



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KELLY CRISTINA DOS SANTOS

**APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA ANÁLISE DOS
EFEITOS DE HERBICIDAS ISOLADOS E EM MISTURA NO
BIVALVE *CORBICULA FLUMINEA***

Londrina
2013

KELLY CRISTINA DOS SANTOS

**APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA ANÁLISE DOS
EFEITOS DE HERBICIDAS ISOLADOS E EM MISTURA NO
BIVALVE *CORBICULA FLUMINEA***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S237a	<p>Santos, Kelly Cristina dos. Aplicação de biomarcadores para análise dos efeitos de herbicidas isolados e em mistura no bivalve <i>Corbicula fluminea</i>/ Kelly Cristina dos Santos. – Londrina, 2013. 165 f.: il.</p> <p>Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2013. Inclui bibliografia</p> <p>1. Bivalve – Teses. 2. Marcadores biológicos– Teses. 3. Herbicidas – Toxicidade – Testes – Teses. 4. Água – Poluição por herbicidas – Teses. I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 594.1</p>
-------	---

KELLY CRISTINA DOS SANTOS

**APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA ANÁLISE DOS EFEITOS
DE HERBICIDAS ISOLADOS E EM MISTURA NO BIVALVE
*CORBICULA FLUMINEA***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Gustavo Monteiro Teixeira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^ª. Dr^ª. Marta Marques de Souza
Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Londrina, 18 de fevereiro de 2013.

*Aos meus pais e irmãos, por serem minha
fortaleza e maior tesouro, e ao meu namorado,
pelo apoio, paciência e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Ao término de mais uma fase em minha vida, gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela força nas horas de dificuldades e pelas bênçãos alcançadas em cada dia, pela superação de cada obstáculo.

Aos meus pais, Marilene e Luiz, e meus irmãos, Jaqueline e Luiz Gustavo, pelas palavras amigas e de conforto em momentos de desânimo, pelo incentivo e apoio, pelas inúmeras ligações nos momentos de dificuldade, pela presença mesmo na distância, sendo uma fortaleza que não me deixou fraquejar no decorrer dos dois anos do curso e durante toda a minha vida.

Ao meu namorado, Marlon Tini, pelo apoio incondicional em todos os momentos do mestrado, sendo meu refúgio nas horas de dificuldade. Pelas inúmeras idas à UEL à meia noite e às cinco da manhã para montar experimentos, pelo desenvolvimento de diversas habilidades a fim de me auxiliar nas amostragens e nas análises durante os feriados e fim de semanas, pela disponibilidade de me ajudar nas coletas no Igapó, mesmo em domingos ensolarados e com jogo de futebol, mas principalmente pela paciência com meus momentos de estresse e nervosismo.

Aos meus amigos, Carla e Eliandro, pelas conversas, conselhos, risadas, ombro amigo e amizade sempre presente, mesmo que, às vezes, fisicamente distantes.

Aos meus colegas do LEFA, muito obrigada pelas palavras amigas e de apoio em momentos de dificuldade. Em especial à Carol, Lu e Angélica pela ajuda nas coletas, auxílio nas execuções laboratoriais, conversas no Igapó e amizade e à Debora e Fernando pela parceria, amizade e companheirismo.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cláudia B. R. Martinez, pela confiança de aceitar minha orientação, pela paciência em meus momentos de nervosismo e ansiedade, pelo apoio, ensinamentos e amizade conferidos nestes anos de mestrado e em anos anteriores durante meu estágio de iniciação científica e desenvolvimento da monografia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UEL, pela oportunidade concedida.

Ao CNPq pela concessão de bolsa que garantiu minha estada em Londrina e conclusão do mestrado.

E, finalmente, a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte da realização deste sonho, o meu Muito Obrigado!

*“Seja a mudança que você quer
ver no mundo”*

Mahatma Ghandi

SANTOS, K.C. **Aplicação de biomarcadores para análise dos efeitos de herbicidas isolados e em mistura no bivalve *Corbicula fluminea***. 2013. 165p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração Zoologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

RESUMO

Atrazina e Roundup[®] se enquadram entre os herbicidas mais consumidos no Brasil e no mundo, sendo potencialmente tóxicos aos organismos aquáticos. Assim, o presente trabalho analisou o efeito agudo (6, 24 e 96 h) dos herbicidas atrazina (ATZ) e Roundup[®] (RD) isolados ou como mistura no bivalve dulcícola *Corbicula fluminea*. Para ATZ, as concentrações foram de 2 (ATZ 2) e 10 (ATZ 10) ppb; para RD, foram de 2 (RD 2) e 10 (RD 10) ppm; e para a mistura, foram de 2 ppb de ATZ + 2 ppm de RD (AR 2) e 10 ppb de ATZ + 10 ppm de RD (AR 10). Foram analisadas, em brânquia (BRQ) e glândula digestiva (GL), as defesas antioxidantes: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione reduzida (GSH); enzimas de biotransformação: etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD), glutathione-S-transferase (GST) e mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR); a ocorrência de lipoperoxidação (LPO). O teste do cometa foi realizado com os hemócitos para análise de danos ao DNA. As enzimas de biotransformação e as defesas antioxidantes se mostraram mais alteradas nos tempos de exposição mais curtos (6 e 24 h), nos quais, para ambos os herbicidas, foi observado inibição da CAT e MXR e aumento da SOD e GPx. Já a ATZ, promoveu inibição da EROD na BRQ e aumento da EROD e GSH na GL, e a GR se apresentou inibida em ambos os tecidos apenas por RD. A maioria das alterações em 6 e 24 h foram observadas em ATZ 2, possivelmente pela atuação de mecanismos de barreira em ATZ 10, como produção de muco. Os principais danos oxidativos foram observados em 96 h, quando o RD aumentou em mais de três vezes a ocorrência de LPO em BRQ e GL, além da inibição da EROD branquial em quase 80% pela ATZ. Com exceção da GSH e LPO, os demais biomarcadores se apresentaram significativamente diferentes entre os dois órgãos analisados, e a BRQ mostrou-se a principal fonte da EROD, MXR, SOD e GPx e a GL da GST, CAT e GR; estas diferenças podem estar relacionadas com a localização e função dos órgãos no animal. A exposição à mistura dos herbicidas não promoveu alteração nas defesas antioxidantes analisadas, com exceção da GR. Efeito antagônico foi observado na EROD branquial, a qual apresentou inibição menos intensa que a observada para ATZ isolada, e em LPO, onde além da neutralização do efeito de LPO do RD isolado, houve uma diminuição da ocorrência deste tipo de dano em AR 10. Já para MXR e danos ao DNA, foi observado efeito de potencialização, uma vez que os herbicidas promoveram alterações significativas nestes biomarcadores apenas quando misturados. Assim, a mistura de herbicidas apresentou mecanismos de toxicidade bastante complexos, não apresentando um padrão aparente de alteração nos biomarcadores analisados. A EROD e LPO se apresentaram como bons biomarcadores de efeito da ATZ e RD, respectivamente, e MXR e teste do cometa, para a mistura dos herbicidas, a qual se apresentou potencialmente tóxica para o bivalve.

Palavras-chave: Atrazina. Biotransformação. Danos no DNA. Estresse oxidativo. Roundup.

SANTOS, K.C. **Use of biomarkers for the analysis of the effects of herbicides, isolated and mixed, in the bivalve *Corbicula fluminea***. 165p. Dissertation (Master's Degree Dissertation in Biological Science – Concentration Area Zoology) – State University of Londrina, Londrina. 2013.

ABSTRACT

Atrazine and Roundup® are among the most commonly consumed herbicides in Brazil and worldwide, being potentially toxic to aquatic organisms. Thus, the present study examined the acute effect (6, 24 and 96 h) of atrazine (ATZ) and Roundup® (RD), alone or as a mixture, to the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*. The concentrations used for ATZ were 2 (ATZ 2) and 10 (ATZ 10) ppb; for RD, were 2 (2 RD) and 10 (DR 10) ppm; and for the mixture were 2 ppb of ATZ + 2 ppm RD (AR 2) and 10 ppb and 10 ppm of ATZ + RD (AR 10). It were analyzed in the gills (BRQ) and digestive gland (GL) the antioxidant defenses: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and reduced glutathione (GSH); the biotransformation enzymes: ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), glutathione-S-transferase (GST); the multixenobiotic resistance mechanism (MXR) and the occurrence of lipid peroxidation (LPO). The comet assay was performed on hemocytes for the analysis of DNA damage. The biotransformation enzymes and antioxidant defenses were more affected in shorter exposure times (6, 24 h) when, for both herbicides alone, it was observed inhibition of CAT and SOD and increased MXR and GPx. On the other hand, ATZ promoted inhibition of EROD in BRQ and increase of EROD and GSH in GL, and GR was inhibited in both tissues only by RD. Most of the changes at 6 and 24 h were observed in ATZ 2, possibly by the action of barrier mechanisms, such as mucus production, in ATZ 10. The major oxidative damages were observed at 96 h, when RD increased more than three times the occurrence of LPO in BRQ and GL, besides the inhibition of EROD in the gills by almost 80% by ATZ. With the exception of GSH and LPO, all the other biomarkers were significantly different between the two organs analyzed, and the BRQ was the main source of EROD, MXR, SOD and GPx while GL was the main source of GST, CAT and GR; these differences may be related to the location and function of each organ. The exposure to herbicides mixture did not promote changes in antioxidant defenses, with exception of GR. An antagonistic effect was observed in gill EROD, which showed a lower inhibition in comparison to that observed for ATZ isolated and in LPO, where besides neutralizing the effect of RD isolated, a reduction of the occurrence of such damage was observed in AR 10. Moreover, for DNA damage and MXR, potentiation effect was observed, since the herbicides provided significant changes in these biomarkers only when mixed together. Thus, the herbicide mixture showed very complex mechanisms of toxicity, showing no apparent pattern of effect on the biomarkers studied. The EROD and LPO were shown as good biomarkers of effect for ATZ and RD, respectively, and MXR and comet assay for the herbicides mixture, which appeared potentially toxic for the bivalve.

Key-words: Atrazine. Biotransformation. DNA damage. Oxidative stress. Roundup.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo do mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) promovido por transportadores ativos de membrana, P-gp e MRP, e enzimas de detoxificação de fase I e II, citocromo P450 (CYP) e glutathione-S-Transferase (GST)	32
Figura 2 – <i>Corbicula fluminea</i>	58
Figura 3 – Foto de satélite (21/07/2006) indicando a localização do Lago Igapó III : local de coleta de <i>C. fluminea</i>	59
Figura 4 – Esquema de renovação de meio de exposição a cada 24 h em teste semi-estático	61
Figura 5 – Delineamento experimental para testes com ATZ e RD em 6, 24 e 96 h	63
Figura 6 – Delineamento experimental para testes da mistura de ATZ e RD em 96 h	64
Figura 7 – Coleta de hemolinfa do seio localizado no músculo adutor anterior	64
Figura 8 – Identificação de brânquia e glândula digestiva em <i>C. fluminea</i>	65
Figura 9 – Classificação de nucleóides quanto o tamanho da cauda.....	71
Figura 10 – Atividade da EROD, GST e MXR em brânquia e glândula digestiva de <i>C. fluminea</i> após exposição (6 e 24 h) a ATZ e RD ou apenas à água desclorada	106
Figura 11 – Atividade da SOD, CAT e GPx em brânquia e glândula digestiva de <i>C. fluminea</i> após exposição (6 e 24 h) a ATZ e RD ou apenas à água desclorada.....	107
Figura 12 – Atividade da GR e concentração de GSH em brânquia e glândula digestiva de <i>C. fluminea</i> após exposição (6 e 24 h) a ATZ e RD ou apenas à água desclorada.....	108
Figura 13 – Concentração de MDA em brânquia e glândula digestiva e ocorrência de danos oxidativos ao DNA de hemócitos de <i>Corbicula fluminea</i> após 6 e 24 h de exposição a ATZ e RD isolados ou em mistura.....	109
Figura 14 – Atividade da EROD, GST e MXR em brânquia e glândula digestiva de <i>C. fluminea</i> após exposição (96 h) a ATZ e RD isolados ou em mistura	140
Figura 15 – Atividade da SOD, CAT e GPx em brânquia e glândula digestiva de <i>C. fluminea</i> após exposição (96 h) a ATZ e RD isolados ou em mistura.....	141
Figura 16 – Atividade da GR e concentração de GSH em brânquia e glândula digestiva de <i>C. fluminea</i> após exposição (96 h) a ATZ e RD isolados ou em mistura	142
Figura 17 – Concentração de MDA em brânquia e glândula digestiva e ocorrência de danos oxidativos ao DNA de hemócitos de <i>Corbicula fluminea</i> após 96 h de exposição à ATZ e RD isolados ou em mistura.....	144
Figura 18 – Esquema dos principais biomarcadores observados em brânquia e glândula digestiva de <i>Corbicula fluminea</i>	164

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Resultados obtidos para os mecanismos de biotransformação, defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas e peroxidação lipídica (TBARS) em brânquia e glândula digestiva de *Corbicula fluminea* dos grupos controle dos experimentos com atrazina e Roundup® 110
- Tabela 2** – Frequência (%) de nucleóides observados em cada uma das classes do cometa (0, 1, 2 e 3) e total de nucleóides danificados em hemócitos de *C.fluminea* expostos apenas a água desclorada ou a ATZ e RD isolados ou em mistura 145
- Tabela 3** – Resultados obtidos para os parâmetros analisados em brânquia (BRQ) e glândula digestiva (GL) de *Corbicula fluminea* expostos por 6, 24 e 96 h a atrazina (ATZ) e Roundup® (RD), isoladamente, e em mistura (ATZ + RD)..... 165

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(-C•-) - radical carbono centrado

µg – micrograma

µM – micromolar

µS – microsiemens (Unidade de condutividade)

•OH – radical hidroxil

¹O₂ – superóxido

abs – absorbância

ANDEF – Associação Nacional de Defesa Vegetal

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AR 10 – mistura de 10 ppb de atrazina + 10 ppm de Roundup[®]

AR 2 – mistura de 2 ppb de atrazina + 2 ppm de Roundup[®]

ATZ – atrazina

ATZ 10 – exposição a 10 ppb de atrazina

ATZ 2 – exposição a 2 ppb de atrazina

BRQ – brânquia

Ca⁺² – íon de cálcio divalente

CAT – catalase

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

cm – centímetro

CO₂ – dióxido de carbono

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CTR – grupo controle

Cu – cobre

Cu⁺² – íon cobre divalente

CuZnSOD – superóxido dismutase contendo íon de cobre e zinco no sítio ativo da enzima

CYP1A – Subfamília do citocromo P450 envolvido no mecanismo de biotransformação de fase I

DDT – dicloro-difenil-tricloroetano

DMSO – dimetilsulfóxido

DTNB – ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

e⁻ - elétron

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

emi.: – emissão

EP – erro padrão

EPA – (Environmental Protection Agency) Agência de Proteção Ambiental

ERN – espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécies reativas de oxigênio

EROD – etoxirresorufina-*O*-desetilase

exc.: – excitação

EXP 10 – experimental 10 (referente a concentração de 10 ppm ou ppb)

EXP 2 – experimental 2 (referente a concentração de 2 ppm ou ppb)

FAD – dinucleotídeo de flavina e adenina

Fe – ferro

FeSOD – superóxido dismutase contendo íon de ferro no sítio ativo da enzima

FFA – (free fat acid) ácidos graxos livres

FMO – (flavin containing monooxygenases) Sistema de flavoproteínas monooxigenases

g – (massa) grama

g –força centrífuga

GL – glândula digestiva

GPx – glutathione peroxidase

GR – glutathione reductase

GSH – glutationa reduzida

GSSG – glutationa oxidada

GST – glutationa-S-transferase

h – hora

H⁺ - íon hidrogênio

H₂O – água

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₃O₂ – hidróxido hidratado

ha – hectare

HO₂[•] - forma protonada do radical superóxido

HSP – (heat shock proteins) Proteínas de choque-térmico

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

L – litro

LPO – lipoperoxidação

m – metro

M – molar

m/v – massa/ volume

m² – metro quadrado

mA – miliampère

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDA – malondialdeído

MFO – (mixed function oxigenases) Sistema de oxigenases de função mista

mg – miligrama

min – minuto

MIP – medidas de manejo integrado

mL – mililitro

mM - milimolar

MnSOD – superóxido dismutase contendo íon de manganês no sítio ativo da enzima

MRD – mecanismo de resistência a multidrogas

MXR – mecanismo de resistência a multixenobióticos

n – (n+1) número de componentes da mistura de substâncias químicas

N – normal

n – número de indivíduos

NaCl – cloreto de sódio

NADP⁺ - nicotinamina adenina oxidada

NADPH – nicotinamida adenina difosfato

NaOH – hidróxido de sódio

nm – nanômetro

nmol – nanomol

NO[•] - radical óxido nítrico

O – oeste (região)

O₂ – oxigênio molecular

O₂^{•-} - ânion radical superóxido

OCPs – (organochlorine pesticides) Pesticidas organoclorados

OD – oxigênio dissolvido

ONOO⁻ - ânion peroxinitrito

ONU – Organização das Nações Unidas

PAHs – (polycyclic aromatic hydrocarbons) Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

PCBs – policlorobifenilas

P-gp – glicoproteínas-P

PHGPx – fosfolípido glutationa peroxidase hidroperóxido

PLA – (phospholipase) Fosfolipase

pmol – picomol

POEA – polioxietilenoamina

ppb – partes por bilhão ppm – partes por milhão

ptn – proteína

RD - Roundup[®]

RD 10 - exposição a 10 ppm de Roundup[®]

RD 2 - exposição a 2 ppm de Roundup[®]

S – sul (região)

SCGE – “Single cell gel electrophoresis”

SH – grupo sulfidril

SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

SMA – solução-mãe de atrazina

SOD – superóxido dismutase

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – (thiobarbituric acid reactive substances) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

TNB – tiolato

TRIS – trisaminometano

U – unidade de SOD (representa a quantidade de SOD que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c

UNT – unidade nefelométricas de turbidez

USEPA – (United States Environmental Protection Agency) Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

UV - ultravioleta

V – volt

v/v – volume/ volume

WHO – (World Health Organization) Organização Mundial de Saúde

XOD – xantina oxidada

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Ecotoxicologia	21
2.2 Biomarcadores	22
2.3 Biotransformação de compostos orgânicos	23
2.3.1 Fase I – Citocromo P450.....	26
2.3.2 Fase II - Glutathione S-transferase (GST)	27
2.3.3 Fase III – Mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR).....	29
2.4 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	32
2.4.1 Radical hidroxil (\bullet OH).....	33
2.4.2 Ânion radical superóxido ($O_2\bullet^-$).....	34
2.4.3 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....	34
2.5 Defesas Antioxidantes	36
2.5.1 Superóxido dismutase (SOD).....	37
2.5.2 Catalase (CAT)	38
2.5.3 Glutathione peroxidase (GPx).....	38
2.5.4 Glutathionas	39
2.5.5 Glutathione reductase (GR)	40
2.6 Estresse Oxidativo	40
2.6.1 Peroxidação lipídica (LPO).....	41
2.6.2 Danos no DNA.....	42
2.7 Agrotóxicos.....	43
2.7.1 Atrazina.....	47
2.7.2 Roundup®.....	49
2.8 Toxicidade de Misturas.....	51
2.9 Moluscos como organismo teste	52
3 OBJETIVOS.....	57
3.1 Objetivo Geral	57
3.2 Objetivos específicos.....	57
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.1 Animais.....	58
4.2 Seleção das concentrações dos herbicidas testados	59

4.3 Testes de toxicidade	60
4.3.1 Experimentos com atrazina e Roundup®.....	62
4.3.2 Experimento da mistura (atrazina + Roundup®).....	63
4.4 Amostragem	64
4.5 Biomarcadores	65
4.5.1 Enzimas de biotransformação.....	65
4.5.1.1 Fase I: EROD (etoxiresorufina-O-desetilase).....	65
4.5.1.2 Fase II: Glutaciona S-Transferase (GST).....	66
4.5.1.3 Fase III: Mecanismo de Resistência a multixenobióticos (MXR) - Ensaio de acúmulo de Rodamina.....	66
4.5.2 Defesas Antioxidantes Primárias.....	67
4.5.2.1 Superóxido dismutase (SOD).....	67
4.5.2.2 Catalase (CAT).....	68
4.5.2.3 Glutaciona peroxidase (GPx).....	68
4.5.3 Glutacionas.....	69
4.5.3.1 Glutaciona reduzida (GSH).....	69
4.5.3.2 Glutaciona redutase (GR).....	69
4.5.4 Danos oxidativos.....	70
4.5.4.1 Lipoperoxidação.....	70
4.5.4.2 Ensaio do cometa.....	70
4.5.4.2.1 Análise das lâminas.....	71
4.6 Dosagem de proteínas totais	72
4.7 Análise Estatística	72
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Introdução, Revisão e Material e Métodos)	73
6 MANUSCRITO I – “Efeitos agudos dos herbicidas Roundup® e atrazina em diferentes tecidos do bivalve <i>Corbicula fluminea</i>”	95
7 MANUSCRITO II – “Efeitos dos herbicidas atrazina e Roundup® isolados e da mistura de ambos no bivalve dulcícola <i>Corbicula fluminea</i>: antagonismo ou potencialização?”	126
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	162

APRESENTAÇÃO DO FORMATO DA DISSERTAÇÃO

O presente trabalho é constituído de uma introdução geral que visa apresentar o assunto a ser tratado, seguido de uma revisão de literatura. Esta tem como objetivo auxiliar, através do embasamento teórico, a compreensão do tema abordado nesta dissertação. Após este item são delineados os objetivos gerais e específicos do trabalho como um todo e em seguida o item Material e métodos geral, no qual é apresentada, de maneira detalhada, toda a metodologia utilizada para o desenvolvimento da pesquisa, bem como o material necessário para a sua realização. As referências utilizadas para elaboração de todos os itens anteriormente apresentados estão relacionadas em “Referências Bibliográficas”. Seguem-se dois manuscritos completos, cada qual com uma Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e suas respectivas referências. Cada um destes manuscritos foi redigido de acordo com as normas exigidas pelo periódico ao qual será enviado para publicação. Como último item, são apresentadas considerações finais sobre o trabalho como um todo.

INTRODUÇÃO GERAL

A população mundial está estimada em mais de 7 bilhões de pessoas (ONU/BR, 2012), sendo que só o Brasil, segundo censo realizado em 2010 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), contribui com mais de 190 milhões de habitantes (IBGE, 2013). Paralelo ao crescimento da população mundial há uma demanda cada vez maior de alimentos. Esta é suprida pela intensa atividade agrícola em todo o mundo, a qual tem se valido do uso de diversos agrotóxicos, que se tornaram parte fundamental do atual modelo agrícola (CALDAS e SOUZA, 2000).

Segundo a Associação Nacional de Defesa Vegetal (ANDEF, 2011), a perspectiva da agricultura brasileira para a década de 2009-2019 é de que os produtos mais dinâmicos do agronegócio brasileiro deverão ser, dentre outros, soja, milho e trigo. A produção nacional destes grãos deverá passar de 139,7 milhões de toneladas em 2007/2008 para 180 milhões de toneladas em 2018/2019. Este cenário indica um acréscimo de 40 milhões de toneladas à produção agrícola brasileira. Além disso, as previsões para 2018/2019 são de que a área de soja deva crescer 5,2 milhões de hectares em relação a 2007/2008, a de milho 1,75 milhões de hectares e a de cana-de-açúcar 6 milhões de hectares. Assim, o Brasil mesmo já ocupando o primeiro lugar em consumo mundial de agrotóxicos, tende a aumentar o consumo destes produtos nos próximos anos, principalmente de Roundup[®] e produtos à base de atrazina, que são amplamente utilizados nas culturas citadas acima. O glifosato e seus sais e a atrazina ocupam o primeiro e terceiro lugar entre os ingredientes ativos com ação herbicida mais consumidos no Brasil, sendo o estado do Paraná, o segundo estado brasileiro que mais comercializa estes ingredientes ativos no país (IBAMA, 2010).

Os herbicidas atrazina e Roundup[®] têm sido detectados em corpos d'água no Brasil e em outros países. Assim, estes herbicidas merecem atenção especial quando se trata de contaminação do ambiente aquático e proteção da biota presente nesse ecossistema. A propriedade do glifosato, ingrediente ativo do produto formulado Roundup[®], de apresentar alta capacidade de adsorção às partículas do solo, garante que o mesmo seja acumulado no sedimento e persista no ambiente. Aliando este fator com a considerável mobilidade da atrazina, e conseqüente facilidade de alcançar o ambiente aquático, torna possível a contaminação dos corpos d'água por ambos os herbicidas simultaneamente, como observado por Armas et al. (2007). Além disso, atrazina e glifosato apresentam um padrão de consumo sazonal nas culturas, sendo que o primeiro é empregado no período de abril a novembro e o segundo de setembro a junho (ARMAS et al., 2005). Assim, a aplicação simultânea dos

agrotóxicos ocorre em praticamente todos os meses do ano, sendo que, mesmo nos meses de julho e agosto, onde não é observada sobreposição dos períodos de uso, as propriedades acima citadas, garantem que os mesmos sejam passíveis de detecção simultânea no ambiente aquático.

Desta forma, torna-se de extrema importância a realização de testes toxicológicos que visem compreender os efeitos promovidos por estes contaminantes, tanto isoladamente, quando em conjunto. A maioria das legislações que definem parâmetros/ padrões de qualidade de água, tanto nacionais quanto internacionais, ainda é baseada na toxicologia de substâncias individuais. Todavia, organismos aquáticos raramente são expostos a apenas um contaminante, mas sim a uma variedade destes, os quais se apresentam como misturas complexas (FAUST et al., 2003). Em contraste com esta realidade ambiental, mais de 95% dos estudos em toxicologia são desenvolvidos sobre a pesquisa de contaminantes individuais (GROTEN, 2000). Sob a forma de mistura, as substâncias químicas podem apresentar comportamento diferente do observado quando isoladas (ALTENBURGER et al., 2003). Assim, dados resultantes da interação de contaminantes são confrontados com dados da toxicidade dos compostos individuais (FAUST, et al., 2003), os quais normalmente são encontrados em baixas concentrações no ambiente. Nesta condição, podem não apresentar toxicidade considerável, porém, em combinação com outras substâncias podem causar diversos efeitos adversos severos (SCHRAB et al., 1993).

Toda a biota aquática se encontra susceptível aos efeitos dos contaminantes presentes no meio, sendo que alguns animais se apresentam mais sensíveis que outros. Nesse sentido, uma vez que testes de toxicidade com agrotóxicos normalmente não são realizados com bivalves (BRINGOLF et al., 2007), é de grande importância a realização deste tipo de análise neste grupo de organismo. Bivalves dulcícolas como *Corbicula fluminea* são considerados bons biomonitores da presença de xenobióticos no meio, uma vez que, por serem animais filtradores e comedores de sedimento (WAY et al., 1990), mantêm íntimo contato com o ambiente, filtram grandes quantidades de água e são sedentários, podendo refletir mais precisamente a situação de um determinado local. Além das já citadas vantagens, embora *C. fluminea* seja uma espécie invasora, estudos ambientais devem primar por meios rápidos e eficientes de obtenção de dados toxicológicos. Em se tratando desta espécie de molusco, tal necessidade é suprida pela facilidade de coleta e amostragem do animal e ciclo de vida rápido.

Uma vez que todo xenobiótico orgânico que ocasionalmente atinja a biota, é biotransformado pelo organismo a fim de facilitar sua eliminação, a utilização dos mecanismos de biotransformação como biomarcadores de poluição aquática, em especial de

herbicidas, é de grande valia. As defesas antioxidantes que protegem o organismo contra a atuação das espécies reativas de oxigênio (ERO), potencialmente formadas pela exposição ao contaminante, também se apresentam como ferramentas muito utilizadas como biomarcadores de poluição do ambiente aquático. Estas defesas são representadas por diversas moléculas e enzimas, dentre as quais, merecem destaque as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e o antioxidante não enzimático glutathione reduzida (GSH). Uma vez que alterações nestes mecanismos de defesas, bem como de biotransformação, são alteradas por atuação de xenobióticos, a observação de danos oxidativos na membrana celular e ao material genético são potenciais ferramentas de biomonitoramento ambiental.

O herbicida atrazina é alvo de diversos estudos em toxicologia, sendo apresentada como potencialmente tóxica aos organismos aquáticos. Todavia, o glifosato e, conseqüentemente seu produto formulado Roundup[®], considerando-se seu elevado uso e detecção no ambiente aquático, ainda é alvo de poucos estudos toxicológicos, principalmente com bivalves. Isso se reflete no posicionamento de grandes organizações mundiais como Agriculture Canada, United States Environmental Protection Agency (USEPA) e World Health Organization (WHO), as quais indicam que Roundup[®] pode ser usado sem o mínimo risco ao meio ambiente. Este fato se apresenta equivocado, uma vez que alguns estudos têm mostrado que Roundup[®] é um agente potencialmente tóxico aos organismos. A Resolução n° 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) estabelece como limite máximo de glifosato em águas de classe 1 e 2 o valor de 65 ug.L⁻¹, acima da qual há, entre outras conseqüências, o comprometimento das formas de vida presentes neste ambiente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ecotoxicologia

O ambiente é continuamente alvo de substâncias químicas resultantes das atividades industriais e urbanas denominadas xenobióticos. Estas substâncias externas ao meio natural e introduzidas acidentalmente ou deliberadamente no ambiente aquático prejudicam a qualidade da água, promovendo respostas ou efeitos adversos nos sistemas biológicos ali presentes (RAND et al., 1995). No século XX, milhares de poluentes orgânicos como PCBs,

agrotóxicos organoclorados (OCPs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), dentre outros, foram produzidos e liberados no ambiente (STEGEMAN e HAHN, 1994). Após a II Guerra Mundial houve um grande avanço no que diz respeito à produção de conhecimento toxicológico e uma crescente preocupação das autoridades e comunidade científica em compreender e estudar os efeitos deletérios gerados nos seres vivos, tanto no ecossistema aquático quanto terrestre, pelas substâncias químicas liberadas no ambiente, principalmente por atividade antrópica (STEGEMAN e HAHN, 1994). Neste panorama, a Ecotoxicologia busca alertar sobre as substâncias químicas que representam risco ao meio ambiente e seus componentes, bem como, sugerir a aplicação de medidas preventivas antes que ocorram danos irreparáveis aos ecossistemas naturais (PAASIVIRTA, 1991). Com este foco, conhecimentos obtidos por meio da Ecotoxicologia permitem avaliar a extensão do risco da presença de um determinado contaminante no meio, determinar metodologias adequadas para o rastreamento de agentes tóxicos e auxiliar na prática de medidas de remediação no que se refere à sua eficiência. Assim, a toxicologia ambiental é capaz de subsidiar a formulação segura de dispositivos legais, normas, programas e diretrizes para nortear questões de risco ecotoxicológico determinados pelo lançamento de agentes químicos no ambiente (FORNICOLA et al., 2003).

A avaliação da qualidade dos recursos hídricos tradicionalmente se baseia na medida de parâmetros físicos e químicos da água. Porém, aos poucos foi crescendo a preocupação e a necessidade de detectar os impactos sofridos pela biota em locais contaminados (ARIAS et al., 2007). Assim, a resolução CONAMA nº 357 (2005) estabelece no artigo 8º, parágrafo 4º, de suas disposições gerais sobre as condições e padrões de qualidade das águas, que “a qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos, quando apropriado, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas”.

Segundo esta mesma resolução, os corpos de água doce são classificados, segundo a qualidade requerida para o seu uso preponderante, em águas de classe especial, classe 1, 2, 3 e 4, sendo que as de classe 1 e 2 são destinadas, dentre outras funções, à proteção das comunidades aquáticas (CONAMA, 2005).

2.2. Biomarcadores

O termo “biomarcador” pode ser usado em um sentido amplo que inclui qualquer medida que reflita uma interação entre o sistema biológico e o potencial perigo, que pode ser químico físico ou biológico (WHO, 1993). Além desta definição, biomarcador também pode

ser definido como qualquer alteração biológica (desde alterações moleculares através de respostas celulares e fisiológicas a alterações comportamentais) que possa estar relacionada à exposição ao contaminante ou a seu efeito tóxico (PEAKALL, 1994). Neste cenário, os biomarcadores podem ser medidos nos fluidos corpóreos, células ou tecidos, indicando modificações bioquímicas ou celulares devido à presença e magnitude dos tóxicos (NRC, 1987), sendo considerados sinais de alerta precoce (BUCHELI e FENT, 1995).

Efeitos em níveis hierárquicos biológicos mais elevados como população, comunidade e ecossistema, se iniciam por alterações precoces em processos biológicos, como aquelas a nível molecular, de organelas, células, tecidos e órgãos, possibilitando o desenvolvimento de biomarcadores de efeito precoce que sinalizam efeitos mais tardios (BAYNE et al., 1985). Do ponto de vista ambiental, os biomarcadores indicam que o contaminante está interagindo com o organismo, sendo distribuído entre seus tecidos e está provocando efeitos em diferentes órgãos-alvo (McCARTHY e SHUGART, 1990).

A toxicidade dos poluentes varia em função do tempo de exposição e de suas concentrações, podendo ser dividida em efeitos agudos e crônicos. Os efeitos agudos são causados por exposições mais curtas a altas concentrações de poluentes. Seus efeitos são considerados mais perigosos, podendo abranger desordens fisiológicas e até mesmo morte por envenenamento. Já os efeitos crônicos são observados quando da exposição por tempo mais prolongado a baixas concentrações do contaminante (OGA et al., 2008).

A principal razão para se usar um biomarcador é que ele pode fornecer informações do efeito biológico do poluente ao invés de uma simples quantificação de seus níveis ambientais. O estresse gerado por um poluente gera uma cascata de respostas biológicas, cada uma das quais, pode, em teoria, servir como um biomarcador (McCARTHY et al., 1991). Além disso, biomarcadores bioquímicos possuem a capacidade de antecipar mudanças em níveis biológicos organizacionais mais elevados como população, comunidade ou ecossistema. Este “aviso” oferecido pelos biomarcadores pode ser usado de maneira preventiva, permitindo que estratégias de remediação possam ser desenvolvidas em ambientes poluídos antes que ocorram danos biológicos irreversíveis e irreparáveis (CAJARAVILLE et al., 2000).

2.3. Biotransformação de compostos orgânicos

Um composto orgânico, que é qualquer substância química que contém moléculas de carbono e hidrogênio em sua estrutura, pode ser eliminado pelo organismo através de duas

maneiras principais: por meio da eliminação de sua forma original (composto de origem) ou através da eliminação de formas biotransformadas pelo organismo (VAN DER OOST, 2003). Todos os animais apresentam um grupo de enzimas de biotransformação, normalmente presentes em níveis elevados no fígado (vertebrados) ou em tecidos relacionados com o processo de digestão (invertebrados), como glândula digestiva em moluscos e hepatopâncreas em crustáceos (LIVINGSTONE, 1998). Muitas enzimas de biotransformação em mamíferos têm sido encontradas também em peixes e invertebrados, incluindo as enzimas de fase I, como as monooxigenases do citocromo P450 ou sistema de oxigenases de função mista (MFO), e as de fase II, como as enzimas da família glutathione S-transferase (GST) (GEORGE, 1994; LIVINGSTONE, 1991; NEWMAN e CLEMENTS, 2008; SCHLENK, 1993; STEGEMAN e HAHN, 1994).

O processo de biotransformação pode ser definido como o conjunto de alterações químicas (estruturais), geralmente mediadas por processos enzimáticos, que as substâncias sofrem no organismo. Tais processos visam formar derivados mais polares e, conseqüentemente, mais solúveis em água. Normalmente, há uma diminuição ou perda do efeito farmacológico e/ou toxicológico do xenobiótico, o que facilita sua eliminação (AZEVEDO e DE LIMA, 2003; LIVINGSTONE, 1998; VERMEULEN, 1996). A biotransformação é um dos mecanismos utilizados pelo organismo para facilitar a eliminação de substâncias químicas (AZEVEDO e DE LIMA, 2003), sendo considerado um processo que afeta a disposição, tempo de residência e toxicidade (detoxificação ou ativação) do xenobiótico (LIVINGSTONE, 1998).

Os produtos das reações de biotransformação podem, por vezes, serem mais tóxicos ou reativos que o componente original (reação de bioativação), bem como, apresentarem reatividade reduzida e excreção elevada (reação de detoxificação) (AZEVEDO e De LIMA, 2003; NEWMAN e CLEMENTS, 2008; VERMEULEN, 1996). Uma vez que nem sempre a biotransformação conduz à diminuição da atividade tóxica de um dado componente, este processo não pode ser usado como sinônimo de desintoxicação (AZEVEDO e DE LIMA, 2003).

Um aumento na taxa de depuração de contaminantes através do processo de biotransformação pode interferir no processo de bioacumulação no organismo. Quando as taxas de absorção são significativamente mais elevadas que a depuração metabólica pode ocorrer a bioacumulação, mesmo que a substância seja facilmente biodegradável (FRANKE et al., 1994). A concentração dos poluentes nos diferentes tecidos e diferenças na excreção dos metabólitos podem ser influenciadas por condições, como estado nutricional e

reprodutivo, condição e duração da exposição ao poluente, estágio de vida do animal, bem como o efeito de um poluente sobre o outro, os quais controlam a atividade das enzimas de biotransformação (FARRINGTON, 1991).

As enzimas de biotransformação de xenobióticos são inespecíficas, e o organismo reage de forma idêntica através de reações de oxidação e redução independentemente do tipo de substância (AZEVEDO e DE LIMA, 2003). As reações que ocorrem neste processo frequentemente são classificadas como reações do tipo fase I e II (HODGSON e GOLDSTEIN, 2001; NEWMAN e CLEMENTS, 2008; VAN DER OOST, 2003). As de fase I compreendem reações de oxidação, redução e hidrólise (GOEPTAR et al., 1995) e conferem maior polaridade às substâncias (aumento de hidroflicidade) por expor ou inserir grupamentos sulfidril, hidroxila, amina ou carboxila. Nesta fase normalmente são produzidos metabólitos mais reativos (pelo caráter eletrofílico, nucleofílico ou radicalar que adquirem) e, às vezes, mais hidrofílicos que o componente original. Os produtos desta fase podem ser eliminados diretamente ou submeter-se a transformações de fase II (NEWMAN e CLEMENTS, 2008).

As reações de fase II conjugam o xenobiótico ou os metabólitos da fase I com acetato, cisteína, ácido glucurônico, sulfato, glicina, glutamina ou glutatona, consistindo, basicamente, de sintases (síntese de co-fatores) e transferases. O conjugado resultante desta fase é mais hidrofílico e facilmente eliminado que o componente antes da conjugação (NEWMAN e CLEMENTS, 2008). As reações de biotransformação são referidas como microsossomais ou citosólicas, conforme a localização das enzimas atuantes. As primeiras catalisam a maioria das reações de fase I, enquanto que as outras são responsáveis principalmente pelas reações de fase II (OGA et al., 2008).

Muitos organismos aquáticos são capazes de sobreviver em ambientes que contêm altos níveis de contaminação natural ou de ação antropogênica. Isso está relacionado não apenas com os processos de biotransformação de fases I e II, que tornam o xenobiótico mais facilmente excretável pelo organismo, como também com mecanismos responsáveis por eliminar o xenobiótico ou seus metabólitos das células. Tal mecanismo é conhecido como a fase III da biotransformação (ZIMNIAK et al., 1993).

Esta terceira fase da biotransformação está relacionada principalmente à presença de glicoproteínas-P (P-gp) associadas às membranas plasmáticas. Estas bombas de efluxo requerem energia para transportar o xenobiótico ou seu metabólito para fora da célula (NEWMAN e CLEMENTS, 2008). Tal mecanismo de resistência a multixenobiótico (MXR) é similar ao mecanismo de resistência a multidrogas (MRD) primariamente observado em

linhagens de células tumorais resistentes a drogas anti-câncer, as quais evitam o acúmulo de drogas nestas células resistentes (BARD, 2000; NEWMAN e CLEMENTS, 2008).

2.3.1. Fase I – Citocromo P450

O citocromo P450 é uma hemoproteína com um átomo de ferro no seu núcleo. Atualmente são conhecidas inúmeras formas deste citocromo, variando entre si quanto à estrutura de cadeias polipeptídicas e a especificidade de ação. Estudos moleculares identificaram cerca de 267 famílias de CYP450, codificadas por mais de 5000 genes. As isoenzimas do citocromo P450 são representadas pela sigla CYP, seguida de um algarismo que indica a família, uma letra que indica a subfamília e outro algarismo que indica o gene (OGA et al., 2008).

As isoenzimas do citocromo P450 estão localizadas na membrana do retículo e são as de maior importância entre as envolvidas nos processos de metabolização de muitos xenobióticos e compostos endógenos (como esteroides e ácidos graxos) de fase I. Estas enzimas, juntamente com a NADPH citocromo P450 redutase e o citocromo b5 redutase, formam o chamado sistema oxidase de função mista (MFO) ou simplesmente P450, o qual é encontrado em diversas espécies desde bactérias até vertebrados (NEWMAN e CLEMENTS, 2008).

O fígado é o principal local de expressão do P450, mas outros tecidos também contêm níveis mais reduzidos de enzimas P450. De fato, um mesmo tecido pode apresentar mais de 30 isoformas de P450 expressas (NEBERT et al., 1991). Em peixes, a fase I é mediada principalmente pela subfamília CYP1A, a qual apresenta uma resposta mais específica e sensível que a simples quantificação do P450 (VAN DER OOST, 2003). Esta subfamília também foi observada para invertebrados como espécies de molusco *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis* e *Chamaelea gallina* (GROSVIK et al., 2006; LIVINGSTONE et al., 1997; PORTE et al., 1995; PETERS et al., 1998; SHAW et al., 2004).

Dois modelos de reação do sistema de monooxigenases, aril hidrocarbono hidroxilase (AHH) e etoxyresorufina-O-desetilase (EROD), tem sido estudados mais intensamente (ELLENTON et al., 1985; LUXON et al., 1987; PAYNE et al., 1987; SPIES et al., 1982). Ambos são catalisados pela subfamília CYP1A do citocromo P450, sendo que a EROD é mais específica para esta subfamília (EGGENS e GALGANI, 1992), sendo geralmente, reportada uma boa correlação entre níveis proteicos de CYP1A e atividade da EROD (VAN DER OOST et al., 1996).

A atividade da P450 tem sido identificada em hemócitos, brânquias, pé e gônadas de moluscos, com a maior concentração encontrada na glândula digestiva, embora esta concentração seja cerca de 10 vezes menor que a observada em fígado de mamíferos (LIVINGSTONE et al., 1989; LIVINGSTONE, 1991). A presença de CYP1A1 e CYP1A2 pode ser mensurada indiretamente através da medida de sua indução em termos de atividade enzimática da EROD (MARTIN-DIAZ et al., 2007; TORRES et al., 2002).

A produção contínua de espécies reativas de oxigênio (ERO) é um resultado inevitável da oxidação do NADPH pelo P450 microsomal tanto na ausência, pela oxidação contínua do NADPH, quanto na presença de substrato, tornando este sistema uma potencial fonte de ERO (SEVANI et al., 1990). Assim, o P450 parece contribuir significativamente com a formação de ERO nas células, mesmo sob condições onde este sistema não é induzido por xenobióticos (BONDY e NADERI, 1994; KUTHAN e ULLRICH, 1982).

A entrada de elétrons para o P450 é necessária para ativar o oxigênio e, finalmente, inserir um átomo de oxigênio na molécula do substrato (ZANGAR et al., 2004). A maioria das biotransformações oxidativas de xenobióticos, como as observadas nesta fase, resultam na formação de produtos que podem se submeter ou não à fase subsequente da biotransformação (fase II) (TEPHLY e BURCHELL, 1990).

Vários compostos químicos podem induzir o P450 através de mecanismos que incluem aumento da transcrição gênica ou ativação enzimática (PARK et al., 1996), sendo que o primeiro mecanismo envolve a ativação do fator de transcrição citossólico, o receptor nuclear aril hidrocarboneto (AhR), que normalmente é inibido por associação com a proteína de choque-térmico (HSP90) (NERBERT et al., 1993; WHITLOCK, 1993). Todavia, P450 também pode ser inibido pela atuação de xenobióticos através da competição entre ligantes pelo sítio ativo da enzima (KITTINGHAM et al., 1998).

