciones obtenidas se encontraron dentro de los rangos establecidos por la AOAC, oscilando entre el 45-78%. Además, el método diseñado ha resultado ser sensible, reproducible y preciso, para la extracción y determinación conjunta de MCs y CYN a partir de vegetales tipo lechuga, pudiéndose usar en la monitorización de ambos tipos de toxinas para posibles estudios de salud pública.

Palabras clave: Microcistinas; cilindrospermopsina; validación; multitoxina; lechuga

ÍNDICE

1. Resumen y palabras clave.....	1
2. Introducción	
2.1 Cianobacterias y cianotoxinas.....	5
2.2 Clasificación de las cianotoxinas.....	6
2.3 Microcistinas.....	6
2.4 Cilindrospermopsina.....	8
2.5 Vías de exposición a cianotoxinas.....	9
2.6 Acumulación y determinación analítica de cianotoxinas en vegetales.....	9
3. Objetivo.....	11
4. Materiales y métodos	
4.1 Reactivos.....	13
4.2 Extracción de las toxinas.....	13
4.3 Purificación de las toxinas.....	15
4.4 Análisis por UPLC-MS/MS.....	17
4.5 Criterios estadísticos para la validación del método.....	18
5. Resultados y discusión	
5.1 Validación del método.....	19
5.2 Linealidad.....	19
5.3 Sensibilidad.....	20
5.4 Precisión.....	21
5.5 Veracidad y recuperaciones.....	23
6. Conclusión.....	25
7. Bibliografía.....	27

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Cianobacterias y cianotoxinas

Las cianobacterias, conocidas coloquialmente como algas verdes-azuladas, son un grupo diverso de bacterias gram negativas que llevan a cabo la fotosíntesis (Miller et al., 2017). Tienen una distribución mundial, ocupando diferentes ecosistemas, yendo desde el frío del Ártico hasta el caluroso desierto de Atacama (Buratti et al., 2017; Cirés et al., 2017; Wierzchos et al., 2006). A estas bacterias se les atribuye la aparición del oxígeno en el planeta y se les considera las precursoras de los cloroplastos presentes en las células eucariotas vegetales (Pang et al., 2018). Se encuentran entre los organismos fotosintéticos más importantes, diversos y abundantes, teniendo diferentes estilos de vidas, ya sea en simbiosis con hongos formando líquenes o como fotótrofos marinos.

A pesar de su distribución mundial, los estudios para la determinación de cianobacterias se han centrado mayoritariamente en reservorios de agua dulce, como son los lagos o los pozos, de las latitudes templadas, ya que es en estas zonas dónde se produce de forma más frecuente el desarrollo masivo de estos organismos, conocido como floración o “blooms”, que se caracterizan por la aparición de una capa azul-verdosa en el agua (Cirés et al., 2017; Muñoz et al., 2017). Las floraciones se deben en parte a la eutrofización del agua (Trifirò et al., 2016), consistente en el aumento de la concentración de nitrógeno y fósforo disuelto en el medio, y a la elevada temperatura de esta, que se ve favorecida cada vez más por el cambio climático (Bittencourt-Oliveira et al., 2016), el cual está haciendo que la frecuencia, la duración y la magnitud de las floraciones sea cada vez mayor (Miller et al., 2017).

Las cianobacterias se caracterizan por tener un metabolismo secundario muy activo, siendo productores de más de 300 compuestos, muchos de ellos sin función conocida por el momento (Singh et al., 2005). Entre ellos destacan las cianotoxinas, que conforman un grupo muy diverso, con estructuras químicas diferentes, teniendo efectos nocivos sobre plantas, animales y la salud de las personas (Codd et al., 1999; Cordeiro-Araújo et al., 2017; Metcalf et al., 2004).

2.2. Clasificación de las cianotoxinas

Estas toxinas podemos clasificarlas, según el órgano al que afecten, en 5 grupos (Gutiérrez-Praena et al., 2013):

- a. Hepatotoxinas: A este grupo pertenecen las nodularinas y las microcistinas (MCs) que tienen una alta capacidad para inducir tumores hepáticos debido a que inhiben las fosfatasa 1 y 2A en el hígado (Humpage et al., 2000).
- b. Citotoxinas: Entre otras, a este grupo pertenece la cilindrospermopsina (CYN) que tiene como dianas principales el hígado y el riñón, aunque puede actuar sobre diferentes órganos, dando lugar por tanto a diferentes síntomas (Funari y Testai, 2008).
- c. Neurotoxinas: Aquí encontramos la anatoxina-a y la saxitoxina; ambas tienen una estructura de tipo alcaloide que les permite bloquear la neurotransmisión de diferente forma según el tipo de toxina que sea, produciendo parálisis respiratoria.
- d. Dermatotoxinas: Cuando se entra en contacto con este tipo de toxinas, aparece una dermatitis severa, irritación ocular e inflamación del tracto respiratorio (Arthur et al., 2006).
- e. Toxinas irritantes: En este grupo se encuentran componentes culares externos de naturaleza lipopolisacárida de las cianobacterias, que causan en el organismo reacciones alérgicas, irritación ocular o problemas intestinales (Funari y Testai, 2008).

2.3. Microcistinas

Las MCs presentan una estructura de heptapéptido cíclico, formado por 3 aminoácidos de la serie D (alanina, ácido eritro- β -metilaspártico y ácido glutámico), dos aminoácidos de la serie L que pueden ser variables y dos aminoácidos inusuales que son el Mdha (N-metildehidroalanina) y el Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-dienoico) (Botes et al., 1984; Tifirò et al., 2016). Estos péptidos tienen una síntesis no ribosómica a diferencia del resto de péptidos que puede sintetizar cualquier organismo (Cordeiro-Araújo et al., 2016; Tillett et al., 2000).

Se han identificado más de 100 variantes de MCs, y esto se debe a que la molécula base puede sufrir diferentes reacciones químicas como pueden ser metilaciones o hidroxilaciones (Milutinovic et al., 2013). De todas las variantes, las más abundantes son MC-LR, que contiene leucina y arginina en su estructura, MC-RR, con dos residuos de arginina y MC-YR, que contiene en su estructura un residuo de tirosina y otro de arginina (Ballot et al., 2014; Briand et al., 2005) (Figura 1).

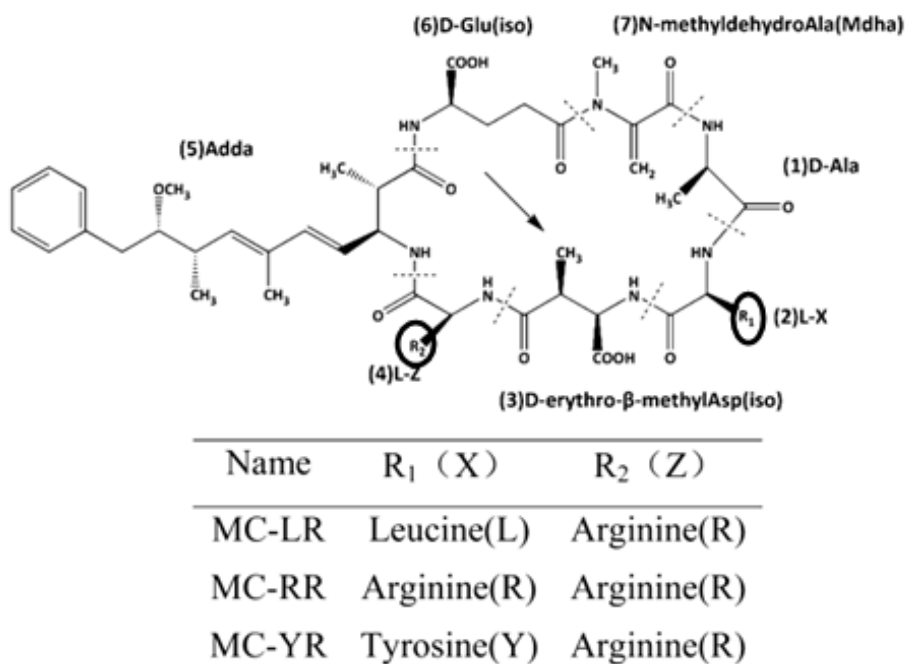


Figura 1. Estructura general de las microcistinas (tomada de Li et al., 2014)