2.3.2. Fase II - Glutathione S-transferase (GST)

Nas reações de fase II, compostos endógenos são conjugados ao contaminante ou seus metabólitos a fim de promover sua detoxificação ou acelerar sua eliminação (NEWMAN e CLEMENTS, 2008). A conjugação compreende reações de adição em que frequentemente grupos químicos polares são covalentemente adicionados ao xenobiótico ou seus metabólitos (LECH e VODICNIK, 1985). Estes grupamentos polares, adicionados por atuação das enzimas de biotransformação de fase II, são representados, por exemplo, pela GSH e ácido glucurônico (COMMANDEUR et al., 1995; MULDER et al., 1990). Alguns compostos

xenobióticos possuem grupos funcionais requeridos (tais como-NH₂, COOH, -OH) para metabolismo direto pelo sistema de enzimas de conjugação de fase II, enquanto outros são inicialmente metabolizados na fase I (GEORGE, 1994; LECH e VODICNIK, 1985; SIJM e OPPERHUIZEN, 1989).

A conjugação de compostos eletrofilicos (ou metabólitos da fase I) com a GSH é catalisada pelas glutathiona-S-transferases (GST), uma superfamília de enzimas diméricas envolvidas na detoxificação de substâncias eletrofilicas endógenas e exógenas (xenobiótico) (EDWARDS et al., 2000; HAYES e WOLF, 1988; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999 THOM et al., 2001).

Algumas das funções essenciais da GST se referem ao transporte intracelular (heme, bilirrubina e ácidos bile) e a biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas, além de um crítico papel na detoxificação de ERO nas células, protegendo os lipídios da peroxidação (EDWARDS et al., 2000; GEORGE, 1994). Estas enzimas estão localizadas principalmente na fração citossólica (SIJM e OPPERHUIZER, 1989). Em plantas, as GSTs estão envolvidas no metabolismo de herbicidas e agrotóxicos (HAYES e PULFORD, 1995), sendo chamadas de agentes protetores contra herbicidas, uma vez que protegem a planta contra a injúria de alguns herbicidas atuando, em parte, no aumento dos níveis de GSH (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). A atividade total da GST pode ser determinada através de um substrato artificial, o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), que é conjugado por praticamente todas as isoformas de GST (GEORGE, 1994; VAN DER AAR, 1996).

Fígado, ou órgãos com função semelhante, como o hepatopâncreas em crustáceos e a glândula digestiva em moluscos, apresentam altas concentrações de GST. Os conjugados resultantes da ligação com a GSH são frequentemente excretados na bile através de bombas de efluxo glutathiona-S-transferase (KAPLOWITZ et al., 1996). Estes transportadores, segundo Bard (2000), são representados pelas MRPs que também constituem o sistema de resistência a multixenobióticos em organismos aquáticos.

Dada sua participação no processo de detoxificação de xenobióticos, a atividade da GST dos organismos aquáticos tem sido utilizada como biomarcador de poluição deste ambiente (GOLDBERG, 1975; GOLDBERG e BERNITE, 2000; MOREIRO e GUILHMINO, 2005; PENNEC e PENNEC, 2003). Embora sejam mais bem descritas em vertebrados, isoformas de GST já foram isoladas e caracterizadas na brânquia e glândula digestiva do mexilhão azul *Mytilus edulis* (FITZPATRICK e SHEEHAN, 1993; FITZPATRICK et al., 1995) e da glândula digestiva do bivalve marinho *Chlamys islandica* (MYRNES e NILSEN, 2006).

Quando comparada com a fase I, a indução de respostas de enzimas de fase II são geralmente menos pronunciadas (ANDERSSON et al., 1985; GEORGE, 1984), podendo ser influenciadas por fatores de variabilidade natural, tais como sexo, estado nutritivo, sazonalidade, temperatura, maturidade. Ainda assim, mesmo pequenas alterações na atividade da fase II podem ser prejudiciais ao organismo (VAN DER OOST, 2003).

2.3.3. Fase III – Mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR)

O termo P-gp normalmente é usado para se referir a diferentes tipos de glicoproteínas-P classificadas como: classe I, transportadora de drogas; classe II, fosfolipídio lipase; spgp, transportadora de sais da bile (BARD, 2000). As P-gps são membros da superfamília ABC (ATP-binding cassette) de proteínas transmembrana, com similaridades estruturais entre si e presentes em eubactérias, eucariontes e, recentemente, descritos em Archaea (JOVELL et al., 1996; KOONIN et al., 1997; XAVIER et al., 1996). Em eucariontes, transportadores ABC funcionam para remover moléculas do citoplasma e exportá-las através da membrana celular ou através das membranas das organelas (SAURIN et al., 1999). Tais transportadores P-gp consistem em um dímero transmembrana de 1280 aminoácidos, sendo que cada metade da proteína consiste em seis regiões transmembrana, um domínio citoplasmático e um sítio de ligação do ATP (CHEN et al., 1986).

A glicoproteína-P é um eficiente transportador transmembrana dependente de ATP que atua como uma barreira ao acúmulo de xenobióticos e seus metabólitos, acelerando seu processo de remoção e evitando que o mesmo se acumule no interior da célula (ABOUDONIA et al., 2002). A ampla distribuição de genes de P-gp através dos táxons filogenéticos sugere que proteínas de resistência a multixenobióticos podem ser comum a todos os organismos e pode transportar substâncias endógenas e externas ao organismo. Tal observação sugere que em adição à sua função celular natural, a atividade das P-gp pode contribuir para a relativa resistência de algumas espécies aquáticas expostas a xenobióticos (BARD, 2000).

Entre os constituintes do grupo ABC, além das já citadas P-gps, temos as MRPs, que são proteínas de resistência a multidrogas (COLE et al., 1992). Estas, são glicoproteínas de 190 kDa com três domínios transmembrana (BARD, 2000). As MRPs são tidas como membros do sistema de metabolização de fase III (ISHIKAWA, 1992), sendo que o transporte mediado por estas proteínas pode tanto complementar quanto suplementar o efluxo P-gp, uma

vez que alguns substratos podem utilizar estes dois sistemas de transporte (LOE et al., 1998; ROBSON et al., 1998).

As glicoproteínas são expressas em muitos dos mesmos tecidos que o citocromo P450. A análise das relações da estrutura-atividade e características moleculares de transportadores de xenobióticos e substratos e inibidores do P-gp indicam que as P-gp podem funcionar na eliminação de metabólitos de xenobióticos hidroxilados após modificação por enzimas de fase I (BAIN et al., 1997). Muitos conjugados da fase II são transportados por outro transportador ABC, o do tipo MRP (BAIN 2000).

A inibição das P-gps pode resultar em uma elevada dose interna de xenobiótico que pode alterar a atividade das enzimas de detoxificação. Além disso, sua inibição tem demonstrado aprimorar os efeitos mutagênicos e carcinogênicos em esponja (*Geodia cydonium*) (KURELEC, 1992), mexilhão (*Dreissena polymorpha*) (KURELEC et al., 1998) e amêijoia (*Corbicula fluminea*) (KURELEC et al., 1996).

Assim, o termo MXR normalmente é usado para se referir às múltiplas glicoproteínas-P (P-gp) e MRPs identificadas em organismos aquáticos e associadas com a resistência a xenobióticos. Sua atividade previne o acúmulo endocelular de metabólitos, fosfolipídios e xenobióticos em animais expostos e culturas celulares. Como apresentado na Figura 1, os xenobióticos, sem prévia modificação por mecanismos de biotransformação, ou metabólitos provenientes da fase I da biotransformação e que não atravessam livremente a membrana celular, são transportados do meio intra para o extracelular através das P-gps. Já os metabólitos destas substâncias exógenas, provenientes da fase II da biotransformação, são eliminados do interior celular através dos transportadores tipo MRPs (BARD, 2000).

Proteínas imunologicamente relacionadas com as glicoproteínas-P em mamíferos têm sido identificadas em tecidos envolvidos com absorção, secreção e função de barreira em muitas espécies de moluscos aquáticos como *Corbicula fluminea* (WALDMANN et al., 1995), na brânquia de *Crassostrea gigas* e *C. virginica* (KEPLER, 1997; MINIER et al., 1993), na brânquia de *Mytilus californianus*, *M. galloprovincialis* e *M. edulis* (CORNWAL et al., 1995; GALGANI et al., 1995; KORNEK et al., 1995), dentre outras espécies. O mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) é considerado um potencial protetor de organismos aquáticos contra danos no DNA (WALDMANN et al., 1995) e durante o desenvolvimento embrionário, uma vez que inúmeros organismos vivem e se reproduzem em áreas ricas em substâncias químicas ambientalmente tóxicas que podem interferir no processo de divisão celular do embrião em crescimento (TOOMEY e EPEL, 1993). Parâmetros ambientais também podem interferir na expressão de genes das P-gp. Luedekink e Koehler (2004)

demonstraram que a expressão destes genes na glândula digestiva de *Mytilus edulis* foi inibida em baixa osmolaridade e estimulada em alta osmolaridade, bem como, a exposição dos animais ao ar também induziu aumento na expressão gênica da P-gp. Todavia, nenhuma alteração de expressão gênica foi observada para as brânquias.

As P-gp são encontradas no epitélio de tecidos especializados envolvidos em processos de secreção e excreção, sendo parte integrante do maquinário de detoxificação celular (BARD, 2000). Em bivalves o MXR tem representado uma proteção contra os efeitos deletérios causados pela exposição a compostos tóxicos orgânicos (McFADZEN et al., 2000; WALDMANN et al., 1995) e metais (ACHARD et al., 2004, ROCHA e SOUZA, 2012). Os níveis basais de atividade deste mecanismo podem aumentar, naturalmente com a idade, mesmo em animais não expostos a contaminantes (ACHAR et al., 2004). As P-gp das membranas branquiais de *Corbicula fluminea* aparentemente apresentam uma massa molecular de 135 kDa e são 20 vezes menos concentradas que na adrenal de bovinos (WALDMANN et al., 1995).

A inducibilidade de MXR por xenobióticos e sua ampla distribuição taxonômica sugere que este pode ser usado como um biomarcador de exposição a poluentes. Uma ampla variedade de químicos que não são necessariamente tóxicos, mas que são mais comuns em ambientes poluídos, pode atuar como substrato para este mecanismo. Assim, competem com os xenobióticos tóxicos, inibindo este mecanismo e interferindo no sistema de defesa do organismo (SMITAL e KURELEC, 1997). Estes inibidores da MXR podem potencializar a toxicidade de outros poluentes (WALDMANN et al., 1995).

As P-gp de moluscos bivalves aparentemente não sofrem interferência de variações na temperatura ambiente entre 4 – 20°C, para *Dreissena polymorpha* (TUTUNDJIAN e MINIER, 2007). Todavia estudos de sazonalidade têm mostrado que durante os meses mais quentes do ano, níveis de proteínas MXR se elevam em muitas espécies de bivalves como *Dreissena polymorpha* (MINIER et al., 2006), *Mytilus galloprovincialis* (MINIER et al., 2000) e *Crassostera virginica* (KEPPLER e RINGWOOD, 2001a,b), estando este fato relacionado com a elevada temperatura da água. Além disso, a síntese de tais proteínas pode ser induzida, em *Mytilus californianus*, pelas proteínas de choque térmico, quando o animal é submetido a uma variação rápida de temperatura (EUFEMIA e EPEL, 2000).

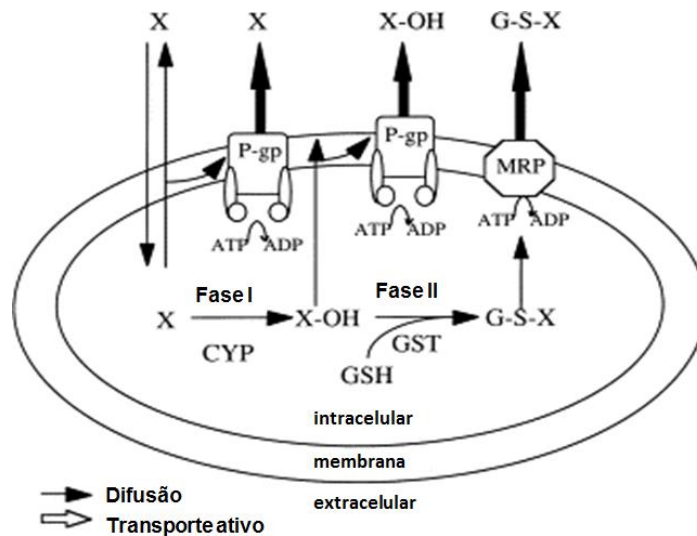


Figura 1. Modelo de resistência a xenobióticos promovido por transportadores ativos de membrana, P-gp e MRP, e as enzimas de detoxificação de fase I e II, citocromo P450 (CYP) e glutatona-S-Transferase (GST) respectivamente. Um produto natural moderadamente hidrofóbico (X) se difunde para dentro e fora da célula em baixas concentrações, sendo pouco acumulado devido a atividade de efluxo da P-gp. Em altas concentrações, o composto X se acumula e é metabolizado por uma ou mais enzimas CYP. O metabólito hidroxilado é (i) removido pelo transporte mediado pela P-gp ou (ii) modificado pela conjugação com a glutatona (GSH), catalisada pela GST. A glutatona conjugada (G-S-X) é eliminada da célula pelos transportadores ativos MRP. (Fonte: Bard, 2000)).

2.4. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Em adição a fontes naturais do organismo, como as mitocôndrias e metabolismo do P450, fontes ambientais como poluentes do ar, poluição fotoquímica, químicos industriais e radiação ionizante, bem como, metabolismo de xenobióticos, contribuem para a concentração de ERO celular (CADENAS, 1995). As ERO representam a classe mais importante de espécies de radicais geradas nos organismos. ERO é um termo que inclui tanto os radicais de oxigênio quanto as formas não radicais como o H_2O_2 (MILLER et al., 1990; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Uma vez que, nem H_2O_2 ou $O_2^{\cdot-}$ são reativos em solução aquosa, o termo “reativo” é relativo e alguns autores preferem usar o termo “espécies derivadas de oxigênio” (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Três produtos intermediários da redução do oxigênio podem ser formados: ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($\cdot OH$), pela redução de um, dois e três elétrons, respectivamente (SIE, 1993). O segundo produto é o mais

estável, podendo ser acumulado em grande quantidade na célula (BUONOCORE et al., 2010). Já o $O_2^{\cdot-}$ pode atuar tanto como um fator redutor (formação o oxigênio molecular) quanto oxidante (formação do H_2O_2) (VALKO et al., 2005). Esses oxi-radicais gerados durante a redução do oxigênio podem atacar e danificar as bases nitrogenadas do DNA ou a estrutura em hélice desta molécula (HARD et al, 1987). Somado a isso, espécies reativas de oxigênio podem oxidar lipídios ou proteínas, gerando intermediários que podem reagir com o DNA e formar adutos (ESTERBAUER et al, 1990).

2.4.1. Radical hidroxil ($\cdot OH$)

O radical hidroxil é produzido principalmente quando há um excesso de produção de ânion radical superóxido e peróxido de hidrogênio, através da reação de Haber-Weiss. Nos organismos, grande parte do $\cdot OH$ provém da quebra do H_2O_2 através da Reação de Fenton, uma catálise metal-dependente (BUONOCORE et al., 2010; CADENAS, 1995). O radical hidroxil apresenta um elevado poder oxidante que o torna um radical muito perigoso, provavelmente o mais reativo dentre todos os radicais de oxigênio, apresentando uma meia-vida in vivo muito curta, cerca de 10^{-9} segundos. Em vista disto, são eliminados no mesmo sítio de formação e normalmente reagem próximo a este com a primeira molécula que encontram (PASTOR et al., 2000).

Reações do $\cdot OH$ com moléculas biológicas, muitas das quais são não-radicais, desencadeiam uma reação em cadeia (THANNICKAL, 2009). Tais reações incluem interação com as bases purinas e pirimidinas do DNA e junção com átomos de hidrogênio de muitas moléculas biológicas, incluindo os tióis (ARUOMA et al., 1989). Além disso, este radical pode reagir rapidamente com outras moléculas como açúcares, aminoácidos, fosfolipídios e ácidos orgânicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

A identificação de oxidantes responsáveis pela produção de bases de DNA oxidadas é ainda foco de muitos estudos. Todavia, o radical hidroxil ($HO\cdot$) é um candidato certo para este dano, uma vez que esta molécula é extremamente reativa, podendo adicionar ou retirar átomos de hidrogênio da molécula produzindo muitos danos que ocorrem no genoma (WARD, 1988). Entretanto, o dano biológico mais característico do radical hidroxil é sua capacidade de estimular a reação em cadeia dos radicais livres, conhecida como peroxidação lipídica, a qual pode ser iniciada por várias espécies que sejam suficientemente reativas (ARUOMA, 1994).

É muito provável que o $\cdot OH$ desempenhe um papel na oxidação endógena do DNA, mas provavelmente não é livremente produzido em um compartimento celular e difundido

para o núcleo. Apresenta uma reatividade tão elevada que não é capaz de se difundir mais de um ou dois diâmetros moleculares sem reagir com um componente celular (PRYOR, 1986). Assim, acredita-se que o H_2O_2 sirva como um difusor, uma forma latente de $\cdot OH$ que reage com um íon metálico ao redor da molécula de DNA para gerar o oxidante (HENLE e LINN, 1987).

2.4.2. Ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$)

A reatividade do ânion radical superóxido, quando comparada com a do radical $\cdot OH$, é muito menor, apesar de bastante variável. Este radical pode ser formado em diversos locais nos organismos, como por exemplo, nos peroxissomos, pela atividade enzimática da xantina oxidase e peroxidases, oxidação de moléculas biologicamente importantes como a adrenalina e noradrenalina, do neurotransmissor dopamina e de compostos tiólicos como a cisteína. Todavia, a principal fonte de produção do $O_2^{\cdot -}$ é a cadeia de transporte de elétrons presente nas mitocôndrias (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O rápido desaparecimento deste íon em meio aquoso se deve à chamada reação de dismutação (a mesma espécie sofre reação de oxidação e redução simultaneamente), onde um $O_2^{\cdot -}$ é oxidado (O_2) e o outro é reduzido (H_2O_2). O dano biológico direto que pode ser causado por este derivado do oxigênio é altamente seletivo e frequentemente envolve a reação deste radical com outros radicais, como $NO\cdot$ ou íons de ferro (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Em meio aquoso também pode oxidar ácido ascórbico e reduzir certos complexos como o citocromo *c* (ARUOMA, 1994). O ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) reage lentamente com tióis, como a cisteína, enquanto que seu conjugado ácido HO_2^{\cdot} reage um pouco mais rápido com a GSH e outros tióis (BUXTON et al, 1988). Sua forma protonada (HO_2^{\cdot}) é mais reativa, podendo iniciar o processo de peroxidação dos ácidos graxos. Esta forma protonada pode ser encontrada em pequenas quantidades em equilíbrio com a sua forma inicial ($O_2^{\cdot -}$), mesmo em condições fisiológicas normais de pH. Esta forma é capaz de atravessar a membrana celular tão facilmente quanto o H_2O_2 .

2.4.3. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A formação do peróxido de hidrogênio ocorre espontaneamente nos peroxissomos e nas mitocôndrias (AMES et al., 1993; FRITZ et al., 2007), pela atuação de enzimas oxidases como xantina, urato e oxidases D-amino (CHANCE et al., 1979), ou por ação da superóxido

dismutase sobre o radical $O_2^{\cdot-}$ (ARUOMA, 1994; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Não é considerado um radical, uma vez que não apresenta elétrons desemparelhados, e apresenta uma reatividade química moderada (ARUOMA, 1994; CANENAS, 1995).

Esta reatividade é reforçada por duas características: I) diferentemente de seu precursor $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 pode atravessar livremente as membranas biológicas (CANENAS, 1995; ARUOMA, 1994); II) este derivado do oxigênio é exigido para a formação de oxidantes mais potentes, como o radical hidroxil e complexos oxiferril, através de reações com metais quelantes e hemeoproteínas, respectivamente (CADENAS, 1995).

Esta espécie derivada do oxigênio se mistura facilmente com a água e se difunde sem dificuldade dentro e entre as células, além de, possivelmente, utilizar proteínas inseridas na membrana (aquaporinas) para fazer esta travessia. Muitos sistemas que formam o $O_2^{\cdot-}$ também poderão produzir H_2O_2 , a menos que alguma outra molécula intercepte o radical superóxido, por exemplo, quando há uma alta concentração de citocromo *c* (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Uma vez que se trata de um fraco agente oxidante e redutor e, geralmente, pobremente reativo, não é observada sua atuação em oxidação de DNA, lipídios ou proteínas quando incubadas com este oxi-derivado, mesmo em níveis milimolar, sendo tóxico para muitas células apenas em níveis de 10-100 μM (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Sua atuação parece estar relacionada com a inativação direta de algumas enzimas através, geralmente, da oxidação do grupo tiol (-SH) do sítio ativo.

O peróxido de hidrogênio presente na matriz celular, produzido por atuação dos peroxissomos, é removido através das catalases. Monoxigenases do retículo endoplasmático, como o citocromo P450, contribuem para o aumento celular de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$. Estes promovem a lipoperoxidação, alteram a homeostase de cálcio, promovem disfunção mitocondrial e morte celular (CARO e CEDERBAUM, 2006; ZANGAR et al., 2004).

Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação das ERO, particularmente pelo $\cdot OH$. A atuação destas ERO sobre as proteínas pode promover modificações de aminoácidos, oxidação de grupos sulfidril (promove mudanças de conformação), alteração de atividade enzimática, clivagem de ligações peptídicas, bem como, modificações em glicoproteínas, perda de metal em metaloproteínas e aumento da susceptibilidade proteolítica (STADTMAN, 1992; SIES, 1993). Somado a isso, ERO também podem atacar DNA, causando ruptura dos filamentos e modificação de bases (mutações pontuais) (SIES, 1993).

Ácidos graxos poli-insaturados também sofrem a ação destes derivados de oxigênio, com consequente formação de um radical lipídico com um carbono no centro da molécula, o

qual reage com o oxigênio para formar o radical peroxil (hidroperóxido lipídico). Este pode retirar um átomo de hidrogênio da cadeia de ácidos graxos insaturados, iniciando uma cadeia de reações que convertem muitos lipídios da membrana em hidroxiperóxidos de lipídios. A presença destes na membrana corrompe sua função por alterar sua fluidez permitindo que íons de Ca^{+2} passem através da membrana. Como consequência, temos a ativação de fosfolipases e eventual ruptura da membrana (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1992). O radical $\bullet\text{OH}$ também pode atacar proteínas de membrana, quebrando-as em uma série de produtos de baixo peso molecular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

De uma maneira geral, pode-se afirmar que as maiores consequências da produção de ERO nos sistemas biológicos são a peroxidação lipídica, a degradação proteica, a inativação enzimática e danos no DNA (LIVINGSTONE, 1993; WINSTON e DI GIULIO, 1991). Certos invertebrados podem ser mais susceptíveis aos efeitos deletérios de contaminantes ambientais, uma vez que são propensos a acumular xenobióticos, os quais podem aumentar a produção de ERO. O potencial para produção de ERO por moluscos parece ser particularmente elevado, especialmente na glândula digestiva, que acumula muitos xenobióticos orgânicos (SMITH et al., 1985).

2.5. Defesas Antioxidantes

Como visto anteriormente, o oxigênio pode se tornar uma molécula extremamente tóxica. Organismos aeróbicos somente são capazes de sobreviver na presença do oxigênio, e seu potencial reativo, graças à presença de defesas antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Estes mecanismos de proteção do organismo podem ser classificados em sistema de defesa primário e secundário (DAVIES, 1986). Os primários compreendem os componentes antioxidantes, tais como α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno, ácido úrico, juntamente com uma variedade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Já as defesas secundárias incluem enzimas proteolíticas e lipolíticas, bem como sistema de reparação do DNA. (CADENAS, 1995).

Quando os mecanismos que evitam a formação das ERO não são suficientes e as ERO são formadas, as defesas do organismo que entram em ação (ARUOMA, 1993; BALLA et al., 1992; FRIDOVICK, 1989; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989, HALLIWELL, 1990; SIES, 1985). Estas podem atuar diretamente na neutralização dos radicais livres, inibir a

produção destes, bem como aumentar o nível das defesas antioxidantes endógenas, atuando, por exemplo, sobre a expressão dos genes que codificam agentes antioxidantes (ARUOMA, 1994).

2.5.1. Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) acelera o processo de dismutação do $O_2^{\cdot-}$, convertendo-o a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (ARUOMA, 1994; McCORD e FRIDOVICH, 1969). Por estar presente em todos os organismos aeróbios (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999), a SOD desempenha um importante papel antioxidante ao catalisar a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) via conversão do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), sendo de essencial importância na defesa do organismo contra esse tipo de radical (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Embora a atividade da SOD esteja relacionada com a presença de oxigênio, característica inerente aos organismos aeróbicos, esta enzima pode ser encontrada, mesmo que em baixas concentrações, em organismos anaeróbios. Isso porque tais organismos apresentam um espectro de tolerância ao oxigênio (MARQUIS, 1995) estando, por vezes, expostos ao oxigênio. Nestas situações, a proteção da SOD se faz necessária para a sobrevivência do mesmo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A SOD é uma família de metaloenzimas que se apresenta em três isoformas: CuZnSOD, MnSOD e FeSOD. A primeira está presente em todas as células eucarióticas, sendo que a maioria se localiza no citossol, mas algumas podem estar presentes nos lisossomos, núcleo e espaço intermembranoso mitocondrial, sendo menos frequente em células procariontes (MARQUIS, 1995). Todas as enzimas desta isoforma catalisam a mesma reação de aceleração do processo de dismutação do $O_2^{\cdot-}$. A segunda isoforma desta enzima apresenta um átomo de manganês no seu sítio ativo e atua catalisando essencialmente a mesma reação que a CuZnSOD (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Trata-se de uma enzima amplamente distribuída em plantas, bactérias e animais, sendo que nestes se localiza principalmente na mitocôndria (FRIDOVICH, 1995). A última isoforma de superóxido dismutase (FeSOD), não é encontrada em tecido animal, apresenta um íon de ferro em seu sítio ativo e apresenta sua atividade inibida em valores elevados de pH (comparados com pH 7). Sua taxa de reação com $O_2^{\cdot-}$ é ligeiramente menor que os outros tipos de SOD (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Tanto a CuZnSOD quanto FeSOD são inativadas pela exposição prolongada ao H_2O_2 , enquanto que MnSOD não é (UCHIDA e KAWAKISHI,

1994). O balanço quantitativo entre as isoformas varia de acordo com o tecido, espécie de organismo, bem como com a quantidade de metal disponível (SHATZMAN e KOSMAN, 1979; DE ROSA et al., 1980).

2.5.2. Catalase (CAT)

O peróxido de hidrogênio geralmente é removido dos organismos aeróbicos através da ação de duas enzimas: a catalase, que catalisa diretamente a decomposição do H_2O_2 a O_2 e água é mais efetiva em controlar o estresse oxidativo quando as concentrações intracelulares de H_2O_2 são muito elevadas e a glutathiona peroxidase (GPx), uma enzima que remove H_2O_2 através da oxidação de outro substrato (GSH, por exemplo) . Esta enzima parece atuar mais sensivelmente quando há um pequeno aumento na concentração do peróxido (HERMES-LIMA, 2004).

O mecanismo de reação da CAT é essencialmente uma dismutação, na qual um oxigênio do H_2O_2 é reduzido a H_2O e o outro é oxidado a O_2 , sendo muito difícil promover a saturação da enzima com peróxido de hidrogênio, dado sua alta velocidade de conversão deste derivado de oxigênio (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). A maioria das células aeróbicas possui atividade catalítica desta enzima (CHANCE et al, 1979), embora poucas não a apresentem, como em algumas bactérias e algas verdes. Nos animais está presente em todos os principais órgãos do corpo, mas especialmente no fígado, sendo constituída por quatro subunidades proteicas, cada uma das quais contém um grupo férrico-heme em seu sítio ativo (REID et al., 1981). A atividade desta enzima em tecidos de plantas e animais é em grande parte, ou completamente, localizada nos peroxissomos (CHANCE et al., 1979). Mitocôndrias, cloroplastos e retículo endoplasmático apresentam pouca, ou até mesmo nenhuma, catalase.

2.5.3. Glutathiona peroxidase (GPx)

A enzimas glutathiona peroxidase (GPx) removem o H_2O_2 através da redução deste derivado de oxigênio a H_2O , com a conseqüente oxidação de uma glutathiona reduzida (GSH) (CHANCE et al., 1979). Este antioxidante foi descrito em tecido animal em 1957, sendo que normalmente não são encontradas em bactérias e plantas superiores, embora tenham sido reportadas em algumas algas e fungos. É amplamente distribuído nos tecidos animais e

apresenta especificidade para a GSH como doadora de hidrogênio, podendo, todavia, atuar em outros peróxidos além do H_2O_2 (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Esta enzima antioxidante compreende quatro subunidades proteicas, cada uma contendo um átomo de selênio no seu sítio ativo sob a forma de selenocisteína (MAIORINO et al., 1995). Deste fato reside a necessidade de ingestão de selênio como cofator para a família das glutations peroxidases, as quais se apresentam, pelo menos, sob quatro formas. Destas merece destaque as glutations clássicas (GPx), uma glicoproteína tetrâmera, e a fosfolípido hidroperóxido glutaciona peroxidase (PHGPx), que consiste em uma proteína monomérica que pode reduzir ácidos graxos esterificados e hidroperóxidos colesterol (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Estudos com supressão de selênio na dieta de ratos, mostrou uma redução muito mais rápida na quantidade de GPx do que PHGPx, sugerindo que a manutenção da atividade da segunda forma enzimática é mais importante do que a GPx, pelo menos no que se refere a estes organismos (JOTTI et al., 1994).

2.5.4. Glutations

A glutaciona, descrita em 1920 por Hunter e Eagles (SOMINI et al., 2002), atua como agente redox central em muitos organismos aeróbicos. Sua forma reduzida (GSH) é utilizada, em condições fisiológicas, na conversão de diversos compostos eletrofilicos. Tais reações são aceleradas por enzimas dependentes de glutaciona (DE PONTES, 2012). A GSH é um tripeptídeo tiol de molécula de baixo peso molecular presente em animais, plantas e muitas bactérias aeróbicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). As glutacionas são encontradas no núcleo e citoplasma, principalmente sob a forma reduzida (GSH) que corresponde a mais de 90% das glutacionas em condições normais. É sintetizada por duas ações sequenciais ATP-dependentes da γ -glutamilcisteína sintetase e glutaciona sintase (TSUJI, 2008).

Além do seu papel como cofator de inúmeras rotas enzimáticas, a glutaciona reduzida (GSH) está envolvida em muitos outros processos metabólicos, incluindo metabolismo do ácido ascórbico e manutenção de comunicação entre as células (BARHOUMI et al., 1993; GILLILAND, 1993). Nas células, GSH auxilia na manutenção do ambiente redutor intracelular, protegendo, assim, grupos tiol da oxidação. Assim, exerce papel central em processos de biotransformação e eliminação de xenobióticos, bem como, como defensor das células quando instaurada uma situação de estresse oxidativo (GILLILAND, 1993). É o tiol celular mais abundante encontrado em todos os organismos aeróbicos, estando em altas concentrações dentro das células (JOSEPH et al., 1997). Muitas das reações das quais a GSH

participa envolvem seu grupo sulfidril (SH) que é altamente polarizável. É considerado um bom redutor, uma vez que apresenta alta habilidade em doar elétrons a outros compostos (SIE, 1993).

2.5.5. Glutationa redutase (GR)

A taxa de formação da glutatona oxidada (GSSG) em células normais é elevada. Assim, deve haver um mecanismo para reduzir a GSSG à sua forma reduzida (GSH). Tal tarefa é desenvolvida pela glutatona redutase (GR). Esta é uma flavoenzima da família das oxiredutases (KRAUTH-SIEGEL et al., 2001) formada por duas subunidades, cada uma das quais, contendo um sítio com FAD (dinucleotídeo de flavina e adenina), derivado nucleotídico da riboflavina que atua como cofator enzimático (SCHULTZ, 1980).

É encontrada em bactérias, fungos, plantas e animais e desempenha um papel fundamental na manutenção dos níveis intracelulares de GSH, bem como, um meio intracelular redutor devido a manutenção de elevados níveis de GSH e baixos níveis de GSSG (GILLILAND, 1993). É considerada extremamente conservada no curso da evolução, tanto no que se refere a suas isoformas, quanto os sítios de ligação ao substrato e até mesmo a sequência de aminoácidos (DE PONTE, 2012).

2.6. Estresse Oxidativo

Nos organismos existe um balanço entre os produtos pró-oxidantes e as defesas antioxidantes, embora danos oxidativos, particularmente em moléculas biológicas como DNA, lipídios e proteínas, estão frequentemente presentes. Todavia, um aumento na produção de ERO pode superar as defesas antioxidantes, resultando em um aumento dos danos oxidativos a macromoléculas, alterando processos celulares críticos. Quando o balanço entre a formação e a remoção das ERO é perturbado, resultando em um acúmulo de biomoléculas oxidativas e potencialmente capazes de promover danos estresse oxidativo, ocorre o chamado estresse oxidativo (IMLAY, 2003).

Qualquer processo que leve a formação de ERO, seja direta ou indiretamente, pode resultar em estresse oxidativo e dano biológico, o qual pode ser distribuído longe do ponto de origem por diferentes ERO e outros produtos oxidativos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). A produção de ERO estimulada pela presença de contaminante no meio e a instauração

do estresse oxidativo têm sido indicadas como um mecanismo de toxicidade em organismos aquáticos expostos a poluição (DI GIULIO et al., 1995).

Uma variedade de contaminantes atinge o ambiente aquático diariamente e são absorvidos pelos organismos a partir do sedimento, coluna d'água e alimento (VAN VELP, 1990; WALKER e LIVINGSTONE, 1992). Os contaminantes incluem muitos compostos químicos que têm se mostrado pró-oxidantes em sistemas vivos. Muitos estudos foram desenvolvidos em organismos aquáticos e mostram a interferência de poluentes na produção de ERO, nas defesas antioxidantes e danos oxidativos. (DI GIULIO et al., 1989; DI GIULIO et al., 1995; KELLY et al., 1998; LEMAIRE e LIVINGSTONE, 1993; LIVINGSTONE et al., 1994; LIVINGSTONE, 2001; WINSTON e DI GIULIO, 1992).

2.6.1. Peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica, um dos processos resultantes da instauração do estresse oxidativo no organismo, pode ser iniciada por várias espécies que sejam suficientemente reativas (ARUOMA, 1994). Normalmente, ocorre quando o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) é gerado próximo a membranas e age sobre as cadeias de ácidos graxos da bicamada de fosfolipídios. A ação é feita, preferencialmente, aos ácidos graxos poli-insaturados, tais como o ácido aracdônico e o linoléico.

No processo lipoperoxidativo o radical hidroxil separa um átomo de hidrogênio de um dos átomos de carbono na cadeia lateral e se combina com ele a fim de formar água. Esta reação remove o $\cdot\text{OH}$, mas deixa para trás um radical carbono-centrado ($-\text{C}\cdot$) na membrana. Este radical de carbono formado da cadeia lateral do ácido graxo poliinsaturado passa por um rearranjo molecular para formar estruturas dieno conjugadas que podem ter vários destinos. Reações com as proteínas da membrana também podem ocorrer, entretanto sob condições fisiológicas, o destino mais provável do radical carbono centrado é combinar com o oxigênio, criando outro radical, o radical peroxil ou peroxilradical (ESTERBAUER et al., 1988).

Radicais peroxil são suficientemente reativos para atacar ácidos graxos adjacentes da cadeia lateral, separando o hidrogênio. Outro radical carbono-centrado é formado e as reações em cadeia continuam. Um $\cdot\text{OH}$ pode resultar na conversão de centenas de ácidos graxos da cadeia lateral em lipídios hidroperóxidos. O acúmulo destes lipídios na membrana perturba a sua função e pode causar seu colapso. Além do que, pode decompor a membrana e produzir uma gama de produtos altamente citotóxicos como, por exemplo, o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonal (ESTERBAUER et al., 1988).

2.6.2. Danos no DNA

Como visto anteriormente, caso as ERO não sejam devidamente neutralizadas pelas defesas antioxidantes do organismo, além da lipoperoxidação, estas podem agir no material genético do organismo, promovendo danos no DNA. Além disso, muitas substâncias químicas apresentam propriedades físicas e químicas que as tornam capazes de interagir com os ácidos nucleicos da molécula de DNA, sendo potencialmente tóxicas ao material genético. Estas substâncias que produzem alterações no DNA, podendo interferir nas características hereditárias, através de mutações, e na integridade da molécula, são chamadas de agentes genotóxicos (SHUGART, 1995).

A interação do xenobiótico ou seus metabólitos com o DNA se manifesta primeiramente através de alterações estruturais na molécula de DNA (SHUGART, 1995). O material genético pode ser modificado pelo contaminante ou por seus metabólitos, bem como por compostos endógenos do metabolismo celular (AMES, 1989). Normalmente tais substâncias são radicais livres ou substâncias que facilitam a produção destes, que se ligam às bases nitrogenadas do DNA. Esses podem romper uma ou ambas as hélices da dupla fita, bem como, oxidar as bases da molécula de DNA. As alterações no material genético também ocorrem através da formação de ligações covalentes do contaminante ou seu metabólito nesta molécula, formando os chamados adutos (NEWMAN e CLEMENTS, 2008; PAOLIELLO e DA SILVA, 2003).

Embora a variação genética seja essencial para a evolução, a estabilidade genética é necessária à sobrevivência do organismo. Assim, muitas das alterações que ocorrem no material genético são reparadas pelo próprio organismo ou a célula é eliminada (ALBERTS et al., 2004; ESTERBAUER et al., 1990; NEWMAN e CLEMENTS, 2008). Caso isso não ocorra, a célula passa por um processo de mutação, podendo transferir e perpetuar tais alterações nas células filhas durante a replicação do material genético (PAOLIELLO e DA SILVA, 2003; SHUGART, 1995). A célula necessita de um mecanismo muito preciso de replicação, mas também de um capaz de reparar as inúmeras alterações, acidentais ou não, que ocorrem na célula por atuação do calor, radiação, metabólitos ou xenobióticos. Aos inúmeros processos envolvidos na correção destas alterações se dá o nome de reparo do DNA, o qual garante que apenas uma pequena quantidade de células acumule as alterações como mutação (ALBERTS et al., 2004).

Visando detectar possíveis danos genotóxicos em organismo, como moluscos, estudos toxicológicos, normalmente, se baseiam em células da hemolinfa dos animais. Isso porque

estas são células nucleadas, de fácil acesso e já isoladas. Entretanto, células do sistema circulatório são menos sensíveis ao ensaio do cometa que células da glândula digestiva e da brânquia (ÇAVAS e KÖNES, 2007; HARTL et al., 2004; HUANG et al., 2009; KIM e HYUN, 2006; LEMIERE et al., 2005; SIU et al., 2004). Isso se deve, provavelmente, pelo fato de as células do tecido branquial estarem em contato direto com o contaminante presente no meio, representando um importante tecido de absorção. Já no caso da glândula digestiva, assim como o fígado dos vertebrados, é conhecida por biotransformar e acumular poluentes (SIU et al., 2004). A hemolinfa é considerada um tecido tamponado e fica alocada no interior de seios e pequenos vasos, sendo atingida pelo contaminante após atravessar uma série de barreiras biológicas. Além disso, hemócitos maduros apresentam uma baixa capacidade metabólica, a qual atua minimizando tanto a acumulação do contaminante quanto a ocorrência de danos no DNA (SIU et al., 2004)

A detecção de quebras no material genético pode ser uma ferramenta muito útil quando se trata do biomonitoramento dos efeitos subletais de poluentes no ambiente aquático. Para isso existem testes como o ensaio do cometa ou “Single cell gel electrophoresis” (SCGE), o qual é utilizado não para detecção de mutações, mas sim lesões gênicas passíveis de reparo, como quebras do DNA (CONTIJO e TICE, 2003). Tal ensaio tem se mostrado altamente adequado para estudos genotóxicos de monitoramento ambiental devido sua simplicidade e alta sensibilidade (CAVALCANTE et al., 2008; FRENZILLI, 2009; KIM e HYUN, 2006).

Outros ensaios como o do micronúcleo também são capazes de detectar danos ao DNA. Todavia, estudos demonstraram que existe uma diferença de sensibilidade entre os testes do cometa e do micronúcleo (MASUDA et al., 2004), sendo que o teste do cometa se mostrou mais sensível no que se refere à capacidade de detectar diferença entre concentrações variadas de contaminantes (ÇAVAS e KÖNES, 2007).

2.7. Agrotóxicos

A agricultura se faz presente desde os primórdios da humanidade e é uma das principais bases da economia brasileira (IBAMA, 2010). A produção de agrotóxicos no Brasil se iniciou em meados dos anos 40, e nos anos 70 se deu a formação do primeiro parque industrial brasileiro de agrotóxicos. Neste novo cenário, a agricultura brasileira, bem como o consumo de agrotóxicos, iniciou um processo de crescimento contínuo, o que levou o Brasil a ocupar, de 1975 a 2007, lugar entre os seis países com maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo (TERRA e PELAEZ, 2009).

A atividade agrícola é prejudicada por um grande número de pragas, as quais são responsáveis por cerca de 40% dos danos à produção vegetal. Dentre as chamadas medidas de manejo integrado (MIP), o uso de agrotóxicos, como herbicidas, fungicidas, inseticidas, dentre outros, é a principal ferramenta utilizada no combate a essas adversidades (SINDAG, 2011; SILVA e COSTA, 2012). Assim, a utilização de agrotóxicos se tornou parte fundamental do atual modelo agrícola, o qual visa elevados índices de produtividade em vista da demanda cada vez maior de alimentos. Este aumento da produtividade sem a necessidade de um idêntico aumento na extensão das áreas de plantio pode ser alcançada, dentre outras alternativas, através do uso de agrotóxicos (CALDAS e SOUZA, 2000).

De acordo com a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, os agrotóxicos são definidos como os produtos e agentes de processos, físicos, químicos ou biológicos, destinados ao setor de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas. Também é destinado ao uso em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989). Já segundo Naidin (1985) agrotóxico pode ser definido como qualquer produto químico que represente determinado efeito, seja de atração, repulsão, prevenção ou eliminação, sobre organismos biológicos considerados nocivos à agricultura.

Os agrotóxicos são popularmente conhecidos como defensivos agrícolas ou pesticidas e visam, de um modo geral, controlar seres vivos considerados indesejáveis em função da conservação de outros seres vivos, produtos e do próprio meio ambiente. No Brasil, um dos maiores produtores de alimentos mundiais, mais de 90% dos produtores dependem do uso de agrotóxicos (IBGE, 2006), sendo que, somente no ano de 2008 mais de 673 toneladas de agrotóxicos foram aplicadas em lavouras, garantindo ao Brasil o posto de maior consumidor mundial de agrotóxicos (ANDEF, 2009).

A base da regulação de agrotóxicos no Brasil foi definida pela Lei Federal nº7.802, promulgada em 1989 (BRASIL, 1989), e em seguida pelos Atos 4074/2002 (BRASIL, 2002) e 5981/2006 (BRASIL, 2006), os quais regulam todos os aspectos que estão relacionados aos agrotóxicos como registro, uso, produção, armazenamento, transporte e distribuição. O registro de um agrotóxico envolve diferentes órgãos governamentais como Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério do Meio Ambiente, que avalia o impacto de seu uso na saúde de espécies não-humanas e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

A ação que se espera de um agrotóxico se deve à presença do chamado ingrediente ou princípio ativo, o qual consiste em uma molécula química tóxica que interfere na atividade biológica normal dos seres vivos que são sensíveis a ela. Para a formulação de um agrotóxico faz-se necessário um composto químico, dito produto técnico, com determinada quantidade deste ingrediente ativo. Este produto técnico deve se apresentar adequado a uma determinada finalidade e, juntamente com os chamados produtos intermediários, formar o produto final, também chamado de produto formulado, que corresponde ao próprio agrotóxico (NAIDIN, 1985), o qual é classificado, de acordo com seu alvo de atuação, em herbicidas, inseticidas, fungicidas, adjuvantes, acaricidas (IBAMA, 2010).

Somente no ano de 2009, foram comercializados 725 mil toneladas de produtos formulados, dos quais 429.693 toneladas (59%) são representadas pelos herbicidas, a principal classe de agrotóxicos. No Brasil, este mercado é tão intenso que, em 2009, representou uma movimentação de aproximadamente US\$ 6,6 bilhões, cerca de 12,9 bilhões de reais, dos quais os herbicidas foram responsáveis pela movimentação de 38% deste valor (US\$ 2,5 bilhões) (SINDAG, 2011).

Apesar da inovação tecnológica ter possibilitado a redução na toxicidade aguda dos agrotóxicos, além do desenvolvimento de novos mecanismos de ação que acabam por provocar menores impactos ao meio ambiente, em comparação com os agrotóxicos lançados na década de 60, ainda são inúmeros os impactos e problemas causados por estas substâncias químicas ao meio ambiente. Isso porque, além do intenso crescimento da agricultura, o preço destes produtos vem caindo a cada dia, facilitando sua aquisição e conseqüentemente seu uso indiscriminado e intenso (SINDAG, 2011).

A Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental, que é conduzida pelo IBAMA, se baseia nas propriedades físicas e químicas, na toxicidade, no seu poder de acumulação em tecidos vivos, na persistência e mobilidade no ambiente. Esta avaliação classifica os agrotóxicos, quanto ao potencial de periculosidade ambiental, em defensivos de classe I (produto altamente perigoso), classe II (produto muito perigoso), classe III (produto perigoso) e classe IV (produto pouco perigoso). Todos os agrotóxicos registrados se enquadram em uma destas classes. Quanto menor a classe maior o seu potencial em causar danos ambientais (IBAMA, 2010).

Estima-se que 99,9% da quantidade de agrotóxicos utilizados nas plantações não atingem alvos específicos, deixando grande parte do volume utilizado livre para se deslocar em diferentes compartimentos ambientais, como o solo e águas superficiais e subterrâneas (BELLUCK et al., 1991). Os agrotóxicos que atingem o solo ou a planta começam a

desaparecer por degradação ou dispersão, podendo volatilizar para o ar, serem absorvidos pelas plantas ou organismos do solo, sofrer lixiviação e escoamento para as águas superficiais e subterrâneas ou permanecer no solo (HAYO e WERF, 1996). Neste cenário, tais substâncias podem atingir o ambiente aquático através de fontes pontuais como estações de tratamento de esgoto, transbordamento deste e más práticas de manejo do agricultor, ou através de fontes difusas como escoamento superficial, lixiviação, drenagem do solo, deposição atmosférica (através da volatilização), deposição eólica de partículas de agrotóxicos e fluxo de água subterrânea, sendo que a primeira parece ser a principal fonte de contaminação aquática (BACH et al., 2001).

Tanto o agrotóxico em solução quanto o adsorvido nas partículas do solo pode ser transportados durante o processo de escoamento. Para agrotóxicos muito solúveis em água, a perda via escoamento superficial é considerada mais importante que as demais vias, como a erosão (LEONARD, 1990). Quando o agrotóxico entra no ambiente aquático, ele está exposto a diferentes processos físicos, químicos e microbianos, como volatilização, sedimentação, fotólise, resuspensão, sorção/desorção, biodegradação, bioacumulação e biotransformação (HOLVOET et al., 2007)

Os organismos que se encontram no ambiente aquático contaminado podem absorver os agrotóxicos através da ingestão de alimento e água, respiração e através do contato com a pele ou exoesqueleto. O contaminante que atravessa as várias barreiras do corpo atinge os tecidos e sofre metabolização ou é acumulado no organismo (HAYO e WERF, 1990). Se a taxa de excreção ou metabolização do pesticida for baixa, se os mesmos forem solúveis em gordura ou se adsorverem fortemente em outros componentes do organismo, a concentração final no organismo será maior que as concentrações encontradas no meio às quais o animal está exposto (MADHUN e FREED, 1990).

A exposição a agrotóxicos pode induzir o estresse oxidativo através do aumento da produção de radicais livres e consequente acúmulo destes nas células, por alterar os mecanismos de defesa antioxidante, incluindo enzimas de detoxificação e neutralização, ou por aumentar a peroxidação lipídica como um resultado da interação das ERO com membranas celulares ou subcelulares (ABDOLLAHI et al., 2004). O estresse oxidativo tem sido relacionado com a toxicidade de vários agrotóxicos, incluindo organofosforados (POSSAMAI et al., 2007), organoclorados (PAL et al., 2009) e triazinas (SINGH et al., 2010). Neste panorama, Ahmad et al. (2010) reportaram que genes de resposta tóxica, como os do citocromo P450 e da glutatona S-transferase (GST) desempenham um papel crítico na toxicidade induzida por agrotóxicos.

Os herbicidas são substâncias químicas que evitam, reduzem ou eliminam plantas infestantes (ervas daninhas), apresentando elevada importância para a obtenção de altos rendimentos da lavoura (EMBRAPA, 2003). Dentre as diferentes classes de herbicidas comercializadas no Brasil, segundo dados do ano de 2009 declarados pelas empresas registradas no Sistema de Relatórios Semestrais de Comercialização de Agrotóxicos do IBAMA, os herbicidas ocupam o primeiro lugar entre os produtos comercializados, totalizando cerca de 130 mil toneladas, distribuídos principalmente na classe III (IBAMA, 2010). O estado do Paraná, em especial, ocupava o 4º lugar entre os dez estados que mais comercializam agrotóxicos no Brasil, passando, atualmente, a ocupar o 3º lugar (IBAMA, 2010).

Dentre os dez ingredientes ativos comercializados no Brasil, o glifosato e seus sais e a atrazina, ocupam o primeiro e o sétimo lugar no ranking, respectivamente. A resolução CONAMA nº 357 (2005) estabelece como limite máximo permitido de atrazina e glifosato, para águas doce de classe 1 e 2, os valores de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $65 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. No que diz respeito à atrazina, tais limites se mantêm para as demais classes de água. Já para o glifosato, seu limite máximo para águas de classe 3 e 4 é de $280 \mu\text{g.L}^{-1}$ (CONAMA, 2005).

2.7.1. Atrazina

A atrazina é um herbicida pertencente ao grupo químico das triazinas (MAPA, 2010). Enquadra-se dentre os herbicidas mais utilizados no Brasil e no mundo, principalmente em culturas de soja, milho e cana-de-açúcar (COX, 2001; SEAB, 2011), as quais representam 48%, 11% e 8% das culturas agrícolas desenvolvidas no Brasil (SINDAG, 2011). Além disso, este herbicida pode também controlar plantas invasoras em culturas de sorgo, pinus, abacaxi e arroz, tanto em período pré-emergente quanto pós-emergente, interferindo no funcionamento normal da fotossíntese (CHAPMAN e STRANGER, 1992). É altamente persistente, altamente tóxico para aves e abelhas e muito tóxico para organismos aquáticos, apresentando produtos técnicos que se enquadram na classe ambiental II (IBAMA, 2010).

Este agrotóxico é mais efetivo em solos úmidos, sendo geralmente aplicada depois de períodos chuvosos. Tal fato é, portanto, propício para a lixiviação do solo e escoamento superficial, particularmente se eventos de chuva ocorrerem logo após a aplicação do herbicida (GRAYMORE et al., 2001). Assim, atrazina é mais de 20 vezes mais frequentemente detectada em águas subterrâneas nos Estados Unidos que qualquer outro herbicida (BELLUCK et al., 1991)

No “ranking” dos dez ingredientes ativos mais comercializados no Brasil, a atrazina ocupa o sétimo lugar, e o estado do Paraná foi o 2º maior consumidor de produtos à base de atrazina para o ano de 2009, perdendo apenas para o estado do Mato Grosso (IBAMA, 2010). A atrazina é sólida como ingrediente ativo (MEISTER, 1981), sendo normalmente aplicado em período pré-emergencial através da pulverização, embora aplicações pós-emergenciais e antes da plantação sejam, por vezes, usadas (EPA, 1994). Apresenta baixa taxa de volatilização, solubilidade moderada e considerável movimento para a água sob o estado adsorvido ao solo, durante processos de irrigação e chuva. Assim, não se adsorve fortemente aos sedimentos (HOWARD, 1991).

O destino da atrazina no ambiente aquático é influenciado pelo anel s-triazina, que torna este herbicida resistente ao ataque microbiano. Assim, a biodegradação pode ser menos importante que a degradação química no ambiente. Esta, representada pela fotólise e hidrólise, é também relativamente baixa, o que auxilia no prolongamento de sua presença na água (HOWARD, 1991). A meia-vida deste herbicida tem sido reportada ser de 244 dias a 25°, pH 4 (LI e FELDBECK, 1972) e de 742 dias, em pH 7 (KHAN, 1978).

No Brasil a atrazina já foi detectada em concentrações acima do limite máximo permitido pelo CONAMA ($2 \mu\text{g.L}^{-1}$), em amostras de água coletadas no aquífero Serra Grande, em Tianguá, estado do Ceará (ARRAES et al., 2008). Assim sendo, de uma maneira geral, pode-se afirmar que o herbicida em questão apresenta características que o posicionam como um potencial contaminante aquático, como hidrólise lenta, baixa solubilidade em água, fácil movimentação e escoamento no solo e capacidade de adsorção em matéria orgânica e tecidos gordurosos (EISLER, 1989).

Em plantas a exposição à atrazina parece estimular a produção ou atividade de enzimas responsável pela detoxificação, como a GST (JACHETTA e RADOSEVICH, 1981). Os organismos aquáticos, que ficam expostos por períodos de tempo mais longos que as plantas pulverizadas com o herbicida, podem ser afetados direta ou indiretamente (através de efeitos nas fontes de alimento e mudanças físicas no habitat) pela atrazina (SOLOMON et al., 1996).

A resposta dos organismos à exposição ao químico depende do mecanismo de ação e a interação entre duração e intensidade da exposição (GIESY e GRANEY, 1989). Em plantas este herbicida entra no organismo primariamente através da raiz e folhas de plantas enraizadas (HULL, 1970). Atua inibindo a fotossíntese através do bloqueio do transporte de elétrons no fotossistema II (FORNEY e DAVIS, 1981; HOLLHOUSE, 1981), sendo que o efeito da atrazina só se dá na presença de luz (SOLOMON et al., 1996). Este bloqueio leva à destruição

da clorofila, inibição da síntese de carboidratos, uma redução no depósito de carbono a um acúmulo de CO₂ dentro da célula (SHABANA, 1987). Uma vez que este sistema só é encontrado em plantas, a atrazina é muito mais tóxica para as plantas que para os animais (SOLOMON et al., 1996)

Dados toxicológicos indicam que os primeiros estágios de vida (gloquídia - larva e juvenil) de mexilhões de água doce estão entre os mais sensíveis a contaminantes como amônia (AUGSPURGUER et al., 2007) e alguns agrotóxicos (CONNERS e BLACK, 2004). Todavia, estes estágios iniciais de vida de mexilhões podem ser menos sensíveis a alguns agrotóxicos quando comparados com outros invertebrados como anfípodos, quironomídeos e cladóceros (CONNERS e BLACK, 2004).

2.7.2. Roundup[®]

O Roundup[®] é um herbicida de amplo espectro de atuação, agindo em todos os tipos de plantas. É também o mais frequentemente aplicado na agricultura em todo o mundo (HULTBERG, 2007) e em ambientes aquáticos para o controle de macrófitas (ABDULLAH et al., 1995; TSUI e CHU, 2003), o que favorece sua concentração neste ambiente (GIESY et al., 2000). Há uma série de formulações de herbicidas a base de glifosato, constituídos por um ingrediente ativo (normalmente o sal isopropilamina de glifosato) e um surfactante (representado principalmente pelo POEA), que facilita a penetração do herbicida pela cutícula da planta-alvo, e água. O Roundup[®] é uma das formulações mais comuns do glifosato, consistindo de um sal amino- isopropil e um surfactante amino polioxietileno (POEA). É aplicado nas culturas no período pós-emergencial (SEAB, 2012), apresenta alta solubilidade (15,7 mg.L⁻¹) e meia-vida na água de 7 até 70 dias. Tais características tornam o Roundup[®] um potencial contaminante do ambiente aquático (GIESY et al., 2000).

O glifosato é o ingrediente ativo com ação herbicida mais amplamente utilizado em todo o mundo (WOODBURN, 2000). O risco dos efeitos adversos do glifosato para organismos aquáticos são considerados geralmente baixos. Entretanto, alguns trabalhos com peixes, anfíbios e invertebrados aquáticos reportam que algumas formulações do glifosato são substancialmente mais tóxicas devido à presença do surfactante em sua formulação (FOLMAR et al., 1979; TSUI e CHU, 2003). Uma vez que os testes de toxicidade de agrotóxicos normalmente não são realizados com bivalves, o impacto do glifosato em moluscos de água doce é desconhecido (BRINGOLF et al., 2007).

O ingrediente ativo do Roundup[®] apresenta ação herbicida e é registrado para o uso em 26 culturas, dentre elas algodão, arroz, café, cana-de-açúcar, citru, milho, pastagens, soja e trigo (MAPA, 2010). Pertence ao grupo químico das glicinas, é considerado tóxico para organismos aquáticos, pouco tóxico para organismos do solo, aves e abelhas, e pouco bioacumulável. Varia entre pouco e medianamente persistente no solo, apresentando pouca mobilidade e elevada absorção no solo. Os produtos técnicos à base do ingrediente ativo glifosato, em geral são classificados como pertencentes à classe III, ou seja, perigoso ao meio ambiente (IBAMA, 2010).

O glifosato é o ingrediente ativo que ocupa primeiro lugar no ranking de comercialização do Brasil, representando 76% do total de produtos comercializados com ação herbicida no Brasil (IBAMA, 2010). Quando se trata da distribuição da comercialização do glifosato e seus sais no Brasil, o estado do Paraná ocupa o 2º lugar entre os estados que mais comercializam tal ingrediente ativo, perdendo apenas para o estado do Rio Grande do Sul.

Com relação ao ingrediente ativo em questão, este é assimilado pelas folhas e rapidamente translocado pelo floema, dando-lhe a propriedade de herbicida sistêmico, ou seja, nenhuma parte da planta sobrevive (FRANZ et al., 1997). Nas plantas, interfere no crescimento destas ao inibir a produção do aminoácido aromático essencial (GIESY et al., 2000). Apesar de seu modo de ação ser bem conhecido em plantas, Giesy et. al. (2000) afirmam que aparentemente o glifosato apresenta baixa atividade em animais, uma vez que seu modo de ação é uma rota bioquímica aparentemente única para plantas e alguns microorganismos.

Proporcionalmente ao seu extenso uso, poucos estudos têm sido realizados visando compreender os impactos ambientais causados pelo glifosato. A falta de interesse em estudos que envolvam glifosato se deve à sua difícil e dispendiosa detecção no ambiente (BUFFIN e JEWELL, 2011). Testes de toxicidade com o teleósteo *Carassius auratus* expostos a 5, 10 e 15 ppm de Roundup[®] por 48, 96 e 144 horas, indicaram danos crescentes e dose-dependente no DNA de eritrócitos (ÇAVAS e KÖNES, 2007). Estudos realizados por Barky et al. (2012) indicaram que atrazina e Roundup[®] foram capazes de promover alterações significativas em todos os parâmetros bioquímicos analisados na hemolinfa (glicose, lactato, glicogênio, piruvato, total de aminoácidos livres, DNA e RNA) de *Biomphalaria alexandrina* expostos, por quatro semanas, a concentrações relativamente baixas de agrotóxicos (0,33 e 0,84 ppm de atrazina e Roundup[®], respectivamente). Além disso, a mortalidade de 100% dos animais expostos a estas concentrações se deu 4 e 5 semanas após o início dos experimentos para atrazina e Roundup[®], respectivamente. Sob as mesmas condições descritas, foi observada uma

inibição significativa das enzimas glicogênio fosforilase, G-6-Pase, dehidrogenase láctica, dehidrogenase succínica, acetilcolinesterase, dentre outras. Além disso, houve uma inibição significativa da SOD, CAT e GR, e um aumento significativo da LPO, bem como efeitos genotóxicos, principalmente em tratamentos com atrazina, a qual se mostrou mais tóxica em todos os parâmetros analisados nestas condições experimentais. Também foram observadas alterações quanto à produção de ovos e a ocorrência de anormalidades, sendo que para ambos os agrotóxicos ambas as situações foram observadas (BARKY et al., 2012).

2.8. Toxicidade de Misturas

Infelizmente a toxicidade de um pesticida não é limitada ao seu local de aplicação. Eles atingem outros locais e compartimentos ambientais através de vários processos físicos de transporte, afetando os organismos que possam estar presentes. Além disso, não é incomum encontrar uma combinação de vários agrotóxicos na superfície da água em áreas agrícolas ou não (ANDERSON e WEBER, 1975), sendo que os organismos aquáticos raramente são expostos a apenas um contaminante, mas sim a uma variedade destes (FAUST et al., 2003). Entretanto, em contraste com esta realidade ambiental, mais de 95% dos recursos em toxicologia foram desenvolvidos com estudos de contaminantes individuais (GROTEN, 2000).

Normas regulatórias normalmente são baseadas em compostos isolados (FOOSTER et al., 2005). Um simples modo de estudar os efeitos de misturas é comparar o efeito da mistura com os efeitos dos constituintes isolados. Isso requer um número mínimo de grupos experimentais ($n+1$, o número de componentes na mistura mais a mistura em si). Entretanto, uma mistura pode, preferencialmente, ser testada tanto em altas quanto baixas concentrações (GROTEN, 2000). O modo de ação de um químico é definido como um conjunto comum de sinais fisiológicos e comportamentais que caracterizam o tipo de resposta biológica adversa, enquanto que o mecanismo tóxico se refere ao processo bioquímico fundamental e/ou interação xenobiótico/organismo relacionada com um determinado modo de ação (RAND et al., 1995)

Quando na forma de misturas, os químicos constituintes podem interagir uns com os outros. Interações químicas são conhecidas por ocorrer através de inúmeros mecanismos, tais como alterações na absorção, ligação a proteínas e a biotransformação e excreção de um ou ambos os agentes tóxicos da interação. Inúmeros termos têm sido usados para descrever interações farmacológicas e/ou toxicológicas. O efeito aditivo ocorre quando o efeito

combinado dos dois contaminantes é igual à soma dos efeitos que cada um é capaz de promover isoladamente ($2+3=5$), sendo que este é o mais comumente observado quando se trata de dois contaminantes juntos. O efeito sinérgico ocorre quando o efeito combinado dos dois químicos é muito maior que a soma dos efeitos de cada uma separadamente ($2+3= 20$). A potencialização é observada quando uma substância não tem efeito tóxico em certo órgão ou sistema, mas quando é adicionada a outro químico, faz com que este se torne muito mais tóxico ($0+2=10$). O chamado antagonismo se refere ao efeito observado quando dois químicos adicionados juntos interferem um na ação do outro ou somente um interfere na ação do outro ($4 + 10 = 8$; $4 + (-4) = 0$; $4 + 0 = 1$) (EATON e GILBERT, 2008).

2.9. Moluscos como organismo teste

Bivalvia reúne cerca de 8.000 espécies, sendo que aproximadamente, 1.300 são de água doce. O achatamento lateral do pé e da concha facilita a escavação a substratos moles. Seu modo de alimentação por filtração garante que o animal possa se alimentar enquanto está enterrado no substrato e seus sifões permitem acesso à água que contém alimento e oxigênio, sem que o animal necessite deixar o sedimento. Estes animais apresentam brânquias grandes, que são responsáveis pela alimentação e trocas gasosas, além de dois músculos adutores transversais, um anterior e outro posterior, estendem-se de uma valva à outra (RUPPERT et al., 2005).

Como não apresentam um exoesqueleto, os moluscos têm contato direto com o meio. Assim, compostos químicos podem ser absorvidos não apenas através da alimentação como também via tegumento, através da respiração, resultando em um grande potencial de acumulação de contaminantes (OEHLMANN e SCHULTE-OEHLMANN, 2003). Moluscos bivalves são conhecidos por filtrarem grandes quantidades de água são considerados potencialmente hábeis para acumular contaminantes presentes no meio (INZA et al., 1997; NARBONNE et al., 1999; ACHARD et al., 2004).

Espécies sésseis de mexilhões e outros bivalves são considerados bons bioindicadores de contaminação por metais e compostos orgânicos, pois podem acumular uma série de contaminantes em seus tecidos. Segundo Manduzio et al. (2004), os moluscos apresentam características que garantem seu uso como organismos sentinelas para poluição química, como sua ampla distribuição e facilidade de coleta. Além disso, os bivalves são organismos sedentários, o que lhes garante um íntimo contato com o ambiente contaminado (SHEEHAN e POWER, 1999).

Moluscos são organismos termoconformadores, tendo que lidar com oscilações na temperatura ambiente e em sua taxa metabólica e, conseqüentemente, com oscilações nos níveis de ERO (WILHELM-FILHO et al., 1993). Como consequência, geração de ERO, taxas de oxidação e status antioxidante são muito provavelmente relacionados com a temperatura ambiente e a atividade metabólica (WILHELM-FILHO et al., 2000). Estes invertebrados são dependentes, pelo menos em parte, de células sanguíneas circulantes (hemócitos) para defesa interna natural contra patógenos (LE GALL et al., 1991; PIPE, 1992). A classificação dos hemócitos em bivalves tem atentado tanto para critérios morfológicos quanto estruturais, sendo que a classificação de Cheng (1981) é a mais amplamente aceita (PIPE e COLER, 1995). Esta classificação diferencia três linhas celulares: hialinócitos, que se maturam em pequenas células, em grande parte agranular, com um grande núcleo em relação ao citoplasma; granulócitos, células ativamente fagocíticas, que contém inúmeros grânulos citoplasmáticos; e células serosas. Pesquisas posteriores à de Cheng (1981), como as de Bâchere et al. (1998) e Pipe (1990a), usando técnicas alternativas como caracterização molecular da superfície celular e centrifugação com gradiente de densidade, têm identificado mais subpopulações de hemócitos (PIPE e COLER, 1995).

O mecanismo predominante de defesa interna dos bivalves envolve a fagocitose por hemócitos circulantes, embora outras respostas à infecção, como encapsulação, são utilizadas por estes organismos. Estes mecanismos normalmente estão relacionados com um aumento no número de hemócitos circulantes que, provavelmente, resultam da estimulação de migração dos tecidos, mais que da proliferação celular (RENWRANTZ, 1981; COLES et al., 1995). A fagocitose envolve outros processos como a liberação de enzimas degradativas (CHENG, 1981; PIPE, 1990b) e a geração de ERO (ANDERSON, 1994a), as quais auxiliam na defesa do organismo contra patógenos, sendo a exposição do animal a um contaminante, um fator que pode aumentar a susceptibilidade do mesmo a patologias (PIPE e COLE, 1995). Outros compostos solúveis liberados pelos hemócitos, como parte de suas estratégias de defesa, incluem aglutininas, lisinas e vários outros fatores antimicrobianos (PIPE e COLER, 1995). Assim, a hemolinfa dos moluscos contém tipos específicos de hemócitos que são fagocitários e parecem atacar patógenos invasores através da liberação de ERO (LE GALL et al., 1991; PIPE, 1992).

Para se proteger das ERO, geradas pelo hemócito durante a fagocitose, estas células contém SOD (Cu, Zn e MnSOD), CAT e GPx (PIPE et al., 1993). São células altamente granuladas devido ao fato de serem ricas em lisossomos (MOORE, 1988; PIPE et al., 1993). Estas organelas são ricas em hidrolases que estão envolvidas na digestão intracelular de

alimento endocitado e macromoléculas, bem como, acúmulo e sequestro de xenobióticos e metais. Lisossomos dispõem de mecanismos de proteção à célula pelo acúmulo de produtos da peroxidação lipídica como aldeídos, álcoois e hidroperóxidos lipídicos (MOORE, 1988). Hemócitos têm um significativo potencial de absorver compostos xenobióticos presentes na hemolinfa e concentrá-los dentro do compartimento lisossomal (WINSTON et al., 1996).

Um importante fator que influencia a bioquímica e fisiologia dos moluscos é a sazonalidade. Dependendo da disponibilidade de nutrientes, status reprodutivo, taxa de crescimento e outros fatores, a atividade de enzimas antioxidantes e outros biomarcadores flutuam significativamente ao longo do ano (SHEEHAM e POWER, 1999). Variações sazonais nas defesas antioxidantes foram observadas em tecido de *Modiolus modiolus* (LESSER e KRUSE, 2004), *Mytilus edulis* (MANDUZIO et al., 2004) e *Perna perna* (WILHELM-FILHO et al., 2001). O estresse oxidativo também é um processo que sofre variação sazonal em moluscos bivalve (LESSER e KRUSE, 2004). A atividade da SOD, GPx, GR, GST foi maior no inverno, a CAT foi menor (BORKOVIC et al., 2005).

As defesas antioxidantes também são influenciadas pela presença de xenobióticos no meio (ORBEA et al., 2002), além de sofrer modificações sazonais devido a flutuações de temperatura, salinidade, oxigênio e quantidade de alimento disponível (VIARENGO et al., 1991). Em temperaturas mais baixas há uma redução na atividade metabólica dos bivalves (PAIN, 2003), além de haver uma redução na taxa de filtração e consumo de oxigênio e consequente aumento na absorção de xenobiótico (FISHER et al., 1993; GOSSIAUX et al., 1996). Tais alterações podem estar relacionadas indiretamente com a temperatura, o qual interfere no aumento da taxa metabólica do animal, a qual contribui mais diretamente com o aumento do MXR (BERNY et al., 2002).

2.9.1. *Corbicula fluminea*

A introdução de espécies exóticas nos ecossistemas aquáticos tem aumentado dramaticamente nas últimas décadas (COHEN e CARLTON, 1998; LIGHT e MARCHETTI, 2007). Ecossistemas de água doce estão sendo intensamente modificados pela atividade humana, resultando no declínio de espécies nativas com a subsequente substituição e propagação de espécies invasoras (HOLECK et al., 2004; RICCIARDI e RASMUSSEN, 1999). Bivalves do gênero *Corbicula* são amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Arquipélago de Malay, Filipinas, Nova Guiné e Leste da Austrália (MORTON, 1986). Durante o Pleistoceno, este gênero também se espalhou para a

Europa (MEIJER e PREECE, 2000). No século XX, estes moluscos foram introduzidos nas Américas e no restante da Europa (ARAÚJO et al., 1993; BRITTON e MORTON, 1979). Rapidamente ampliaram sua área de ocupação e atualmente constituem um potencial perigo às espécies nativas (McMAHON, 1999; MORTON, 1986; MOUTON, 2001; PFENNINGER et al., 2002). Este gênero apresenta uma ampla variedade de estratégias reprodutivas, variando de desenvolvimento indireto com larva livre-nadante até incubação de larva nas brânquias até atingirem o estágio de juvenis bentônicos (KENNEDY et al., 1991; MORTON, 1986). O primeiro modo se restringe às espécies estuarinas, enquanto que o segundo é restrito aos animais de água doce (MORTON, 1986; RAJAGOPAL et al., 2000).

Corbicula fluminea (Müller 1774) é considerado uma das mais importantes espécies invasoras em ambiente aquático, tendo sua origem na Ásia (McMAHON, 2002; SOUSA et al., 2008b). Uma vez que são abundantes, podem desempenhar um papel significativo na ciclagem de nutrientes (SOUSA et al., 2008a), apresentando uma densidade que chega a 1320 indivíduos.m⁻² (SOUSA et al., 2008b). Sua introdução nos ecossistemas da América e Europa ocorreu, provavelmente, como resultado de atividade humana (McMAHON, 2002) como uso dos organismos como isca de peixe, transporte de indivíduos para outras localidades como objeto de curiosidade e também por sua extensiva capacidade de dispersão (McMAHON, 2002; SOUSA et al., 2008c).

De uma maneira geral, a heterogeneidade de reprodução e desenvolvimento observado no gênero *Corbicula* pode estar relacionada com seu amplo espectro de distribuição ecológica (KORNIUSHIN e GLAUBRECHT, 2003). Os bivalves de água doce apresentam reprodução altamente especializada para exploração deste ambiente (MORTON, 1991), sendo que o desenvolvimento do marsúpio, incubação de larvas e cuidado parental dos juvenis são consideradas convergências adaptativas para este tipo de ambiente (PARK e Ó FOIGHIL, 2000), estando possivelmente relacionado à proteção da prole em resposta às variações bióticas e abióticas dos ambientes límnicos (ITUARTE, 1984).

Enquanto que a maioria das espécies de bivalves marinhos é ovípara, muitos bivalves dulcícolas exibem várias formas de ovoviviparidade e viviparidade (KORNIUSHIN e GLAUBRECHT, 2003), como, por exemplo, as famílias da ordem Unionoidea e duas famílias de Veneroidea: Sphaeriidae e Corbiculidae. Bivalves límnicos geralmente utilizam as brânquias para incubar seus embriões (MACKIE, 1986), sendo os corbiculídeos, típicos exemplos de bivalves que incubam seus embriões (MORTON, 1991). Com relação à família Corbiculidae há registros de um grande número de modos de desenvolvimento embrionário, o qual varia desde larva do tipo véliger livre nadante, normalmente em espécies de águas

salobras como *C. fluminalis* (Muller, 1774), *C. japonica* (Prime, 1864) e *Polymesoda (Geloida) erosa* (Solander, 1786) (MORTON, 1982, 1985, 1986), até espécies que desenvolvem cuidado parental dos juvenis com redução ou completa ausência da larva pelágica (PARK e Ó FOIGHIL, 2000), como na espécie neotropical *Cyanocyclas limosa* (Maton, 1809) que incuba seus embriões até aproximadamente $\frac{1}{4}$ do tamanho da concha da mão (PARODIZ e HENNINGS, 1965; FOCHT e VEITENHEIMER-MENDES, 2001).

A incubação em Corbiculidae é restrita aos táxons de água doce, como *C. fluminea* (MORTON, 1986), dentre outras espécies. Com exceção de *C. passoensis* que é a única espécie do gênero *Corbicula* que incuba suas larvas tanto nas demibrânquias internas quanto externas (tetrabranquiais), todas as demais espécies deste gênero, estudadas até o momento, são tipicamente endobranquiais, ou seja, as larvas são incubadas nas demibrânquias internas (KORNIUSHIN e GLAUBRECHT, 2003). As gônadas desta espécie são verde-acinzentadas (MARTINS et al., 2006), apresentando principalmente incubação endobranquial, podendo ser tetrabranquiais. As larvas normalmente são espalhadas por toda a extensão das demibrânquias internas, estando distribuídas mais restritamente e em menor quantidade em tubos aquíferos nas demibrânquias externas (MARTINS et al., 2006).

C. fluminea apresenta um crescimento contínuo ao longo do ciclo de vida e seu tempo de vida parece variar entre 24 e 36 meses. Todavia algumas populações podem apresentar este tempo mais curto ou mais longo, dependendo da latitude, temperatura e disponibilidade de alimento (SOUSA et al., 2008a). Juvenis desta espécie crescem rapidamente, cerca de 1 mm por semana, em temperatura de 25°C. Todavia, tal crescimento é interrompido quando mantidos em temperaturas abaixo de 15°C, havendo uma considerável mortalidade de animais quando mantidos por uma semana em 0°C. Assim, a população destes organismos tende a decair em ambientes de águas frias (DEN HARTOG et al., 1992).

Este bivalve dulcícola vem sendo utilizado em diversos estudos de biomonitoramento da qualidade de águas continentais como organismo biomonitor na detecção de contaminantes (CATALDO et al., 2001; COLOMBO et al., 1995; SHOULTS- WILSON et al., 2009). Isso porque tal animal apresenta uma ampla distribuição geográfica, maturação sexual precoce, alta taxa de fecundidade, crescimento rápido, baixa capacidade de locomoção (animal sedentário) e uma alta taxa de filtração, permanecendo com as valvas abertas durante grande parte do dia (McMAHON, 2002).

Corbicula fluminea apresenta uma elevada taxa de filtração, sendo que esta varia dependendo da quantidade de partículas suspensas no meio: quanto maior a concentração de partículas suspensas, maior a taxa de filtração. Assim, estes animais são capazes de fazer

ajustes fisiológicos para que a taxa de filtração atinja uma “taxa ótima” de remoção de partículas. Há restrições morfológicas potenciais na brânquia destes moluscos que controlam a quantidade de partículas, bem como, o tamanho que pode ser processado. Adicionalmente, a plasticidade na resposta da alimentação por filtração e a capacidade de alterar os modos de alimentação contribuem para o sucesso de *C. fluminea* como uma espécie invasora (WAY et al., 1990).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Verificar os efeitos agudos do herbicida atrazina (ATZ) e Roundup® (RD), e da mistura destes, no bivalve dulcícola *Corbicula fluminea* por meio da análise de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar se a atrazina e o Roundup® interferem no processo de biotransformação, na glândula digestiva e na brânquia de *C. fluminea*, por meio da análise da EROD (fase I), GST (fase II) e MXR (fase III);
- Verificar se a atrazina e o Roundup® interferem na capacidade antioxidante de *C. fluminea*, por meio da análise da atividade de antioxidantes enzimáticos (CAT, SOD, GPx e GR), e não enzimáticos (GSH) na glândula digestiva e na brânquia;
- Verificar se a exposição à atrazina e ao Roundup® interfere na ocorrência de peroxidação lipídica na glândula digestiva e na brânquia, e de danos no DNA de células da hemolinfa de *C. fluminea*;
- Verificar o efeito causado pela interação de atrazina e Roundup® nos mecanismos de biotransformação, nas defesas antioxidantes e na ocorrência de lipoperoxidação em brânquia e glândula digestiva e na ocorrência de danos no DNA em hemócitos de *C. fluminea*,

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Exemplares de *Corbicula fluminea* (Müller 1774) (Mollusca, Corbiculidae) (Figura 2), com medidas (média \pm EP, n = 90) de $6,34 \pm 0,09$ g, largura de $3,01 \pm 0,04$ cm e altura $2,8 \pm 0,02$ cm, foram coletados no Lago Igapó III ($23^{\circ}19'5.89''S$ $51^{\circ}11'7.31''O$) (Figura 2), localizado no município de Londrina, Paraná, Brasil. Esta área, delimitada pelo círculo amarelo na Figura 3, foi selecionada em vista da grande quantidade de exemplares ali presentes e do fácil acesso ao local. As coletas, realizadas sempre no período da manhã, por questão de padronização, foram feitas através do revolvimento do substrato e subsequente separação dos animais. Os exemplares coletados foram transportados, totalmente submersos, em recipientes de plástico contendo água do local até o laboratório de Bioensaios Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos em aquários contendo cascalhos de granulometria 7 mm e cerca de 40 L de água desclorada, constantemente aerada, por 5 dias (aclimatação), com renovação total da água a cada 24 horas, até que o início dos experimentos.

Durante a aclimatação, bem como, no decorrer dos experimentos, os parâmetros físicos e químicos da água, como temperatura, condutividade, dureza, oxigênio dissolvido e pH, foram monitorados a cada 24 horas, com o uso de um medidor multiparâmetros (Horiba, modelo U-50). O fotoperíodo foi ajustado e mantido em 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Os exemplares coletados não receberam alimentação durante o período de aclimatação tampouco durante a realização dos experimentos. Uma vez que o estado nutricional é um fator que pode interferir nas defesas antioxidantes do animal, tal procedimento poderia ser mais um fator de interferência pela falta de controle quanto aos animais que iriam ou não ingerir o alimento, podendo assim, gerar variação entre os organismos testados que não pela atuação do herbicida em questão.



Figura 2. *Corbicula fluminea*



Figura 3. Foto de satélite (21/07/2006) indicando a localização do Lago Igapó III (delimitado pela linha vermelha): local de coleta de *Corbicula fluminea*, mais especificamente, na área delimitada pelo círculo amarelo. (Fonte: Google Earth).

4.2. Seleção das concentrações dos herbicidas testados

Para os experimentos com o herbicida atrazina, foi utilizado apenas o ingrediente ativo em pó, uma vez que produtos formulados à base deste triazínico apresentam em sua formulação basicamente o ingrediente ativo acrescido de ingredientes inertes. Já no caso dos experimentos realizados com o herbicida à base de glifosato foi utilizado o produto formulado Roundup® e não apenas seu ingrediente ativo. Isso porque, diferentemente da atrazina, este produto apresenta em sua formulação, além dos ingredientes ativo e inertes, o surfactante polioxietilenoamina (POEA), o qual visa facilitar a absorção do agrotóxico pelas folhas das plantas. Tal substância é conhecida como sendo potencialmente tóxica aos organismos aquáticos, sendo muitas vezes de toxicidade mais elevada que o glifosato. Assim, o uso apenas do ingrediente ativo glifosato nos experimentos poderia subestimar os efeitos do produto formulado Roundup®.

A Resolução CONAMA nº 357 de 2005 dispõe como limite máximo permitido de atrazina e glifosato, para águas de classe 1 e 2, os valores de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $65 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. No que diz respeito à atrazina, tais limites se mantêm para as demais classes de água. Já para o glifosato, seu limite máximo para águas de classe 3 e 4 é de $280 \mu\text{g.L}^{-1}$ (CONAMA, 2005).

A Portaria nº 518/2004, do Ministério da Saúde, estabelece, dentre outras providências, o padrão de potabilidade da água dirigida ao consumo humano, cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos não ofereçam risco à saúde humana. Tal Portaria, firma como limite máximo permitido para atrazina e glifosato as concentrações de 2 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. O valor especificado para atrazina é idêntico ao firmado como limite máximo para o DDT, cujo consumo foi banido em diversos países, incluindo o Brasil em 2009 (BRASIL, 2004).

Assim, para o presente trabalho foram selecionadas as concentrações de 2 e 10 ppb para atrazina, que equivalem a 2 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (m/v), e 2 e 10 ppm para o Roundup, que correspondem a 2 e 10 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (v/v). Para atrazina, as concentrações de 2 e 10 ppb, correspondem ao limite máximo permitido pelo CONAMA e a 40% da concentração de atrazina usada nas culturas (VENTURA et al., 2008), respectivamente. Para o Roundup® (RD) (36% m/v, Monsanto do Brasil LTDA), a seleção de tais concentrações se baseia em dois pontos principais: I) o presente herbicida apresenta elevada afinidade ao solo, podendo se concentrar no substrato, e se apresentar em concentrações mais elevadas que as observadas na água; II) organismos aquáticos sedentários, como *C. fluminea*, revolvem e se enterram no substrato, mantendo um íntimo contato com esse “estoque” de glifosato. Uma vez que, considerando as taxas de aplicação de glifosato usuais, um corpo d’água próximo a lavoura, sem mata ciliar, pode receber até 3,7 mg.L^{-1} de glifosato (GIESY et al., 2000), e as concentrações de 2 e 10 ppm testadas no presente trabalho correspondem a cerca de 0,72 e 3,6 mg.L^{-1} de glifosato, respectivamente, as concentrações selecionadas são passíveis de serem detectadas no meio ambiente e possuem grande relevância quando se trata de organismo sedentários. Assim sendo, as concentrações selecionadas para ambos os herbicidas são ambientalmente relevantes.

4.3. Testes de toxicidade

Após o período de aclimação, exemplares de *C. fluminea* foram submetidos aos testes de toxicidade aguda do tipo estático (6 e 24 horas) e semi-estático (96 horas), com renovação completa do meio a cada 24 horas. Os tempos experimentais foram de 6, 24 e 96 horas para atrazina e Roundup® e de 96 horas para a mistura dos herbicidas (atrazina + Roundup). Isso porque nos testes realizados com os herbicidas individualmente, o tempo de 96 horas foi o que apresentou alterações mais significativas e, portanto, mais interessantes do ponto de vista de observação de efeito, de serem testadas sob atuação conjunta dos dois

herbicidas. Durante todo o tempo experimental qualquer animal que viesse a morrer antes do período de amostragem era retirado do aquário para evitar qualquer perturbação ao meio de exposição, como liberação da hemolinfa no meio ou processo de putrefação.

Para os testes de toxicidade os animais foram alocados em aquários (40 x 20 x 20 cm) contendo apenas água desclorada (grupo controle) ou os contaminantes a serem testados (grupos experimentais). O número de animais/aquário foi de 10 (dez) exemplares. Tal número evitaria o uso excessivo de organismos e ao mesmo tempo garantiria um número adequado de organismos amostrados para futuras análises estatísticas.

O procedimento de renovação do meio, realizado para os testes de 96 h, se baseou na transferência dos animais, com o auxílio de redes, para outros aquários contendo o meio de exposição (apenas água, para o grupo controle, e água acrescida de contaminante na concentração testada, para o grupo experimental, ambos contendo cerca de 10 L de água desclorada e aerada), com mínima manipulação do animal a fim de evitar o estresse do mesmo. Tal renovação não ocorreu para os tempos experimentais de 6 e 24 h, dado ser um curto intervalo de tempo de exposição (Figura 4).

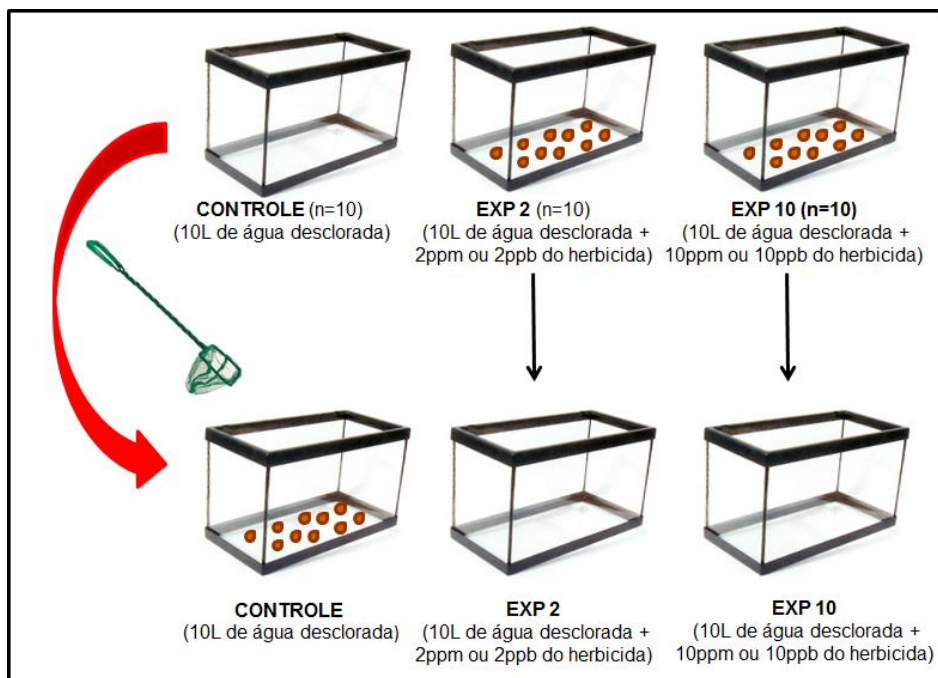


Figura 4. Esquema de renovação da água a cada 24 horas para experimentos de 96h. Animais são transferidos para outros aquários, com o auxílio de redes, contendo o mesmo meio de exposição em que se encontravam (controle ou experimental).

O volume de água contido nos aquários foi igual para ambos os grupos, 10 L de água desclorada em constante aeração. Os aquários, controle e experimentais, a serem utilizados

nos experimentos foram preparados com 24 horas de antecedência, a fim de garantir a obtenção de um ambiente desprovido de cloro, bem como, com total dissolução e distribuição do contaminante no aquário.

A atrazina (PESTANAL, analytical standart, Fluka) foi pesada e diluída em metanol, visando à obtenção de uma solução-mãe de atrazina (SMA) de concentração 5 mg.ml⁻¹. A concentração desta solução foi calculada a fim de se obter uma concentração determinada que propiciasse a utilização de um volume viável (que não fosse tão pequeno a ponto de aumentar as chances de erros de pipetagem) para a montagem dos experimentos, bem como, evitasse a produção de volumes excedentes de SMA. Assim, calculou-se o volume de solução-mãe que deveria ser adicionado ao volume de 10 L de água contida no aquário para que fosse obtida uma concentração final de atrazina de 2 ppb e 10 ppb.

Durante todo o experimento a SMA foi armazenada em tubos de plástico para microcentrífuga (criogênicos) de 2 ml cuidadosamente lacrados com papel parafilme e mantida em geladeira, visando minimizar a possibilidade de evaporação do metanol. Após o término dos experimentos a solução-mãe de atrazina restante era descartada, uma vez que dada a volatilidade do metanol, a concentração da solução poderia sofrer alteração em sua concentração pela evaporação do metanol e conseqüente concentração do herbicida.

No caso dos ensaios com Roundup[®] foi utilizado o pesticida Roundup[®] Original (Monsanto) adquirido em casas agropecuárias, sem diluições prévias, uma vez que tal produto é muito solúvel em água e não foram observados problemas de pipetagem quando ao volume do herbicida a ser utilizado nos aquários.

4.3.1. Experimentos com atrazina e Roundup[®]

Foram testadas as concentração de 2 e 10 ppb de atrazina e 2 e 10 ppm de Roundup[®]. Assim, para cada tempo experimental de um dado herbicida a ser testado, três aquários (n=30 animais) eram preparados. Para experimentos com atrazina: I) Controle (CTR), 10 L de água desclorada; II) ATZ 2, 10 L de água desclorada + 2 ppb de atrazina; III) ATZ 10, 10 L de água desclorada + 10 ppb de atrazina. Para experimentos com Roundup[®]: I) Controle (CTR), 10 L de água desclorada; II) RD 2, 10 L de água desclorada + 2 ppm de Roundup[®]; III) RD 10, 10 L de água desclorada + 10 ppm de Roundup[®] (Figura 5).