Entre los productores de este tipo de cianotoxinas, se encuentran especies de los géneros *Anabaena sp.*, *Planktothrix sp.*, (Ernst et al., 2001; Sivonen et al., 1992) *Dolichospermum sp.* o *Microcystis sp.*, considerada la mayor productora (Muñoz et al., 2017).

Las MCs son hepatotóxicas, ya que es en el hígado de los vertebrados dónde llevan a cabo su mecanismo de acción, consistente en la inhibición, mediante la formación de enlaces covalentes, de las fosfatasa 1 y 2A (Dawson, 1998; Hitzfeld et al., 2000; Machado et al., 2017). Además son capaces de modular la expresión de oncogenes, protooncogenes, citoquinas y del factor de necrosis tumoral (TNF- α), afectando a la división celular, su supervivencia y apoptosis (Li et al., 2014; Machado et al., 2017). Se ha demostrado que las MCS producen también estrés oxidativo (Casquilho et al., 2018;

Huang et al., 2015; Zegura et al., 2011). Como consecuencia de una intoxicación por MCs, puede aparecer hepatomegalia, hemorragias intrahepáticas, insuficiencia hepática e incluso la muerte en algunos de los casos (Yoshida et al., 1997; Cordeiro-Araújo et al., 2016; Muñoz et al., 2017). En ciertas zonas del planeta, se relaciona la ingesta de estas toxinas con el aumento en la incidencia del carcinoma hepatocelular y de cáncer colorrectal (Machado et al., 2017; Yu, 1995; Zhou et al., 2002). En este sentido, la MC-LR está clasificada por la IARC en el grupo 2B, lo que significa que es un compuesto posiblemente carcinógeno para humanos, y los extractos de *Microcystis sp.* en el grupo 3, no clasificable como carcinógeno en humanos (IARC, 2010).

En vegetales, estas toxinas pueden producir apoptosis, pérdida de la membrana mitocondrial, alteración de la permeabilidad de dicha membrana y activación de las caspasas (Peuthert et al., 2008; Romero-Oliva et al., 2014). Además, inhiben la germinación de las semillas, disminuyen el proceso fotosintético y el crecimiento de las plantas (Levizou et al., 2017).

2.4. Cilindrospermopsina

La cilindrospermopsina (CYN) es un alcaloide formado por una guanidina tricíclica y un hidroximetiluracilo (Figura 2), que necesita de una aminotransferasa para su síntesis, así como de enzimas que participan en la síntesis proteica y no proteica (Mihali et al., 2008; Prieto et al., 2011).

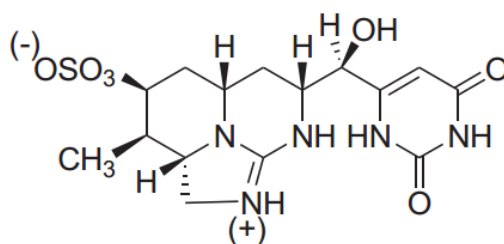


Figura 2. Estructura de la cilindrospermopsina (tomada de Nyoni et al., 2017)

Es producida por numerosas especies, entre las que se encuentran *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker et al., 1997) y *Cylindrospermopsis raciborskii*, principalmente (Ohtani et al., 1992; Prieto et al., 2011).

Se le considera de tipo citotóxica para los mamíferos, y aunque su mecanismo de acción aún no está totalmente dilucidado (Buratti et al., 2017), hay evidencias de que produce una inhibición de la síntesis proteica y de la síntesis del glutatión, además de presentar genotoxicidad al fragmentar el ADN (Runnegar et al., 1995; Bazin et al., 2010; Zegura et al., 2011). También se cree que en el organismo se potencia su toxicidad debido a su activación por el citocromo P450 (Humpage et al., 2005), lo que nos podría hacer pensar que la CYN y sus metabolitos pueden actuar por diferentes mecanismos (Buratti et al., 2017). Su participación en el estrés oxidativo también se ha demostrado tanto en ensayos *in vitro* (Gutiérrez-Praena et al., 2012) como *in vivo* (Guzmán-Guillén et al., 2013; Puerto et al., 2011).

Los efectos de CYN en vegetales son alteraciones en el crecimiento (Vasas et al., 2002; Guzmán-Guillén et al., 2017; Prieto et al., 2018), germinación y desarrollo (Metcalf et al., 2004; Silva y Vasconcelos, 2010), descenso de la clorofila (Kinnear et al., 2008) y cambios en el contenido mineral (Freitas et al., 2015).

2.5. Vías de exposición a cianotoxinas

Estas cianotoxinas pueden permanecer en el agua durante meses, ya que presentan una gran estabilidad (Bourne et al., 2006; Zong-Yao et al., 2017) y pueden entrar en contacto con el hombre a través de su acumulación en las aguas de bebida no tratadas o en los alimentos que han estado en contacto con las toxinas, como pueden ser los vegetales regados con dichas aguas o los animales acuáticos como los peces (Nyoni et al., 2017; Yang et al., 2008; Yunlu et al., 2018) o al realizar actividades en aguas contaminadas, tales como la natación o el esquí acuático (Kittler et al., 2012).

2.6. Acumulación y determinación analítica de cianotoxinas en vegetales

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, las cianotoxinas pueden permanecer durante mucho tiempo en el agua, y esto favorece su acumulación en plantas crecidas en los bordes de los reservorios de agua. Así, se ha demostrado la acumulación de MCs (Machado et al., 2017) y CYN (Kittler et al., 2012) en los vegetales cultivados por el hombre, cuando el agua de riego de los lagos o pantanos cercanos a las zonas de cultivo puede estar contaminada.

Debido a esto, es fácil que estas toxinas lleguen al hombre a través de la ingesta de dichos vegetales, por lo que constituyen un problema de salud pública que debe ser estudiado.

Se han desarrollado métodos para la detección y cuantificación de estas toxinas de forma independiente, como pueden ser la de MCs en zanahorias (Machado et al., 2017) o lechuga (Cao et al., 2018) o de CYN en lechuga (Prieto et al., 2018). Estos métodos están desarrollados para un único tipo de toxina, ya sean MCs o CYN, y la gran mayoría no suelen estar validados. Sin embargo, las cianotoxinas no se encuentran de forma aislada en la naturaleza, por lo que resultan poco efectivos a la hora de analizar vegetales contaminados con floraciones productoras de varias toxinas, que llegan finalmente al consumidor, pudiendo así no preverse de forma completa los posibles efectos que puede sufrir la población si ingiere esos productos. Debido a esto, se hace necesario contar con un método validado que permita analizar de forma simultánea MCs y CYN presentes en los vegetales, para así poder evitar posibles problemas de salud en la población.