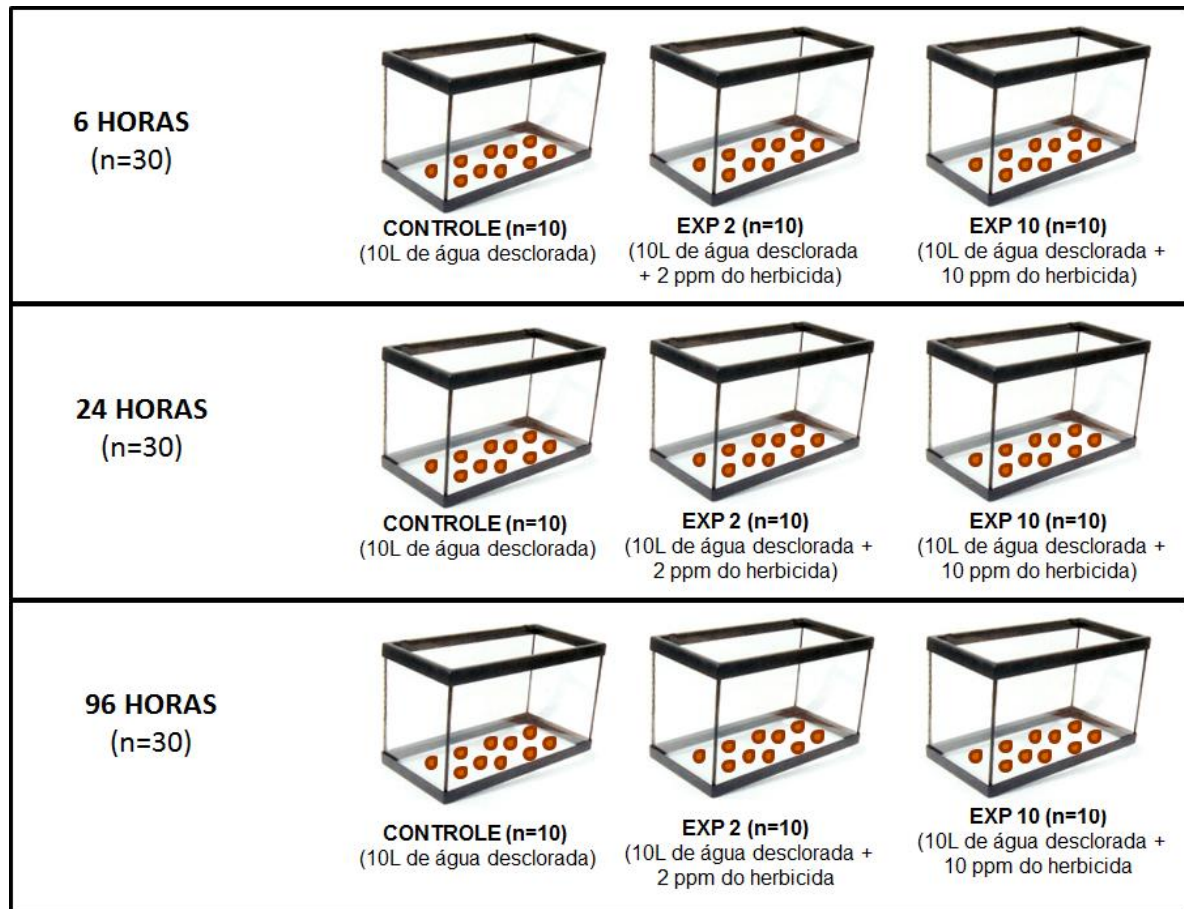


Figura 5. Delineamento experimental para os testes com atrazina e Roundup® em 6, 24 e 96 horas. Para cada tempo experimental foram montados três aquários, sendo um controle (apenas água desclorada) e dois experimentais: EXP 2 e EXP 10 correspondem, respectivamente, à concentração dos herbicidas de 2 e 10 ppb de atrazina ou 2 e 10 ppm de Roundup®.

4.3.2. Experimento da mistura (atrazina + Roundup®)

A mistura dos herbicidas Roundup® e atrazina foi testada nas condições de 2 ppb de atrazina acrescido de 2 ppm de Roundup® e 10 ppb de atrazina acrescido de 10 ppm de Roundup® durante 96 horas de exposição. Para a realização de tal experimento foram montados três aquários: I) Controle (CTR), 10 L de água desclorada; II) AR 2, 10 L de água desclorada + 2 ppb de atrazina + 2 ppm de Roundup®; III) AR 10, 10 L de água desclorada + 10 ppb de atrazina + 10 ppm de Roundup® (Figura 6).

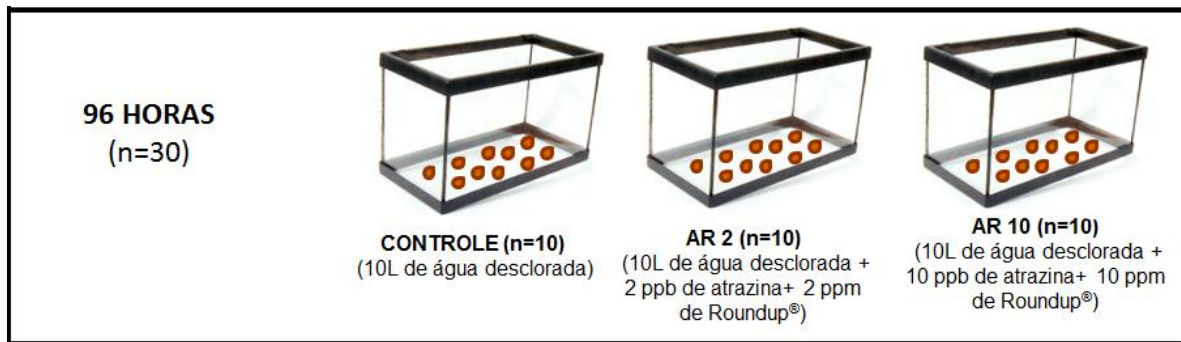


Figura 6. Delineamento experimental para o teste da mistura de atrazina e Roundup[®] em 96 horas. Montagem de três aquários, sendo um controle e dois experimentais: AR 2 (10L de água desclorada + 2 ppb de atrazina + 2 ppm de Roundup[®]) e AR 10 (10 L de água desclorada + 10 ppb de atrazina + 10 ppm de Roundup[®]).

4.4. Amostragem

Decorrido o período de experimentação, foi iniciado o processo de amostragem com coleta de material para as análises bioquímicas e genéticas. Com o auxílio de um bisturi, era realizada a raspagem na junção das valvas, visando facilitar a abertura das conchas. A hemolinfa de *C. fluminea* foi então coletada com o auxílio de uma seringa com agulha inserida, através da pequena abertura nas valvas, do seio localizado no músculo adutor anterior do animal (Figura 7). O líquido coletado foi transferido rapidamente para um tubo plástico de microcentrífuga de 1,5 mL, devidamente identificado, mantidos em plataformas para tubos plásticos de microcentrífuga sobre o gelo durante todo o período amostral e até o momento da realização do teste do cometa em laboratório.

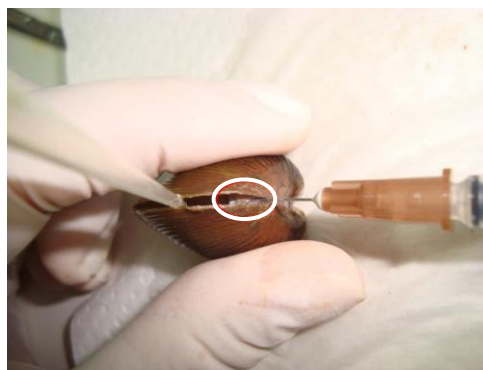


Figura 7. Coleta de hemolinfa do seio localizado no músculo adutor anterior (estrutura esbranquiçada localizada entre a abertura das valvas e limitada pelo círculo branco), com o auxílio de uma seringa.

Após a coleta da hemolinfa, o músculo adutor anterior foi seccionado com o auxílio de um bisturi, a fim de abrir completamente a concha do animal. Brânquias e glândula digestiva foram coletadas (Figura 8), com o auxílio de pinças e tesoura, e transferidas para tubos plásticos de microcentrífuga (1,5 mL), devidamente identificados, mantidos em gelo durante toda a amostragem e armazenados em ultrafreezer -80°C (Freeztec, ultra low) para análises posteriores. A glândula digestiva não é facilmente diferenciada dos tecidos adjacentes a ela, e por isso, a denominação de glândula digestiva, utilizada no presente trabalho, refere-se ao tecido glandular adicionada dos tecidos adjacentes.

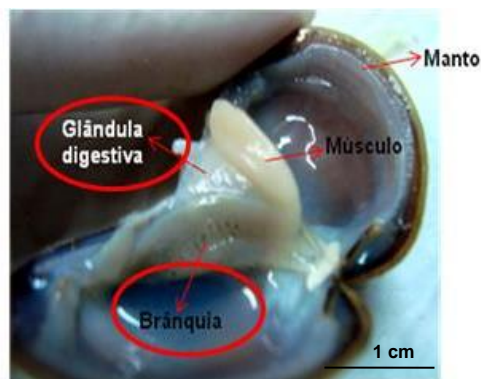


Figura 8. Identificação de órgãos em *Corbicula fluminea*. Círculos vermelhos identificam os órgãos-alvo de análise bioquímica no presente trabalho (brânquia e glândula digestiva).

4.5. Biomarcadores

Os tecidos branquial e glandular foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7) e posteriormente centrifugadas (Universal 320R) a 16000 g por 20 minutos a 4°C . O sobrenadante resultante da centrifugação foi retirado e armazenado em ultrafreezer (-80°C) até o momento das análises. A medida da atividade das defesas antioxidantes enzimáticas foi feita em espectrofotômetro UV/Visível (Biochrom, Libra S32) com banho termostatizado acoplado.

4.5.1. Enzimas de biotransformação

4.5.1.1. Fase I: EROD (etoxiresorufina-O-desetilase)

Este ensaio é um método adaptado de Eggens e Galgani (1992) e determina a atividade catalítica associada à CYP1A. Neste, a conversão da 7-etoxiresorufina (ETOX) para resorufina é monitorada fluorimetricamente (exc.: 530 nm; emi.: 590 nm) a cada 1 minuto por 40 minutos em espectrofotômetro de fluorescência (VICTOR³ PerkinElmer 1420, Multiabel Counter). Este ensaio se baseia na adição de um meio de reação (tampão fosfato de potássio 0,1 M / pH 7,6, NADPH 2 mM.10 mL⁻¹ e etoxiresorufina 0,1 mM.10 mL⁻¹) à amostra a ser analisada em microplaca preta de 96 poços.

Após a leitura calculou-se a inclinação da reta que descreve a variação dos valores obtidos ao longo dos 40 minutos (onde Y são os valores e X o tempo de ensaio). A concentração de resorufina foi correspondente à diferença entre o valor da fluorescência e a razão da interceptação/ inclinação. Este valor foi dividido pelo valor obtido para a proteína e multiplicado por 1000 (μM) e expresso em μM de resorufina.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

4.5.1.2. Fase II: *Glutathione S-Transferase (GST)*

A atividade da GST foi determinada através do método descrito por Keen et al. (1976) em espectrofotômetro no comprimento de onda 340 nm. O ensaio consiste em adicionar à cubeta de plástico 970 μL de tampão fosfato de potássio (0,1 M / pH 7,0), 10 μL de CDNB (diluído em etanol), 10 μL de GSH e 10 μL de amostra. A atividade enzimática é mensurada através da complexação da glutathione reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), por atuação da glutathione S-transferase presente na amostra durante 1 minuto, sendo expressa em nmol CDNB conjugado. min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

4.5.1.3. Fase III: *Mecanismo de Resistência a multixenobióticos (MXR) - Ensaio de acúmulo de Rodamina*

A medida de atividade das proteínas transportadoras componentes do mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) pode ser feita através de testes de bioacumulação ou efluxo. No primeiro, o acúmulo de uma substância fluorescente, como a Rodamina B, é medida com ou sem um inibidor competitivo em células vivas ou em tecidos homogeneizados após exposição, através de leitores de placa fluorométricos (SMITAL e KURELEC, 1998), sendo que a taxa de efluxo é diretamente proporcional à atividade de transporte da P-gp. A acumulação ou liberação de rodamina permite a detecção de concentrações muito mais baixas

de inibidores do MXR, possibilitando a detecção direta da capacidade dos organismos liberarem ou acumularem rodamina em seus tecidos (SMITAL e KURELEC, 1997). Estes mesmos autores demonstraram que o teste de Rodamina B é o teste mais rápido, barato e simples para a detecção de contaminantes no meio. Além disso, se apresentou como sendo o mais confiável.

Assim, para se estimar indiretamente a atividade das glicoproteínas P (P-gp) e MRP, ou seja, do mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR), foi realizado o ensaio de acúmulo do fluorescente Rodamina B (substrato da P-gp) de acordo com Kurelec et al. (2000). Após o sacrifício dos animais, foi feita a coleta das brânquias e glândula digestiva, os quais foram lavados rapidamente em salina ($2,5 \cdot 10^{-2}$ M NaCl, $4 \cdot 10^{-3}$ M sacarose/ pH 7,4), diluída seis vezes, para a retirada do excesso de muco. Em seguida foi retirado o excesso de salina em papel filtro e os tecidos foram transferidos para poços de microplacas (24 poços) contendo Rodamina B (1 μ M). Cada órgão de cada animal foi mantido em um dos poços da placa, os quais continham 1 mL do corante, por 2 (duas) horas. Em seguida, as amostras foram novamente lavadas em salina para retirada do excesso de Rodamina e, posteriormente, submetidas ao congelamento em freezer -20°C por pelo menos 30 minutos. Transcorrido este tempo e certificados do congelamento do material, este foi homogeneizado em água destilada (1:7), centrifugados a $1500\text{ g} / 4^{\circ}\text{C} / 7$ minutos. O volume mínimo de sobrenadante necessário para este ensaio é de 200 μ L, assim em alguns casos foram feitos ajustes necessários de diluição até a obtenção do volume necessário. O sobrenadante resultante foi utilizado para leitura de fluorescência (exc.: 544 nm / emi.: 590 nm) em microplaca preta, referente ao acúmulo de rodamina, em espectrofotômetro de fluorescência (VICTOR³ PerkinElmer 1420, Multiabel Counter). As concentrações de Rodamina no tecido foram determinadas através de uma curva padrão de rodamina, sendo os dados expressos em μ M de rodamina. mg de tecido úmido⁻¹.

4.5.2. Defesas Antioxidantes Primárias

4.5.2.1. Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada segundo McCord e Fridovich (1969). Este ensaio se baseia na inibição da taxa redução do citocromo c, promovida pelo ânion radical superóxido oriundo do sistema xantina/xantina oxidase, pela SOD.

A atividade da SOD foi estimada pela taxa de redução do citocromo c inibida pelo O_2^- , em 550 nm e expressa em U de SOD.mg de proteína⁻¹, sendo que U representa a quantidade de SOD que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c (FLOHÉ e OTTING, 1984).

O ensaio se baseia na adição à cubeta de plástico de 990 μ L de mistura reativa (tampão fosfato de sódio/potássio 50 mM / pH 7,8 contendo 0,1 M de EDTA, xantina 1 mM em NaOH 0,001 N e citocromo c), 5 μ L de amostra e 30 μ L de XOD (0,2 U.mL⁻¹). O volume de mistura reativa e XOD adicionados podiam ser alterados dependendo da absorbância obtida na leitura da referência (adição de todos os constituintes acima descritos, exceto a amostra), a qual deve ser de 0,025 abs.min⁻¹. Caso não fosse alcançado este valor, era feito um balanço entre os dois constituintes, sempre mantendo a mesma proporção, até que se atingisse 0,025 abs.min⁻¹.

4.5.2.2. Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi baseada no protocolo descrito por Beutler, (1975). Neste ensaio foi avaliado o decréscimo de absorbância a 240 nm, o qual está relacionado com a velocidade da decomposição do H_2O_2 pela enzima catalase presente na amostra. Tal procedimento consiste na adição de 990 μ L de meio de reação e 10 μ L de amostra em cubeta de quartzo. O meio de reação possui H_2O_2 e tampão da catalase (TRIS 1 M e EDTA 5 mM / pH 8,0) sendo a atividade enzimática expressa em μ mol de H_2O_2 metabolizado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

4.5.2.3. Glutathione peroxidase (GPx)

A atividade de GPx foi estimada através da oxidação do NADPH em presença de H_2O_2 , em espectrofotômetro (340 nm) a 25 °C e é expressa em μ mol de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ (HOPKINS e TUDHOPE, 1973). O ensaio se baseia na dismutação do H_2O_2 pela GPx presente na amostra. Tal processo gera uma ponte dissulfeto entre duas GSH (GS-GS), que por sua vez, volta ao estado reduzido (2 GSH) pela ação da glutathione redutase (GR), mediante a oxidação do NADPH. Assim, o ensaio registra a diminuição de NADPH (oxidação) durante 1 minuto.

Para análise de cada amostra, são adicionados à cubeta de quartzo 1 ml de meio de reação (tampão fosfato de sódio 0,1 M / pH 7,0 com EDTA 2 mM, NADPH 0,2 mM, azida

sódica 5 mM, GSH 1 mM e água destilada), 10 μL de amostra, 20 μL de GR (1 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 20 μL de H_2O_2 (20 mM).

4.5.3. Glutationas

4.5.3.1. Glutationa reduzida (GSH)

A concentração de GSH foi determinada pelo método de Beutler et al. (1963) pelo ensaio da reciclagem da glutatona. Na complexação da GSH com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), é formado o tiolato (TNB) que produz uma cor amarelada, a qual é detectada por espectrofotometria a 412 nm (VICTOR³ PerkinElmer 1420, Multiabel Counter), e a glutatona é oxidada. As amostras são centrifugadas em ácido tricloroacético (TCA) 6% (1:1) em 1500 g / 4 $^{\circ}\text{C}$ / 5 minutos. O sobrenadante das amostras é disposto em microplaca transparente de 96 poços com posterior adição de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (2,5 mM) e tampão fosfato de potássio (0,1 M / pH 7,0). A concentração de GSH é obtida através de uma curva padrão de GSH e expressa em μM de GSH. mg^{-1} de proteína.

4.5.3.2. Glutationa redutase (GR)

A atividade da GR foi determinada com base no protocolo proposto por Carlberg e Mannervik (1975). Neste ensaio a glutatona oxidada (GSSG) é reduzida a GSH por ação da GR, mediante oxidação do NADPH. Assim este método se baseia na medida indireta de atividade da GR, uma vez que registra a diminuição do NADPH.

GR



O ensaio se resume na adição, à cubeta de quartzo, de 50 μL de água ultra-pura, 400 μL de meio de reação (tampão fosfato de potássio 0,1 M / pH 70 com EDTA e NADPH 0,225 mM), 25 μL de GSSG e 25 μL de amostra. A atividade enzimática é medida em 340 nm e expressa em $\mu\text{mol NADPH oxidado}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$

4.5.4. Danos oxidativos

4.5.4.1. Lipoperoxidação

O ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) se baseou em Camejo et al. (1998) e foi utilizado como medida indireta de lipoperoxidação, a 60°C, pela leitura de fluorescência (exc.: 535 nm/ emi.: 590 nm). Este ensaio foi realizado usando 10µL da amostra (em duplicata), adicionado ao poço da microplaca preta de 96 poços, contendo 10 µL de BHT (burilato hidroxitolueno) e 170 µL de PBS (salina tamponada com fosfato / pH 7,4). Em seguida, foram adicionados 50 µL de TCA (ácido tricloroacético) 50% (m/v), seguido de uma leitura inicial da placa (detecção de autofluorescência) e TBA (ácido tiobarbitúrico) dissolvido em 0,3% (m/v) de NaOH com posterior incubação da placa por 1 hora em estufa a 60°C. Transcorrido este período de tempo, fez-se uma nova leitura a fim de detectar os valores de fluorescência. A concentração de malondialdeído (MDA), um dos produtos da lipoperoxidação (LPO), foi expressa em µmol de MDA por mg.mL⁻¹ de proteína.

4.5.4.2. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa realizado no presente trabalho se baseou em Fedato et al. (2010). Para a realização deste teste as lâminas eram previamente preparadas e submetidas a banho em agarose de ponto de fusão normal (1,5%), visando a formação de um filme de agarose sobre as lâminas, no qual a hemolinfa foi depositada. A hemolinfa, coletada durante o processo de amostragem, era primeiramente submetida a um processo de centrifugação a 1160 g / 20 min, a fim de concentrar as células presentes neste fluido. Em seguida, o sobrenadante era descartado e o pellet resultante da centrifugação era então ressuspenso com a adição de agarose de baixo ponto de fusão 0,5%, sendo então espalhadas sobre as lâminas histológicas previamente codificada.

Em seguida, as lâminas foram mantidas em geladeira por pelo menos 30 minutos ou até que as lamínulas apresentassem certa resistência ao deslizamento. Após a retirada das lamínulas, as lâminas foram submetidas aos seguintes procedimentos: I) lise: submersão em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por 1 hora a 4°C, protegido da luz; II) relaxamento e desenrolamento do DNA: manutenção em tampão de eletroforese (0,3 N NaOH, 1 mM de EDTA, pH>13) por 30 minutos; III) eletroforese: 30 minutos, 300 mA e 25 V, sendo 1 V.cm⁻¹; IV) neutralização:

três lavagens de 5 minutos cada em tampão de neutralização (0,4 M TRIS, pH 7,5); V) fixação em etanol absoluto por 10 minutos, seguido de secagem e armazenamento das lâminas sob refrigeração até o momento das análises.

4.5.4.2.1. Análise das lâminas

Para análise das lâminas, estas eram coradas com GelRed (0,3 $\mu\text{L}.\text{ml}^{-1}$ diluído em água e NaCl 1M) e analisadas em fotomicroscópio de fluorescência (Leica DM 2500) com filtro de excitação (450-490 nm) e um filtro barreira de 515 nm, a uma magnificação de 4000 vezes. Trata-se de um teste cego, onde as lâminas previamente codificadas, não são identificadas (como controle ou experimental) ao longo das análises, a fim de evitar análises tendenciosas. Para cada animal foram analisados 100 nucleóides, cada um dos quais recebeu uma classificação de acordo com o comprimento da cauda gerada pela migração dos DNA, que é diretamente proporcional ao dano observado (quando maior a cauda, maior o dano observado): classe 0 = sem dano aparente, classe 1 = dano mínimo, classe 2 = dano médio e classe 3 = dano máximo, tomando-se por base o comprimento da cauda do cometa. A identificação das classes de danos foram feitas segundo Kobayashi et al (1995) que apresenta a seguinte metodologia: classe 0 = sem dano aparente, classe 1 = cauda medindo até 1 vez o tamanho do diâmetro do nucleóide; classe 2 = cauda medindo entre 1 e 2 vezes o tamanho do diâmetro do nucleóide e classe 3 = cauda medindo mais de 2 vezes o diâmetro do nucleóide (Figura 9)

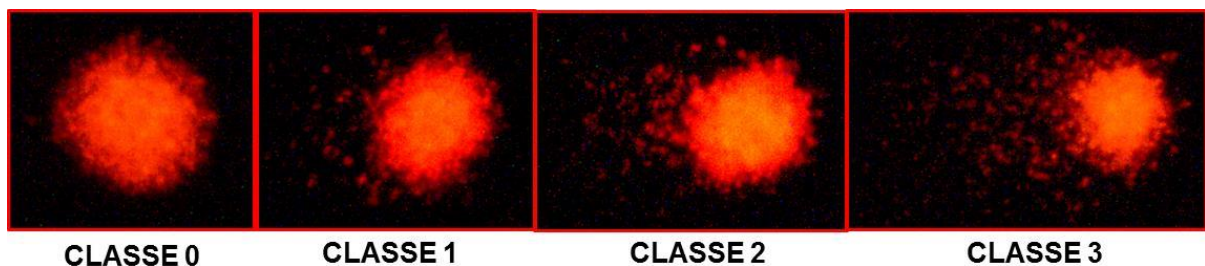


Figura 9. Classificação de nucleóides quanto o tamanho da cauda: classe 0= sem dano aparente; classe 1= até 1 vez o tamanho do diâmetro do nucleóide; dano 2= entre 1 e 2 vezes o tamanho do diâmetro do nucleóide; classe 3= mais de 2 vezes o diâmetro do nucleóide.

Para o cálculo do escore de dano, o número de nucleóides em cada classe (0, 1, 2 ou 3) foi multiplicado pelo valor de cada classe e o escore calculado pela fórmula: $(0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$, em que: A, B, C e D correspondem ao número de células em cada uma das

classes. Assim, o escore total para as células analisadas pode variar de 0 (dano mínimo = nenhuma célula danificada) a 300 (dano máximo = todas as células apresentam dano de classe 3).

4.6. Dosagem de proteínas totais

O método utilizado no presente trabalho foi o de Lowry et al. (1951) o qual foi originalmente proposto em 1922, é amplamente utilizado em estudos de dosagem proteica. O princípio deste método se baseia na utilização de uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente de Folin-Ciocalteu). Este reagente sofre uma redução, catalisada pelo Cu^{+2} , ao entrar em contato com as proteínas presentes na amostra, produzindo um composto azulado e de absorção máxima em 750 nm (ZAIA et al., 1998). Chou e Goldstein (1960) e Legler et al. (1985) sugerem que a reação de redução ocorre diretamente através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina). Estes contribuem com quatro elétrons ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, a qual é facilitada pela formação do quelato entre cobre e peptídeos/proteínas.

A principal vantagem deste método é sua alta sensibilidade, sendo utilizado para a determinação proteica de diversos meios (ZAIA et al., 1998). Para dosagem proteica em tecidos animais, estudos comparativos como os de UPRETI et al. (1988) demonstraram que o método de Lowry é mais recomendável, pois mostrou-se mais sensível, com melhor exatidão, menor consumo de amostras e, menos susceptíveis a alguns tipos de interferentes (lipídios, melanina, açúcares, RNA, detergentes e compostos fenólicos (ZAIA et al., 1998).

4.7. Análise Estatística

Os resultados obtidos para cada órgão (brânquia e glândula digestiva), em cada tempo experimental (6, 24 e 96 h), para as diferentes concentrações de atrazina, Roundup e atrazina +Roundup ([2] X [10]) foram comparados entre si e com o respectivo grupo controle (CTR X [2] X [10]) por meio de análise de ANOVA ou Kruskal-Wallis. Na indicação de diferença significativa os resultados foram comparados por testes de comparações múltiplas (Teste de Dunn's) para a localização das diferenças. Para os experimentos de 6 e 24 h, para cada biomarcador empregado, os resultados obtidos para os grupos controle de ambos os herbicidas foram agrupados para cada órgão e foram comparados entre os dois órgãos

(brânquia X glândula digestiva) por meio de teste t de student ou Mann-Whitney. As comparações foram feitas por meio de teste paramétrico (ANOVA e teste t) ou não paramétrico (Kruskall-Wallis e Mann-Whitney), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância, teste Shapiro-Wilk). Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. A análise estatística foi feita com auxílio do software SigmaPlot 11.0.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Introdução, Revisão e Material e Métodos)

ABDULLAH, M.P.; DAUD, J.; HONG, K.S.; YEW, C.H. Improved method for the determination of glyphosate in water. **Journal of Chromatography**, v.697, p. 363-369, 1995.

ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIIEE, A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, v. 10, n. 6, 2004.

ABOU-DONIA, M.; ELMASRY, E.M.; ABU-QARE, A.W. Metabolism and toxicokinetics of xenobiotics. In: DERELANKO, M.J.; HOLLINGER, M.A. (eds.) **Hand Book of Toxicology**, 2.ed. Boca Ranton: CRC Press, p. 769-833, 2002.

ACHARD, M.; BAUDRIMONT, M.; BOUDOU, A.; BOURINEAUD, J.P. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metal exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 67, p. 347-357, 2004.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed., Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALTENBURGER, R.; NENDZA, M.; SCHUURMANN, G. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, 1900-1915, 2003.

AMES, B.N. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. **Mutation Research**, v. 214, p. 41-46, 1989.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 90, p. 7915-7922, 1993.

ANDEF [Associação Nacional de Defesa Vegetal]. Disponível em:<<http://www.undef.com.br/defensivos>>. Acesso em: 01.nov.2012.

ANDERSON, P.D.; WEBER, L.J. The toxicity to aquatic populations of mixtures containing certain heavy metals. In: **Proc. Int. Conf. on Heavy Metals in the Environment, Toronto**, 27-31, October 1975, pp. 933-954, 1975.

ANDERSON, R. S., MORA, L. M. & THOMSON, S. A. Modulation of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocyte immune function by copper, as measured by luminol-enhanced

chemiluminescence. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 108C, p. 215-220, 1994.

ARAÚJO, R.D.; MORENO, D.; RAMOS, M.A. The Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in Europe. **American Malacological Bulletin**, v. 10, n. 1, p. 39-49, 1993.

ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na Bacia do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 975-982, 2005.

ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R.; ANTUNES, P.M.; SANTOS, M.A.P.F.; CAMARGO, P.B.; ABAKERLI, R.B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1119-1127, 2007.

ARRAES, A.A.; BARRETO, E.M.S.; ARAUJO, J.C. Use of Atrazine and groundwater availability in Brazil: Case Study Tainguá. Trabalho apresentado ao 13° World Water Congress, International Water Resources Association, Montpellier, 2008.

ARUOMA, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 7, p. 671-683, 1994.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; DIZDAROGLU, M. Iron ion-dependent modification of bases in DNA by superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 13024-13028, 1989.

AZEVEDO, F.A.; DE LIMA, I.V. Toxicocinética. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003.

BACH, M.; HUBER, A.; FREDE, H.G. Input pathways and river load of pesticides in Germany – a national scale modeling assessment. **Water Science and Technology**, v. 5, p. 261-268, 2001.

BAIN, L.J.; McLACHLAN, J.B.; LeBLANC, G.A. Structure-activity relationships for xenobiotic transport substrates and inhibitory ligands of P-glycoprotein. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, p. 812-818, 1997.

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

BARHOUMI, R.; BOWEN, J.A.; STEIN, L.S.; ECHOLS, J.; BURGHARDT, R.C. Concurrent analysis of intracellular GSH content and gap junctional intercellular communication. **Cytometry**, v. 14, p. 747-756, 1993.

BARKY, F.A.; ABDELSALAM, H.A.; MAHMOUD, M.B.; HAMDI, S.A.H. Influence of atrazine and Roundup pesticides on biochemical and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. **Pesticides Biochemistry and Physiology**, v. 104, p. 9-18, 2012.

BAYNE, B.L.; BROWN, D.A.; BURNS, K.; DIXON, D.R.; IVANOVICI, A.; LIVINGSTONE, D.A.; LOWE, D.M.; MOORE, M.N.; STEBBING, A.R.D.; WIDDINGS, J. **The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals**. New York: Praeger, 1985.

BELLUCK, D.A.; BENJAMIN, S.L.; DAWSON, T. Groundwater contamination by atrazine and its metabolites: risk assessment, policy and legal implications. In: SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R. (eds.) **Pesticides transformation products: fate and significance in the environment**. Washington: American Chemical Society, p. 254-273, 1991.

BERNY, P.; LACHAUX, O.; BURONFOSSE, T.; MAZALLON, M.; GILLET, C. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as indicators of freshwater contamination with lindane. **Environmental Research Section A**, v. 90, p. 142-151, 2002.

BONDY, S.C.; NADERI, S. Contribution of hepatic cytochrome P450 system to the generation of reactive oxygen species. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, p. 155-159, 1994.

BORKOVIC, S.S.; SAPONJIC, J.S.; PAVLOVIC, S.Z.; BLAGOJEVIC, D.P.; MILOSEVIC, S.M.; KOVACEVIC, T.B.; RADOJICIC, R.M.; SPASIC, M.B.; ZIKIC, R.V.; SAICIC, Z.S. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 141, p. 366-374, 2005.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propagando comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 168º da Independência e 101º da República, 11 jul. 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm. Acesso em: 01.nov.2012.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei ° 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propagando comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 4 jan. 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 16 jan. 2013.

BRASIL, Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos de responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 mar. 2004. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>>. Acesso em 02. Fev. 2013.

BRASIL. Decreto-lei nº 5.981, de 6 de dezembro de 2006. Dá nova redação e inclui dispositivos ao Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propagando comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 185º da Independência e 118º

da República, 6 dez. 2006. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5981.htm#art5>. Acesso em: 16 jan. 2013.

BRINGOLF, R.B.; COPE, W.G.; MOSHER, S.; BARNHART, M.C., SHEA, D. Acute and chronic toxicity of glyphosate compounds to glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoidea* (Unionidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 10, 2007. p. 2094-2100.

BRITTON, J.C.; MORTON, B. *Corbicula* in North America: the evidence reviewed and evaluated. In: BRITTON, J.D. (ed.) **Proceedings of the First International Corbicula Symposium**. Fort Worth: Texas Christian University Research Foundation, p. 249-287, 1979.

BUCHELI, T.D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 25, p. 201-268, 1995.

BUCHLER, M.; KONIG, J.; BROM, M.; KARTENBECK, J.; SPRING, H.; HORIE, T.; KEPPLER, D. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. **Biological Chemistry**, v. 271, p. 15091-15098, 1996.

BUXTON, G.V.; GREENSTOCK, C.L.; HELMAN, W.P.; ROSS, A.B. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}/\bullet\text{O}-$) in aqueous solutions. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 17, p. 513-886, 1988.

CADENAS, E. Mechanisms of Oxygen Activation and Reactive Oxygen Species Detoxification. In: AHMAD, S. **Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology**. New York: Chapman & Hall, 1995.

CALDAS, E.; SOUZA, L.C. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de agrotóxicos da dieta brasileira. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000.

CAMEJO, G.; WALLIN, B.; ENOJÄRVI, M. Analyses of Oxidation and Antioxidants using Microtiter Plates. In: AMSTRONG, D. (Ed.). **Free radical and antioxidants protocols**. New Jersey: Humana Press, pp.377-387, 1998.

CARO, A.A.; CEDERBAUM, A.I. Role of cytochrome P450 in phospholipase A2- e arachidonic acid- mediated cytotoxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, p. 364-375, 2006.

CATALDO, D.; COLOMBO, J.C.; BOLTOVSKOY, D.; LANDONI, P. Environmental toxicity assessment in the Paraná river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles. **Environmental Pollution**, v. 112, p. 379-389, 2001.

CAVALCANTE, D.G.S.M.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research**, v. 655, p. 41-46, 2008.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. the use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, p. 201-212, 2000.

ÇAVAS, T.; KÖNEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, v. 22, n. 4, p. 263-268, 2007.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Review**, v. 59, p. 527-605, 1979.

CHAPMAN, R.N.; STRANGER, J.W. **Horticultural pesticide residues in water: a review of potential for water contamination by pesticides used in the vegetable industry in Victoria**. Melbourne: Department of Food and Agriculture, 1992. 137p.

CHEN, C.-J.; CHIN, J.E.; UEDA, K.; CLARK, D.P.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M.M.; RONINSON, I.B. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. **Cell**, v. 47, p. 381-389, 1986.

CHENG, T.C. Bivalves. In: RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F. (eds.). *Invertebrate Blood Cells 1*. London: Academic Press, p. 233-300, 1981.

COHEN, A.N.; CARLTON, J.T. Accelerating invasion rate in a highly invaded estuary. **Science**, v. 279, p. 555-558, 1998.

COLE, S.P.S.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J.H.; MACKIE, J.E.; GRANT, C.E.; ALMQUIST, K.C.; STEWART, A.J.; KURZ, E.U.; DUNCAN, A.M.V.; DEELEY, R.G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. **Science**, v. 258, p. 1650-1654, 1992.

COLE, S.P.C.; SPARKS, K.E.; FRASER, K.; LOE, D.W.; GRANT, C.E.; WILSON, G.M.; DEELEY, R.G. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. **Cancer Research**, v. 54, p. 5902-5910, 1994.

COLES, J.A.; FARLEY, S.R.; PIPE, R.K. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 22, p. 59-65, 1995.

COLOMBO, J.C.; BILOS, C.; CAMPANARO, M.; PRESA, M.J.R.; CATOGGIO, J.A. Bioaccumulation of Polychlorinated Biphenyls and Chlorinated Pesticides by the Asiatic Clam *Corbicula fluminea*: Its use as sentinel organism in the Rio de La Plata Estuary, Argentina. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 914-927, 1995.

CONAMA (2005) [Conselho Nacional do Meio Ambiente] / Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre>>. Acesso em: 05 mai. 2011.

CONNERS, D.E.; BLACK, M.C. Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in law care. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 3, 2004.

CORNWALL, R.; HOLLAND TOOMEY, B.; BARD, S.; BACON, C.; JARMAN, W.M.; EPEL, D. Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. **Aquatic Toxicology**, v. 31, p. 277-296, 1995.

COSTA, L.L.F.; SANT'ANA, E.S.; SUCHARA, E.A.; BENATO, V.S.; CARASEK, E. Determinação de herbicidas usados no cultivo de arroz arrigado na Região Sul do Estado de Santa Catarina através da SPME-GC-ECD. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 79-83, 2008.

COSTA, M.J.; MONTEIRO, D.A.; OLIVEIRA-NETO, A.L.; RANTIN, F.T. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 153-163, 2008.

COX, C. Atrazine: environmental contamination and ecological effects. **Journal of Pesticides Reform**, v. 21, p. 12 – 20, 2001.

DAVIES, K.J.A. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses : a hypothesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 9902-9907, 1986.

DE ROSA, G.; KEEM, C.L.; LEACH, R.M.; HURLEY, L.S. Regulation of SOD activity by dietary manganese. **Journal of Nutrition**, v. 110, p. 795-804, 1980.

DEN HARTOG, C.; VAN DEN BRINK, F.W.B.; VAN DER VELDE, G. Why was the invasion of the river Rhine by *Crophiom curvispinum* and *Corbicula* species so successful? **Journal of Natural History**, v. 26, p. 1121-1129, 1992.

DI GIULIO, R.T.; WASHBUM, P.C.; WENNING, R.J.; WINSTON, G.W.; JEWELL, C.S. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 8, p. 1103-1123, 1989.

DI GIULIO, R.T.; BENSON, W.H.; SANDERS, B.M.; VAN VELP, P.A. Biochemical mechanism, adaptation and toxicity. In: RANG, G. (ed.) **Fundamental of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. London: Taylor and Francis, 1995.

DOYOTTE, A.; COSSU, C.; JACQUIN, M-C.; BABUT, M.; VASSEUR, P. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. **Aquatic Toxicology**, v. 39, p. 93-110, 1997.

EATON, D.L.; GILBERT, S.G. General Principles of Toxicology In: CASARRET, L.; KLAASSEN, C.D. **CASARETT e DOULL'S Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 7. ed., United States of America: Mc Graw Hill p.17, 2008. 1293 p.

EDWARDS, R.; DIXON, D.P.; WALBOT, V. Plant glutathione-S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 193-198, 2000.

EGGENS, M.L.; GALGANI, F. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with fluorescence plate-reader. **Marine Environmental Research**, v. 33, p. 213-221, 1992.

EISLER, R. Atrazine hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. **Biological Report**, v. 85, 1989.

EMBRAPA (2003) [Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária]. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2003**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/control.htm>>. Acesso em: 24 maio 2010.

EPA [U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY]. **Pesticides industry sales and usage, 1992 and 1993 market estimates**. EPA 733-K-94-001. Washington D.C., 1994

ESTERBAUER, H.; ZOLLNER, H.; SCHAUR, R.J. Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation, **ISI Atlas of Science: Biochemistry**, v. 1, p. 311-315, 1988.

ESTERBAUER, H.; ECKL, P.; ORTNER, A. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. **Mutation Research: Reviews in Genetic Toxicology**, v. 238, p. 223-233, 1990.

EUFEMIA, N.A.; EPEL, D. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. **Aquatic Toxicology**, v. 49, p. 89-100, 2000.

FARRINGTON, J.W. Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms. **Environmental Health Perspectives**, v. 90, p. 75-84, 1991.

FAUST, M.; ALTENBURGER, R.; BACKHAUS, T.; BLANCK, H.; BODECKER, W.; GRAMATICA, P.; HAMER, V.; SCHOLTZE, M.; VIGHI, M.; GRIMME, L.H. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. **Aquatic Toxicology**, v. 56, p. 13-32, 2003.

FEDATO R.P.; SIMONATO, J.D.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. **Mutation Research: Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis**, v. 700, p. 80-85, 2010.

FITZPATRICK, P.J.; CHEEHAM, D. Separation of multiple forms of glutathione S-transferase from the Blue Mussel *Mytilus edulis*. **Xenobiotica**, v. 23, p. 851-861, 1993.

FITZPATRICK, P.; KRAG, T.O.B.; HØJRUP, P.; SHEEHAN, D. Characterization of glutathione S-transferase and a related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel *Mytilus edulis*. **Biochemical Journal**, v. 305, p. 145-150, 1995.

FLOHÉ L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods in Enzymology.**, v. 105, p. 93 - 104, 1984.

FOCHT, T.; VEITENHEIMER-MENDES, I.L. Distribuição de *Neocorbicula limosa* (Maton) (Bivalvia, Corbiculidae) no Lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 18, n. 1, p. 35-43, 2001.

FOLMAR, L.C.; SANDERS, H.O.; JULIN, A.M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. . **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 8, p. 191-197, 1979.

FORNEY, D.R.; DAVIS, D.E. Effects of low concentrations of herbicides on submersed aquatic plants. **Weed Science**, v. 29, p. 677-685, 1981.

FOSTER, K.L.; MACKAY, D.; PARKERTON, T.F.; WEBSTER, E.; MILFORD, L. Five stage environmental exposure assessment strategy for mixtures: gasoline as a case study. **Environmental Science and Technology**, v. 39, p. 2711-2718, 2005.

FRANKE, C.; STUDINGER, G.; BERGER, G.; BÖHLING, S.; BRUCKMANN, U.; COHORS-FRESENBORG, D.; JÖHNCKE, U. The assessment of bioaccumulation. **Chemosphere**, v. 29, p. 1501-1514, 1994.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B.P. the comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v. 681, p. 80-92, 2009.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review Biochemistry**, v. 64, p. 97-112, 1995.

FRITZ, R.; BOL, J.; HEBLING, U.; ANGERMULLER, S.; VOLKL, A.; FAHIMI, H.D.; MUELLER, S. Compartment-dependent management of H₂O₂ by peroxisomes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, p. 1119-1129, 2007.

GALGANI, F.; CORNWALL, R.; HOLLAND TOOMEY, B.; EPEL, D.D. Interaction of the environmental xenobiotics with a multixenobiotic defense mechanism in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* from coast of California. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, p. 325-331, 1995.

GEORGE, S.G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: MALINS, D.C.; OSTRANDER, G.K. (eds.). **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. Boca Ranton: Lewis Publishers, 1994.

GIESY, J.P.; GRANEY, R.L. Recent development in and intercomparisons of acute and chronic bioassays. **Hydrobiologia**, v.188/189, p. 21-60, 1989.

GIESY, J.P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K.R. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. **Reviews of Environmental Contamination & Toxicology**, v. 167, p. 35-120, 2000.

GILLILAND, G.L. Glutathione proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 3, p. 875-884, 1993.

GOLDBERG, E.D. The mussel watch – a first step in global marine monitoring. **Marine Pollution Bulletin**, v. 6, p. 111- , 1975.

GOLDBERG, E.D.; BERTINE, K.K. Beyond the mussel watch – news directions for monitoring marine pollution. **Science of the Total Environment**, v. 247, p. 165-174, 2000.

GONTIJO, A.M.M.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: SALVADORI, D.M.; MARQUES, E.K. (Org.) **Mutagênese Ambiental**. Ulbra, Canoas, pp. 173-200, 2003.

GOSSIAUX, D.C.; LANDRUM, P.F.; FISHER, S.W. Effect of temperature on the accumulative kinetics of PAHs and PCBs in the Zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. **Journal of Great Lakes Research**, v. 22, n, 2, p. 379-388, 1996.

GRAYMORE, M.; STAGNITTI, F.; ALLINSON, G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. **Environmental International Journal**, v. 26, p.483–495, 2001.

GROSVICK, B.E.; JONSSON, H.; RODRÍGUEZ-ORTEGA, M.J.; ROEPSTORFF, P.; GOKSOYR, A. CYP1A-immunopositive proteins in bivalves identified as cytoskeletal and major vault proteins. **Aquatic Toxicology**, v. 79, p. 334-340, 2006.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTERRIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, UK: Clarenton Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press, 3. ed., 936p, 1999.

HARTL, M.G.J.; COUGHLAN, B.M.; SHEEHAN, D.; MOTHERSILL, C.; VAN PELT, F.N.A.M.; O'REILLY, S.J.; HEFFRON, J.J.A.; O'HALLORAN, J.; O'BRIEN, N.M. Implications of seasonal primind and reproductive activity on the interpretation of Comet assay derived from the clam, *Tapes semidecussatus* Reeves, 1864, exposed to contaminated sediments. **Marine Environmental Research**, v. 57, p. 295-310, 2004.