Algunos de los métodos que determinan MCs y CYN de forma individual se basan en el uso de ELISA, electroforesis capilar, cromatografía líquida con detector de diodo-array (LC-DAD), con detector de masas (LC/MS) o de masas en tándem (LC-MS/MS) (Guzmán-Guillén et al., 2015). La cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) está siendo últimamente aplicada para la detección de dichas toxinas (Greer et al., 2016; Manubolu et al., 2018; Prieto et al., 2018).

Sin embargo, pocos son los métodos diseñados para determinar de forma simultánea ambos tipos de toxinas, siendo algunos ejemplos el de Oehrle et al. (2010), Rodríguez et al. (2017) o Zervou et al. (2017). Estos métodos mutitoxina se han llevado a cabo en agua, nunca en matrices más complejas como los vegetales, y además, de ellos, solo el último está validado, de ahí que sea necesario un método como el propuesto en el presente trabajo para este tipo de matrices vegetales.

3. OBJETIVO

El objetivo del presente Trabajo Fin de Grado es el desarrollo y validación de un método analítico basado en una extracción en fase sólida (EFS) seguido de una cuantificación por UPLC-MS/MS para la determinación simultánea de MCs y CYN en lechuga (*Lactuca sativa*). El método optimizado podría ser usado para estudios de monitorización con el fin de poder evaluar el riesgo que puede representar el consumo de estos alimentos contaminados con cianotoxinas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos

El patrón de CYN de pureza superior al 95%, fue suministrado por Alexis Corporation (Lausen, Switzerland) y los patrones de los tres congéneres de MCs (MC-LR, MC-RR y MC-YR) con un 99% de pureza, fueron suministrados por Enzo Life Sciences (Lausen, Switzerland).

Todos los reactivos y productos químicos usados durante el transcurso del trabajo fueron de grado analítico. Se utilizó diclorometano (DCM), MeOH, ácido fórmico (AF) y agua Milli-Q (sistema de purificación Millipore, Bedford, USA). Para ajustar el pH se usó una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2M.

Los cartuchos de carbón grafitizado (PGC) BOND ELUT[®] (500 mg, 6 mL) fueron suministrados por Agilent Technologies (Países Bajos, Europa) y los de carbono 18 (C18) Bakerbond[®] (500 mg, 6 mL) por Dicsa (Andalucía, España).

Se preparó una solución estándar de 100 µg/L con la mezcla de toxinas en metanol (MeOH) al 20% y esta se diluyó a tres concentraciones diferentes (5, 20 y 50 µg/L) para usarlas como soluciones de trabajo.

4.2. Extracción de las toxinas

Se partió de 9 muestras de lechuga con un peso medio de $1,06 \pm 0,05$ g de peso fresco (P.F.). A cada una de las muestras se le adicionó, por triplicado, 1 mL de la solución multitoxina, y para cada una de las concentraciones (5, 20 y 50 µg/L). A continuación, se congelaron a -80°C para su posterior liofilización.

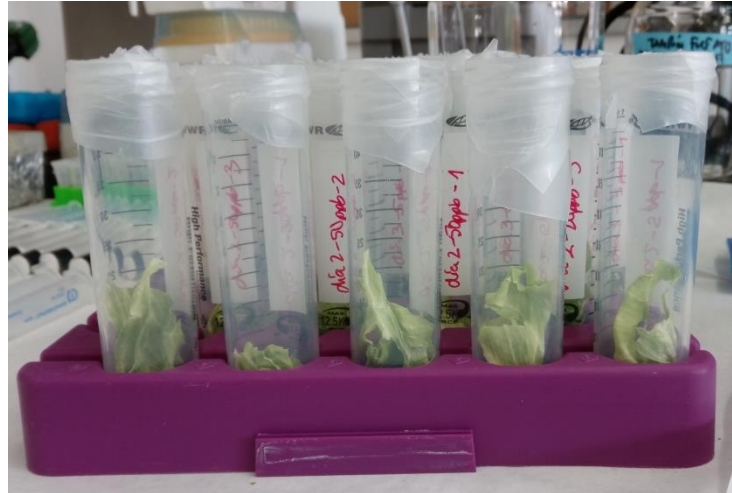


Figura 3. Muestras de lechuga liofilizada

Una vez liofilizadas las muestras, obteniendo un peso medio de $0,05 \pm 0,002$ g de peso seco (P.S.) (pérdida de 95% de humedad), se procedió a la extracción de las toxinas, siguiendo el método de Greer et al. (2016) con modificaciones. Para esta primera etapa, se usó como disolvente 6 mL de MeOH, el cual fue probado anteriormente a dos concentraciones (70 y 80%), obteniéndose mejores resultados con el porcentaje mayor (datos no mostrados). Para homogenizar, se pasaron las muestras por ultraturrax (1 min) y a continuación, se sonicaron (15 min) para favorecer la salida de las toxinas que aún pudieran seguir retenidas en las células. A continuación, se agitaron (15 min), se centrifugaron (3700 rpm, 15 min) y se recogió el sobrenadante.

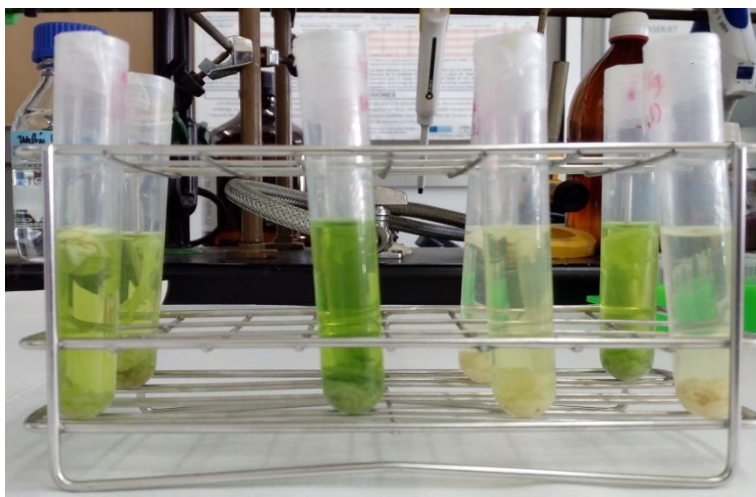


Figura 4. Tubos de ensayo con muestras tras centrifugar

Por último, se ajustó el pH de las muestras a pH 11, tras probar previamente tres pH diferentes (7, 9 y 11) y realizar pruebas de extracción, obteniendo mejores resultados cuando las muestras se ajustaban a pH 11 (datos no mostrados).

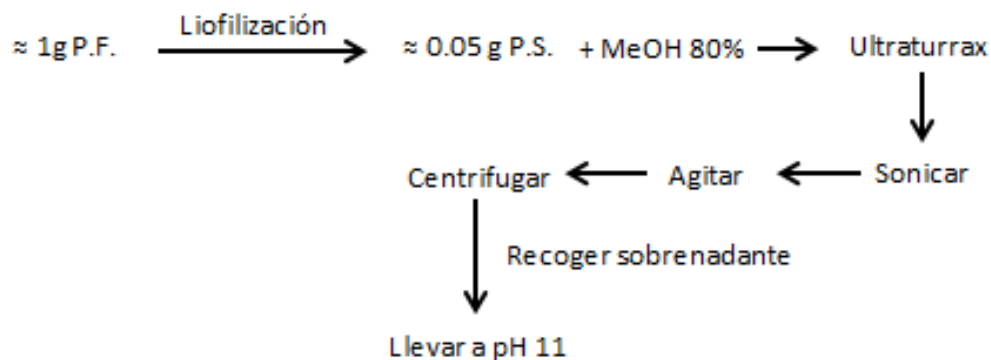


Figura 5. Esquema del proceso de extracción

4.3. Purificación de las toxinas

Una vez se tuvieron todas las muestras con el pH seleccionado, se pasó al proceso de purificación o “clean up”, siguiendo el método de Zervou et al. (2017) con modificaciones. En esta etapa, se usó un sistema de doble cartucho, poniendo abajo el cartucho de carbón grafitizado (PGC), que retiene la CYN, y encima de este el de C18, que retiene las MCs. La velocidad de flujo seleccionada fue de 5 mL/min (Figura 6).

Los cartuchos se acondicionaron con 6 mL de DCM, 6 mL MeOH 100%, y 6 mL de agua Milli-Q al mismo pH que tienen las muestras (pH 11). A continuación, se pasó la totalidad de las muestras por los cartuchos, con el fin de que las toxinas quedasen retenidas en ellos y se dejaron secar durante 5 minutos.



Figura 6. Proceso de limpieza de las muestras y purificación de las toxinas mediante extracción en fase sólida con un sistema dual de cartuchos

Para la elución de las toxinas, se invirtió el orden de los cartuchos con el fin de evitar que las MCs que estaban retenidas en el cartucho de arriba (C18) pudiesen quedar retenidas en el cartucho de PGC, y se eluyeron con 10 mL de una mezcla DCM/MeOH (40:60) acidificado con un 0,5% de AF. Seguidamente, se evaporaron a sequedad y se resuspendieron en 1 mL de MeOH 20% (tras probar MeOH 20, 50 y 80% y obtener mejores resultados con el primero) (Figura 7). Por último, los extractos se pasaron por filtros de 0,45 μm (Ultrafree®) y filtros de jeringa de 0,2 μm , guardándose a -80°C hasta su posterior análisis por UPLC-MS/MS.



Figura 7. Matrices con los extractos tras resuspender en MeOH 20%

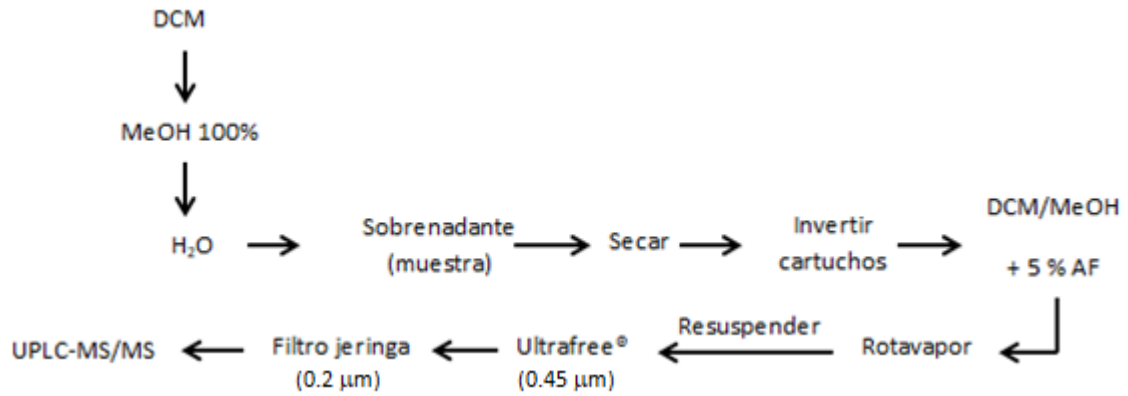


Figura 8. Esquema del proceso de purificación

4.4. Análisis por UPLC-MS/MS

La separación cromatográfica se realizó utilizando un sistema UPLC Acquity (Waters) acoplado a un espectrómetro de masas Xevo TQ-S micro (Waters) que consistía en un triple cuadrupolo equipado con una fuente de iones electrospray, operando en modo positivo. Los análisis LC se realizaron en una columna XSelect HSS T3 de 2,1 x 100 mm y 2,5 µm. La velocidad de flujo fue de 0,45 mL/min.

Se usó un gradiente binario que consistía en (A) agua, y (B) acetonitrilo, ambos con ácido fórmico al 0,1% (v/v). El volumen de inyección fue de 5 µL. El perfil de elución fue: 2% B (0.8 min), gradiente lineal hasta 70% B (6,2 min), 100% B (1 min) y finalmente 2% B (2 min). Un experimento de Monitoreo de Reacción Múltiple (MRM) se aplicó donde los iones padres y los fragmentos fueron monitoreados en Q1 y Q3, respectivamente. Las transiciones para la detección de CYN fueron 416,2/194,0 y 416,2/176,0; para la MC-LR fueron 996,5/135,0, 996,5/213,1 y 996,5/996,5; para la MC-RR fueron 520,2/135,0, 520,2/620,3 y 1039,5/135,0; finalmente, para la MC-YR fueron 1046,5/135,0, 1046,5/213,0 y 1046,5/1046,5, seleccionando la primera transición MRM de cada analito para su cuantificación y las demás para su confirmación. Para los análisis LC/ESI-MS/MS, se optimizaron los siguientes parámetros: voltaje del capilar a 1,0 kV, temperatura de desolvatación 500 °C, flujo de gas de desolvatación a 1000 L/h y flujo de gas de cono a 50 L/h.

4.5. Criterios estadísticos para la validación del método

Una vez desarrollado el método, debe ser validado para verificar que satisface los requisitos de aplicación. Para ello, el método propuesto se validó teniendo en cuenta las directrices de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) para la linealidad, sensibilidad, precisión y recuperación. Se usaron 3 estándares de validación para cubrir el rango óptimo de trabajo; se hicieron por triplicado y en 3 días diferentes. Se añadió 1 mL de tres concentraciones diferentes (5, 20 y 50 $\mu\text{g/L}$) a las diferentes muestras, para obtener 5, 20 y 50 ng/g P.F., de cada toxina.

Tras la aplicación de un análisis de varianza (ANOVA), como se explica en Resultados y Discusión, se obtuvieron tanto la precisión como las recuperaciones, comparándose posteriormente con valores de referencia.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Validación del método

Se realizó una curva de calibración en la matriz vegetal (lechuga), a partir de diferentes concentraciones (0.2, 0.4, 0.6, 1, 2.5, 5, 10, 15, 25, 35, 50 y 75 $\mu\text{g/L}$) de una mezcla de toxinas (CYN, MC-LR, MC-RR y MC-YR) añadidos por triplicado a extractos blancos de lechuga liofilizada obtenidos por el método de extracción propuesto. El intervalo lineal abarcó todo el rango de 0.2-75 $\mu\text{g/L}$, equivalente a 0,2-75 ng/g P.F. Las ecuaciones de las rectas de calibración obtenidas para cada toxina se presentan en la Figura 9.