HAYES, A.W. **Principles and Methods of Toxicology**, 4. ed. Philadelphia: Taylor HAYES, J.D.; PULFORD, D.J. The glutathione-S-transferase supergene Family: regulation of GST and contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemitry and Molecular Biology**, v. 30, p. 445- , 1995.

HAYES, J.D.; WOLF, C.R. In: SIES, H.; KETTERER, B. (Eds.) In **Glutathion Conjugation: Mechanism and Biological Significances**. Londres: Academic Press, p. 315-355, 1988.

HAYO, M.G.; WERF, V. Assessing the impact of pesticides on the environment. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 60, p. 81-96, 1990.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (ed.) **Functional metabolism: regulation and adaptation**. New York: John Wiley & Sons, 2004. p. 319-368.

HODGSON, E.; GOLDSTEIN, J.A. Metabolism of toxicants: phase I reactions and pharmacogenetics. In: Hodgson, E.; Smart, R.C. (eds.) **Introduction to biochemical toxicology**. 3ed. New York: Wiley-Interscience, 2001. p. 67-113.

HOLECK, K.T., MILLS, E.L., MACISAAC, H.J., DOCHODA, M.R., COLAUTTI, R.I., RICCIARDI, A. Bridging troubled waters: biological invasions, transoceanic shipping, and the Laurentian Great Lakes. **BioScience**, v. 54, p. 919-929, 2004.

HOPKINS, J.; TUDHOPE, G.R. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. **Journal of Haematology**, v. 25, p. 563 – 575, 1973.

HOWARD, P.H. **Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals**, v. 3. Chelsea: Lewis, 1991.

HUANG, D.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; XIE, Z.; JI, W. Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China. **Mutation Research**, v. 629, p. 81-88, 2009.

HULL, H.M. **Herbicide Handbook of the Weed Society of America**. Geneva: W.F.Humphrey Press, 1970.

HULTBERG, M. Cysteine turnover in human cell lines is influenced by glyphosate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 19-22, 2007.

IBAMA (2010) [Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis] Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: Uma abordagem ambiental. REBELO, R.M. (coord.); VASCONCELOS, R.A.; BUYS, B.D.M.C.; REZENDE, J.A.; MORAES, K.O.C.; OLIVEIRA, R.P. Brasília: IBAMA, 2010.

IBGE [Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística]. Censo Agropecuário 2006. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro, 2006.

IMLAY, J.A. Pathways of oxidative damage. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 395-418, 2003.

INZA, B.; RIBEYRE, F.; MAURY-BRACHET, R.; BOUDOU, A. Tissue distribution in inorganic mercury, methyl mercury and cadmium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to the contamination levels of the water column and sediment. **Chemosphere**, v. 35, p. 2817-2836, 1997.

ISHIKAWA, T. ATP-dependent glutathione-S-conjugate export pump. **Trends in Biochemical Science**, v. 17, p. 463-468, 1992.

ITUARTE, C.F. Aspectos biológicos de las poblaciones de *Corbicula largillierii* Philippi (Mollusca Pellecypoda) em el Rio de La Plata. Ver. Mus. La Plata Secc. Zool, v. 13, n. 143, p. 231-247, 1984.

JACHETTA, J.J.; RADOSEVICH, S.R. Enhanced degradation of corn by (*Zea mays*). **Weed Science**, v. 29, p. 37-44, 1981 JOSEPH et al., 1997.

JOTTI, A.; MAIORINO, M.; PARACHINNI, L.; PICCININI, F.; URSINI, F. Protective effect of dietary selenium supplementation on delayed cardiotoxicity of adriamycin in rat: is PHGPx but not GPx involved? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 16, p. 283-288, 1994.

JOVELL, R.J.; MACARIO, A.J; CONWAY DE MACARIO, E. ABC transporters in Archaea-two genes encoding homologs of the nucleotide-binding components in the methanogen *Methanosarcina mazei* S-6. **Gene**, v. 174, p. 281-284, 1996.

KAPLOWITZ, N.; FERNÁNDEZ-CHECA, J.C.; KANNAN, R.; GARCIA-RUIZ, C.; OOKHTENS, M.; YI, J.R. GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. **Biological Chemistry Hoppe Seyler**, v. 377, p. 267-273, 1996.

KELLY, S.A.; HAVRILLA, C.M.; BRADY, T.C.; ABRAMO, K.H.; LEVIN, E.D. Oxidative stress: established mammalian and emerging piscine model systems. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, p. 375-384, 1998.

KENNEDY, V.S.; FULLER, S.C.; LUTZ, R.A. Shell and hinge development of young *Corbicula fluminea* (Müller) (Bivalvia: Corbiculidae). **American Malacological Bulletin**, v. 8, n. 2, p. 107-111, 1991.

KEPLER, C. **Expression of multixenobiotic resistance proteins and total protein in the gills of the oyster, *Crassostrea virginica***. Masters Thesis. Department of biology, University of Charleston, South Carolina, Charleston, SC, 1997.

KEPLER, C.; RINGWOOD, A.H. Expression of P-glycoprotein in southeastern oysters, *Crassostrea virginica*. **Marine Environmental Research**, v.52, p. 81-96, 2001.

KHAN, S.U. Kinetics of hydrolysis of atrazine in aqueous fulvic acid solution. **Pesticides Science**, v. 9, p. 39-43, 1978.

KIM, Y.; HYUN, C. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, p. 288-297, 2006.

KÖNIG, J.; ROST, D.; CUI, Y.; KEPLER, D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. **Hepatology**, v. 29, p. 1156-1163, 1999.

KOOL, M.; De HAAS, M.; SCHEFFER, G.L.; SCHEPER, R.J.; VAN EIJK, M.J.T.; JUIJN, J.A.; BAAS, F.; BORST, P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4 and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. **Cancer Research**, v. 57, p. 3537-3547, 1997.

KOOL, M.; VAN DER LINDEN, M.; DE HAAS, M.; BAAS, F.; BORST, P. Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. **Cancer Research**, v. 59, p. 175- 182, 1999.

KOONIN, E.V.; MUSHEGIAN, A.R.; GALPERIN, M.Y.; WALKER, D.R. Comparison of archael and bacterial genomes-computer analysis of protein sequences predicts novel functions and suggests a chimeric origin for the archael. **Molecular Microbiology**, v. 25, p. 619-637, 1997.

KORNEK, G.; RADERER, M.; SCHENK, T.; PIDLICH, J.; SCHULZ, F.; GLOBITS, S.; TETZNER, C.; SCHEITHAUER, W. Phase I/II trial of dexverapamil, epirubicin and granulocyte macrophage-colony stimulating factor in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma. **Cancer**, v. 76, p. 1356-1362, 1995.

KORNIUSHIN, A.V.; GLAUBRECHT, M. Novel reproductive models in freshwater clams: brooding and larval morphology in Southeast Asian taxa of *Corbicula* (Mollusca, Bivalvia, Corbiculidae). **Acta Zoologica**, v. 84, p. 293-315, 2003.

KURELEC, B. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organism. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, p. 23-43, 1992.

KURELEC, B.; PIVCEVIC, B. Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 19, p. 291-302, 1991.

KURELEC, B. ; WALDMANN, P. ; ZAHN, R.K. The modulation of protective effects of the multixenobiotic resistance mechanism in a clam *Corbicula fluminea*. **Marine Environmental Research**, v. 42, p. 383-387, 1996.

KURELEC, B.; BRITVIC, S.; PIVCEVIC, B.; SMITAL, T. Fragility of multixenobiotic resistance in aquatic organisms enhances the complexity of risk assessment. **Marine Environmental Research**, v. 46, p. 415-419, 1998.

KURELEC, B., SMITAL, T., PIVCEVIC, B., EUFEMIA, N., EPEL, D. Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein and Chemosensitizers. **Ecotoxicology**, v.9, p.307-327, 2000.

KUTHAN, H.; ULLRICH, V. Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P450 monooxygenase system. **European Journal of Biochemistry**, v. 126, p. 583-588, 1982.

LE GALL, G.; BACHERE, E.; MIALHE, E. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific Rickettsiales-like organisms. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 11, p. 181-186, 1991.

LEMAIRE, P.; LIVINGSTONE, D.T. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interations in marine organism, in particular the flounder *Platichthys flesus* and mussel *Mytillus edulis*. **Trends in Comparative Biochemistry & Physiology**, v. 1, p. 1119-1150, 1993.

LEMIERE, S.; COSSU-LEGUILLE, C.; BISPO, A.; JOURDAIN, M.J.; LANHERS, M.C.; BURNEL, D.; VASSEUR, P. DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis

(Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by “Erika” oil-spill. **Mutation Research**, v.581, p. 11-21, 2005.

LOE, D.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P.C. Characterization of vincristine transport by the Mr 190 000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. **Cancer Research**, v. 58, p. 5130-5136, 1998.

LEONARD, R.A.; Movement of pesticides into surface water. In: CHENG, H.H. (ed.) **Pesticides in the soil environment: Process, Impacts and Modeling**. Madison: Soil Science Society of America, p. 303-349, 1990.

LI, G.C.; FELDBECK, G.T. Atrazine Hydrolysis as catalysed by humic acids. **Soil Science**, v. 114, p. 201-109, 1972.

LIGHT, T.; MARCHETTI, M.P. Distinguishing between invasions and habitat changes as drivers of diversity loss among California’s freshwater fishes. **Conservation Biology**, v.21, p. 434-446, 2007.

LIVINGSTONE, D.R. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: GILLES, R. (ed.) **Advances in Comparative and Environmental Physiology**, v. 7. Berlin: Springer, 1991.

LIVINGSTONE, D.R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in aquatic environment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 57, p. 195-211, 1993.

LIVINGSTONE, D.R. The fate of the organics xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 120, p. 43-49, 1998.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 656-666, 2001

LIVINGSTONE, D.R.; KIRCHIN, M.A. WISEMAN, A. Cytochrome P450 and oxidative metabolism in mollusks. **Xenobiotica**, v. 19, p. 1041-1042, 1989.

LIVINGSTONE, D.R.; FÖRLIN, L.; GEORGE, S. Molecular biomarkers and toxic consequences of impact by organic pollution in aquatic organisms. In: SUTCLIFFE, D.W. (ed.) **Water quality and stress indicators in marine and freshwater systems: linking levels of organization**. UK: Freshwater Biological Association, 1994.

LIVINGSTONE, D.R., NASCI, C., MONTSERRAT, S., DA ROS, C., O'HARA, S., PETERS, L., FOSSATO, V., WOOTTON, A., GOLDFARB, P. Apparent induction of a cytochrome P450 with immunochemical similarities to CYP1A in digestive gland of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) with exposure to 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl and Arochlor 1254. **Aquatic Toxicology**, v. 38, p. 205–224, 1997.

LUEDEKING, A.; KOEHLER, A. Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v. 69, p. 1-10, 2004.

MACKIE, G.L. Adaptations of Pisidiidae (Heterodonta: Corbiculacea) to freshwater habitats. *Am. Malacol. Bull.*, Special Edition, v. 2, p. 113-124, 1986.

MADHUN, Y.A.; FREED, V.H. Impact of pesticides on the environment. In: CHENG, H.H. (ed.) **Pesticides in the Soil Environment: Processes, impacts and modeling**. Book Series n. 2, Madison, Wis: Soil Science Society of America, p. 429-466, 1990.

MAIORINO, M. Probing the presumed catalytic triad of Se-containing peroxidases by mutational analysis of PHGPx. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 376, p. 651- , 1995.

MANDUZIO, H.; MONSINJON, T.; GALAP, C.; LEBOULENGER, F.; ROCHER, B. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione-S-transferase. **Aquatic Toxicology**, v. 70, p. 83-93, 2004.

MANDUZIO, H.; ROCHER, B.; DURANT, F.; GALAP, C.; LEBOULENGER, F. The point about oxidative stress in molluscs. **Invertebrate Survival Journal**, v. 2, p. 91-104, 2005.

MAPA (2010) [Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento]. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT). Disponível em: <http://www.agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 19.mai.2010.

MARQUIS, R.E. Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 198-207 , 1995.

MARTINS, D.S.; VEITENHEIMER-MENDES, I.L.; FACCIONI-HEUSER, M.C. Morphological aspects and incubation in three species of *Corbicula Mühlfeld*, in Guaíba Lake, Rio Grande do Sul, Brazil (Bivalvia, Corbiculidae). **Biota Neotropica**, n. 2, v. 6, 2006.

MASUDA, S.; DEGUCHI, Y.; MASUDA, Y.; WATANABE, T.; NUKAYA, H.; TERAU, Y.; TAKAMURA, T.; WAKABAYACHI, K.; KINAE, N. Genotoxicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitro-biphenyl (ADDB) in gold fish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research**, v. 560, p. 33-40, 2004.

McCARTHY, J.F.; HALBROOK, R.S.; SHUGART, L.R. **Conceptual strategy for design, implementation and validation of a biomarker-based biomonitoring capability**. Tennessee: Oak Ridge National Laboratory, 1991.

McCORD, J.M.; FRIDOVIXH, I. Superoxide dismutase: An enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

McMAHON, R.F. Invasive characteristics of the fresh-water bivalve *Corbicula fluminea*. Capítulo 3. In: CLAUDI, R.; LEACH, J.H. (eds.) **Nonindigenous Freshwater Organisms: Vectors, Biology and Impacts**. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 315-343, 1999.

- McMAHON, R.F. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: R selection versus resistance. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 59, p. 1235-1244, 2002.
- MEIJER, T.; PREECE, R.C. A review of the occurrence of *Corbicula* in the Pleistocene of North-West Europe. **Geology in Mijnbouw/ Netherlands Journal of Geosciences**, v. 79 (2/3), p. 241-255, 2000.
- MEISTER, R.T. **Farm Chemicals Handbook**. Willoughby: Meister Publishing Company, 1981.
- MILLER, D.M.; BUETTNER, G.R.; AUST, S.D. Transition metal as catalysts of "autoxidation" reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, p. 85-108, 1990.
- MINIER, C.; AKCHA, F.; GALGANI, F. P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 106B, p. 1029-1036, 1993.
- MINIER, C.; BORGHI, V.; MORRE, M.N.; PORTE, C. Seasonal variation of the MXR and stress protein expression in the common mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 50, p. 167-176, 2000.
- MINIER, C.; ABARNOU, A.; JAOUEN-MADOULET, A.; LE GUELLEC, A.M.; TUTUNDJIAN, R.; BOCQUENÉ, G.; LÉBOULENGER, F. A pollution monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, p. 112-119, 2006.
- MOORE, M.N. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. **Marine Ecology Progress Series**, v. 46, p. 357-368, 1988.
- MOREIRO, S.M.; GUILHMINO, L. the use of *Mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest Portuguese coast. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 105, p. 309-325, 2005.
- MORTON, B. Some aspects of the population structure and sexual strategy of *Corbicula* cf. *fluminalis* (Bivalvia: Corbiculacea) from the Pearl River, peoples' Republic of China. **J. Mollusca Stud.**, v. 48, p. 1-23, 1982.
- MORTON, B. The reproductive strategy of the mangrove bivalve *Polymesoda (Geloina) erosa* (Bivalvia: Corbiculoidea) in Hong Kong. **Malacol. Ver.**, v. 18, p. 83-89, 1985.
- MORTON, B. *Corbicula* in Asia – an updated synthesis. **American Malacological Bulletin, Special Edition**, v. 2, p. 113-124, 1986.
- MORTON, B. Do the Bivalvia demonstrate environment-specific sexual strategies? A Hong-Kong model. **J. Zool.**, v. 223, p. 131-142, 1991.

MOUTON, J. Life cycle and populations dynamics of the Asian clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) in the Rhone River at Creys-Malville (France). **Archiv für Hydrobiologie**, v. 151, n. 4, p. 571-589, 2001.

MYRNES, B.; NILSEN, I.W. Glutathione S-transferase from the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*): Isolation and partial characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 144, p. 403-407, 2006.

NARBONNE, J.F.; DJOMO, J.E.; RIBEIRA, D.; FERRIER, V.; GARRIGUES, P. Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons absorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 42, p. 1-8, 1999.

NEWMAN, M.C.; CLEMENTS, W.H. **Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment**. New York: CRC Press, 2008.

NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council, Biological markers in environmental health research. **Environmental Health Perspectives**, v. 74, p. 3-9, 1987.

OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U. Molluscs as bioindicators. In: MARKET, B.A.; BREURE, A.M.; ZECHMEISTER, H.G. (eds.) **Bioindicators and biomonitoring**. Elsevier Science, 2003. p. 577-635.

OGA, S.; FARSKY, S.H.P.; MARCOURAKIS, T. Toxicocinética. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos da Toxicologia**, 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

ORBEA, A.; MAROGOMEZ, I.; FERNANDEZ, C.; TARAZONA, J.V.; CANCIO, I.; CAJARAVILLE, M.P. Structure of peroxisomes and activity of the marker enzyme catalase in digestive epithelial cells in relation to PAH content of mussels from two basque estuaries (Bay of Biscay): seasonal and site-specific variations. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 36, p. 158-166, 1999.

PAL, R.; AHMED, T.; KUMAR, V.; SUKE, S.G.; RAY, A.; BANERJEE, B.D. Protective effects of different antioxidants against endosulfan-induced oxidative stress and immunotoxicity in albino rats. **Indian Journal of Environmental Biology**, v. 47, p. 723-729, 2009.

PAOLIELLO, M.M.B.; DA SILVA, E.S. Toxicodinâmica. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (coordenadores). **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003.

PARK, J-K.; Ó FOIGHIL, D. Sphaeriid and Corbiculid clams represent separate heterodont bivalve radiations into freshwater environments. *Mol. Phylogenet. Evol.*, v. 14, n. 1, p. 75-88, 2000.

PARODIZ, J.J.; HENNINGS, L. The Neocorbicula (Mollusca, Pelecypoda) of the Parana-Uruguay basin, South America, *Ann. Carnegie Mus.*, v. 38, n. 3, p. 69-95, 1965.

PASTOR, N.; WEINSTEIN, H.; JAMISON, E.; BRENOWITZ, M.A. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. **Journal of Molecular Biology**, v. 304, p. 55-68, 2000.

PAYNE, N.; FENG, J.; REYNOLDS, P. **Off-target deposit measurements and buffer zones required around water for various aerial applications of glyphosate**. Ottawa: Minister of Supply and Services, 1987.

PEAKALL, D.W. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicology and Ecotoxicology News**, v. 1, p. 55-60, 1994.

PENNEC, G.L.; PENNEC, M.L. Induction of glutathione-S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L.): Application of a new cellular model in biomonitoring studies. **Aquatic Toxicology**, v. 64, p. 131-142, 2003

PIPE, R. K. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. **Cell and Tissue Research**, v. 261, p. 261-268, 1990a.

PIPE, R. K. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. **Histochemical Journal**, v. 22, p. 595-603, 1990b.

PIPE, R.K. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 16, p. 111-122, 1992.

PIPE, R. K., PORTE, C. & LIVINGSTONE, D. R. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 3, p. 221-233, 1993.

PIPE, R.K.; COLES, J.A. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 5, p. 581-595, 1995.

PORTE, C., LEMAIRE, P., PETERS, L.D., LIVINGSTONE, D.R. Partial purification and properties of cytochrome P450 from digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. **Marine Environmental Research**, v. 39, p. 27-31, 1995.

POSSAMAI, F.P.; FORTUNATO, J.J.; FEIER, G.; AGOSTINHO, F.R.; QUEVEDO, J.; WILHELM FILHO, D.; DAL-PIZZO, F. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 198-204, 2007.

PRYOR, W.A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Annual Review of Physiology**, v. 48, p. 657-667, 1986.

RAJAGOPAL, S.; VAN DER VELDE, G.; BIJ DE VAATE, M. Reproductive biology of the Asian clams *Corbicula fluminalis* e *Corbicula fluminea* in the river Rhine. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 149, n. 3, p. 403-420, 2000.

RAND, G.M.; WELLS, P.G.; McCARTY, L.S. Introduction to aquatic toxicology. Cap. 1. In: RAND, G.M. (Ed.) **Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, Environmental Fates and Risk Assessment**. 2.ed. United States of America: Taylor Francis, 1995.

REIDI, T.J.; MURTHY, M.R.N.; SICIGNANO, A. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2,5Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, p. 4767-4771, 1981.

RENWRANTZ, L. (1981). Internal defence system of *Mytilus edulis*. In: STEFANO, G.B. (ed.) **Studies in Neuroscience, Neurobiology of *Mytilus edulis***, pp. 256-275. Manchester: Manchester University Press, 1981.

RICCIARDI, A., RASMUSSEN, J.B. Extinction rates of North American freshwater fauna. **Conservation Biology**, v. 13, p. 1220-1222, 1999.

ROBSON, C.; WRIGHT, K.A.; TWENTYMAN, P.R.; LAMBERT, P.A.; GRIFFIN, R.J. Chemical synthesis and biological properties of novel fluorescent antifolates in P-gp and MRP- overexpressing tumor cell lines. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, p. 807-816, 1998.

ROCHA, C.T.; SOUZA, M.M. The influence of Lead on different proteins in gill cells from the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*, from defense to repair biomarkers. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, n. 1, p. 56-67, 2012.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. cap 12 Mollusca. 7.ed. São Paulo: Roca, 2005.

SAURIN, W.; HOFNUNG, M.; DASSA, E. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, p. 22-41.

SCHAUB, T.P.; KARTENBECK, J.; KÖNIG, J.; VOGEL, O.; WITZGALL, R.; KRIZ, W.; KEPLER, D. Expression of the conjugate export pump encoded by the MRP2 gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 8, p. 1213-1221, 1997.

SCHLENK, D. A comparison of endogenous and exogenous substrates of the flavin-containing monooxygenases in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 26, p. 157-162, 1993.

SCHRAB, G. E.; BROWN, K.W., DONELLY, K.C., Acute and genetic toxicity of municipal landfill leachate. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 69, p. 99-112, 1993.

SCHULTZ, G.E. Gene duplication in glutathione reductase. **Journal of Molecular Biology**, v. 138, p. 335-347, 1980.

SEAB (2012) [Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná] Disponível em: <<http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/bulas.asp>>. Acesso em: 01.nov.2012.

SEVANIAN, A.; NORDENBRAND, K.; KIM, E.; ERNSTERM L.; HOCHSTEIN, P. Microsomal lipid peroxidation: The role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 8, p. 145-152, 1990.

SHABANA, E.F. Use of batch assays to assess the toxicity of atrazine to some selected cyanobacteria. I. Influence of atrazine on the growth, pigmentation and carbohydrate contents of *Aulosira fertilissima*, *Anabaena oryzae*, *Nostoc Muscorum* and *Tolypothyrix tenuis*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 2, p. 113-119, 1987.

SHATZMAN, A.R.; KOSMAN, D.J. Biosynthesis and cellular distribution of the two SODs of *Dactylium dendroides*. **Journal of Bacteriology**, v. 137, p. 313-320, 1979.

SHEEHAM, D.; POWER, A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 123, p. 193-199, 1999.

SHOULTS-WILSON, W.A.; PETERSON, J.T.; UNRINE, J.M.; RICHARK, J.; BLACK, M.C. The Asian clam *Corbicula fluminea* as a biomonitor of trace element contamination: Accounting for different sources of variation using an hierarchical linear model. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, p. 2224-2223, 2009.

SIE, H. Strategies of antioxidant defense. Review. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SIJIM, D.T.H.M.; OPPERHUIZEN, A. Biotransformation of organic chemicals by fish: enzyme activities and reactions. In: HUTZINGER, O. (ed.) **Handbook of Environmental Chemistry Reactions and Processes**, v. 2E. Berlin: Springer, p. 163-235, 1989.

SILVA, M.F.O.; COSTA, L.M. **A indústria de agrotóxicos**. BNDES Setorial, v. 35, p. 233-276. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3507.pdf>. Acesso em: 01.nov.2012.

SINGH, M.; SANDHIR, R.; KIRAN, R. Oxidative stress induced by atrazine in rat erythrocytes: mitigating effect of vitamin E. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 20, p. 119-126, 2010.

SIU, W.H.L.; CAO, J.; JACK, R.W.; WU, R.S.S.; RICHARDSON, B.J., XU, L.; LAM, P.K.S. Application of the comet and micronuclei assays to the detection of B[a] P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 381-392, 2004.

SMITAL, T.; KURELEC, B. The activity of multixenobiotic resistance mechanism determined by rhodamine B-efflux method as a biomarker of exposure. **Marine Environmental Research**, v. 46, p. 443-337, 1998.

SMITH, M.T.; EVANS, C.G.; THOR, H.; ORRENIUS, S.; Quinone-induced oxidative injury to cells and tissues. In: SIES, H. (ed.) **Oxidative stress**. New York: Academic Press, 1985.

SOLOMON, K.R.; BAKER, D.B.; RICHARDS, R.P.; DIXON, K.R.; KLAINE, S.J.; LA POINT, T.W.; KENDALL, R.J.; WEISSKOFF, C.P.; GIDDINGS, J.M.; GIESY, J.P.; HALL, L.W.; WILLIAMS, W.M. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 31-76, 1996.

SOUSA, R.; NOGUEIRA, A.J.A.; GASPAR, M.B.; ANTUNES, C.; GUILHERMINO, L. Growth and extremely high production of the non-indigenous invasive species *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): Possible implications for ecosystem functioning. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. v. 80, p. 289-295, 2008a.

SOUSA, R.; RUFINO, M.; ANTUNES, C.; GUILHERMINO, L. Abiotic impacts on spatial and temporal distribution of *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in the River Minho Estuary, Portugal. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**. v. 18, p. 98-110, 2008b.

SOUSA, R.; ANTUNES, C.; GUILHERMINO, L. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. **Annales de Limnologie – International Journal of Limnology**. v. 44, p. 85-94, 2008c.

STADTMAN, E.R. Protein Oxidation and aging. **Science**, v. 257, p. 1220-1224, 1992.

STEGEMAN, J.J.; HAHN, M.E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: MALINS, D.C.; OSTRANDER, G.K. (eds.) **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994.

TERRA, F.H.B.; PELAEZ, V.M. A evolução da indústria de agrotóxicos no Brasil de 2001 a 2007: a expansão da agricultura e as modificações na lei de agrotóxicos. Curitiba: UFPR, 2009. Disponível em: < <http://www.sober.org.br/palestra/9/755.pdf> >. Acesso em: 31/10/2012.

THANNICKAL, V.J. Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 40, p. 507-510, 2009.

THOM, R.; DIXON, D.P.; EDWARDS, R.; COLE, D.L.; LAPHORN, A.J. The structure of a zeta class glutathione-S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterization of a GST with a novel active-site tyrosine catabolism. **Journal of Molecular Biology**, v. 308, p. 949-962, 2001.

TOOMEY, B.H.; EPEL, D. Multixenobiotic Resistance in *Urechis caupo* Embryos: Protection from Environmental Toxins. **The Biological Bulletin**, v. 185, p. 355-364, 1993.

TORRES, M.A., TESTA, C.P., GASPARI, C., MASUTTI, M.B., PANITZ, C.M.N., CURIPEDROSA, R., DE ALMEIDA, E.A., DI MASCIO, P., FILHO, D.W. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 923-932, 2002.

TSUI, M.T.K.; CHU, L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v. 52, p.1189-1197, 2003.

TSUJI, Y. Regulation and Polymorphisms in Phase II Genes. In: SMART, R.C.; HODGSON, E., **Molecular and Biochemical Toxicology**, 4.ed. John Wiley & Sons: New Jersey, 2008.

TUTUNDJIAN, R.; MINIER, C. Effect of temperature on the expression of P-glycoprotein in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. **Journal of Thermal Biology**, v. 32, p. 171-177, 2007.

UCHIDA, K.; KAWAKISHI, S. Identification of oxidized histidine generated at the active site of CuZnSOD exposed to H₂O₂. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 2405-2410, 1994.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medical Chemistry**, v. 12, p. 1161-1208, 2005

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VAN VELP, P.A. Absorption and metabolism of dietary xenobiotics by the intestine of fish. **Reviews in Aquatic Science**, v. 2, p. 185-203, 1990.

VERMEULEN, N.P.E. Role of metabolism in chemical toxicity. In: IOANNIDES, C. (Ed.), *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. Boca Raton: CRC Press, 1996.

VIARENGO, A.; CANESI, L.; PERTICA, M.; LIVINGSTONE, D.R. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 100C, n. 1/2 p. 187-190, 1991.

XAVIER, K.B.; MARTINS, L.O.; PEIST, R.; KOSSMANN, M.; BOOS, W.; SANTOS, H. High-affinity maltose/trehalose transport system in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 4773-4777, 1996.

WALDMANN, P.; PIVCEVIC, B.; MÜLLER, W.E.G.; ZAHN, R.K.; KURELEC, B. Increased genotoxicity of acetyl-amino-fluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the freshwater clam *Corbicula fluminea*. **Mutation Research**, v. 342, p. 113-123, 1995

WALKER, C.H.; LIVINGSTONE, D.R. (eds.) **Persistent Pollutants in Marine Ecosystems**. Oxford: Pergamon Press, 1992.

WARD, J.F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 35, p. 95-125, 1988.

WAY, C.M., HORNBAUGH, D.J., MILLER-WAY, C.A., PAYNE, B.S., MILLER, A.C. Dynamics of filter feeding in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 68, p. 115-120, 1990.

WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155. Geneva: World Health Organization, 1993.

WHO [World Health Organization] Glyphosate. Environment health criteria no 159. 1994.

WILHELM FILHO, D.; DE GIULIVI, C.; BOVERIS, A. Antioxidant defences in marine fish I. teleosts. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 106, p. 409-413, 1993.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; MARCON, J.L.; FRAGA, C.G.; BOVERIS, A; Comparative antioxidante defences in vertebrates – emphasis on fish and mammals. **Trends in Comparative Biochemistry & Physiology**, v. 7, p. 33-45, 2000.

WINSTON, G.W.; DI GIULIO, R.T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 19, p. 137-161, 1991.

WOODBURN, A.T. Glyphosate: Production, pricing, and use worldwide. **Pest Management Science**, v. 56, p. 309-312, 2000.

ZAMAN, G.J.R.; LANKELMA, J.; VAN TELLINGEN, O.; BEIJNEN, J.; DEKKER, H.; PAULUSMA, C.; OUDE ELFERINK, R.P.J.; BAAS, F.; BORST, P. Role of glutathione in the export of compounds from cells by multidrug-resistance-associated protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, v. 92, p. 7690-7694, 1995.

ZANGAR, R.C.; DAVYDOV, D.R.; VERMA, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 199, p. 316-331, 2004.

6. MANUSCRITO I

Efeitos agudos dos herbicidas Roundup[®] e atrazina em diferentes tecidos do bivalve *Corbicula fluminea*

Kelly Cristina dos Santos e Cláudia Bueno dos Reis Martinez

**Efeitos agudos dos herbicidas Roundup[®] e atrazina em diferentes tecidos do bivalve
*Corbicula fluminea***

Kelly Cristina dos Santos e Cláudia Bueno dos Reis Martinez*

Laboratório de Ecofisiologia Animal - Departamento de Ciências Fisiológicas

Universidade Estadual de Londrina. Paraná. Brasil.

*Autor para correspondência. Tel.: +55-43-33714650; +55-43-33714207;

E-mail: cbueno@uel.br (C. B. R. Martinez).

RESUMO

Biomarcadores bioquímicos e genotóxicos foram empregados para avaliar os efeitos agudos (6 e 24 h) dos herbicidas atrazina (ATZ) e Roundup[®] (RD) nos mecanismos de biotransformação, defesas antioxidantes e ocorrência de danos oxidativos em brânquia (BRQ) e glândula digestiva (GL) e danos ao DNA de hemócitos de *Corbicula fluminea*, expostos às concentrações de 2 e 10 ppb de ATZ e 2 e 10 ppm de RD. As principais alterações promovidas pela ATZ foram inibição da catalase (CAT), etoxirresorufina-*O*-desetilase (EROD) branquial, mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) e aumento de glutatona reduzida (GSH), EROD glandular, superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e danos oxidativos no DNA. Já para RD, foi observado aumento da SOD e GPx e inibição do MXR, CAT e GR. Diferentemente da ATZ, RD promoveu mais alterações quando na maior concentração e em tempo de exposição mais curto (6 h), sendo que para ambos os herbicidas a GL se apresentou como o principal alvo de interferência dos contaminantes. Com exceção da GSH e LPO, todos os demais biomarcadores se apresentaram significativamente diferentes entre os dois órgãos analisados, sendo que a BRQ é a principal fonte da EROD, MXR, SOD e GPx e a GL da GST, CAT e GR. Assim, por promover danos oxidativos ao DNA, a ATZ se apresenta potencialmente tóxica para *C. fluminea*, sendo a EROD um bom biomarcador para contaminação com este herbicida. Já o RD, embora alguns biomarcadores tenham se apresentado alterados por este herbicida, tais alterações são menos severas que as observadas para ATZ.

Palavras-chave: Biomarcadores. Biotransformação. Brânquias. Danos no DNA. Estresse oxidativo. Glândula digestiva.

Introdução

A atrazina é um herbicida pertencente ao grupo químico das triazinas e enquadra-se dentre os herbicidas mais utilizados no Brasil e no mundo, principalmente em culturas de soja, milho e cana-de-açúcar (Cox, 2001; SEAB, 2011). As propriedades da atrazina de moderadamente hidrofílica, com uma solubilidade em água de 33 mg. L^{-1} , e persistente, com uma meia-vida de 124 - 365 dias em lagoas e lagos, têm resultado em extensiva contaminação da água, com níveis superiores a 48 ug.L^{-1} , reportados após ocorrência de chuvas (Huber, 1993).

Sua alta toxicidade aos organismos aquáticos pode ser comprovada através de inúmeras alterações provenientes da atuação deste herbicida em diferentes níveis organizacionais dos animais. Este herbicida tem sido relacionado com diversas alterações em moluscos como aumento no nível de aneuploidia na ostra *Crassostrea gigas* (Bouilly et al., 2004), diminuição da permeabilidade dos lisossomos do gastrópode *Lymnaea stagnalis* (Russo et al., 2009), genotoxicidade a células do hepatopâncreas do bivalve *Pecten maximus* (Pennec e Pennec, 2001). Além destas, atrazina também promove alterações teciduais e aumento na produção de muco, as quais interferem na alimentação e respiração dos animais como o bivalve *Diplodon expansus* (Noragol et al., 2012). Pode interferir, também, em parâmetros de elevada relevância ambiental como diminuição da atividade locomotora do gastrópoda *Potamopyrgus antipodarum* (Gerard e Poullain, 2005), diminuição do grau de agregação entre invertebrados sedentários como *Elipitio complanata* (Flynn e Spellman, 2009), mudanças de fecundidade de *Lymnaea palustris* (Baturó, 1995) e no número e massa de ovos produzidos (Lagadic et al., 2007).

Outro herbicida de grande relevância quando se trata de poluição de recursos hídricos é o Roundup[®]. O glifosato é o ingrediente ativo com ação herbicida mais amplamente utilizado em todo o mundo (Woodburn, 2000; Hultberg, 2007), e é uma das formulações mais comuns do glifosato, consistindo de um sal amino-isopropil e um surfactante amino polioxietileno (POEA) (Giesy et al., 2000). Este herbicida também é frequentemente aplicado em ambientes aquáticos para o controle de macrófitas aquáticas (Abdullah et al., 1995; Tsui e Chu, 2003). A meia-vida do glifosato na água é de cerca de 7 a 70 dias (Giesy et al., 2000). Já no solo esse período varia entre 30 a 90 dias (Cox, 1998). A toxicidade aguda do Roundup[®] é considerada baixa (WHO, 1994), entretanto este herbicida tem se mostrado dotado de potencial toxicidade para diferentes grupos taxonômicos de organismos aquáticos, promovendo distúrbios em diferentes níveis organizacionais e em diferentes classes de

animais. Pode promover alterações nas defesas antioxidantes anfíbios (*Rana catesbeiana*), de peixes (*Rhamdia quelen*, *Carassius auratus* e *Prochilodus lineatus*) (Costa, 2008; Ferreira et al., 2010; Lushchak et al., 2009; Modesto e Martinez, 2010), alteração em neurotransmissores, como a acetilcolinesterase, em peixes (*Prochilodus lineatus*, *Cyprinus carpio*) e anfíbios (*Rana catesbeiana*) (Cattaneo et al., 2011; Costa, 2008; Modesto e Martinez, 2010), estimulação adrenérgica em anfíbios (*Rana catesbeiana*) (Costa, 2008), inibição de enzimas de regulação iônica como a Na^+K^+ ATPase, diminuição de glicogênio, lipídios, triglicerídios, colesterol em crustáceos como *Hyaella castroi* (Dutra et al., 2011). Pode promover também danos às membranas celulares em peixes (*Prochilodus lineatus*, *Cyprinus carpio*) e malacostraca (*Hyaella castroi*) (Modesto e Martinez, 2010; Cattaneo et al., 2001; Dutra et al., 2011), bem como, alterações histopatológicas em brânquia, manto e glândula digestiva do mexilhão *Ruditapes decussatus* (El-Shenawy, 2009). Além disso, pode alterar parâmetros relacionados à manutenção da espécie no ambiente, através da diminuição de fecundidade em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como, diminuição do número de juvenis de animais, como observado para *Daphnia magna* (Papchenkova, 2009), além de promover alterações comportamentais como na atividade de abertura e fechamento das valvas de *Ruditapes decussatus* (El-Shenawy et al., 2003).

A biotransformação de xenobióticos se apresenta como o mecanismo que facilita a eliminação dos contaminantes do organismo (Van Der Oost, 2003), compreendendo três fases (Hodgson e Goldstein, 2001; Newman e Clements, 2008; Van Der Oost, 2003). Isoenzimas do citocromo P450 são de importância central no metabolismo de muitos xenobióticos e compostos endógenos de fase I, sendo que os níveis de P450 totais são normalmente mais elevados em peixes que em invertebrados (Livingstone, 1998). Em peixes, a fase I é mediada principalmente pela subfamília CYP1A (Van Der Oost, 2003), a qual também está presente em moluscos. A identificação imunológica da CYP1A tem sido extensivamente estudada nestes invertebrados, principalmente em glândula digestiva (Grosvik et al., 2006; Goksoyr et al., 1991; Livingstone et al., 1997; Porte et al., 1995), sendo que sua atividade pode ser avaliada indiretamente através da indução da atividade da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) (Torres et al., 2002). A atividade da P450 tem sido identificada em células sanguíneas, brânquia, pé e gônada de moluscos, com uma elevada concentração encontrada na glândula digestiva, embora esta concentração seja dez vezes menor que a observada no fígado de mamíferos (Livingstone et al., 1989; Livingstone, 1991). A fase II compreende as reações de conjugação do xenobiótico ou seus metabólitos com a glutatona reduzida (GSH) por atuação da glutatona-S-transferase. Muitas isoenzimas da GST têm sido purificadas e

caracterizadas em moluscos (Fitzpatrick e Sheeham, 1993; Fitzpatrick et al., 1995). Estas são usadas como biomarcadores de exposição a herbicidas em peixes (Modesto e Martinez, 2010; Peebua et al., 2007; Santos e Martinez, 2012). A fase III, também conhecida como mecanismo de resistência a multixenobiótico (MXR), está relacionada à presença proteínas transportadoras, como as glicoproteínas-P (P-gp) e proteínas de resistência a multidrogas MRPs, associadas às membranas plasmáticas. Estas representam eficientes transportadores transmembrana dependentes de ATP que atuam como uma barreira ao acúmulo de xenobióticos e seus metabólitos na célula, acelerando o processo de remoção do contaminante do interior celular (Abou-Donia et al., 2002). A observação deste mecanismo em membranas celulares de molusco (*Mytilus galloprovincialis*) levou Kurelec e Pivcevic (1991) a acreditar que este mecanismo poderia explicar a relativa alta tolerância destes organismos a contaminantes, sendo recentemente encontrado no peixe marinho (*Anoplarcus purpureus*) (Bard et al., 2000), nos moluscos *Mytilus edulis* (Luedeking e Korhler, 2004), *Corbicula fluminea* (Achard et al., 2004; Rocha e Souza, 2012; Waldmann et al., 1995) e *Dreissena polymorpha* (Smital e Kurelec, 1997).

No organismo, o metabolismo de agrotóxicos pode contribuir para a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Cadenas, 1995), como ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($\cdot OH$) (Sie, 1993). Neste sentido, defesas antioxidantes removem cataliticamente os radicais livres e outras espécies reativas (Halliwell e Gutteridge, 1999), sendo representadas pela superóxido dismutase (SOD), que acelera o processo de dismutação do $O_2^{\cdot-}$, convertendo-o a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (Aruoma, 1994; McCord e Fridovich, 1969), pela catalase (CAT), que catalisa diretamente a decomposição do H_2O_2 a O_2 e água (Chance et al., 1979), pela glutathione peroxidase (GPx), que remove o H_2O_2 através da redução deste derivado de oxigênio a H_2O , com a consequente oxidação de uma glutathione reduzida (GSH) (Chance et al., 1979), pela glutathione reductase (GR), que é responsável por manter os níveis intracelulares de glutathione reduzida (GSH) através da conversão da GSSG (Gilliland, 1993), bem como, pela ação antioxidante da própria GSH, que também atua como cofator de inúmeras rotas enzimáticas, como da GPx e GR, e de muitos outros processos metabólicos (Barhoumi et al., 1993, Gilliland, 1993).

Quando ocorre um desbalanço entre a formação e a remoção das ERO pode haver um acúmulo de biomoléculas capazes de promover danos oxidativos, instaurando-se o estresse oxidativo (Imlay, 2003), que apresenta como principais consequências a peroxidação lipídica (Aruoma, 1994) e alterações no material genético, com consequentes danos à molécula de

DNA (Paoliello e Da Silva, 2003). Neste sentido, o ensaio do cometa, que é utilizado para detecção de danos no DNA passíveis de reparo, tem se mostrado altamente adequado para estudos genotóxicos de monitoramento ambiental devido sua simplicidade e alta sensibilidade (Cavalcante et al., 2008; Frenzilli, 2009; Kim e Hyun, 2006).

Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, enzimas de biotransformação, bem como indicadores de estresse oxidativo, têm sido amplamente utilizados como biomarcadores de poluição em moluscos (Cossu et al., 1997; Livingstone et al., 1990). Estes mecanismos podem sofrer interferência de diversos fatores como sazonalidade, nutrição, tipo de órgão, tipo de tecido, diferenciando-se, até mesmo, entre células de um mesmo tecido (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Espécies sésseis de mexilhões e outros bivalves são considerados bons bioindicadores de contaminação por metais e compostos orgânicos, pois podem acumular uma série de contaminantes em seus tecidos, bem como apresentar várias alterações indicadoras de danos (O'Connor, 2002). O bivalve dulcícola *Corbicula fluminea* é uma espécie invasora, originária da Ásia, e utilizada em diversos estudos de biomonitoramento da qualidade de águas continentais como organismo biomonitor na detecção de contaminantes (Cataldo et al., 2001; Colombo et al., 1995; Shoults-Wilson et al., 2009;). Isso porque tal animal apresenta uma ampla distribuição geográfica, maturação sexual precoce, alta taxa de fecundidade, crescimento rápido, baixa capacidade de locomoção (animal sedentário) e uma alta taxa de filtração, permanecendo com as valvas abertas durante grande parte do dia (McMahon, 2002).

Assim, o presente trabalho buscou compreender os efeitos tóxicos agudos dos herbicidas atrazina e Roundup[®], por meio do uso de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos, do bivalve dulcícola *Corbicula fluminea*. Para tal, foi determinada, em brânquia e glândula digestiva, a atividade enzimática da EROD, GST e MXR, visando compreender a biotransformação destes herbicidas, da SOD, CAT, GPx, GR e concentração de GSH, para análise dos mecanismos de defesa antioxidante, e ocorrência de lipoperoxidação (LPO) e, em hemócitos, danos no DNA. Além disso, os dados resultantes deste trabalho serviram de base para comparações quanto à interferência do tipo de tecido nos diferentes mecanismos analisados.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

Exemplares de *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Mollusca, Corbiculidae) com medidas (média \pm EP, n = 120) de $6,29 \pm 0,15$ g, largura de $2,90 \pm 0,04$ cm e altura $2,80 \pm 0,02$ cm, foram coletados no Lago Igapó III ($23^{\circ}19'5.89''S$ $51^{\circ}11'7.31''O$), localizado no município de Londrina, Paraná, Brasil. Após a coleta os animais foram transportados em recipientes de plástico contendo água do local até o Laboratório de Bioensaios da Universidade Estadual de Londrina. Os indivíduos foram mantidos em aquários contendo cascalhos de granulometria 7 mm, e cerca de 40 L de água desclorada, constantemente aerada, por 5 dias (aclimatação) até que o início dos experimentos, sem alimentação e com renovação da água a cada 24 horas.