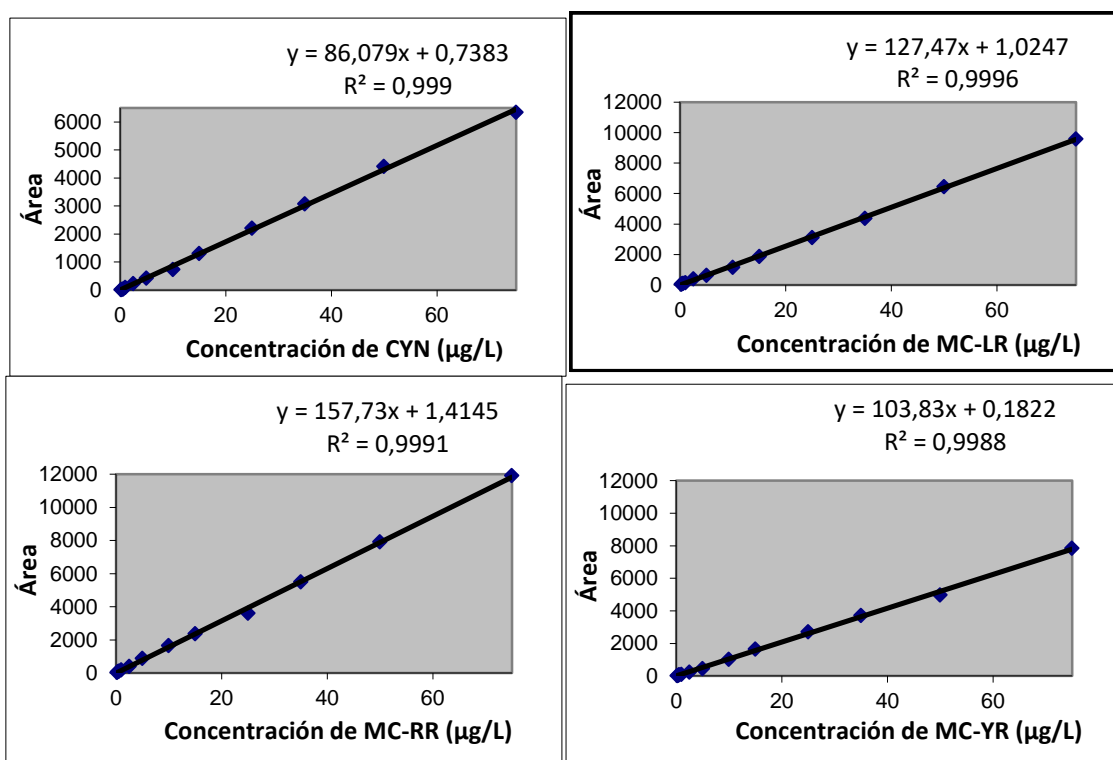


Figura 9. Ecuaciones de las rectas obtenidas para CYN, MC-LR, MC-RR, MC-YR.

5.2. Linealidad

La linealidad es una característica analítica del método que indica el rango de concentraciones de un analito en el que el método da resultados proporcionales a la concentración del mismo.

Con los resultados de la calibración descrita en el apartado anterior, se construyó el gráfico de calibración de Huber (señal/concentración en “y” frente a sus concentraciones en “x”) para cada toxina (Figura 10).

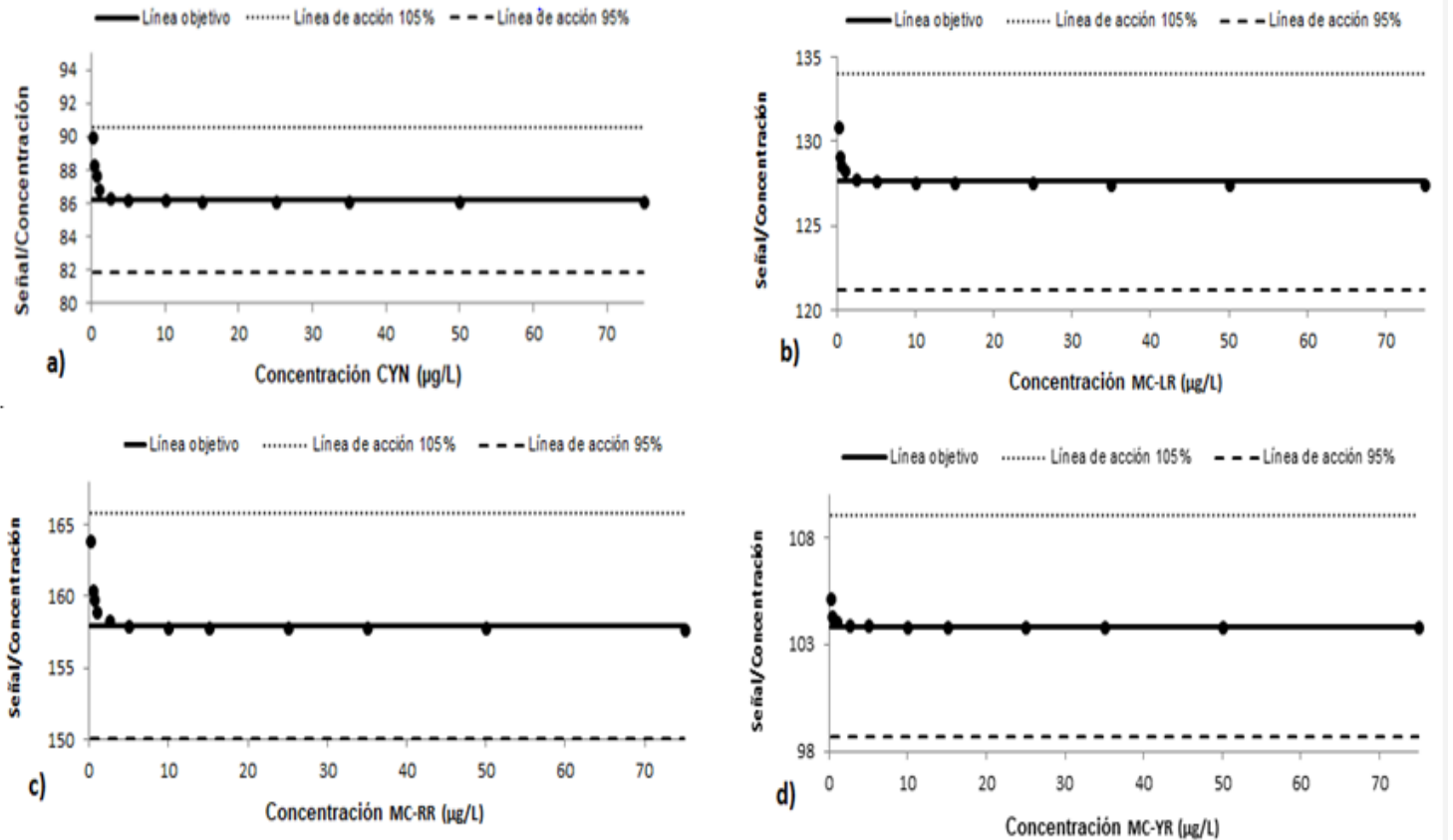


Figura 10. Gráficos de calibración de Huber para evaluar el rango lineal de a) CYN, b) MC-LR, c) MC-RR y d) MC-YR en lechuga

La línea intermedia, con pendiente cero, representa la mediana de los factores de respuesta obtenidos. Las dos líneas discontinuas horizontales representan +/- 5% del valor de la mediana. Y cada uno de los puntos representa el cociente señal/concentración para cada punto de la recta. Como puede observarse, no se encontraron intersecciones con las líneas, por lo que el rango lineal del método se aplica a todo el rango estudiado (0.2-75 µg/L).

5.3. Sensibilidad

La sensibilidad de un método consiste en determinar a partir de qué concentraciones el método diseñado es capaz de detectar el analito (límite de detección, LOD) y a partir

de qué concentraciones es capaz de cuantificarlo (límite de cuantificación, LOC). El cálculo de estos dos parámetros se realizó en función de la desviación estándar del blanco, midiendo 10 muestras independientes y de acuerdo a la ecuación $Y_{LOD \text{ o } LOC} = Y_{blanco} + nS_{blanco}$, donde Y_{blanco} y S_{blanco} son la media de los valores obtenidos en las medidas de los blancos y su correspondiente desviación estándar. Por su parte, n , es una constante, con un valor de 3 para el cálculo del LOD y un valor de 10 si se calcula el LOC. Estos valores son posteriormente convertidos a concentraciones usando las funciones de calibración obtenidas anteriormente. Los valores de LOD y LOC obtenidos para cada toxina pueden observarse en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de LOD y LOC obtenidos para cada una de las toxinas

	CYN	MC-LR	MC-RR	MC-YR
LOD (µg/L)	0.07	0.06	0.23	0.42
LOC (µg/L)	0.19	0.16	0.50	0.91

5.4. Precisión

La precisión de un método se obtiene aplicándolo de forma continuada sobre una misma muestra, debiéndose obtener una concordancia entre todos los valores tomados, es decir, que sean próximos unos de otros. La precisión se suele expresar mediante 3 conceptos, que son la repetitividad, la reproducibilidad y la precisión intermedia. La repetitividad consiste en calcular la variabilidad de los resultados obtenidos tras la realización de mediciones llevadas a cabo por un solo analista, utilizando el mismo equipo, en las mismas condiciones y en un corto periodo de tiempo. La reproducibilidad por su parte, mide las variaciones de los resultados obtenidos entre diferentes laboratorios, es decir, realizado por distintos analistas, con distintos equipos, en diferentes condiciones y en un tiempo diferente. Entre estas dos medidas de precisión, se encuentra también la precisión intermedia, que consiste en realizar medidas en el mismo laboratorio pero no con condiciones constantes como se mantienen en la repetitividad. En este trabajo no se han tenido en cuenta resultados de distintos laboratorios, así que se hablará de repetitividad intra- e inter- grupos y de precisión intermedia, siempre referido al mismo laboratorio.

Para este estudio, se aplicó el método durante 3 días consecutivos a 3 muestras por día (triplicado) de lechuga liofilizada fortificadas con 3 concentraciones diferentes de solución multitoxina (5, 20 y 50 µg/L), dando lugar a 27 muestras totales. Después, se sometieron al método de extracción y cuantificación propuesto y se obtuvieron los resultados por UPLC-MS/MS. Una vez obtenidos los resultados, considerándose como principal fuente de variación 3 días diferentes, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA), tratándose los resultados según González y Herrador (2007) y González et al. (2010), obteniéndose así las estimaciones de la repetitividad dentro del mismo día (S_w), la repetitividad entre distintos días (S_b) y la precisión intermedia (S_{ip}). A partir de este último parámetro y de las concentraciones calculadas para cada toxina, se calcula la correspondiente desviación estándar relativa (RSD_{ip}) y se compara con valores porcentuales tabulados como aceptables por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) en 2016, que deben ser inferiores o del mismo orden al 16-22 % para 5 µg/L y al 8-16 % para 20 y 50 µg/L. En nuestro caso, los tres niveles de concentración ensayados presentan valores adecuados para cada toxina (**Tabla 2**), por lo que el método propuesto puede considerarse como preciso. Para mayor claridad, solo se presentan en la tabla los valores de RSD_{ip} y de recuperaciones para cada toxina.

Tabla 2. Valores de desviación estándar de la precisión intermedia (RSD_{ip}) y de recuperaciones (%) para CYN, MC-LR, MC-RR y MC-YR.

	Concentración de toxina (estándares de validación) (µg/L)											
	CYN			MC-LR			MC-RR			MC-YR		
	5	20	50	5	20	50	5	20	50	5	20	50
RSD_{ip} (%)	19.30	15.29	10.42	21.68	5.14	7.96	8.31	3.15	8.55	21.22	9.38	2.42
Recuperaciones (%)	45,2	62,6	62,7	62,3	72,3	78,4	41,3	62,1	63,2	45,5	64,3	61,4

5.5. Veracidad y recuperaciones

La veracidad de un método analítico expresa la proximidad y la concordancia de la media obtenida tras la realización de una serie de medidas y el valor aceptado como referencia. Este se puede obtener del test ANOVA realizado anteriormente, y normalmente se expresa como vías de recuperación por cada estándar considerado. Estas recuperaciones se definen como la razón entre la concentración de analito medido y la concentración de analito añadido a la muestra realmente; se muestra en forma de porcentaje. Las recuperaciones obtenidas se presentan en la **Tabla 2**. Según la AOAC, para las concentraciones de toxinas ensayadas en este estudio, los rangos de recuperación aceptables (%) podrían oscilar entre 40 y 115% para 5 µg/L y entre 60 y 110% para 20 y 50 µg/L, por lo que los resultados obtenidos indican que el método puede considerarse libre de sesgos y fiable en términos de recuperaciones.

6. CONCLUSIÓN

En el presente Trabajo Fin de Grado se ha desarrollado y validado por vez primera un método para extraer y cuantificar simultáneamente la presencia de tres variantes de MCs (MC-LR, MC-RR y MC-YR) y CYN en matrices vegetales, concretamente en lechuga. El método ha resultado ser lineal, sensible, reproducible y preciso, con un rango lineal de 0.2-75 µg/L y valores de recuperaciones de 45-78%, dentro de los valores establecidos por la AOAC, lo que ha permitido su validación. El presente método puede ser útil en la monitorización de ambos tipos de toxinas para posibles estudios de salud pública.

7. BIBLIOGRAFÍA

Arthur KE, Limpus CJ, Roelfsema CM, Udy JW, Shaw GR. A bloom of *Lyngbya majuscula* in Shoalwater Bay, Queensland, Australia: an important feeding ground for the green turtle (*Cheloniemydas*). Harmful Algae. 2006; 5 (3): 251- 65.

AOAC International. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC Official Methods of Analysis. 2016. [Consultado en Mayo 2018]. Disponible en: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf.

Banker R, Carmeli S, Hadas O, Teltsch B, Porat R, Sukenik A. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from lake kinneret, Israel. J Phycol. 1997; 33 (4): 613- 16.

Ballot A, Sandvik M, Rundberget T, Botha CJ, Miles CO. Diversity of cyanobacteria and cyanotoxins in Hartbeespoort Dam, South Africa. Mar Freshwater Res. 2014; 65 (2): 175- 89.

Bazin E, Mourot A, Humpage AR, Fessard V. Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cylindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and HepaRG. Environ Mol Mutagen. 2010; 51 (3): 251- 59.

Bittencourt-Oliveira MC, Cordeiro-Araújo MK, Ahii Chia M, Dias de Toledo J, de Oliveira ET, dos Santos F. Lettuce irrigated with contaminated water: Photosynthetic effects, antioxidative response and bioaccumulation of microcystin congeners. Ecotox Environ Safe. 2016; 128: 83- 90.

Botes DP, Tuinman AA, Wessels PL, Viljoen CC, Kruger H, Williams DH. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. J Chem Soc, Perkin Trans 1. 1984; 1 (10): 2311- 18.