2.2. Testes de toxicidade

Após o período de aclimatação os animais foram submetidos aos testes estáticos de toxicidade aguda (6 e 24 horas). As concentrações dos herbicidas testadas foram de 2 e 10 ppb para a atrazina e 2 e 10 ppm para o Roundup[®]. No caso da atrazina (ATZ) (PESTANAL, analytical standart, Fluka), tais concentrações correspondem à concentração máxima permitida pela resolução nº357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA/2005) e a 40% da concentração normalmente utilizada nas lavouras (Ventura et al., 2008), respectivamente. Já para o Roundup[®] (RD) (36% glifosato m/v, Monsanto do Brasil LTDA), as concentrações foram definidas considerando-se que, de acordo com as taxas de aplicação de glifosato usuais, um corpo d'água próximo a lavoura, sem mata ciliar, pode receber até $3,7$ mg.L⁻¹ de glifosato (Giesy et al., 2000), e as concentrações de 2 e 10 ppm testadas no presente trabalho correspondem a cerca de $0,72$ e $3,6$ mg.L⁻¹ de glifosato, respectivamente. Portanto, as concentrações selecionadas são passíveis de serem detectadas no meio ambiente e possuem grande relevância quando se trata de organismos sedentários.

Os testes foram realizados em aquários de vidro contendo cerca de 10 L de água desclorada em constante aeração, contendo 10 animais cada aquário. Para cada tempo experimental de cada herbicida testado, os animais foram separados em um grupo controle (CTR), expostos apenas à água desclorada, e dois grupos experimentais, correspondentes às duas concentrações testadas. Durante a aclimatação e no decorrer dos experimentos foi mantido fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro e os demais parâmetros da água mantiveram-se em: pH 7,1 ; condutividade $80 \mu S.cm^{-1}$; turbidez 0,02 UNT; temperatura e oxigênio dissolvido mantiveram em torno de $20^{\circ}C$ e $7,9$ mg O₂.L⁻¹.

2.3. Coleta de material biológico

A coleta da hemolinfa foi feita do seio do músculo adutor anterior com o auxílio de uma seringa com agulha, através de uma pequena abertura (raspagem) feita nas conchas. O material coletado foi mantido em raques sobre o gelo até o momento do ensaio do cometa, para detecção de danos no DNA. Após a secção do músculo e abertura da concha, brânquias e glândula digestiva foram coletadas e mantidas em ultrafreezer -80°C (Freeztec, ultra low) até o momento das análises bioquímicas, para detecção e medida dos processos de biotransformação, defesas antioxidantes e danos oxidativos (lipoperoxidação).

2.4. Biomarcadores Bioquímicos

Os tecidos branquial e glandular foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M / pH 7) e centrifugados (Universal 320R) (16000 g, 4°C , 20 min). O sobrenadante foi utilizado para a medida dos parâmetros bioquímicos e dosagem de proteína totais, pelo método proposto por Lowry et al. (1951).

2.4.1. Mecanismos de biotransformação

2.4.1.1. *Etoxyresorufina-O-desetilase (EROD)*

Este ensaio foi baseado no método proposto por Eggens e Galgani (1992), no qual a conversão da 7-etoxiresorufina (ETOX) para resorufina é monitorada fluorimetricamente (ex: 530 nm; em: 590 nm) a cada 1 minuto, durante 40 min (VICTOR³ Perkin Elmer 1420, Multiabel Counter). A atividade enzimática foi expressa em μM de resorufina. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína⁻¹.

2.4.1.2. *Glutathione S-transferase (GST)*

A atividade da glutathione S-transferase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Keen et al. (1976), que mede a complexação da glutathione reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) durante 1 min em 340 nm (Biochrom, Libra S32), sendo expressa em nmol CDNB conjugado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína⁻¹.

2.4.1.3. *Mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR)*

A atividade das proteínas transportadoras P-gps e MRPs foi determinada indiretamente através do ensaio de acúmulo de Rodamina B, proposto por Kurelec et al. (2000). Os tecidos

foram expostos à Rodamina B (1 μM) contida nos poços da microplaca, por 2 horas. Em seguida, os tecidos foram pesados, congelados, homogeneizados (1:7 m/v) em água destilada e centrifugados (1500 g, 4°C, 7 min). O sobrenadante foi transferido para microplaca preta e submetido à leitura de fluorescência (exc.: 544 nm / emi.: 590 nm) (VICTOR³ PerkinElmer 1420, Multilabel Counter), a qual se refere ao acúmulo de Rodamina. As concentrações deste substrato foram determinadas através de uma curva padrão com diferentes concentrações de Rodamina, sendo os dados expressos em nM de rodamina. mg de tecido úmido⁻¹.

2.4.2. Antioxidantes enzimáticos

A medida da atividade das enzimas antioxidantes foi feita em espectrofotômetro UV/Visível (Biochrom, Libra S32) com banho termostatizado acoplado (25°). A atividade da SOD (CuZn-SOD) foi determinada de acordo com a metodologia de McCord e Fridovich (1969). Este ensaio se baseia na inibição da taxa de redução do citocromo c, promovida pelo ânion radical superóxido, em 550 nm, sendo a atividade da SOD expressa em U de SOD.mg de proteína⁻¹, onde U representa a quantidade de SOD que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c. A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com a técnica descrita por Beutler (1975), na qual se avalia a velocidade de decomposição do H₂O₂ pelo decréscimo de absorvância em 240 nm, sendo expressa em μmol de H₂O₂ metabolizado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Já a atividade da GPx foi determinada baseada no método proposto por Hopkins e Tuphope (1973). Neste ensaio se mede a oxidação do NADPH em presença de H₂O₂, em 340 nm, sendo a atividade expressa em μmol de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. A atividade enzimática da glutathiona redutase (GR) foi determinada de acordo com Carlberg e Mannervik (1975). Neste ensaio é medida a diminuição de NADPH, oxidado pela redução da GSSG a GSH via atividade da GR. A atividade é medida em 340 nm e expressa em μmol NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

2.4.3. Antioxidantes não-enzimáticos

A concentração de GSH (glutathiona reduzida) foi determinada de acordo com o método de Beutler et al. (1963). Na complexação da GSH, e sua consequente oxidação, com o ácido 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) é produzido o tiolato (de coloração amarela), que é detectado em 412, nm (VICTOR³ PerkinElmer 1420, Multiabel Counter). A concentração de GSH foi obtida a partir de uma curva padrão e expressa em μM de GSH. mg de proteína⁻¹.

2.5. Danos oxidativos

2.5.1. Peroxidação lipídica (LPO)

A lipoperoxidação foi medida pela quantificação de malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da LPO, presente nas amostras, segundo a metodologia proposta por Camejo et al. (1998), com modificação no tempo de análise em fluorescência para 40 min. O ensaio mede a quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico a 60 °C através da leitura de fluorescência (exc.: 535 nm / emi.: 590 nm) (VICTOR³ PerkinElmer 1420, Multiabel Counter). A concentração de MDA foi expressa em μmol de MDA.mg de proteína⁻¹.

2.5.2. Danos no DNA

Os danos no DNA foram quantificados através do ensaio do cometa, com modificações para bivalve, proposto por Fedato et al. (2010). A hemolinfa foi previamente centrifugada (1160 g / 20 min) a fim de concentrar as células presentes neste fluido. Em seguida, o sobrenadante foi dispensado e, ao pellet restante, foi acrescido agarose de baixo ponto de fusão com posterior distribuição do material em lâminas previamente preparadas com agarose normal (1,5%). Após a secagem das lâminas em geladeira e retirada da lamínula foram executadas as seguintes etapas: I) lise: em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por 1 hora a 4°C, protegido da luz; II) relaxamento e desenrolamento do DNA: manutenção em tampão de eletroforese (0,3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) por 30 minutos; III) eletroforese: 30 minutos, 300 mA, 25 V, sendo 1 V.cm⁻¹; IV) neutralização: três lavagens de 5 minutos cada em tampão de neutralização (0,4 M TRIS, pH 7,5); V) fixação em etanol absoluto por 10 minutos, seguido de secagem e armazenamento das lâminas sob refrigeração até o momento das análises. As lâminas foram coradas com GelRed e analisadas em fotomicroscópio de fluorescência (Leica DM 2500). Para cada animal foram analisados 100 nucleóides, classificados segundo Kobayashi et al. (1995) em: classe 0 = sem dano aparente, classe 1 = cauda medindo até 1 vez o tamanho do diâmetro do nucleóide; classe 2 = cauda medindo entre 1 e 2 vezes o tamanho do diâmetro do nucleóide e classe 3 = cauda medindo mais de 2 vezes o diâmetro do nucleóide Para o cálculo do escore de dano, o número de nucleóides em cada classe (0, 1, 2 ou 3) foi multiplicado pelo valor de cada classe e o escore calculado pela fórmula: (0xA) + (1xB) + (2xC) + (3xD), em que: A, B, C e D correspondem ao número de células em cada uma das classes

2.6. Análise estatística

Os resultados obtidos para cada órgão (brânquia e glândula digestiva), em cada tempo experimental (6 e 24 h), para as diferentes concentrações de atrazina e Roundup ([2] X [10]) foram comparados entre si e com o respectivo grupo controle (CTR X [2] X [10]) por meio de análise de ANOVA ou Kruskal-Wallis. Na indicação de diferença significativa os resultados foram comparados por testes de comparações múltiplas (Teste de Dunn's) para a localização das diferenças. Para cada biomarcador empregado, os resultados obtidos para os grupos controle (6 e 24 h) de ambos os herbicidas foram agrupados para cada órgão e foram comparados entre os dois órgãos (brânquia X glândula digestiva) por meio de teste t de student ou Mann-Whitney. As comparações foram feitas por meio de teste paramétrico (ANOVA e teste t) ou não paramétrico (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância, teste Shapiro-Wilk). Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$

3. Resultados

No que diz respeito ao processo de biotransformação dos herbicidas atrazina (ATZ) e Roundup® (RD) (Figura 10), foi verificado, após 24 horas de exposição à ATZ, uma inibição (64%) em 2 ppb da atividade da CYP1A na brânquia (BRQ) e um aumento (92%) na glândula digestiva (GL) de *Corbicula fluminea* em 10 ppb deste herbicida. Quanto à fase II da biotransformação, não foi observado alteração na atividade da GST em nenhuma das situações teste. Já com relação à terceira fase da biotransformação, foi observado um aumento na quantidade de Rodamina B (300%), ou seja, inibição do mecanismo de eliminação P-gp/MRP na BRQ de *C. fluminea* expostos a 2 ppb de ATZ por 6 h e em ambos os órgãos de animais expostos a 10 ppm de RD por 6 h.

Em se tratando das defesas antioxidantes primárias (Figura 11), após exposição de 24 horas à atrazina, foi observado um aumento da atividade da SOD, tanto na brânquia, em 2 ppb (26%), quanto na glândula, em 2 ppb (32%) e 10 ppb (52%). Comportamento semelhante foi observado em animais expostos ao Roundup®, nos quais houve um aumento da atividade da superóxido dismutase branquial (80%) e glandular (146%) em 6 horas de exposição a 10 ppm de RD e, somente na brânquia, em 24 horas de exposição tanto para 2 ppm (15%) quanto 10 ppm (18%) do herbicida em questão. A catalase (CAT) se apresentou inibida somente no menor tempo de exposição na brânquia e na glândula de animais expostos a 10 ppb de atrazina e a 2 e 10 ppm de Roundup®, com inibição de 27% e 57%, respectivamente. Já a

glutationa peroxidase (GPx) não sofreu alteração em nenhuma das situações teste na brânquia, mas apresentou aumento de atividade na glândula digestiva de animais expostos por 24 h a 2 ppb de ATZ e por 6 h a 10 ppm de RD (25%).

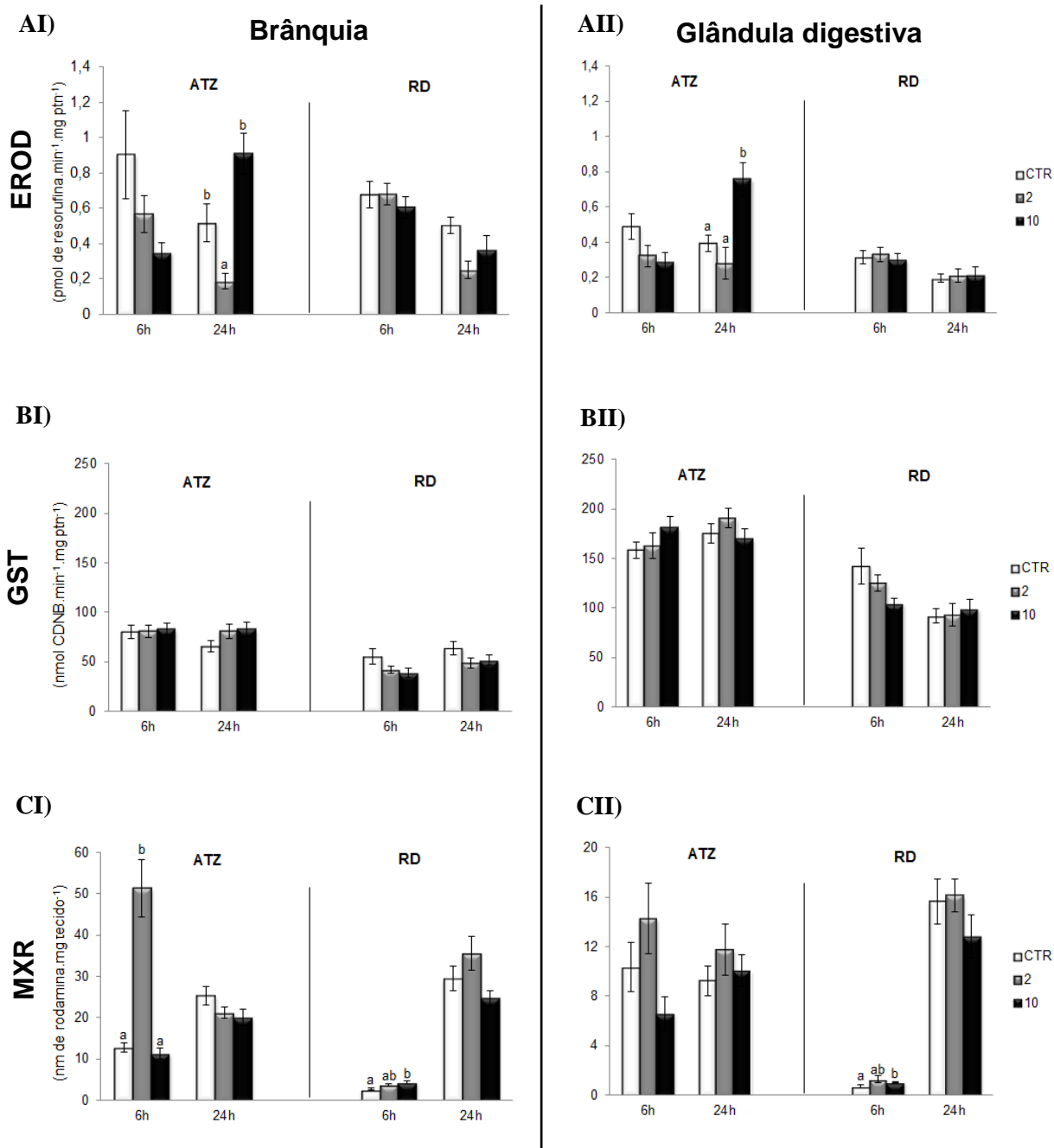


Figura 10. Atividade (média \pm EP, n = 6 a 11) da EROD (A), GST (B) e MXR (C) em brânquia (I) e glândula digestiva (II) de *Corbicula fluminea* após exposição (6 e 24 h) a 2 e 10 ppb de atrazina (ATZ) e 2 e 10 ppm de Roundup[®] (RD) ou apenas à água desclorada (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas considerando-se um mesmo período de exposição ao mesmo herbicida ($p \leq 0,05$).

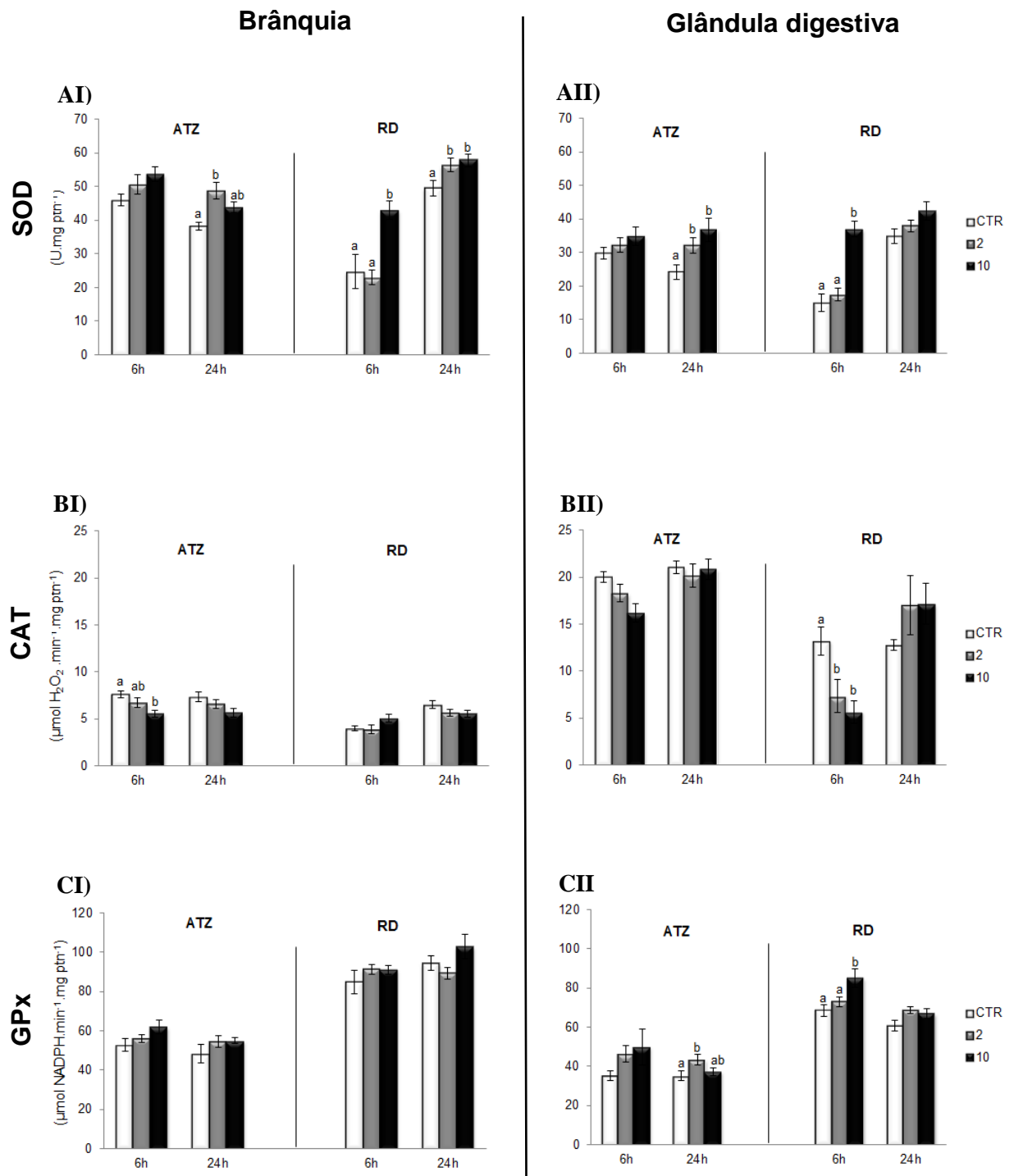


Figura 11. Atividade (média ± EP, n = 8 a 11) da SOD (A), CAT (B) e GPx (C) em brânquia (I) e glândula digestiva (II) de *Corbicula fluminea* após exposição (6 e 24 h) a 2 e 10 ppb de atrazina (ATZ), 2 e 10 ppm de Roundup® (RD) ou apenas à água desclorada (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas considerando-se um mesmo período de exposição ao mesmo herbicida ($p \leq 0,05$).

Outras defesas do organismo se baseiam na atuação da glutathiona redutase (GR) e da GSH (Figura 12). O antioxidante enzimático em questão só se mostrou susceptível ao Roundup[®], uma vez que nenhuma alteração foi observada nas situações teste com atrazina. Para Roundup[®], foi observada uma inibição de 34% da atividade da GR na brânquia após 24 horas de exposição à maior concentração. Na glândula digestiva, foi observada inibição após 6 h de exposição a 10 ppm de RD (41%) e à ambas as concentrações de RD após 24 h, com inibição enzimática de 35%. A concentração de GSH somente se apresentou mais elevada, quando comparada com os respectivos grupos controle, na glândula digestiva de animais expostos à 10 ppb de atrazina por 6 (72%) e 24 horas (40%).

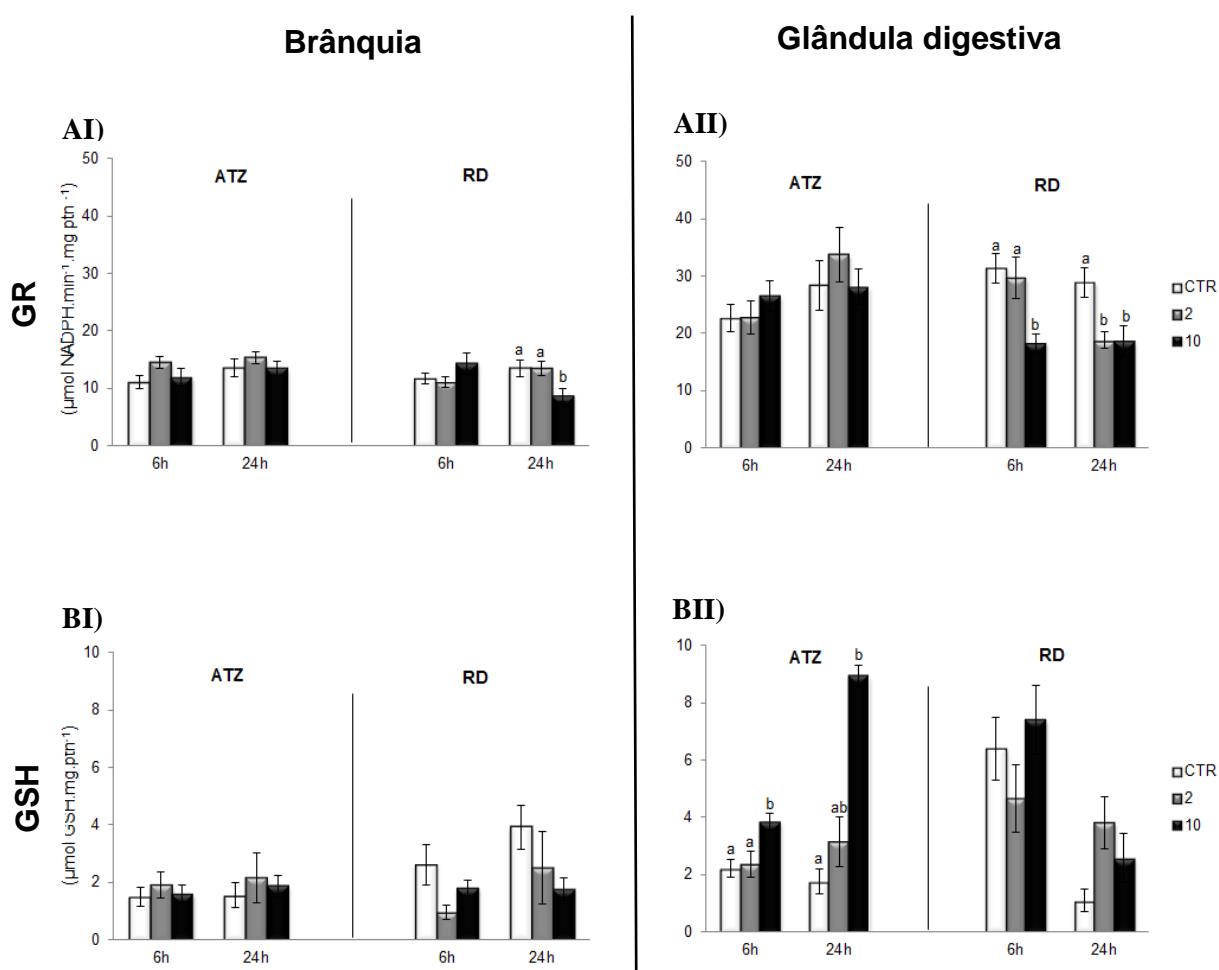


Figura 12. Atividade (média \pm EP, n = 4 a 11) da GR (A) concentração de GSH (B) em brânquia (I) e glândula digestiva (II) de *Corbicula fluminea* após exposição (6 e 24 h) a 2 e 10 ppb de atrazina (ATZ), 2 e 10 ppm de Roundup[®] (RD) ou apenas à água desclorada (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas considerando-se um mesmo período de exposição ao mesmo herbicida ($p \leq 0,05$).

As situações testadas no presente trabalho não foram capazes de promover os chamados danos oxidativos, lipoperoxidação (LPO) e danos ao DNA, exceto para animais

expostos a 2 ppb de atrazina por 24 h, onde foi possível observar um aumento na fragmentação do DNA e, conseqüentemente, de danos ao material genético (Figura 13).

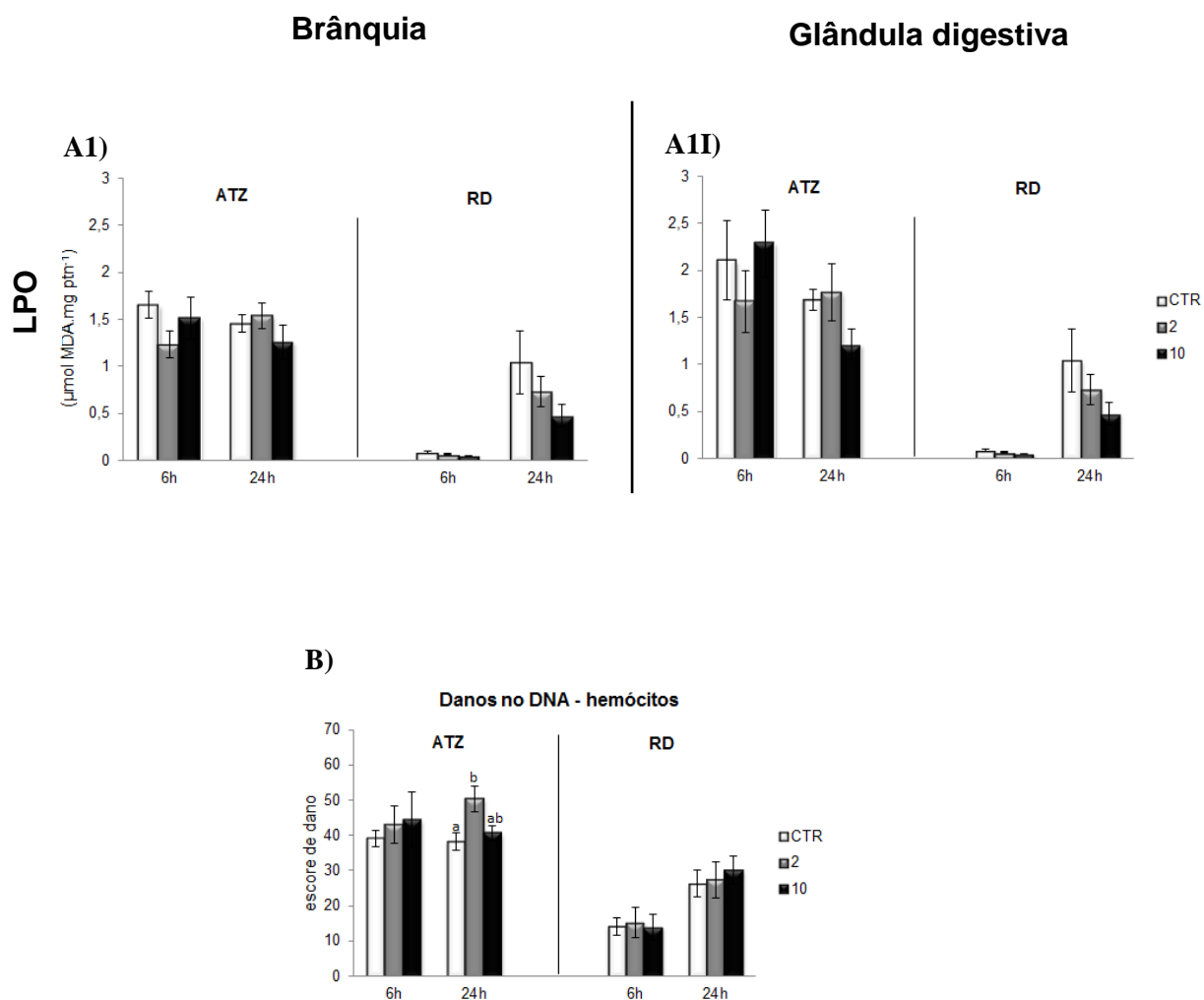


Figura 13. Concentração (média \pm EP, n = 8 a 10) de malondialdeído (MDA) (A) em brânquia (I) e glândula digestiva (II); (B) Escore de danos (média \pm EP, n = 6 a 10) em hemócitos. Dados obtidos para *Corbicula fluminea* após exposição (6 e 24 h) a 2 e 10 ppb de atrazina (ATZ), 2 e 10 ppm de Roundup® (RD) ou apenas a água desclorada (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas considerando-se um mesmo período de exposição ao mesmo herbicida ($p \leq 0,05$).

As defesas antioxidantes, enzimáticas ou não, bem os como mecanismos envolvidos no processo de biotransformação, se mostraram influenciados pelo tipo de tecido em questão (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados (média \pm EP (n) e intervalo de variação) obtidos para os mecanismos de biotransformação, defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas e peroxidação lipídica (TBARS) em brânquia e glândula digestiva de *Corbicula fluminea* dos grupos controle dos experimentos com atrazina e Roundup®. * indica diferença significativa entre os experimentos com atrazina e Roundup, considerando-se o mesmo órgão ($p < 0,05$).

	Brânquia	Glândula digestiva
Etoxiresorufina –O-desetilase (EROD)	0,64 \pm 0,07 (n = 37) 0,09 – 2,24	0,34 \pm 0,02 (n = 39)* 0,09 – 1,01
Glutathione-S-transferase (GST)	66,72 \pm 3,56 (n = 38) 36,28 – 110,94	141,64 \pm 7,38 (n = 38)* 54,60 – 231,63
Acúmulo de Rodamina (MXR):	16,89 \pm 1,93 (n = 38) 0,98 – 46,39	8,79 \pm 1,12 (n = 36)* 0,29 – 20,55
Superóxido dismutase (SOD)	40,14 \pm 1,95 (n = 38) 8,85 – 59,70	26,64 \pm 1,54 (n = 37)* 8,98 – 44,06
Catalase (CAT)	6,52 \pm 0,36 (n = 40) 2,17 – 12,53	16,73 \pm 0,95 (n = 40)* 2,81 – 26,61
Glutathione peroxidase (GPx)	69,34 \pm 3,91 (n = 38) 34,32 – 118,84	48,90 \pm 2,73 (n = 38)* 27,08 – 76,59
Glutathione redutase (GR)	12,42 \pm 0,65 (n = 39) 5,91 – 22,59	27,77 \pm 1,51 (n = 39)* 8,12 – 43,66
Glutathione reduzida (GSH)	2,36 \pm 0,34 (n = 28) 0,29 – 7,75	2,68 \pm 0,45 (n = 32) 0,40 – 8,91
Lipoperoxidação (LPO)	0,93 \pm 0,12 (n = 37) 0,06 – 2,09	1,29 \pm 0,18 (n = 37) 0,03 – 4,94

A brânquia, órgão relacionado com a alimentação e trocas gasosas, se apresenta como a principal fonte dos antioxidantes primários SOD e GPx, e dos mecanismos de biotransformação de fase I, o qual apresenta aproximadamente o dobro de atividade neste órgão. Já a glândula digestiva, apresenta como principal defesa contra as espécies reativas de oxigênio a CAT, a qual possui atividade mais de duas vezes superior à observada na brânquia. Além disso, GL é o local de maior atividade dos mecanismos de biotransformação de fase II e III, sendo que para a fase III foi observado, aproximadamente, metade do conteúdo de rodamina acumulado (dobro de atividade) na GL em relação à BRQ. Além disso, a GR também se apresenta mais ativa na glândula digestiva, com atividade enzimática mais de duas vezes superior à observada para a brânquia.

4. Discussão

Visando compreender os possíveis mecanismos de toxicidade da atrazina e do Roundup[®], em curtos períodos de tempo, o presente trabalho delineou um conjunto de parâmetros que refletem a atuação dos herbicidas em diferentes estágios de defesa do organismo, desde sua absorção pelo organismo com conseqüente submissão ao processo de biotransformação, seguida pela sua atuação nos mecanismos de defesa do organismo e indução de estresse oxidativo.

Muitos estudos também têm buscado entender a toxicidade destes herbicidas em outros organismos aquáticos. Entretanto, poucos são aqueles que promovem um estudo integrado dos possíveis mecanismos de atuação de herbicidas. Os resultados apresentados sugerem que a atrazina, nas condições descritas no presente trabalho, é capaz de interferir nos mecanismos de metabolização, mais precisamente na fase I. A brânquia é o órgão de contato inicial do contaminante, principalmente em invertebrados como *C.fluminea*, nos quais está relacionada com os processos de respiração e alimentação do animal (Ruppert et al., 2005).

Embora não tenham sido observadas alterações na EROD em tempos de exposição mais curtos e de menor concentração da atrazina, após exposição de 24 h, a menor concentração foi capaz de inibir o mecanismo de biotransformação de fase I. A exposição à maior concentração do herbicida, diferentemente de 2 ppb, foi capaz de promover o disparo de “alarme” no organismo, fazendo com que o mesmo reagisse à presença do contaminante através de um reestabelecimento da atividade enzimática, tendendo a estimulação da EROD. Este aumento pode ser fruto de um aumento na produção de proteínas com esta finalidade, visando minimizar a toxicidade do contaminante. Já na glândula digestiva, a menor concentração não foi capaz de promover a inibição observada na brânquia, mas o aumento na atividade de CYP1A, observada para a maior concentração de atrazina, aponta para a participação deste órgão na metabolização do herbicida e proteção do organismo.

A GST tem sido comumente usada como biomarcador de locais poluídos (Cairrão et al., 2004), e em especial como um indicador de exposição a agrotóxicos (Bowles et al., 2005; Peebua et al., 2007; Taysse et al., 1998; Xiao et al., 2006) mostrando sua participação no processo de detoxificação de herbicidas. Esta enzima pode se apresentar tanto inibida (Santos e Martinez, 2012) quanto estimulada (Menezes et al., 2011; Ezemonye e Tongo, 2010) pela exposição ao herbicida. Além disso, estudos como os de Tang et al. (1998), apontam que a atrazina é um substrato de metabolização pela GST.

Diferentemente do observado em peixes, onde a participação de enzimas relacionadas com o citocromo P450 (fase I) na metabolização da atrazina parece ter menos importância quando comparado com mecanismos de fase II, como a GST (Wiegand et al., 2001), em *C.fluminea* a atividade de enzimas de fase I, como a EROD, parece ser de especial importância na metabolização da atrazina, uma vez que não foram observadas alterações em outros mecanismos de biotransformação, como a GST, tampouco estes mecanismos de biotransformação se apresentaram alterados por atuação do Roundup®.

Segundo Wu et al. (2005) quando um organismo é exposto a uma substância química, existe um período latente antes que uma resposta possa ser observada (indução inicial). Esta então irá surgir até um nível máximo (indução máxima) e, em uma exposição prolongada, se a adaptação for observada, a resposta pode diminuir ou até mesmo retornar aos níveis iniciais. Assim, a ausência de alterações na atividade da GST, para ambos os herbicidas, pode ser resultado do curto período de exposição, não sendo possível a observação de possíveis alterações nesta fase da biotransformação. Além disso, uma vez que os metabólitos resultantes da fase I podem ser eliminados diretamente, por meio de proteínas transportadoras, sem que sejam transferidos para a fase II (Newman e Clements, 2008), os herbicidas testados podem, em *C. fluminea*, não terem sido capazes de interferir nesta fase simplesmente por não necessitarem dela para sua biotransformação.

Assim como para a EROD, comportamento semelhante, porém em tempo de exposição mais curto (6 h) foi observado para o mecanismo de excreção celular (MXR) em animais expostos à ATZ, com inibição inicial e posterior reestabelecimento da atividade semelhante ao controle. Este mecanismo de fase III é considerado um potencial protetor de organismos aquáticos contra danos no DNA (Waldmann et al., 1995). No que diz respeito ao Roundup®, uma vez que este não promoveu interferência significativa na EROD tampouco na GST, é possível que a fase III da biotransformação seja mais sensível à atuação deste herbicida, uma vez que foi observada uma inibição do MXR tanto na brânquia quanto na glândula digestiva. A inibição do MXR, por estar relacionado com a eliminação de metabólitos da célula, pode promover o acúmulo de herbicida e seus metabólitos no interior celular, onde podem atuar diretamente sobre o DNA ou promover a formação de ERO. No caso dos experimentos com atrazina, pode ser feita uma relação entre o aumento da CYP1A, como forma de metabolizar possíveis acúmulos de herbicida, e a inibição do MXR. De acordo com Oliveira-Brett e Silva (2002), a atrazina, assim como outros herbicidas do grupo triazina, é capaz de se ligar diretamente no DNA, através de mecanismos de intercalação e formação de adutos entre adenina e guanina. Assim, o acúmulo deste herbicida na célula está

relacionado com o aumento na ocorrência de danos no DNA de hemócitos observado em condições onde houve a inibição da CYP1A e da MXR. Para o Roundup, a inibição da excreção do contaminante, e seu conseqüente armazenamento, pode ainda não ser suficiente para promover alterações nos demais mecanismos de biotransformação, como as observadas para atrazina.

O citocromo P450 é uma potencial fonte de ERO (Sevanian et al., 1990). Assim, o aumento de atividade da CYP1A na glândula digestiva promovida pela atrazina pode ter promovido o aumento da quantidade de ERO, como o ânion radical superóxido, baseado no aumento de atividade observado para a SOD. O mesmo foi observado para a brânquia, onde mesmo não significativo, a tendência ao aumento da CYP1A promoveu a crescente metabolização da atrazina com conseqüente produção de ERO e estimulação da SOD. A possível retenção de Roundup[®] e seus metabólitos nas células, reflexo da inibição do MXR, embora não atuando sobre a maioria dos mecanismos de biotransformação, promoveu um desbalanço na produção basal de ERO, uma vez que foi observado aumento de atividade da SOD branquial e glandular. Tendo em vista que a SOD atua sobre o $O_2^{\cdot-}$ convertendo-o a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (Aruoma, 1994; McCord e Fridovich, 1969), o aumento de atividade desta enzima tem como conseqüência um aumento na concentração de H_2O_2 . Tanto a CAT quanto a GPx podem atuar na conversão deste derivado do oxigênio (Hermes-Lima, 2004). Uma vez que a CAT se manteve inalterada ou inibida na brânquia pela atrazina e na glândula digestiva pelo Roundup[®] e a GPx glandular foi estimulada por ambos os herbicidas, esta parece ter papel mais relevante na neutralização do peróxido de hidrogênio nesta espécie de bivalve dulcícola que a catalase. Além disso, o H_2O_2 pode atravessar livremente as membranas biológicas (Cadenas, 1995; Aruoma, 1994). Assim, a não estimulação da GPx em todos os casos de estimulação da SOD pode ser resultado do fato de este derivado do oxigênio estar sendo liberado através da membrana celular.

As glutationas redutase e reduzida se apresentaram mais susceptíveis à atuação do Roundup[®] e da atrazina, respectivamente. A GR não sofreu alterações por atuação da atrazina, todavia, foi inibida em ambos os órgãos por atuação do Roundup[®]. Uma vez que tal enzima está relacionada com a manutenção dos níveis intracelulares de GSH, bem como, de um meio intracelular redutor devido a manutenção de elevados níveis de GSH e baixos níveis de GSSG (Gilliland, 1993), era de se esperar que houvesse uma conseqüente diminuição na concentração de GSH. Todavia, isto não foi observado, possivelmente porque esta inibição ainda não foi capaz de interferir nos níveis basais da GSH disponível, mantidos constantes provavelmente pela síntese deste antioxidante em outros locais do organismo, uma vez que a

GR se encontra inibida. Tampouco foi observada uma alteração na atividade da GPx, dependente indiretamente da atividade da GR, uma vez que seu cofator (GSH) não foi alterado. Embora não tenha sido observada estimulação da GR pela atrazina, houve um aumento na quantidade de GSH disponível na glândula digestiva. Este antioxidante é considerado defensor das células quando instaurada uma situação de estresse oxidativo (Gilliland, 1993). Todavia, mesmo com este aumento na concentração de GSH, este e os demais mecanismos de defesa não foram suficientes e se instaurou um estado de estresse oxidativo em 24 horas de exposição ao herbicida, com aumento de ocorrência de danos no DNA. A situação de aumento da GSH, observado neste trabalho, possivelmente não é proveniente da reciclagem da GSSG pela GR, mas de síntese de glutatona, a qual pode estar relacionado com o aumento de atividade da GPx, bem como, pode ser um requerimento para possível conjugação com o herbicida por atuação da GST.

Estudos realizados por Santos e Martinez (2012) demonstraram que a exposição (24 e 48 horas) de *Prochilodus lineatus* às concentrações de 2 e 10 ppb de atrazina, promoveram inibições significativas em quase todas as enzimas antioxidantes analisadas (SOD, CAT, GPx), além de um aumento de atividade da GR, associado com diminuição na quantidade de GSH. Além disso, também foram observados danos no DNA de hemócitos e células branquiais e hepáticas, embora não tenha sido associado aumento da concentração de MDA (TBARS). No que diz respeito ao Roundup[®], estudos como o de Modesto e Martinez (2010) observaram que após exposição (6, 24 e 96 h) de *Prochilodus lineatus* a 2 e 10 ppm de Roundup[®] houve a inibição de SOD (24 h) e GPx (6 e 24 h) e aumento da GSH (6 e 24 h) e GST (96 h).

Os efeitos, muitas vezes contrários, observados pelo presente estudo com *C. fluminea*, quando comparado com os estudos com atrazina e Roundup apresentados acima, apontam este bivalve como sendo mais resistente a estes herbicidas por ter a capacidade de reagir, através de ativação enzimática, aumento na quantidade de GSH e inalteração de alguns mecanismos de defesa como GST, CAT, GPx, dentre outros, em determinadas situações teste. Esta característica pode estar relacionada ao fato de, diferentemente do *P. lineatus*, o bivalve dulcícola apresentar mecanismos mais eficientes de resistência a condições adversas como contaminação por herbicidas como, por exemplo, o comportamento de fechamento das valvas quando expostos a contaminantes, diminuindo assim o contato com xenobióticos presentes no meio (El-Shenawy et al., 2003; Liao et al., 2005; Liao et al., 2007; Liao et al., 2009; Tran et al., 2004)

Como apresentado anteriormente, ao observar as alterações desenvolvidas em animais expostos a 2 ppb de atrazina, é possível observar um comportamento comum. Todas as alterações nesta concentração de herbicida normalmente retornam à níveis similares ao grupo CTR em exposições de 10 ppb. Inibição da EROD e MXR e aumento da SOD, na brânquia, aumento da GPx na glândula e aumento na ocorrência de danos no DNA, são fruto da não ativação de mecanismos de defesa inerentes ao organismo. Nos bivalves, a brânquia representa uma ampla superfície de contato com a água circulante, tornando-se hábeis para acumular elevadas concentrações de compostos tóxicos (Gregory et al., 1999) e avaliar os diferentes condições da água e sedimentos (David e Fontanetti, 2005). A capacidade destes organismos sobreviverem em ambientes impactados é possível, dentre outros mecanismos, devido a função protetora dos tecidos que formam os filamentos branquiais (Alyakrinskaya, 2003). A produção de muco em bivalves, além de ter um papel indispensável em muitos processos vitais (captura e transporte de partículas de alimento, formação de pseudofezes e prevenção de perda de água quando expostos ao ar) (Sze e Lee, 1995), tem se mostrado como uma resposta à exposição a poluentes como metais (Kàdar et al, 2001; Sze e Lee, 1995), poluentes orgânicos (David e Fontanetti, 2005) e herbicidas como a atrazina (Noragol et al., 2012).