Bourne DG, Blakeley RL, Riddles P, Jones GJ. Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters. Water Res. 2006; 40 (6): 1294- 302.

Briand JF, Jacquet S, Flinois C, Avois-Jacquet C, Maisonnnette C, Leberre B, Humbert JF. Variations in the microcystin production of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) assessed from a four-year survey of Lac du Bourget (France) and from laboratory experiments. *Microb Ecol.* 2005; 50 (3): 418- 28.

Buratti FM, Manganelli M, Vichi S, Stefanelli M, Scardala S, Testai E, Funari E. Cyanotoxins: Producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch Toxicol.* 2017; 91 (3): 1049- 130.

Casquilho NV, Moreira-Gomes MD, Magalhaes CB, Okuro RT, Ortenzi VH, Feitosa-Lima EK, Lima LM, Barreiro EJ, Soares RM, Azevedo SMFO, Valenca SS, Fortunato RS, Carvalho AR, Zin WA. Oxidative imbalance in mice intoxicated by microcystin-LR can be minimized. *Toxicon.* 2018; 144: 75- 82.

Cao Q, Steinman AD, Wan X, Xie L. Bioaccumulation of microcystin congeners in soil plant system and human health risk assessment: A field study from Lake Taihu region of China. *Environ Pollut.* 2018; 240 (2): 44-50.

Cirés S, Casero MC, Quesada A. Toxicity at the Edge of life: A Review on Cyanobacterial Toxins from Extreme Environments. *Mar Drugs.* 2017; 15 (7): 233.

Codd GA, Bell SG, Kaya K, Ward CJ, Beattie KA, Metcalf, JS. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *Eur J Phycol.* 1999; 34 (4): 405- 15.

Cordeiro-Araújo MK, Ahii Chia M, Bittencourt-Oliveira MC. Potential human health risk assessment of cylindrospermopsin accumulation and depuration in lettuce and arugula. *Harmful Algae.* 2017; 68:217- 23.

Cordeiro-Araújo MK, AhiiChia M, Arruda-Neto J, Tornisielo VL, Vilca FZ, Bittencourt-Oliveira MC. Microcystin-LR bioaccumulation and depuration kinetics in lettuce and arugula: Human health risk assessment. *Sci Total Environ.* 2016; 566: 1379- 86.

Dawson RM. The toxicology of microcystins. *Toxicon.* 1998; 36 (7): 953- 62.

Ernst B, Hitzfeld B, Dietrich D. Presence of *Planktothrix sp.* and cyanobacterial toxins in Lake Ammersee, Germany and their impact on whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Environ Toxicol.* 2001; 16 (6): 483- 88.

Freitas M, Azevedo J, Pinto E, Neves J, Campos A, Vasconcelos V. Effects of microcystin LR, cylindrospermopsin and a microcystin-LR/cylindrospermopsin mixture on growth, oxidative stress and mineral content in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015; 116: 59- 67.

Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol.* 2008; 38 (2): 97- 125.

Gutiérrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Moreno IM, Cameán AM. Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. *Food Chem Toxicol.* 2013; 53 (0): 139-52.

Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos A, Moreno FJ, Cameán AM. Biochemical and pathological toxic effects induced by the cyanotoxin Cylindrospermopsin on the human cell line Caco-2. *Water Res.* 2012; 46 (5): 1566- 75.

Guzmán-Guillén R, Campos A, Machado J, Freitas M, Azevedo J, Pinto E, Almeida A, Cameán AM, Vasconcelos V. Effects of *Chrysosporium (Aphanizomenon) ovalisporum* extracts containing cylindrospermopsin on growth, photosynthetic capacity, and mineral content of carrots (*Daucus carota*). *Ecotox.* 2017; 26 (1): 22- 31.

Guzmán-Guillén R, Moreno I, Prieto AI, Soria-Díaz ME, Vasconcelos V, Cameán AM. Cyn determination in tissues from freshwater fish by LC-MS/MS: Validation and application in tissues from subchronically exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Talanta.* 2015; 131 (C): 452-59.

Guzmán-Guillén R, Prieto AI, Vasconcelos VM, Cameán AM. Cyanobacterium producing cylindrospermopsin cause oxidative stress at environmentally relevant concentrations in sub-chronically exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere.* 2013; 90 (3): 1184- 94.

Greer B, McNamee S, Boots B, Cimarelli L, Guillebault D, Helmi K, Marcheggiani S, Panaiotov S, Breitenbach U, Akcaalan R, Medlin LK, Kittler K, Elliott CT, Campbell K. A validated UPLC-MS/MS method for the surveillance of ten aquatic biotoxins in European brackish and freshwater systems. *Harmful Algae.* 2016; 55: 31-40.

Harada KI, Ohtami I, Iwamoto K, Suzyuki M, Watanabe MF, Watanabe M, Terao K. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicol.* 1994; 32 (1): 73- 84.

Hitzfeld BC, Höger SJ, Dietrich DR. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment and human risk assessment. *Environ Health Perspect.* 2000; 108 (S1): 113- 22.

Huang X, Chen L, Liu W, Qiao Q, Wu K, Wen J, Huang C, Tang R, Zhang X. Involvement of oxidative stress and cytoskeletal disruption in microcystin-induced apoptosis in CIK cells. *Aquat Toxicol.* 2015; 165: 41- 50.

Humpage AR, Fontaine F, Froschio S, Burcham P, Falconer IR. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *J Toxicol Environ Health A.* 2005; 68 (9): 739- 53.

Humpage A, Hardy S, Moore E, Froschio S, Falconer I. Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. *J Toxicol Environ Health A.* 2000; 61 (3): 155- 65.

IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. [Consultado en Mayo 2018]. Disponible en: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. [Consultado en Mayo 2018]. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.

Kinnear S, Fabbro L, Duivenvoorden L. Variable growth responses of water thyme (*Hydrillaverticillata*) to whole-cell extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2008; 54 (2): 187- 94.

Kittler K, Schreiner M, Krumbein A, Manzei S, Koch M, Rohn S, Maul R. Uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in *Brassica* vegetables. *Food Chem.* 2012; 133 (3): 875- 79.

Levizou E, Stataris G, Papadimitriou T, Laspidou CS, Kormas KA. Lettuce facing microcystin-rich irrigation water at different developmental stages: Effects on plant performance and microcystins bioaccumulation. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2017; 143: 193- 200.

Li YW, Zhan XJ, Xiang L, Deng ZS, Huang BH, Wen HF, Sun TF, Cai QY, Li H, Mo CH. Analysis of Trace Microcystins in Vegetables Using Solid-Phase Extraction Followed by High Performance Liquid Chromatography Triple-Quadrupole Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2014; 62 (49): 11831-39.

Machado J, Azevedo J, Freitas M, Pinto E, Almeida A, Vasconcelos V, Campos A. Analysis of the use of microcystin-contaminated water in the growth and nutritional quality of the root-vegetable, *Daucus carota*. *Environ Sci Pollut Res.* 2017; 24 (1): 752-64.

Manubolu M, Lee J, Riedl KM, Kua ZX, Collart LP, Ludsin SA. Optimization of extraction methods for quantification of microcystin-LR and microcystin-RR in fish, vegetable, and soil matrices using UPLC-MS/MS. *Harmful Algae.* 2018; 76: 47- 57.

McFadden GI. Origin and evolution of plastids and photosynthesis in eukaryotes. *C Sh Perspect Biol.* 2014; 6 (4).

Metcalf JS, Barakate A, Codd GA. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 235 (1): 125- 29.

Mihali TK, Kellmann R, Muenchhoff J, Barrow KD, Neilan BA. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl Environ Microb.* 2008; 74 (3): 716- 22.

Miller T, Berversdorf L, Weirich CA, Bartlett SL. Cyanobacterial Toxins of the Laurentian Great Lakes, Their Toxicological Effects, and Numerical Limits in Drinking Water. *Mar Drugs.* 2017; 15 (6): 160.

Milutinovic A, Zorc-Pleskovic R, Živin M, Vovk A, Serša I, Šuput D. Magnetic resonance imaging for rapid screening for the nephrotoxic and hepatotoxic effects of microcystins. *Mar Drugs*. 2013; 11 (8): 2785- 98.

Muñoz G, Vo Duy S, Roy-Lachapelle A, Husk B. Analysis of individual and total microcystins in surface water by on-line preconcentration and desalting coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2017; 1516: 9-20.

Nyoni H, Mamba BB, Msagati TAM. Development of a silicone-membrane passive sampler for monitoring cylindrospermopsin and microcystin LR-YR-RR in natural waters. *Phys Chem Earth*. 2017; 100: 189-200.

Oehrle SA, Southwell B, Westrick J. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicon*. 2010; 55 (5): 965- 72.

Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC. Cylindrospermopsin, a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc*. 1992; 114 (20): 7941- 42.

Pang K, Tang Q, Chen L, Wan B, Niu C, Yuan X, Xiao S. Nitrogen-Fixing Heterocystous Cyanobacteria in the Tonian Period. *Cell Pres*. 2018; 28 (4): 616-22.

Peuthert A, Lawton L, Pflugmacher S. In vivo influence of cyanobacterial toxins on enzyme activity and gene expression of protein phosphatases in Alfalfa (*Medicago sativa*). *Toxicon*. 2008; 52 (1), 84- 90.

Planavsky NJ, Asael D, Hofmann A, Reinhard CT, Lalonde SV, Knudsen A, Wang X, Ossa FO, Pecoits E, Smith AJB. Evidence for oxygenic photosynthesis half a billion years before the Great Oxidation Event. *Nat Geosci*. 2014; 7 (4): 283-86.

Prieto A, Campos A, Cameán AM, Vasconcelos V. Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*). *Ecotoxicol Environ Saf*. 2011; 74 (7): 1973- 80.

Prieto AI, Guzmán-Guillén R, Díez-Quijada L, Campos A, Vasconcelos V, Jos A, Cameán AM. Validation of a Method for Cylindrospermopsin Determination in Vegetables: Application to Real Samples Such as Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Toxins*. 2018; 10 (2): 63.

Puerto M, Jos A, Pichardo S, Gutierrez-Praena D, Cameán AM. Acute effects of pure cylindrospermopsin on the activity and transcription of antioxidant enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed by gavage. *Ecotoxicology*. 2011; 20 (8): 1852- 60.

Rodríguez I, Fraga M, Alonso A, Guillebault D, Medlin L, Baudart J, Jacob P, Helmi K, Meyer T, Breitenbach U, Holden NM, Boots B, Spurio R, Cimarelli L, Mancini L, Marcheggiani S, Albay M, Akcaalan R, köker L, Botana LM. Monitoring of freshwater toxins in European environmental waters by using novel multi-detection methods. *Environ Toxicol Chem*. 2017; 36 (3): 645- 54.

Romero-Oliva CS, Contardo-Jara V, Block T, Pflugmacher S. Accumulation of microcystin congeners in different aquatic plants and crops - A case study from lake Amatitlán, Guatemala. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2014; 102 (1): 121- 28.

Runnegar MT, Kong SM, Zhong YZ, Lu SC. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 1995; 49 (2): 219- 25.

Silva P, Vasconcelos V. Allelopathic effect of *Cylindrospermopsis raciborskii* extracts on the germination and growth of several plant species. *Chem Ecol*. 2010; 26 (4): 263-71.

Singh S, Kate BN, Banerjee U. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. *Crit Rev Biotechnol*. 2005; 25 (3): 73- 95.

Sivonen K, Namikoshi M, Evans WR, Carmichael WW, Sun F, Rouhianen L, Luukkainen R, Rinehart KL. Isolation and characterization of a variety of Microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. *Appl Environ Microb*. 1992; 58 (8): 2495- 500.

Spoof L, Berg KA, Rapala J, Lahti K, Lepisto L, Metcalf JS, Codd GA, Meriluoto J. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). *Environ Toxicol.* 2006; 21 (6): 552- 60.

Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Döhren H, Börner T, Neilan BA. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Cell Chem Biol.* 2000; 7 (10): 753- 64.

Trifirò G, Barbaro E, Gambaro A, Vita V, Clausi MT, Franchino C, Palumbo MP, Floridi F, De Pace R. Quantitative determination by screening ELISA and HPLC-MS/MS of microcystins LR, LY, LA, YR, RR, LF, LW, and nodularin in the water of Occhito lake and crops. *Anal Bioanal Chem.* 2016; 408 (27): 7699- 708.

Vasas G, Gáspár A, Surányi G, Batta G, Gyémánt G, M-Hamvas M, Máthé C, Grigorszky, Molnár E, Borbély G. Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum*, by plant test (blue-green sinapis test). *Anal Biochem.* 2002; 302 (1): 95- 103.

Wierzchos J, Ascaso C, McKay CP. Endolithic cyanobacteria in halite rocks from the hyperarid core of the Atacama desert. *Astrobiology.* 2006; 6 (3): 415- 22.

Yang M, Yu J, Li Z, Guo Z, Burch M, Lin T. Lake Taihu not to blame for Wuxi's woes. *Science.* 2008; 319 (5860): 158.

Yoshida T, Makita Y, Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, Sekijima M, Tamaru SI, Ueno Y. Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. *Nat Toxins.* 1997; 5 (3), 91- 5.

Yu SZ. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J Gastroen Hepatol.* 1995; 10 (6): 674- 82.

Yunlu J, Huiling L, Yueming Q, Wei C, Lirong S. Phytotoxicity, bioaccumulation and potential risk of plant irrigations using cyanobloom-loading freshwater. *Sci Total Environ.* 2018; 624: 704-12.

Žegura B, Gajski G, Štraser A, Garaj-Vrhovac V. Cylindrospermopsin induced DNA damage and alteration in the expression of genes involved in the response to DNA damage, apoptosis and oxidative stress. *Toxicon*. 2011; 58 (6-7): 471- 79.

Zegura B, Straser A, Filipič M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins—a review. *Mutat Res*. 2011; 727 (1-2):16- 41.

Zervou SK, Christophoridis C, Kaloudis T, Triantis TM, Hiskia A. New SPE-LC-MC/MC method for simultaneous determination of multi-class cyanobacterial and algal toxins. *J Hazard Mater*. 2017; 323 (Pt A): 56- 66.

Zhou L, Yu H, Chen K. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomed Environ Sci*. 2002; 15 (2): 166- 71.

Zong-Yao Q, Zhi-Gang L, Ting-ting G, Qi-Ming X. Analysis of trace microcystins in vegetables using matrix solid-phase dispersion followed by high performance liquid chromatography triple-quadrupole mass spectrometry detection. *Talanta*. 2017; 173: 101-6.