Estudos como os de Noragol et al. (2012), mostraram que a exposição do bivalve *Diplodon expansus*, por um período de sete dias, a diferentes concentrações de atrazina, promoveram alterações como produção de muco nas brânquias, rompimento de filamentos branquiais e perda da integridade destes filamentos. A exposição a 2 ppb não foi capaz de promover nenhuma das alterações acima descritas. Assim, o poluente é livremente absorvido pelo organismo, onde pode atuar sobre o funcionamento normal das defesas antioxidantes e mecanismos de biotransformação, promovendo a instauração da situação de estresse oxidativo, com consequentes danos no material genético, como observado no presente trabalho. Todavia, a concentração de 6,25 ppb de atrazina foi capaz de promover um aumento na produção de muco na superfície frontal da brânquia, tornando-as cobertas por uma grande quantidade desta substância viscosa. A produção deste muco na superfície frontal deste órgão está relacionada com a prisão do poluente e posterior eliminação como pseudofezes. Já a sua produção nas zonas laterais e abfrontais branquiais é responsável pela eliminação de poluentes previamente absorvidos. (David e Fontanetti, 2009). Grupos expostos a 12,5 ppb, concentração pouco mais elevada que a de 10 ppb testada no presente trabalho, promoveu, além da grande quantidade de muco, o rompimento dos filamentos branquiais e perda de cílios. Assim, quando, no presente trabalho, exemplares de *C.fluminea* foram expostos a

concentrações mais elevadas do herbicida (10 ppb), mecanismos de defesa do animal podem ter sido ativados. O envolvimento da brânquia pelo muco supostamente pode ter sido capaz de proteger o animal dos efeitos tóxicos do contaminante, nas condições específicas deste trabalho, através da diminuição da absorção do herbicida, o que é comprovado pelo reestabelecimento do funcionamento normal das enzimas nestas condições experimentais. Embora a produção de muco pareça ser uma vantagem para o animal, a exposição de animais a altas concentrações de herbicidas pode, assim, comprometer o funcionamento normal das brânquias e, conseqüentemente, comprometer a alimentação e respiração (David e Fontanetti, 2009).

Moluscos apresentam uma variação metabólica sazonal, e conseqüente variação nas defesas antioxidantes, relacionada com a flutuação de parâmetros ambientais como temperatura, salinidade, níveis de oxigênio, estado fisiológico, disponibilidade de alimento e ciclo gametogênico (Gabbott, 1975; Livingstone, 1981; Orbea et al., 1999; Power e Sheeham, 1996; Widdows, 1978). Além destes fatores, idade, tipo de tecido e características físicas do ambiente podem ser fatores interferentes (Di Giulio et al., 1989; Livingstone, 2001).

Os dados apresentados na Tabela 1 indicam que há uma diferença de expressão dos mecanismos de defesa, biotransformação e ocorrência de lipoperoxidação (LPO) em brânquia e glândula digestiva. Por ser o principal órgão de absorção do contaminante do meio, bem como eliminação destes, pelo íntimo contato com o ambiente externo, a brânquia se apresenta como principal fonte do primeiro mecanismo relacionado à redução da toxicidade do herbicida (fase I). Isso aponta para sua importância como primeira linha de defesa do organismo. A GST e o MXR, por outro lado, apresentam-se mais ativos na glândula digestiva, representando, assim, o principal local de metabolização e detoxificação do organismo através da eliminação dos poluentes e seus metabólitos. LeBlanc et al. (1988) reportou que existe uma íntima relação entre lipofilicidade, toxicidade e inibição da atividade da GST em *Daphnia magna* exposta a uma série de fenóis clorados. Assim, tecidos que apresentem maior concentração de gordura, como a glândula digestiva, são os principais locais de metabolização de inseticidas (Timur et al., 2002). Além disso, a glândula digestiva é o órgão de maior atividade de mecanismos de excreção. Estes dados contrariam os observados por Manduzio et al. (2004) e Almeida et al. (2005), com os moluscos *Mytilus edulis* e *Perna perna*, respectivamente, onde foi observado maior concentração de GST na brânquia destes animais. Tais disparidades entre os dados do presente trabalho e dos acima citados pode estar relacionado à biologia dos organismos-teste. Isso porque, diferentemente de *C. fluminea* que é uma espécie dulcícola, *M. edulis* e *Perna perna* são espécies de bivalves marinhos e de zona

intertidal. Assim, estão expostos a adversidades ambientais diferentes do organismo de água doce, principalmente no que diz respeito à temporária exposição dos animais ao ambiente aéreo quando da retração da maré.

Por estar relacionado com as trocas gasosas no animal e, portanto, sujeito a uma grande exposição ao oxigênio, a brânquia se apresenta como principal fonte da SOD e GPx. Com a adição de apenas um elétron ao O_2 há a formação do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual é considerado ERO primária, podendo gerar outras ERO secundárias (H_2O_2 e $\cdot OH$) (Sie, 1993). Assim, a SOD atua como defesa primária no combate deste derivado do oxigênio e a GPx está mais relacionada com a redução do H_2O_2 produzido por ação da SOD, do que da CAT. A baixa atividade da CAT na brânquia pode estar relacionada à habilidade das brânquias excretarem peróxido de hidrogênio diretamente na água (Wilhelm-Filho et al., 1994). Isso impediria o estabelecimento de elevadas concentrações de peróxido na brânquia, levando a GPx a decompor em níveis mais baixos desse derivado do oxigênio. Hermes-Lima (2004) afirma que a CAT é mais efetiva em controlar o estresse oxidativo quando as concentrações intracelulares de peróxido de hidrogênio são muito elevadas e que a GPx atua mais sensivelmente quando há um pequeno aumento na concentração de H_2O_2 . No presente trabalho, assim como o observado por Satovito et al. (2005), a maior concentração de H_2O_2 , por elevada atividade da SOD, na brânquia aparentemente é mais sensivelmente neutralizado pela ação da GPx que da CAT. Esta apresenta papel mais relevante na glândula digestiva, confirmando a premissa de que tal enzima é encontrada em todos os principais órgãos do organismo, mas especialmente no fígado ou órgãos relacionados (Reid et al., 1981). Este órgão de metabolização, assim como o manto, possui maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), quando comparada com a brânquia (Ribera et al., 1991). Isso tem uma relação direta com a maior ocorrência natural de danos oxidativos (LPO) na glândula digestiva.

Embora não totalmente eficientes, uma vez que foram observados danos no DNA, as defesas antioxidantes se mostraram suficientes na proteção das membranas celulares pela não alteração na quantidade de MDA em nenhuma das situações teste. Uma vez que, a inativação de algumas enzimas, sem que sejam observados danos oxidativos, pode ser considerado como um evento de suave estresse oxidativo (Lushchak et al., 2009), pode-se dizer que as alterações enzimáticas associadas com a verificação da capacidade genotóxica da atrazina, promoveram a instauração, mesmo que momentânea, da situação de estresse oxidativo nos animais expostos ao herbicida. Por não promover tantas alterações como o outro herbicida testado, Roundup[®] se apresentou menos tóxico ao bivalve dulcícola *Corbicula fluminea* que a

atrazina, sob as condições especificadas no presente trabalho. Além disso, os mecanismos de biotransformação e as defesas antioxidantes enzimáticas se apresentaram como ferramentas mais sensíveis a contaminação por atrazina e Roundup[®], respectivamente. Mesmo com a diversidade de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos empregados, houve certa dificuldade de se estabelecer um sequencia de alterações, bem como, uma pontualidade de atuação dos herbicidas. Desta forma, estudos que utilizem *Corbicula fluminea* como biomonitor de ambientes contaminados com atrazina e Roundup[®], devem ser realizados em tempos experimentais mais longos que os utilizados no presente trabalho, com a consideração de fatores de variação, como a tecidual.

Referências

- Abdullah MP, Daud J, Hong, KS, Yew, CH (1995) Improved method for the determination of glyphosate in water. *J Chromatog* 697: 363-369
- Abou-Donia M, Elmasry EM, Abu-Qare AW (2002) Metabolism and toxicokinetics of xenobiotics. In: Derelanko MJ, Hollinger MA (eds) *Handbook of Toxicology*, 2nd edn. CRC Press, Boca Ranton, pp 769-833
- Achard M, Baudrimont M, Boudou A, Bourineaud JP (2004) Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metal exposure. *Aquatic Toxicol* 67: 347-357
- Almeida EA, Bainy ACD, Dafre AL, Gomes OF, Medeiros MHG, Di Mascio P (2005) Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J Exp Mar Biol Ecol* 318: 21-30
- Alyakrinskaya, I.O. Tissue Hemoglobins in Bivalvia (Mollusca). *Biol. Bull.* 30 (6), 617-626.
- Aruoma OI (1994) Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol* 32 (7): 671-683
- Bard SM (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicol.* 48: 357-389.
- Barhoumi R, Bowen JA, Stein LS, Echols J, Burghardt RC (1993) Concurrent analysis of intracellular GSH content and gap junctional intercellular communication. *Cytom* 14: 747-756
- Baturo W (1995) Etude des effets écotoxicologiques de l'atrazine et de l'hexachlorobenzène sur *Lymnaea palustres* (Müller) (Gastropoda, Pulmonata) maintenue em mésocosmes: indentification et validation expérimentale de biomarqueurs. France: University of Paris-Sud, Orsay
- Baturo W, Lagadic L (1996) Benzo[a]pyrene hydroxylase and glutathione-S-transferase activities as biomarkers in *Lymnaea palustres* (Mollusca, Gastropoda) exposed to atrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms. *Environ Toxicol Chem* 15: 771-781
- Biagianti-Risbourg S, Bastide J (1995) Hepatic perturbations induced by herbicide (atrazine) in juvenile grey mullet *Liza ramada* (Mugilidae, Teleostei): an structural study. *Aquatic Toxicol* 31: 217-229
- Blanco P, Machado A, Satrustegui J (1987) Variations due to hyperoxia and ageing in the activities of glutathione S-transferase and NADPH-cytochrome c reductase. *Mech Ageing Develop* 39: 11-19

- Bouilly K, McCombie H, Leitao A, Lapegue S (2004) Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Mar Biol* 145: 699-705
- Bowles D, Isayenkova J, Lim E, Poppenberg B (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr Opin Plant Biol* 8: 254-263
- Cadenas E (1995) Mechanisms of Oxygen Activation and Reactive Oxygen Species Detoxification. In: Ahmad S Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. Chapman & Hall, New York
- Camejo G, Wallin B, Enojärvi M (1998) Analyses of Oxidation and Antioxidants using Microtiter Plates. In: Armstrong, D (ed) Free radical and antioxidants protocols. Humana Press, New Jersey, pp. 377-387
- Cairrão E, Couderchet M, Soares AMVM, Guilhermino L (2004) Glutathione-S-transferase activity of *Focus* spp. as a biomarker of environmental contamination. *Aquatic Toxicol* 70: 277-286
- Cataldo D, Colombo JC, Boltovskoy D, Landoni P (2001) Environmental toxicity assessment in the Paraná river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles. *Environ Pollut* 112: 379-389
- Cattaneo R, Clasen B, Loro VL, Menezes CC, Pretto A, Baldisserotto B, Santi A, Avila LA (2011) Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing glyphosate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 87: 597-602.
- Cavalcante DGSM, Martinez CBR, Sofia SH (2008) Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat Res* 655: 41-46
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605
- Colombo JC, Bilos C, Campanaro M, Presa MJR, Catoggio JA (1995) Bioaccumulation of Polychlorinated Biphenyls and Chlorinated Pesticides by the Asiatic Clam *Corbicula fluminea*: Its use as sentinel organism in the Rio de La Plata Estuary, Argentina. *Environ Sci Technol* 29: 914-927
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Vasseur, P. 1997. Biomarqueurs de stress oxydant chez les animaux aquatiques. In: Lagadic, L.T., Coquet, J.C., Amiard, C., Ramade, F. (Ed.). Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Collection Écologie, Paris, Masson.
- CONAMA (2005) [Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente]. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre>. Acesso em: 05 mai. 2011.
- Costa LLF, Sant'Ana ES, Suchara EA, Benato VS, Carasek E (2008) Determinação de herbicidas usados no cultivo de arroz arrigado na Região Sul do Estado de Santa Catarina através da SPME-GC-ECD. *Química Nova* 31(1): 79-83
- Costa MJ, Monteiro DA, Oliveira-Neto AL, Rantin FT, Kalinin AL (2008) Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicol* 17: 153-163
- Cox C (1998) Glyphosate (Roundup). *J Pestic Reform* 18: 3-17
- Cox C (2001) Atrazine: environmental contamination and ecological effects. *J Pestic Reform* 21: 12 – 20
- David JAO, Fontanetti CS (2005) Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of the Santos estuary. *Braz J Morphol Sci* 22: 203-210.
- David JAO, Fontanetti CS (2009) The role of mucus in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gills from polluted environments *Water Air Soil Pollut* 200: 1-6.

- Di Giulio RT, Washburn PC, Wenning, RJ, Winston GW, Jewell CS (1989) Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ Toxicol Chem* 8: 1103-1123
- Dong, X, Zhu L, Wang J, Xie H, Hou X, Jia W (2009) Effects of atrazine on cytochrome P450 enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 77: 404-412
- Dutra BK, Fernandes FA, Failace DM, Oliveira GT (2011) Effect of Roundup (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). *Ecotoxicol* 20: 255- 263
- Fedato RP, Simonato JD, Martinez CBR, Sofia SH (2010) Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 700: 80-85
- Eggens ML, Galgani F (1992) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish fast determination with fluorescence plate-reader. *Mar Environ Res* 33: 213-221
- El-Shenawy NS, Abdel-Nabi IM, Moawad TI, Taha IA (2003) Physiological and behavioural responses of *Ruditapes decussatus* to roundup and reldan. *Egypt J Biol* 5: 108-119
- El-Shenawy N, Moawad TI, Mohallal ME, Abdel-Nabi IM, Taha IA (2009) Histopathologic biomarkers responses of clam, *Ruditapes decussates*, to organophosphorous pesticides Reldan and Roundup: A laboratory study. *Ocean Sci J* 44: 27-34
- Ezemonye L, Tongo I (2010) Sublethal effect of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere* 81: 214-217
- Ferreira D, Motta AC, Kreutz LC, Toni C, Loro VL, Barcellos LJG (2010) Assessment of oxidative stress in *Rhombia quelen* exposed to agrichemical. *Chemosphere* 79: 914-921
- Fitzpatrick PJ, Sheeham D (1993) Separation of multiple forms of glutathione S-transferase from the Blue Mussel *Mytilus edulis*. *Xenobiotica* 23: 851-861
- Fitzpatrick P, Krag TOB, Højrup P, Sheeham D (1995) Characterization of glutathione S-transferase and a related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biochem J* 305: 145-150
- Flynn KM, Delclos KB, Newbold RR, Ferguson SA (2005) Long-term dietary methoxychlor exposure in rats increases sodium solution consumption but has few effects on other sexually dimorphic behaviors. *Food Chem Toxicol* 43(9): 1345-1354
- Flynn K, Spellman T (2009) Environmental levels of atrazine decrease spatial aggregation in the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 1228-1233
- Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP (2009) The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat Res* 681: 80-92
- Gabbott PA (1975) Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In: Barnes H (ed) *Proceedings of the European Marine Biology Symposium*. University Press, Aberdeen, pp 191-211
- Gerard C, Poullain V (2005) Variation in the response of the invasive species *Potamopyrgus antipodarum* (Smith) to natural (cyanobacterial toxin) and anthropogenic (herbicide atrazine) stressors. *Environ Pollut* 138: 28-33
- Giesy JP, Dobson S, Solomon KR (2000) Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. *Rev Environ Contam Toxicol* 167: 35-120
- Gontijo AMM, Tice R (2003) Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Salvadori, D.M., Marques, E.K. (org) *Mutagênese Ambiental*. Ulbra, Canoas, pp. 173-200.
- Gilliland GL (1993) Glutathione proteins. *Curr Opin Struct Biol* 3: 875-884

- Goksoyr A, Andersson T, Buhler DR, Stegeman JJ, Williams DE (1991) Immunochemical cross-reactivity of β -naphthoflavone inducible cytochrome P450 (P450^{1A}) in liver microsomes from different fish species and rat. *Fish Physiol Biochem* 9: 1–13
- Gregory MA, George RC, Marshall DJ, Anandraj A, McClurg TP (1999) The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filaments in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). *Mar Pollut Bull* 39: 116–121
- Grosvick BE, Jonsson H, Rodríguez-Ortega MJ, Roepstorff P, Goksoyr A (2006) CYP1A-immunopositive proteins in bivalves identified as cytoskeletal and major vault proteins. *Aquatic Toxicol* 79: 334–340
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free Rad Biol Med*, 3rd edn. Oxford University Press, New York
- Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA, Vonk A (2002) Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc Natl Acad Sci* 99: 5476–5480
- Hermes-Lima M (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey KB (ed) *Functional metabolism: regulation and adaptation*. John Wiley & Sons, New York 2004, pp 319–368
- Hodgson E, Goldstein JA (2001) Metabolism of toxicants: phase I reactions and pharmacogenetics. In: Hodgson E, Smart RC (eds) *Introduction to biochemical toxicology*, 3rd edn. Wiley-Interscience, New York, pp 67–113
- Huber W (1993) Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. *Environ Toxicol Chem* 12: 1865–1881
- Hultberg M (2007) Cysteine turnover in human cell lines is influenced by glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol* 23: 19–22
- Hussein SY, El-Nasser A, Ahmed M (1996) Comparative Studies on the Effects of Herbicide Atrazine on Freshwater Fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysithyes auratus* at Assiut, Egypt. *Bull Environ Contam Toxicol* 57: 503–510.
- IBAMA (2010) [Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis] *Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: Uma abordagem ambiental*. Rebelo RM (coord), Vasconcelos RA, Buys BDMC, Rezende JA, Moraes KOC, Oliveira RP. Ibama, Brasília
- Imlay JA (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57: 395–418
- Johnson PD, McMahon RF (1998) Effects of temperature and chronic hypoxia on survivorship of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and Asian clam (*Corbicula fluminea*). *Can J Fish Aquatic Sci* 55: 1564–1572
- Kádár E, Salánki J, Jugdaohsingh R, Powell JJ, McCrohan CR, White KN (2001) Avoidance responses to aluminum in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Aquatic Toxicol* 55: 137: 148
- Kim Y, Hyun C (2006) Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicol Environ Saf* 64: 288–297
- Kurelec B, Pivcevic B (1991) Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicol* 19: 291–302
- Kurelec B, Smital T, Pivcevic B, Eufemia N, Epel D (2000) Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein and Chemosensitizers. *Ecotoxicol* 9: 307–327
- Lagadic L, Coutellec MA, Caquet T (2007) Endocrine disruption in aquatic pulmonate molluscs: few evidences, many challenges. *Ecotoxicol* 16: 45–59
- Leblanc GA, Hilgenberg B, Cochrane BJ (1988) Relationship between the structure of chlorinated phenols, their toxicity and their ability to induce glutathione S-transferase activity in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicol* 12: 147–156

- Liao CM, Jou LJ, Chen BC (2005) Risk-based approach to appraise valve closure in the clam *Corbicula fluminea* in response to waterborne metals. *Environ Pollut* 135: 41-52
- Liao CM, Lin CM, Jou LJ, Chiang KC (2007) Linking valve closure behavior and sodium transport mechanism in freshwater clam *Corbicula fluminea* in response to cooper. *Environ Pollut* 147: 656-667
- Liao CM, Jau SF, Lin CM, Jou LJ, Liu CW, Liao VHC, Chang FJ (2009) Valve movement response of the freshwater clam *Corbicula fluminea* following exposure to waterborne arsenic. *Ecotoxicol* 18: 567-576
- Livingstone DR (1981) Induction of enzymes as a mechanism for the seasonal control of the metabolism in marine invertebrates: glucose-6-phosphate dehydrogenases from the mantle and hepatopancreas of the common mussel *Mytillus edulis* L. *Comp Biochem Physiol* 69 B: 147-1560
- Livingstone DR (1991) Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. *Advanced Comp Environ Physiol* 7: 45-187
- Livingstone DR (1998) The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp Biochem Physiol A* 120: 43-39
- Livingstone DR (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* 42: 656-666
- Livingstone DR, Kirchin MA (1989) Wiseman, A. Cytochrome P450 and oxidative metabolism in mollusks. *Xenobiotica* 19: 1041-1042
- Livingstone DR, Garciamartinez P, Michel K, Narbonne JF, O'hara S, Ribera D, Winston GW (1990) Oxyradicals production as a pollution mediated mechanism of toxicity in the common mussel *Mytillus edulis* L. and other molluscs. *Func Ecol* 4: 415-424
- Livingstone DR, Nasci C, Montserrat S, Da Ros C, O'hara S, Peters L, Fossato V, Wootton A, Goldfarb P (1997) Apparent induction of a cytochrome P450 with immunochemical similarities to CYP1A in digestive gland of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) with exposure to 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl and Arochlor 1254. *Aquatic Toxicol* 38: 205-224
- Luedeking A, Koehler A (2004) Regulation of expression of multixenobiotic resistance(MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicol* 69: 1-10
- Lushchak OV, Kubrak OI, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI (2009) Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76: 932-937
- Manduzio H, Monsinjon T, Galap C, Leboulenger F, Rocher B (2004) Seasonal variations in antioxidante defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted área: major contributions in gills of na inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione-S-transferase. *Aquatic Toxicol* 70: 83-93
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: An enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
- McMahon RF (1979) Response to temperature and hypoxia in the oxygen consumption of the introduced Asiatic freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller). *Comp Biochem Physiol* 63A: 383-388
- McMahon RF (2002) Revolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: selection versus resistance. *Can J Fish Aquatic Sci* 96: 1235-1244
- Menezes CC, Loro VL, Fonseca MB, Cattaneo R, Pretto A, Miron DS, Santi A (2011) Oxidative parameters of *Rhamdia quelen* in response to commercial herbicide containing clomazone and recovery pattern. *Pestic Biochem Physiol* 100: 145-150

- Modesto KA, Martinez CBR (2010) Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lienatus*. *Chemosphere* 78: 294-299
- Newman MC, Clements WH (2008) *Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment*. CRC Press, New York
- Noragol LR, Brossi-Garcia AL, Fontanetti CS (2012) Surface morphology of *Diplodon expansus* (Küster, 1856; Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) gill filaments after exposure to environmentally relevant concentrations of atrazine herbicide. *Microsc Res Tech* 75: 807-813
- O'Connor TP (2002) National distribution of chemical concentrations in mussel and oysters in the USA. *Mar Environ Res* 53: 117-143
- Oliveira-Brett AM, Silva LA (2002) A DNA-electrochemical biosensor for screening environmental damage caused by s-triazinederivates. *Anal Bioanal Chem* 137C: 43-51
- Orbea A, Marogomez I, Fernandez C, Tarazona JV, Cancio I, Cajaraville MP (1999) Structure of peroxisomes and activity of the marker enzyme catalase in digestive epithelial cells in relation to PAH content of mussels from two basque estuaries (Bay of Biscay): seasonal and site-specific variations. *Arch Environ Contam Toxicol* 36: 158-166
- Pannunzio TM, Storey KB (1998) Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J Exp Mar Biol Ecol* 221: 277-292
- Paoliello MMB, Da Silva ES (2003) Toxicodinâmica. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (coordenadores). *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*. RiMa, São Carlos
- Papchenkova GA, Golovanova IL, Ushakova NV (2009) The parameter of reproduction, sizes and activities of hydrolases in *Daphnia magna* straus of successive generations affected by Roundup herbicide. *Aquatic Toxicol* 2 (3): 286-291
- Peakall D (1992) *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. Chapman & Hall, London
- Peebua P, Kosiyachinda P, Pokethitiyook P, Kruatrachue M (2007) Evaluation of Alachlor herbicide impacts on the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) using Biochemical Biomarkers. *Bull Environ Contam Toxicol* 78: 138-141
- Pennec GL, Pennec ML (2001) Evaluation of the toxicity of chemical compounds using digestive acini of the bivalve mollusk *Pecten maximus* L. maintained alive in vitro. *Aquatic Toxicol* 53: 1-7
- Porte C, Lemaire P, Peters LD (1995) Livingstone, D.R. Partial purification and properties of cytochrome P450 from digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar Environ Res* 39: 27-31
- Power A, Sheeham D (1996) Seasonal variation in the antioxidant defence system of gill and digestive gland of the Blue Mussel, *Mytilus edulis*. *Comp Biochem Physiol* 144C: 99-103
- Reidi TJ, Murthy MRN, Sicignano A (1981) Structure and heme environment of beef liver catalase at 2,5Å resolution. *Proc Nat Acad Sci USA* 78: 4767-4771
- Ribera D, Narbonne JF, Michel X, Livingstone DR, O'hara S (1991) Responses of antioxidante and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp Biochem Physiol* 100C: 177-181
- Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD (2005) *Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva*. cap 12 Mollusca. 7th edn. Roca, São Paulo
- Russo J, Lagadic L (2004) Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snails *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environ Pollut* 127: 303-311

- Russo J, Madec L, Brehélin M (2009) Haemocyte lysosomal fragility facing an environmental reality: A toxicological perspective with atrazine and *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) as a test case. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 1719-1726
- Santos TG, Martinez CBR (2012) Atrazine promotes biochemical changes and DNA Damage in the Neotropical fish species. *Chemosphere* 89: 1118-1125
- Santovito G, Piccinni E, Cassini A, Irato P, Albergoni V (2005) Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytillus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. *Comp Biochem Physiol* 140: 321-329
- SEAB (2012) [Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná]. <http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/bulas.asp>. Acesso em: 01.nov.2012
- Sevanian A, Nordenbrand K, Kim E, Ernster L, Hochstein P (1990) Microsomal lipid peroxidation: The role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Radic Biol Med* 8: 145-152
- Shoults-Wilson WA, Peterson JT, Unrine JM, Richark J, Black MC (2009) The Asian clam *Corbicula fluminea* as a biomonitor of trace element contamination: Accounting for different sources of variation using an hierarchical linear model. *Environ Toxicol Chem* 28: 2224-2223
- Sie H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Rev Eur J Biochem* 215: 213-219
- Spanò L, Tyler CR, Van Aerle R, Devos P, Mandiki SN, Silvestre F, Thomé JP, Kestemont P (2004) Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult gold fish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicol* 66 (4): 369-379
- Steinberg CEW, Lorenz R, Spieber OH (1995) Effect of atrazine on swimming behavior of zebrafish *Brachydanio rerio*. *Water Res* 29: 981-985
- Tang J, Siegfried BD, Hoagland KD (1998) Glutathione-S-transferase and in vitro metabolism of atrazine in freshwater algae. *Pestic Biochem Physiol* 59: 155-161
- Taysse L, Chambras C, Marionnet D, Bosgiraud C, Deschaux P (1998) Basal level and induction of cytochrome P450, EROD, UDPGT and GST activities in carp (*Cyprinus carpio*) immune organs (spleen and head kidney). *Bull Environ Contam Toxicol* 6: 300-305
- Timur S, Onal S, Karabay UN, Sayim F, Zihniogul F (2002) In vivo effects of malathion on glutathione-S-transferase and acetylcholinesterase activities in various tissues of neonatal rats. *Turk J Zool* 27: 247-252
- Torres MA, Testa CP, Gaspari C, Masutti MB, Panitz CMN, Curri-Pedrosa R, De Almeida EA, Di Mascio P, Filho DW (2002) Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar Pollut Bull* 44: 923-932
- Tran D, Fournier E, Durrieu G, Massabuau JC (2004) Cooper detection in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: optimum valve closure response. *Aquatic Toxicol* 66: 333-343
- Tsui MTK, Chu LM (2003) Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52: 189-1197
- Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen PE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149
- Ventura BC, Angelis DF, Marin-Morales MA (2008) Mutagenic and genotoxic effects of the atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and comet assay. *Pestic Biochem Physiol* 90: 42-51
- Vidal ML, Basseres A, Narbonne JF (2002) Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Muller). *Comp Biochem Physiol C* 132: 93-104

- Waldmann P, Pivcevic, B, Müller WEG, Zahn RK, Kurelec B (1995) Increased genotoxicity of acetylamino-fluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Mutat Res* 342: 113-123
- WHO (1994) [World Health Organization] Glyphosate. Environment health criteria no 159. 1994.
- Widdows J (1978) Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytillus edulis*. *J Mar Biol Assoc UK* 58: 109-124
- Wiegand C, Pflugmacher S, Giese M, Frank H, Steinberg C (2000) Uptake, toxicity and effects on detoxification enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish. *Ecotoxicol Environ Saf* 45: 122-131
- Wiegand C, Krause E, Steinberg C, Pflugmacher S (2001) Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 49: 199-205
- Wilhelm-Filho D, González FB, Boveris A (1994) Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. *Braz J Med Biol Res* 27(12): 2879-2872
- Woodburn AT (2000) Glyphosate: Production, pricing, and use worldwide. *Pest Manag Sci* 56: 309-312
- Wu RSS, Siu WHL, Shin PKS (2005) Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring. *Mar Pollut Bull* 51: 623–634.
- Xiao N, Liu X, Li W, Ge F (2006) Effect of herbicide acetochlor on cytochrome P450 monooxygenases and GST of earthworms *Eisenia fetida*. *J Environ Sci* 18 (1): 135-140

7. MANUSCRITO II

Efeitos dos herbicidas atrazina e Roundup[®] isolados e da mistura de ambos no bivalve dulcícola *Corbicula fluminea*: antagonismo ou potencialização?

Kelly Cristina dos Santos e Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Efeitos dos herbicidas atrazina e Roundup[®] isolados e da mistura de ambos no bivalve dulcícola *Corbicula fluminea*: antagonismo ou potencialização?

Kelly Cristina dos Santos e Cláudia Bueno dos Reis Martinez*

Laboratório de Ecofisiologia Animal - Departamento de Ciências Fisiológicas

Universidade Estadual de Londrina. Paraná. Brasil.

*Autor para correspondência. Tel.: +55-43-33714650; +55-43-33714207;

E-mail: cbueno@uel.br (C. B. R. Martinez).

RESUMO

Aliado ao crescente uso de agrotóxicos há um aumento na contaminação do ambiente aquático por estes compostos. Assim, biomarcadores bioquímicos (defesas antioxidantes, mecanismos de biotransformação e danos oxidativos) e genotóxicos (dano no DNA de hemócitos) foram utilizados para avaliar a toxicidade aguda (96 h) dos herbicidas atrazina (ATZ) e Roundup[®] (RD) em brânquia (BRQ) e glândula digestiva (GL) de *Corbicula fluminea*, expostos a 2 e 10 ppb de atrazina (ATZ), 2 e 10 ppm de Roundup[®] (RD) ou à mistura de 2 ppb de ATZ + 2 ppm de RD e 10 ppb de ATZ + 10 ppm de RD. Para ambos os pesticidas isolados foi observado aumento da superóxido dismutase (SOD) e da glutatona peroxidase (GPx), além de inibição da catalase (CAT) pelo RD, inibição de quase 80% da etoxirresorufina-*O*-desetilase (EROD) branquial pela ATZ e aumento na ocorrência de lipoperoxidação (LPO) na BRQ (370%) e GL (350%) por atuação do RD. A exposição à mistura dos herbicidas promoveu efeito antagônico na EROD e LPO, onde não só foi observada neutralização do efeito peroxidativo do RD isolado, como também, diminuição na ocorrência de dano na concentração mais elevada da mistura, sendo também observado o efeito de potencialização no MXR e na ocorrência de danos ao DNA. Assim, EROD e LPO se apresentam como bons biomarcadores de ATZ e RD, respectivamente, e ensaio do cometa e MXR, biomarcadores para monitoramento de contaminação simultânea destes herbicidas, sendo que a mistura se apresentou potencialmente tóxica para *C. fluminea*.

Palavras-chave: Biomarcadores. Teste do cometa. Estresse oxidativo. Brânquia; Glândula digestiva.

1. Introdução

O uso de agrotóxicos têm se mostrado responsável por inúmeros efeitos indesejados no ambiente tais como acúmulo de resíduos no ambiente e danos à cadeia trófica como um todo (Fan et al., 2007; Graymore et al., 2001; Hayes et al., 2002; Hayes et al., 2006). Estima-se que 99,9% da quantidade de agrotóxicos utilizados nas plantações não atingem alvos específicos. Apenas uma pequena quantidade de produto atinge o alvo (Pimentel e Levitan, 1986), deixando uma grande quantidade de agrotóxicos livre para se deslocar em diferentes compartimentos ambientais, como solo, ar e águas superficiais e subterrâneas e, conseqüentemente, organismos aquáticos (Belluck et al., 1991; Jablonowski et al., 2009).

Assim, os agrotóxicos se tornaram cada vez mais comuns em contaminações aquáticas, sendo encontrados tanto em águas superficiais quanto subterrâneas. Entre os agrotóxicos detectados a maior parte corresponde a herbicidas (Kross et al., 1992). O Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos (ANDEF, 2009), sendo a classe dos herbicidas a mais representativa dentre os agrotóxicos utilizados no país, com mais de 127 mil toneladas de ingredientes ativos distribuídos nos produtos formulados em 2009 (IBAMA, 2010)

Neste cenário, merecem destaque os herbicidas atrazina e Roundup[®], os quais se enquadram entre os agrotóxicos com ação herbicida mais utilizados no Brasil e no mundo (Cox, 2001; Hultberg, 2007; IBAMA, 2010; Steinberg et al., 1995). A atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina) é um herbicida de amplo espectro de atuação. É primariamente aplicada para aumentar o rendimento de culturas alimentícias como soja, cana-de-açúcar e milho, sendo o pesticida mais comumente utilizado nos Estados Unidos, com mais de 36 mil toneladas aplicadas anualmente em mais de 25,4 ha de terra agrícola (Graymore et al., 2001). Apresenta baixa taxa de volatilização de superfícies e água, solubilidade moderada e considerável movimentação do solo para a água durante processos de irrigação e chuva. Assim, não se adsorve fortemente aos sedimentos. Uma vez na água, sua relativamente baixa hidrólise e taxa de fotólise pode resultar em um alongamento de sua presença na água (Howard, 1991).

Como um reflexo de seu elevado consumo mundial e propriedades já citadas, a atrazina é frequentemente encontrada em ambientes aquáticos e, normalmente, se apresenta como o herbicida de maior ocorrência e concentração em ambientes dulcícolas (Appleyard, 1995; Balinova e Mondesky, 1999; Bushway et al., 1992; Gojmerac, 1996; Pionke e Glotfelty, 1989; Ritter, 1990), sendo detectado também em ambiente estuarino e marinho (Readman et al., 1993). Além disso, é cerca de 20 vezes mais frequentemente detectada em

águas subterrâneas dos Estados Unidos que qualquer outro herbicida (Belluck et al., 1991). No Brasil a atrazina foi detectado em concentrações acima do limite máximo ($2 \mu\text{g.L}^{-1}$) permitido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) em amostras de água coletadas no aquífero Serra Grande, em Tianguá, estado do Ceará (Arraes et al., 2008) e em águas superficiais em Corumbataí, estado de São Paulo, em concentração de até $2,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Armas et al., 2007). Além disso, também foi detectada, mesmo que em concentrações inferiores aos limites permitidos pelo CONAMA em várias amostras de água no Estado de Santa Catarina (Costa, L.L.F et al., 2008).

Este herbicida triazínico tem como principal forma de contaminação as fontes não pontuais relacionadas à prática agrícola (Kross et al., 1992). Apresenta as maiores concentrações geralmente coincidentes com as estações de aplicação dos herbicidas na lavoura e com eventos de chuva forte (Muir et al., 1978; Smith et al., 1996). Nestes eventos a perda de atrazina por escoamento é maior quando ocorrem logo em seguida da aplicação (Hall et al., 1972, Hall, 1974; Kleinschmidt, 2007; White et al., 1967) e/ou em solos sujeitos a erosão (Kookana et al., 1998). Hidrólise lenta, baixa solubilidade em água, fácil movimentação e escoamento no solo e capacidade de adsorção em matéria orgânica e tecidos gordurosos posicionam a atrazina como um potencial contaminante aquático (Eisler, 1989). Sua toxicidade está relacionada a diversas alterações do organismo, como genéticas em bivalves (*Pecten maximus* e *Crassostrea gigas*) (Pennec e Penne, 2001; Bouilly et al., 2004), bioquímicas em gastrópodos (*Lymnaea palustris*, *Lymnaea stagnalis*) e actinoptérgios (*Liza ramada*, *Danio rerio*, *Prochilodus lineatus*) (Batur, 1995; Batur e Lagadic, 1996; Biagianti-Risbourg e Bastide, 1995; Dong et al., 2009; Russo et al., 2009; Santos e Martinez, 2012), comportamentais em anfíbios (*Xenopus laevis*), gastrópodos (*Potamopyrgus antipodarum*), actinoptérgios (*Carassius auratus*, *Brachydanio rerio*) (Gerard e Poullain, 2005; Hayes et al., 2002 ; Spanò et al., 2004; Steinberg et al., 1995) e alterações na estruturação das comunidades em bivalves (*Elliptio complanata*) (Flynn e Spellman, 2009).

O glifosato é o ingrediente ativo com ação herbicida mais amplamente utilizado em todo o mundo (Woodburn, 2000). Roundup[®], uma das formulações mais comuns do glifosato e consiste de um sal amino-isopropil adicionado de um surfactante (POEA) (Giesy, 2000). É um herbicida de amplo espectro de atuação, agindo em todos os tipos de plantas, além de ser também o mais frequentemente aplicado na agricultura em todo o mundo (Hultberg, 2007) e em ambientes aquáticos para o controle de macrófitas (Abdullah et al., 1995; Tsui e Chu, 2003). Apresenta alta solubilidade ($15,7 \text{ mg.L}^{-1}$) e meia-vida na água de 7 até 70 dias (Giesy, 2000). Tais características tornam o Roundup[®] um potencial contaminante do ambiente

aquático, apresentando alta afinidade com o solo e podendo se acumular no sedimento (Giesy et al., 2000). Assim, é considerado como sendo persistente no ambiente (Dyson et al., 2002). Todavia, em condições ambientais favoráveis (pH e força iônica da solução) pode se desligar das partículas do solo, ficando disponível na coluna d'água (Lavorenti, 1996). Duas grandes organizações mundiais (USEPA, 1993; WHO, 1994) indicaram que Roundup[®] pode ser usado sem o mínimo risco ao meio ambiente. Entretanto, um crescente número de trabalhos reporta que Roundup[®] é potencialmente tóxico aos organismos aquáticos, podendo causar alterações moleculares em actinopterígeos (*Cyprinus carpio*, *Rhamdia quelen*, *Carassius auratus* e *Prochilodus lineatus*), malacostracas (*Hyalella castroi*) e anfíbios (*Rana cateisbeiana*) (Cattaneo et al., 2001; Costa, M.J. et al., 2008; Dutra et al., 2011; Ferreira et al., 2010; Lushchak et al., 2009; Modesto e Martinez 2010). Pode também promover danos às membranas celulares em actinopterígeos (*Cyprinus carpio*, *Prochilodus lineatus*) e malacostraca (*Hyalella castroi*) (Cattaneo et al., 2001; Dutra et al., 2011; Modesto e Martinez, 2010), alterações teciduais (El-Shenawy, 2009) e comportamentais em bivalves (*Ruditapes decussatus*) (El-Shenawy et al., 2003). Alteração na constituição das comunidades aquáticas, com interferência na reprodução dos animais, como em crustáceos (*Daphnia magna*) (Papchenkova, 2009), também podem ser resultado da toxicidade do Roundup[®]. Baseado em sua visível toxicidade, pesquisas recentes buscam compreender os riscos ambientais e à saúde humana associados com o glifosato (Giesy et al., 2000; Solomon e Thompson, 2003). No Brasil, embora menos detectável no ambiente aquático que a atrazina, devido suas propriedades já citadas, estudo como de Da Silva et al. (2003) detectaram glifosato em 46,5% das amostras de água no Estado do Rio Grande do Sul, com concentrações entre 20-30 ppb até 30 dias após a aplicação do herbicida. Neste mesmo estado, tal ingrediente ativo também foi detectado em águas superficiais em concentrações superiores a 100 ppb, e até 120 dias após a aplicação do herbicida nas culturas, mostrando sua elevada persistência no ambiente (Mattos et al., 2002).

Infelizmente a toxicidade de um pesticida não é limitada ao seu local de aplicação, tampouco, à atuação de um único defensivo agrícola. A prática da agricultura pode envolver a aplicação de mais de um pesticida no mesmo local, o que significa que misturas de agrotóxicos podem estar presentes na superfície da água (Anderson e Weber, 1975; Backhaus et al., 2000; Cuppen et al., 2002; Van Den Brink et al., 2002). Assim, os organismos são expostos a numerosos poluentes simultaneamente, os quais podem interagir entre si de diferentes maneiras, promovendo diversos efeitos. O efeito aditivo ocorre quando o efeito combinado dos dois contaminantes é igual à soma dos efeitos que cada um é capaz de

promover isoladamente, sendo o mais comumente observado quando se trata de dois contaminantes juntos. O efeito sinérgico ocorre quando o efeito combinado dos dois químicos é muito maior que a soma dos dois efeitos de cada uma separadamente. A chamada potencialização, ocorre quando uma substância não tem efeito tóxico em certo órgão ou sistema, mas adicionada a outro químico faz com que este se torne muito mais tóxico. Já o efeito de antagonismo, é observado quando dois químicos adicionados juntos interferem uns nas ações dos outros ou interfere na ação do outro, seja minimizando ou inibindo sua ação observada isoladamente (Eaton e Gilbert, 2008). Atrazina e Roundup[®] apresentam sobreposição de períodos de aplicação na agricultura (Armas et al., 2005), ou seja, são passíveis de serem encontrados simultaneamente no ambiente, como o observado por Armas et al. (2007). Neste estudo, ambos os herbicidas foram detectados em amostras de água superficiais, sendo que, a concentração de atrazina variou de 0,6 – 2,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$, ultrapassando o limite máximo de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ permitido pelo CONAMA.

Os poluentes, de uma maneira geral, podem interferir na produção de espécies reativas de oxigênio como ânion radical superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio, bem como, nas defesas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) e glutathione reduzida (GSH), as quais atuam na neutralização de derivados do oxigênio. Além disso, contaminantes podem promover danos oxidativos nas membranas celulares e no material genético (Di Giulio et al., 1989; Di Giulio et al., 1995; Kelly et al., 1998; Lemaire e Livingstone, 1993; Livingstone et al., 1994; Livingstone, 2001; Winston e Di Giulio, 1992). Os mecanismos de biotransformação também são influenciados por contaminantes como os herbicidas (Hanioka et al., 1998; Ramljak et al., 2000; Santos e Martinez, 2012; Modesto e Martinez, 2010). Isoenzimas do citocromo P450 são de importância central no metabolismo de muitos xenobióticos de fase I, sendo que os níveis de P450 totais são normalmente mais elevados em peixes que em invertebrados (Livingstone, 1998). Em peixes, a fase I é mediada principalmente pela subfamília CYP1A (Van Der Oost, 2003), a qual também está presente em moluscos, principalmente na glândula digestiva (Goksoyr et al., 1991; Grosvik et al., 2006; Livingstone et al., 1997; Porte et al., 1995). A atividade da CYP1A pode ser avaliada indiretamente através da indução da atividade da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) (Torres et al., 2002). A fase II compreende as reações de conjugação do xenobiótico ou seus metabólitos com a glutathione reduzida (GSH) por atuação da glutathione-S-transferase (GST). Muitas isoenzimas desta enzima glutathione têm sido purificadas e caracterizadas em moluscos (Fitzpatrick e Sheeham, 1993; Fitzpatrick et al., 1995). A fase III, também conhecida como mecanismo de resistência

a multixenobiótico (MXR), está relacionada principalmente à presença de glicoproteínas-P (P-gp) associadas às membranas plasmáticas, as quais atuam como uma barreira à absorção de xenobióticos e seus metabólitos, bem como, acelera o processo de remoção, caso este consiga entrar na célula, evitando que o mesmo se acumule no interior da célula (Abou-Donia et al., 2002). A observação deste mecanismo em membranas celulares de molusco (*Mytilus galloprovincialis*) levou Kurelec e Pivcevic (1991) a acreditar que este mecanismo poderia explicar a relativa alta tolerância destes organismos a contaminantes, sendo posteriormente encontrado no peixe marinho *Anoplarcus purpureus* (Bard et al., 2002), nos moluscos *Mytilus edulis* (Luedeking e Korhler, 2004), *Corbicula fluminea* (Achard et al., 2004; Waldmann et al., 1995) e *Dreissena polymorpha* (Smital e Kurelec, 1997).

Assim, por ter potencial de interferir em diferentes mecanismos de defesas do animal, a exposição a agrotóxicos pode induzir o estresse oxidativo, seja através do aumento da produção de radicais livres, alterações dos mecanismos de defesa antioxidante (enzimas de detoxificação e neutralização) ou por aumentar a peroxidação lipídica como um resultado da interação das ERO com membranas celulares ou subcelulares (Abdollahi et al., 2004). O estresse oxidativo tem sido relacionado com a toxicidade de vários agrotóxicos (Possamai et al., 2007; Pal et al., 2009; Singh et al., 2010). Além disso, Ahmad et al. (2010) reportou que genes de resposta à toxicidade, como os do citocromo P450 e da glutathione-S-transferase (GST) desempenham um papel crítico na toxicidade induzida por agrotóxicos.

Os ecossistemas de água doce vêm sendo continuamente modificados pela atividade humana, resultando em declínio de espécies nativas e consequente substituição e propagação de espécies invasoras (Holeck et al., 2004; Ricciardi e Rasmussen, 1999). O bivalve dulcícola *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) é reconhecido como uma das mais importantes espécies invasoras nos ambientes aquáticos (McMahon, 2002; Sousa et al., 2008) e de especial importância em estudos de biomonitoramento (Cataldo et al., 2001; Colombo et al., 1995; Livingstone, 1993; Shoults- Wilson et al., 2009). Os bivalves dulcícolas são organismos sedentários, o que lhes garante um íntimo contato com o ambiente contaminado (Sheehan e Power, 1999). Sabe-se que a atrazina afeta diretamente o crescimento do fitoplâncton e, consequentemente, muitas espécies de zooplâncton podem apresentar redução na reprodução e crescimento quando seus ecossistemas são expostos a estes componentes. Este fato, afeta indiretamente as espécies de invertebrados que ocorrem no local e que possuem estes organismos como fonte de alimento (Graymore et al., 2001).

Assim, o presente trabalho buscou compreender a toxicidade dos herbicidas Roundup® e atrazina separadamente, bem como, da mistura destes herbicidas, no bivalve dulcícola

Corbicula fluminea, através do uso de biomarcadores bioquímicos e genéticos. Para tal, foi determinada, na brânquia e glândula digestiva, a atividade da SOD, CAT, GPx e GR, a concentração de GSH, atividade de enzimas relacionadas aos mecanismos de biotransformação de fase I (EROD), fase II (GST) e fase III (MXR), bem como a ocorrência de lipoperoxidação (LPO) e, em hemócitos, danos no DNA.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

Exemplares de *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Mollusca, Corbiculidae) com medidas (média \pm EP, n = 90) de $6,40 \pm 0,14$ g, largura de $3,10 \pm 0,04$ cm e altura $2,8 \pm 0,02$ cm, foram coletados no Lago Igapó III ($23^{\circ}19'5.89''S$ $51^{\circ}11'7.31''O$), localizado no município de Londrina, Paraná, Brasil. Após a coleta os animais foram transportados em recipientes de plástico contendo água do local até o Laboratório de Bioensaios da Universidade Estadual de Londrina. Os indivíduos foram mantidos em aquários contendo cascalhos de granulometria 7 mm, e cerca de 40 L de água desclorada, constantemente aerada, por 5 dias (aclimação), com renovação de água a cada 24 h, até que o início dos experimentos, sem alimentação.

2.2. Testes de toxicidade

Após o período de aclimação os animais foram submetidos ao teste de toxicidade aguda semi-estático (96 horas) com renovação completa do meio de exposição a cada 24 horas. As concentrações dos herbicidas utilizadas no presente trabalho foram de 2 e 10 ppb para a atrazina e 2 e 10 ppm para o Roundup[®].

Para o Roundup[®] (RD) (36% m/v, Monsanto do Brasil LTDA), a seleção de tais concentrações se baseia em dois pontos principais: I) o presente herbicida apresenta elevada afinidade ao solo, podendo se concentrar no substrato, e se apresentar em concentrações mais elevadas que as observadas na água; II) organismos aquáticos sedentários, como *C.fluminea*, revolvem e se enterram no substrato, mantendo um íntimo contato com o glifosato que venha a se acumular no sedimento. Uma vez que, considerando as taxas de aplicação de glifosato usuais, um corpo d'água próximo a lavoura, sem mata ciliar, pode receber até $3,7 \text{ mg.L}^{-1}$ de glifosato (Giesy et al., 2000), e as concentrações de 2 e 10 ppm testadas no presente trabalho

correspondem a cerca de 0,72 e 3,6 mg.L⁻¹ de glifosato, respectivamente, as concentrações selecionadas são passíveis de serem detectadas no meio ambiente e possuem grande relevância quando se trata de organismo sedentários. No caso da atrazina (ATZ) (PESTANAL, analytical standart, Fluka), tais concentrações correspondem à concentração máxima permitida pela resolução n°357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA/2005) e a 40% da concentração normalmente utilizada nas lavouras (Ventura et al., 2008), respectivamente.

Os testes foram realizados em aquários de vidro contendo cerca de 10 L de água desclorada em constante aeração, contendo 10 animais cada aquário. Para cada herbicida e para a mistura, os animais foram divididos em três grupos, sendo um controle e dois experimentais. O grupo controle (CTR) foi exposto apenas à água desclorada. Para os herbicidas testados isoladamente, os grupos experimentais foram: ATZ 2 (2 ppb de atrazina) e ATZ 10 (10 ppb de atrazina), para atrazina, e RD 2 (2 ppm de Roundup[®]) e RD 10 (10 ppm de Roundup[®]), para Roundup[®]. Já para os testes com a mistura dos herbicidas, os grupos experimentais foram: AR2 (2 ppb de atrazina + 2 ppm de Roundup[®]) e AR10 (10 ppb de atrazina + 10 ppm de Roundup[®]). Durante a aclimação e no decorrer dos experimentos foi mantido fotoperíodo de 12 h claro /12 h escuro e os demais parâmetros da água mantiveram-se em torno de: pH 7,8, condutividade 80 µS.cm⁻¹ e turbidez 9,36 NTU; temperatura e oxigênio dissolvido da meio de exposição dos aniamis se mantiveram em torno de 21°C e 6,3 mg O₂.L⁻¹.

2.3. Coleta de material biológico

A coleta da hemolinfa foi feita no músculo adutor anterior com o auxílio de uma seringa com agulha, através de uma pequena abertura (raspagem) feita nas conchas. O material coletado foi mantido em tubos de microcentrífuga sobre o gelo até o momento do ensaio do cometa, para detecção de danos no DNA. Após a secção do músculo e abertura da concha, brânquias e glândula digestiva foram coletadas e mantidas em freezer -80°C (Freeztec, ultra low) até o momento das análises bioquímicas, para detecção e medida dos processos de biotransformação, defesas antioxidantes e danos oxidativos (lipoperoxidação).

2.4. Biomarcadores Bioquímicos

Os tecidos branquial e glandular foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M/ pH 7) e centrifugadas a 16000 g / 4°C / 20 min. O sobrenadante foi utilizado para a medida de todos os parâmetros bioquímicos analisados no presente trabalho e a dosagem de proteína totais foi feita baseada no método proposto por Lowry et al., (1951).

2.4.1. Mecanismos de biotransformação

2.4.1.1. *Etoxyresorufina-O-desetilase (EROD)*

Este ensaio foi baseado no método proposto por Eggens e Galgani (1992), o qual determina a atividade catalítica associada à CYP1A. Neste, a conversão da 7-etoxiresorufina (ETOX) para resorufina é monitorada fluorimetricamente no comprimento de onda de 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão) a cada 1 minuto durante 40 minutos em espectrofotômetro de fluorescência (VICTOR³ PerkinElmer 1420, Multiabel Counter). A atividade enzimática foi expressa em μM de resorufina. min^{-1} .mg de proteína⁻¹.

2.4.1.2. *Glutathione S-transferase (GST)*

A atividade da glutathione S-transferase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Keen et al. (1976), que mede a complexação da glutathione reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em 340 nm, durante 1 minuto, sendo expressa em nmol CDNB conjugado. min^{-1} .mg de proteína⁻¹.

2.4.1.3. *Mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR)*

A atividade das proteínas transportadoras P-gps e MRPs, foi determinada indiretamente através do ensaio de acúmulo de Rodamina B proposto por Kurelec et al (2000). Os tecidos foram expostos à Rodamina B (1 μM) por 2 horas. Em seguida, os tecidos foram pesados, congelados, homogeneizados (1:7 m/v) em água destilado e centrifugados durante 7 minutos a 1500 g / 4°C. O sobrenadante foi submetido à leitura de fluorescência (excitação: 544 nm / emissão: 590 nm) em microplaca preta, referente ao acúmulo de rodamina, em espectrofotômetro de fluorescência (VICTOR³ PerkinElmer 1420, Multiabel Counter). As concentrações de Rodamina no tecido foram determinadas através de uma curva

padrão de concentração de rodamina, sendo os dados expressos em nM de rodamina. mg de tecido úmido⁻¹.

2.4.2. Antioxidantes enzimáticos

A medida da atividade das enzimas antioxidantes foi feita em espectrofotômetro UV/Visível (Biochrom, Libra S32) com banho termostatizado acoplado. A atividade da SOD (CuZn-SOD) foi determinada de acordo com a metodologia de McCord e Fridovich (1969). Este ensaio se baseia na inibição da taxa de redução do citocromo c, promovida pelo ânion radical superóxido, em 550 nm, sendo a atividade da SOD expressa em U de SOD.mg de proteína⁻¹, onde U representa a quantidade de SOD que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c. A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com a técnica descrita por Beutler (1975), onde se avalia a velocidade de decomposição do H₂O₂ pelo decréscimo de absorbância em 240 nm, sendo expressa em μmol de H₂O₂ metabolizado.minuto⁻¹.mg de proteína⁻¹. Já a atividade da GPx foi determinada baseada no método proposto por Hopkins e Tuphope (1973). Neste ensaio se mede a oxidação do NADPH em presença de H₂O₂, em espectrofotômetro (340 nm), sendo a atividade expressa em μmol de NADPH oxidado.minuto⁻¹.mg de proteína⁻¹. A atividade enzimática da glutathione redutase (GR) foi determinada de acordo com a proposta metodológica de Carlberg e Mannervik (1975). Neste ensaio é medida a diminuição de NADPH, oxidado pela redução da GSSG a GSH via atividade da GR. A atividade é medida em 340nm e expressa em μmol NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

2.4.3. Antioxidantes não-enzimáticos

A concentração de GSH foi determinada pelo método de Beutler et al. (1963) pelo ensaio da reciclagem da glutathione. Na complexação da GSH com o ácido 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), é formado o tiolato (TNB) que produz uma cor amarelada, a qual é detectada por espectrofotometria a 412 nm (VICTOR³ PerkinElmer 1420, Multiabel Counter) As amostras são centrifugadas em ácido tricloroacético (TCA) 6% (1:1) em 1500 g / 4 °C / 5 minutos. A concentração de GSH é obtida através de uma curva padrão de GSH e expressa em μM de GSH. mg.⁻¹ de proteína.

2.5. Danos oxidativos

2.5.1. Peroxidação lipídica (LPO)

A lipoperoxidação foi medida através da quantificação de malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da LPO, presente nas amostras, segundo a metodologia TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) proposta por Camejo et al. (1998), com algumas modificações para bivalve. A leitura da fluorescência (excitação: 535 nm/ emissão: 590 nm) foi feita em espectrofotômetro de fluorescência (VICTOR³ PerkinElmer 1420, Multiabel Counter) e expressa em μmol de MDA por mg.mL^{-1} de proteína.

2.5.2. Danos no DNA

Os danos no DNA foram quantificados por meio do ensaio do cometa, com modificações para bivalve, proposto por Fedato et al. (2010). A hemolinfa foi previamente centrifugada a 1160 g durante 20 min, a fim de concentrar as células presentes neste fluido. Em seguida, o sobrenadante foi dispensado e, ao pellet restante, foi acrescido agarose de baixo ponto de fusão, posteriormente distribuído em lâminas previamente preparadas com agarose de alto ponto de fusão (1,5%). Após a secagem das lâminas em geladeira e retirada da lamínula foram executadas as seguintes etapas: I) lise: submersão em tampão de lise (2,5M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM TRIS, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por 1 hora a 4°C, protegido da luz; II) relaxamento e desenrolamento do DNA: manutenção em tampão de eletroforese (0,3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) por 30 minutos; III) eletroforese: 30 minutos, 300 mA, 25 V, sendo 1 V.cm^{-1} ; IV) neutralização: três lavagens de 5 minutos cada em tampão de neutralização (0,4 M TRIS, pH 7,5); V) fixação em etanol absoluto por 10 minutos, seguido de secagem e armazenamento das lâminas sob refrigeração até o momento das análises. As lâminas foram coradas com GelRed e analisadas em fotomicroscópio de fluorescência (Leica DM 2500). Para cada animal foram analisados 100 nucleóides classificados segundo Kobayashi et al. (1995) que apresenta a seguinte metodologia: classe 0 = sem dano aparente, classe 1 = cauda medindo até 1 vez o tamanho do diâmetro do nucleóide; classe 2 = cauda medindo entre 1 e 2 vezes o tamanho do diâmetro do nucleóide e classe 3 = cauda medindo mais de 2 vezes o diâmetro do nucleóide. Para o cálculo do escore de dano, o número de nucleóides em cada classe (0, 1, 2 ou 3) foi multiplicado pelo valor de

cada classe e o escore calculado pela fórmula: $(0xA) + (1xB) + (2xC) + (3xD)$, em que: A, B, C e D correspondem ao número de células em cada uma das classes.

2.6. Análise estatística

Os resultados obtidos para cada grupo experimental (atrazina, Roundup[®] e atrazina + Roundup[®]) foram comparados entre si por meio de análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não-paramétrica (Kruskall-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância, teste de Shapiro-Wilk). Quando observada indicação de diferença significativa ($p \leq 0,05$) os resultados foram comparados por testes de comparações múltiplas (Teste de Dunn's) para a localização das diferenças.

3. Resultados

Em se tratando dos mecanismos de biotransformação (Figura 14), foi possível observar que dentre os órgãos analisados pelo presente trabalho a brânquia se apresentou mais susceptível à atuação dos herbicidas testados, uma vez que não foi observada nenhuma alteração significativa nos parâmetros analisados na glândula digestiva. A exposição à atrazina promoveu inibição significativa na atividade da CYP1A branquial nas duas concentrações testadas, diminuindo a atividade desta enzima em cerca de 70% de sua atividade normal a 2 ppb e 79% em 10 ppb do herbicida. Embora não tenha sido observado efeito do Roundup[®] nesta fase da biotransformação, a mistura dos dois herbicidas foi capaz de promover uma inibição na atividade enzimática de fase I, tanto em AR 2 quanto em AR 10, nas quais foi observada uma inibição enzimática de aproximadamente 15 e 25%, respectivamente. Embora sejam observadas estas alterações na fase I, a fase II permaneceu com a atividade da GST inalterada em todas as situações teste, apesar da tendência de inibição desta enzima na glândula em situações de exposição à atrazina e à mistura. Em se tratando da fase III, novamente foram observadas alterações apenas na brânquia, a qual apresentou aumento no acúmulo de rodamina de aproximadamente 116% em relação ao controle, e consequente inibição do mecanismo de eliminação via glicoproteínas-P, nas células branquiais de animais expostos à maior concentração da mistura (10 ppb de atrazina +10 ppm de Roundup[®]).

Com relação às defesas antioxidantes primárias (Figura 15), é observado um aumento da atividade da SOD na brânquia de animais submetidos ao Roundup[®] e à atrazina, somente

na concentração mais elevada destes herbicidas isolados. A menor concentração dos herbicidas e a mistura dos mesmos, não foram capazes de promover alterações nesta enzima na brânquia. A SOD glandular apresentou alteração somente nos tratamentos com atrazina, em ambas as concentrações, não sendo observada nenhuma alteração nas exposições ao Roundup[®] e à mistura. Diferentemente da enzima citada anteriormente, que apresentou mais alterações no tecido branquial, A CAT se apresentou mais sensível na glândula, onde teve sua atividade inibida significativamente em aproximadamente 62% em animais exposto a 10 ppm de Roundup[®], não apresentando alterações em nenhuma das demais situações teste. Já a GPx, assim como a SOD, apresentou-se mais alterada na brânquia, onde foi observado um aumento (68%) da atividade desta enzima nos tratamentos com 10 ppm de Roundup[®]. Uma pequena alteração foi observada em animais expostos à menor concentração de atrazina. Todavia, este aumento singelo da atividade enzimática retornou a valores próximos ao CTR em RD 10. A glutaciona peroxidase glandular se apresentou inalterada em todas as situações teste.

Para a atividade da glutaciona redutase e concentração da glutaciona reduzida (Figura 16), apesar de algumas tendências de diminuição na quantidade de GSH, não foi observada nenhuma alteração significativa na quantidade deste antioxidante não enzimático em nenhum dos órgãos analisados. Já a GR apresentou uma alteração na brânquia dos tratamentos expostos à mistura, sendo observado um aumento de aproximadamente 60% da atividade enzimática na menor concentração deste tratamento, com posterior diminuição (20%) da atividade da GR e aproximação de valores representativos do controle.

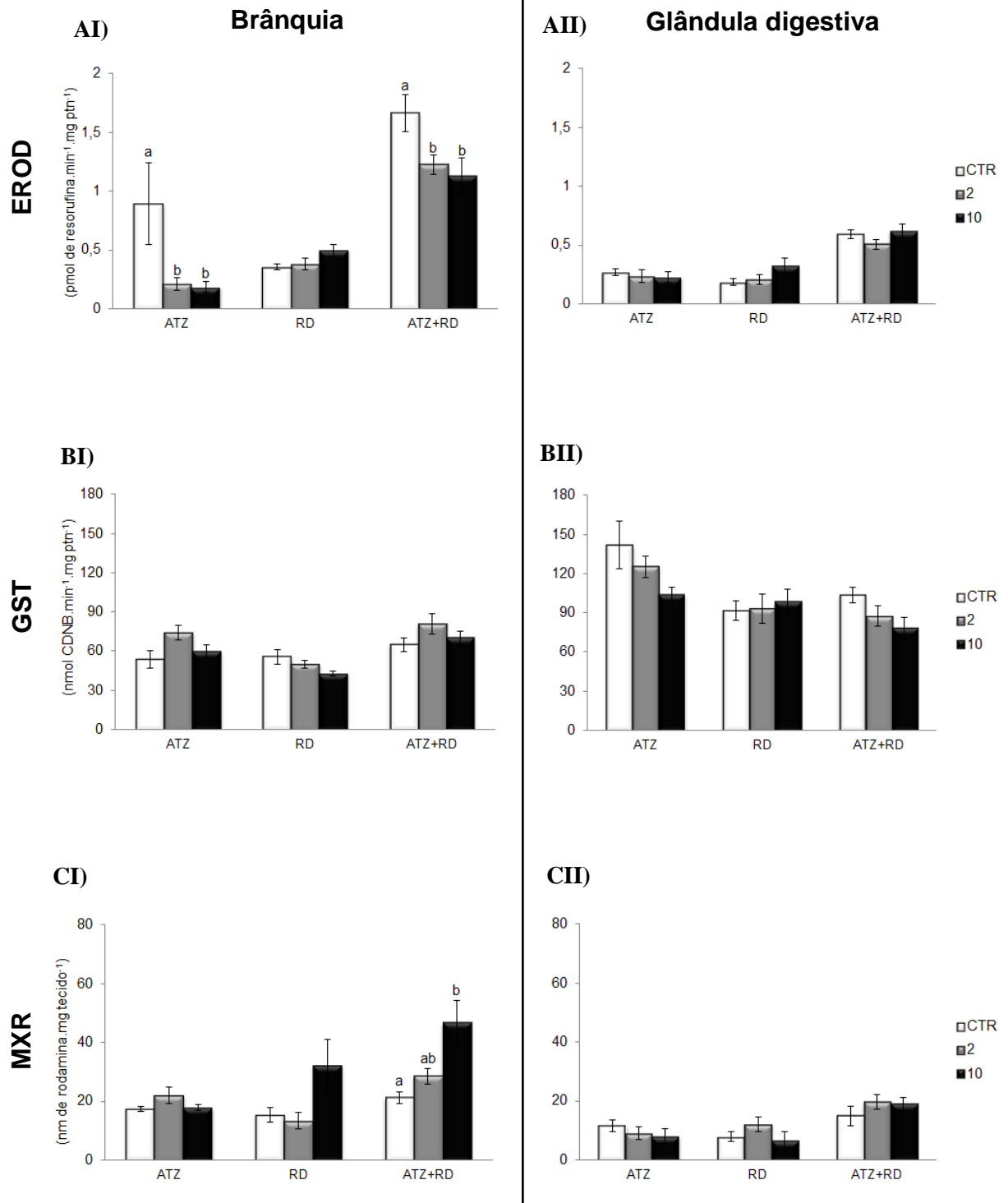


Figura 14. Atividade (média \pm EP, n = 6 a 11) da EROD (A), GST (B) e MXR (C) em brânquia (I) e glândula digestiva (II) de *Corbicula fluminea* após exposição (96 h) a 2 e 10 ppb de atrazina (ATZ), 2 e 10 ppm de Roundup[®] (RD), 2 ppb de atrazina + 2 ppm de Roundup[®], 10 ppb de atrazina + 10 ppm de Roundup[®] ou apenas à água desclorada (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas, considerando-se situações teste de um mesmo tratamento (ATZ, RD ou ATZ+RD) ($p \leq 0,05$).

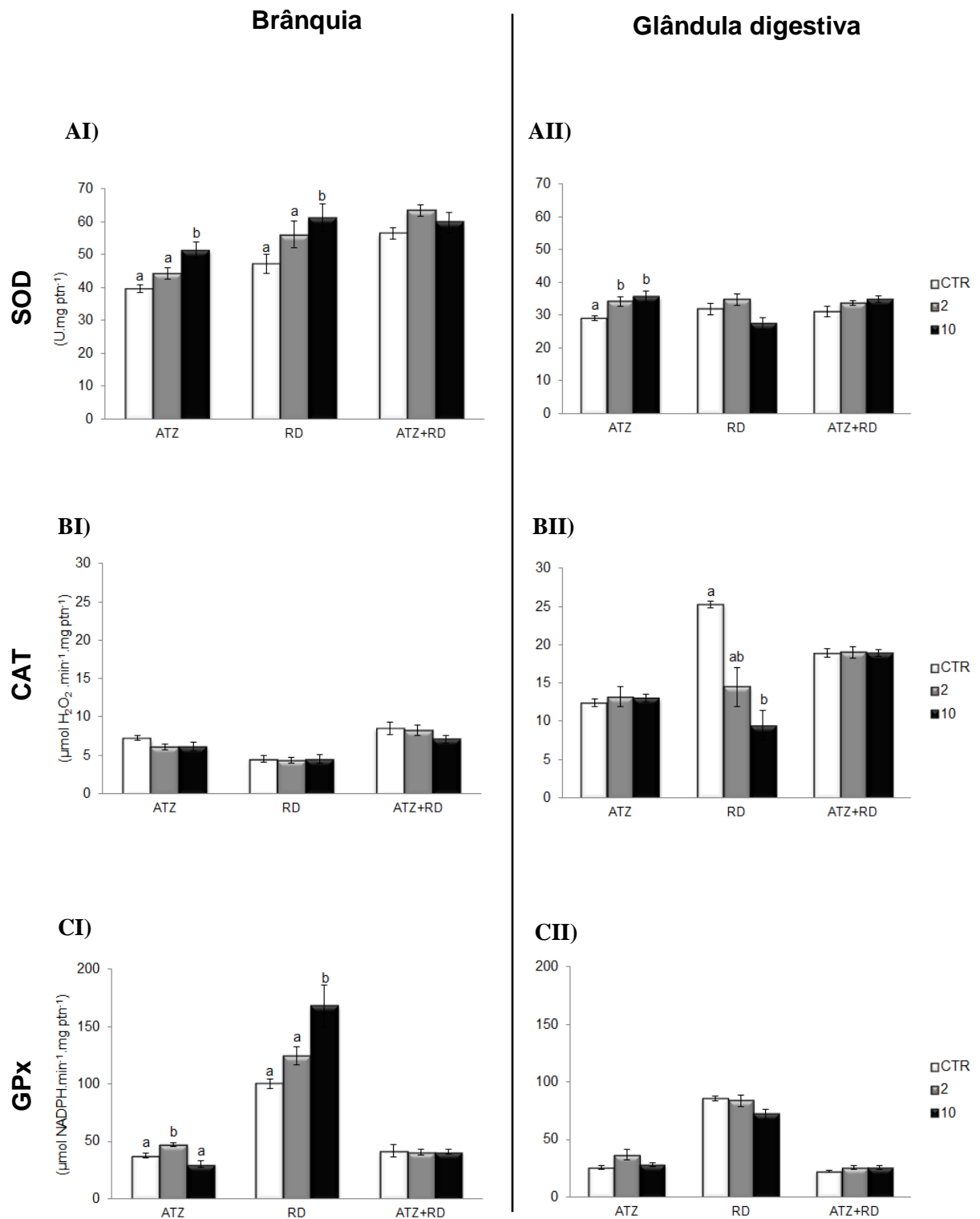


Figura 15. Atividade (média \pm EP, n = 4 a 14) da SOD (A), CAT (B) e GPx (C) em brânquia (I) e glândula digestiva (II) de *Corbicula fluminea* após exposição (96 h) a 2 e 10 ppb de atrazina (ATZ), 2 e 10 ppm de Roundup[®] (RD), 2 ppb de atrazina + 2 ppm de Roundup[®], 10 ppb de atrazina + 10 ppm de Roundup[®] ou apenas à água desclorada (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas, considerando-se situações teste de um mesmo tratamento (ATZ, RD ou ATZ+RD) ($p \leq 0,05$).

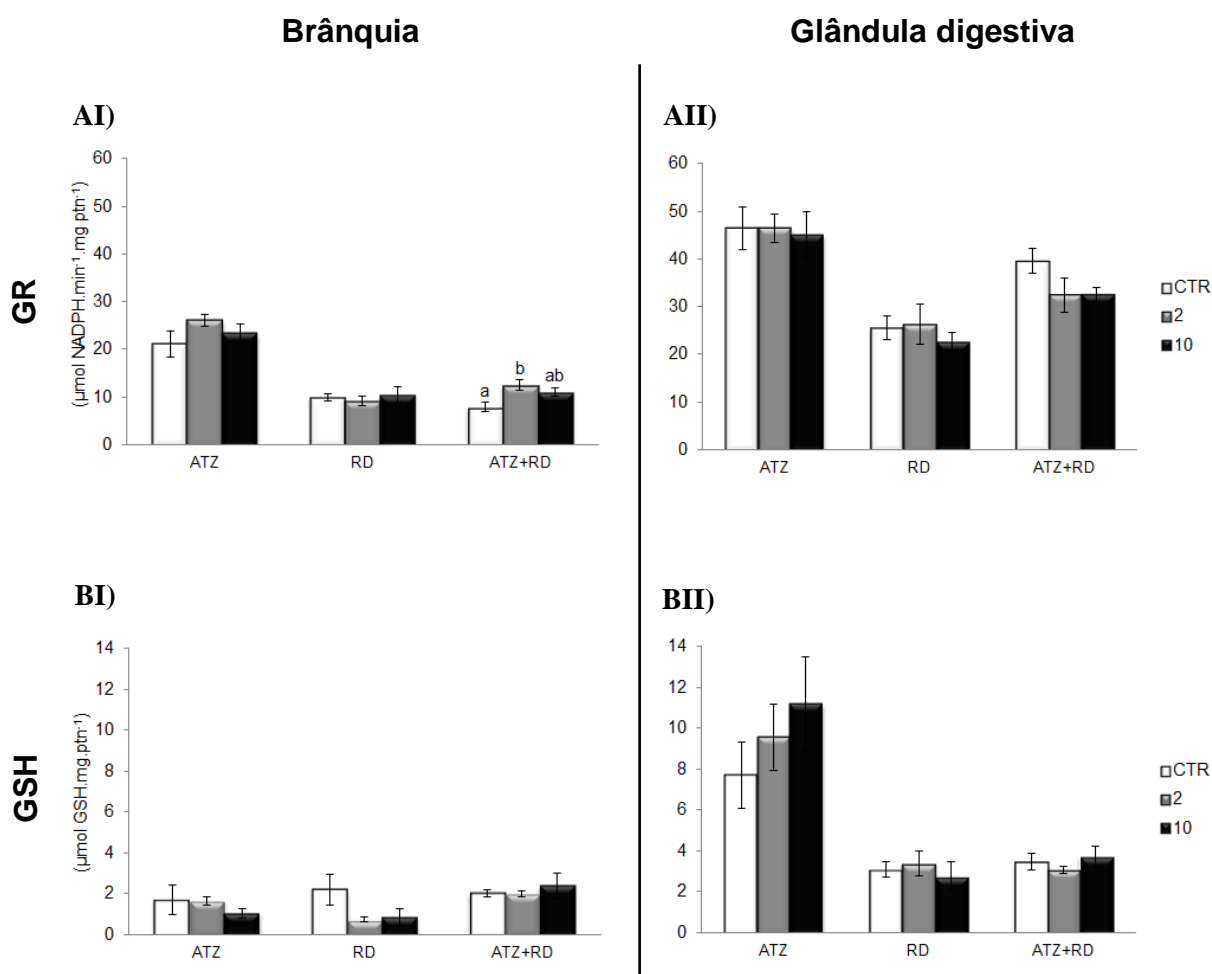


Figura 16. Atividade (média ± EP, n = 5 a 10) da GR (A) e concentração de GSH (B) em brânquia (I) e glândula digestiva (II) de *Corbicula fluminea* após exposição (96 h) a 2 e 10 ppb de atrazina (ATZ), 2 e 10 ppm de Roundup® (RD), 2 ppb de atrazina + 2 ppm de Roundup®, 10 ppb de atrazina + 10 ppm de Roundup® ou apenas à água desclorada (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas, considerando-se situações teste de um mesmo tratamento (ATZ, RD ou ATZ+RD) ($p \leq 0,05$).

Apesar de algumas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas terem sido estimuladas, algumas das situações teste do presente trabalho foram capazes de promover danos oxidativos, tanto nos lipídios de membrana quanto no DNA (Figura 17). As alterações mais significativas são observadas para os animais expostos a 10 ppm de Roundup®. Estes apresentaram um aumento significativo de aproximadamente 370% na quantidade de MDA na brânquia, ou seja, ocorreu um aumento na ocorrência de peroxidação lipídica (LPO) neste órgão. Situação semelhante foi observada na glândula digestiva, onde se observa um aumento de 350% na ocorrência de peroxidação lipídica para a maior concentração de Roundup®.

testada. Na glândula, a atrazina promoveu uma diminuição da ocorrência de LPO em 2 ppb e reestabelecimento da concentração de MDA semelhante ao controle em 10 ppb. Quando na presença dos dois herbicidas concomitantemente, uma situação inversa à do Roundup[®] se desenvolveu no órgão em questão, havendo uma diminuição na concentração de MDA na maior concentração da mistura, ou seja, houve uma diminuição na ocorrência de danos às membranas celulares. Embora a exposição isolada aos herbicidas não tenha sido capaz de promover danos ao DNA de hemócitos dos organismos expostos, a exposição aos dois agrotóxicos concomitantemente, promoveu um aumento significativo na ocorrência de danos ao DNA, tanto em AR 2 quanto em AR 10, sendo este aumento correspondente a cerca de 114 e 124%, respectivamente, quando comparado com o grupo controle.

O tipo de dano que os hemócitos apresentaram pode ser visualizado na Tabela 2. Embora em todas as situações testes seja observada uma predominância de danos de classe 0, também é possível observar que em situações de exposição ao contaminante a quantidade de danos de classes 1 a 3 se eleva, havendo uma predominância de danos de classe 1. No que se refere aos danos de classe 2, exceto para testes com atrazina, é possível observar uma relação entre a quantidade de nucleóides possuidores deste tipo de dano e a concentração de herbicida, sendo que quanto maior a concentração dos contaminantes no meio, maior a quantidade de nucleóides pertencentes a classe 2. Já para a classe 3, tal relação com a concentração do pesticida não é observada, embora haja uma clara predominância deste tipo de dano nos hemócitos de animais expostos à ambas as concentrações da mistura. Neste sentido, ao comparar as três situações teste (atrazina, Roundup[®] e mistura), quanto a quantidade de danos de classe 3, considerado o mais agressivo dentre os citados, é possível estabelecer uma ordem, sendo esta a de atrazina, Roundup[®] e mistura, a qual representa, respectivamente, uma ordem crescente de capacidade de promover a ocorrência destes danos nos hemócitos de *Corbicula fluminea*.

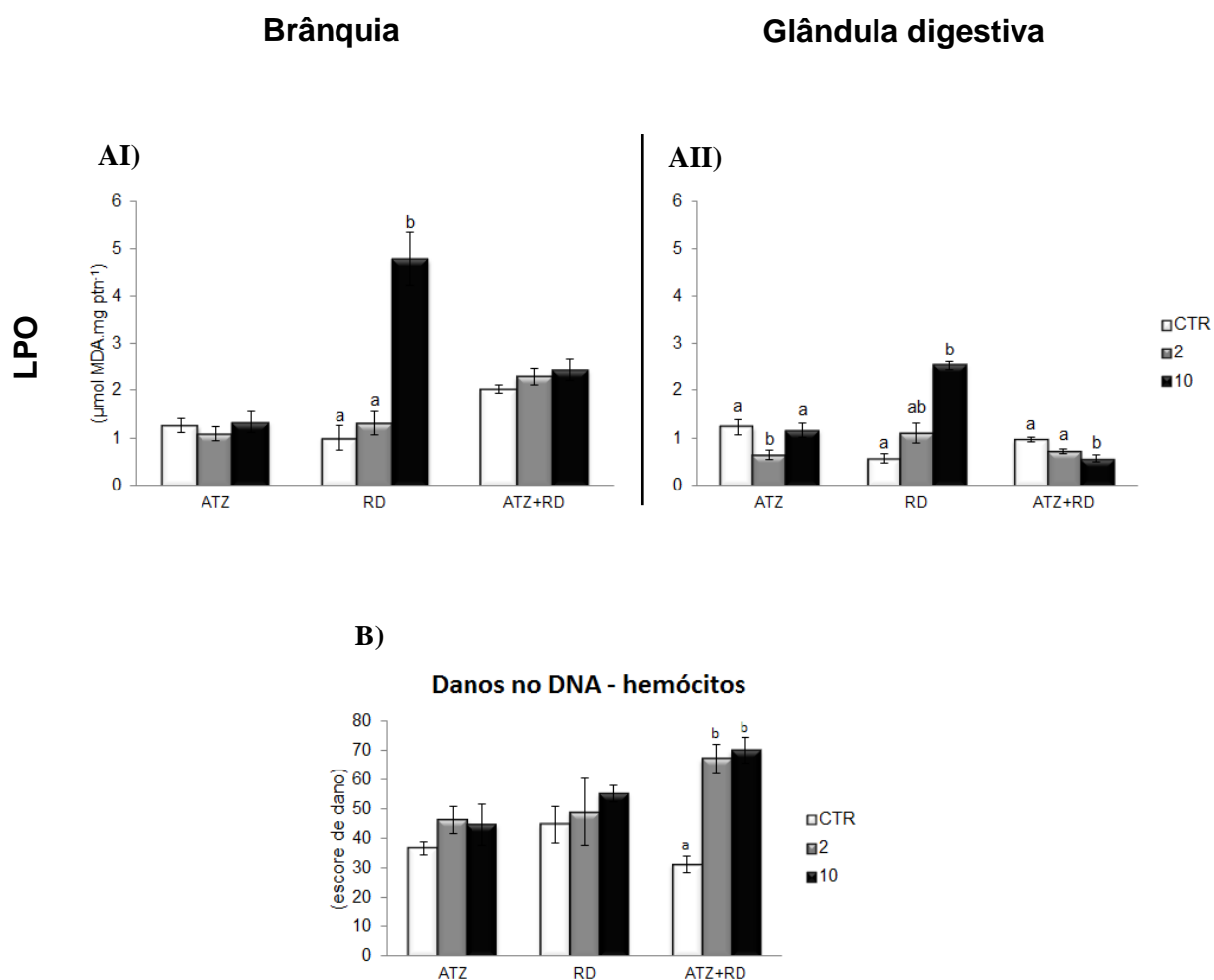


Figura 17. Concentração (média \pm EP, n = 6 a 10) de malondialdeído (MDA) (A) em brânquia (I) e glândula digestiva (II); (B) escore de danos (média \pm EP, n = 8 a 10) em hemócitos. Dados obtidos para *Corbicula fluminea* após exposição (96 h) a 2 e 10 ppb de atrazina (ATZ), 2 e 10 ppm de Roundup[®] (RD), 2 ppb de atrazina + 2 ppm de Roundup[®], 10 ppb de atrazina + 10 ppm de Roundup[®] ou apenas à água desclorada (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas, considerando-se situações teste de um mesmo tratamento (ATZ, RD ou ATZ+RD) ($p \leq 0,05$).

Tabela 2. Frequência (%) de nucleóides observados em cada uma das classes do cometa (0, 1, 2 e 3) e total de nucleóides danificados (média ± EP) em hemócitos de *C.fluminea* expostos apenas a água desclorada (CTR), a 2 e 10 ppm de Roundup (RD), a 2 e 10 ppb de atrazina (ATZ) ou a mistura de herbicidas (ATZ + RD) (2 ppb ATZ + 2 ppm RD) (10 ppb ATZ + 10 ppm RD) após 96 h. Os valores representam a média ± EP. * diferença significativa em relação ao CTR do mesmo experimento.

Experimento	Grupo	N	Classes de danos				Total de nucleóides danificados (Média ± EP)
			0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
ATZ	CTR	8	65,3	31,0	3,2	0,3	38,2 ± 4,3
	2 ppb	10	58,9	36,2	4,4	0,5	35,1 ± 6,3
	10 ppb	9	66,1	30,3	1,6	0,3	39,7 ± 0,7
RD	CTR	8	61,3	30,0	7,75	0,8	34,6 ± 2,9
	2 ppm	7	64,8	25,1	9,0	1,0	41,1 ± 3,0
	10 ppm	7	60,2	27,5	10,8	1,2	33,8 ± 1,1
ATZ + RD	CTR	9	69,8	29,2	1,0	0,0	30,1 ± 2,7
	2	10	48,0	39,6	10,2	2,2	50,3 ± 3,5*
	10	10	44,8	41,2	11,8	1,7	55,3 ± 1,8*

4. Discussão

Como apresentado na Figura 14, a brânquia, sendo o principal órgão local de absorção de contaminantes presentes no meio, apresentou maior número de alteração nos mecanismos de biotransformação, se comparada com a glândula digestiva, na qual não se observou nenhuma alteração significativa deste processo. Se analisarmos o comportamento da EROD frente a atrazina, Roundup[®] e a mistura destes, observamos que a atrazina se apresenta como um potencial inibidor da fase I da biotransformação, corroborando os dados apresentados por Santos e Martinez (2012) para *Prochilodus lineatus* expostos às mesmas concentrações de atrazina testadas no presente trabalho. Esta inibição é resultado da atuação do herbicida no citocromo P450 através da competição entre ligantes pelo sítio ativo da enzima CYP1A (Kitteringham et al., 1998). Uma vez que a metabolização tende formar compostos menos reativos e mais facilmente excretáveis que o composto de origem (Van Der Oost, 2003), a inibição deste mecanismo acarreta na permanência do produto formulado na célula, o que pode facilitar sua atuação como agente tóxico para o organismo. O Roundup[®] não se

apresentou como interferente na primeira fase da biotransformação. Todavia, a mistura dos dois herbicidas promoveu uma inibição da EROD na brânquia, provavelmente por ação da atrazina, uma vez que trabalhos como o de Abass et al. (2009) e Hietanen et al. (2009) notificaram aumento dos níveis de P450 e da atividade de monoxigenases em fígado de rato por atuação do glifosato. Esta interferência foi inferior à observada pela atuação da atrazina, sendo reestabelecida a atividade da CYP1A em cerca de 50% nesta situação teste. Assim, este efeito do Roundup[®] e da atrazina indica um efeito antagônico, onde o efeito da atrazina é, em parte, neutralizado pela presença do herbicida à base de glifosato, conhecido como ter efeito de aumentar a atividade de monooxigenases. Neste sentido, o Roundup[®] pode estar interferindo na disponibilidade e/ou acesso da atrazina aos sítios ativo da CYP1A, bem como, sob as condições dos experimentos desenvolvidos no presente trabalho, há uma sinalização celular para induzir a produção enzimática, relacionada ao aumento de atividade da EROD.

Embora a GST seja frequentemente usada como um indicador de exposição a agrotóxicos (Bowles et al., 2005; Peebua et al., 2007; Taysse et al., 1998; Xiao et al., 2006), apresentando-se ora inibida (Santos e Martinez, 2012) ora estimulada (Ezemonye e Tongo, 2010; Menezes et al., 2011), em *C. fluminea* tal enzima parece não ser de potencial importância para a metabolização de herbicidas, embora esta glutatona já tenha sido associada com a metabolização de contaminantes como PCBs e PAH em outras espécies de bivalves (Sheeham et al., 1995) e identificada como via de metabolização da atrazina (Jachetta e Radosevich, 1981). Segundo Wu et al. (2005) quando um organismo é exposto a um químico, existe um período latente antes que uma resposta possa ser observada (indução inicial). Passado este período, a resposta irá surgir até um nível máximo (indução máxima) e, em uma exposição prolongada, se adaptação for observada, a resposta pode diminuir ou até mesmo retornar aos níveis iniciais. Assim, as condições do presente trabalho não foram capazes de alterar o possível estado de latência da GST, seja por curto tempo de exposição ou concentrações de herbicidas insuficientes. Já a eliminação dos contaminantes e seus metabólitos (fase III) foi afetada, tendo sua atividade inibida, somente quando na presença dos dois contaminantes simultaneamente. Assim, a interferência neste mecanismo de fase III se apresenta como efeito do tipo potencialização, uma vez que a toxicidade dos herbicidas somente é observada na exposição simultânea aos herbicidas, não apresentando toxicidade para este mecanismo quando isolados. A inibição do mecanismo de eliminação de xenobióticos (MXR), associado com a inibição da EROD, pode dificultar a eliminação do xenobiótico do meio intracelular, promovendo o acúmulo de herbicidas e seus metabólitos nas células, tornando o organismo mais exposto e susceptível à atuação dos contaminantes.

As alterações observadas no processo de biotransformação podem estar relacionadas às mudanças obtidas para as defesas antioxidantes do animal, sendo que novamente, a brânquia se apresentou como principal alvo de efeito dos herbicidas. A exposição dos organismos ao xenobiótico pode aumentar a produção de ERO (Cadenas, 1995). O ânion radical superóxido, considerado uma ERO primária, é primariamente formado, podendo originar as ERO secundárias (Sie, 2003). O aumento de atividade da superóxido dismutase tanto na brânquia quanto na glândula, indica que atrazina e Roundup[®] são agentes potenciais de estímulo à produção de ERO no animal, sendo que o primeiro herbicida apresenta capacidade oxidativa mais elevada, ao interferir na atividade enzimática de ambos os órgãos.

Embora o animal esteja respondendo ao agente estressor através do aumento da SOD, tendo em vista que esta enzima atua sobre o $O_2^{\cdot-}$, convertendo-o a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (Aruoma, 1994; McCord e Fridovich, 1969), o aumento de atividade desta enzima tem como consequência imediata um aumento na concentração de H_2O_2 . Tanto a CAT quanto a GPx podem atuar na conversão deste derivado do oxigênio (Hermes-Lima, 2004). Uma vez que, na exposição à Roundup[®] e atrazina, a CAT permaneceu inalterada ou até mesmo inibida, e a GPx foi estimulada pela presença dos herbicidas, esta enzima tem papel central na defesa do organismo contra o H_2O_2 excedente. O aumento de atividade desta glutatona, todavia, não foi capaz de promover uma diminuição na quantidade da GSH disponível, em vista da reciclagem pela GR e/ou síntese pelo organismo. O não concomitante aumento da GPx com o aumento da SOD, como na glândula de animais expostos à atrazina, pode estar relacionado ao fato de o peróxido de hidrogênio se difundir facilmente pela membrana celular (Aruoma, 1994; Cadenas, 1995). Assim, este derivado de oxigênio formado possivelmente está sendo liberado através das membranas celulares e não pela atividade enzimática. Além disso, a CAT é a principal defesa antioxidante glandular se apresentou mais susceptível à toxicidade do Roundup[®], enquanto que a SOD, à da atrazina. As glutatonas se apresentaram como as mais resistentes à exposição aos herbicidas, uma vez que não foram observadas alterações nestes antioxidantes por atuação dos herbicidas isolados. Isso ocorre, possivelmente, por não estarem envolvidas diretamente na neutralização das ERO, mas sim como cofatores de enzimas de biotransformação, bem como, atuando na reciclagem de antioxidantes. O aumento de atividade enzimática antioxidante em bactérias (Demple, 1991; Lushchak, 2001) e levedura (Delaunay et al., 2000) é coordenada por mecanismos ERO-sensíveis, incluindo sensores, transcrição de genes transdutores e reguladores. Estes mecanismos em peixes e invertebrados é ainda incerto, mas elevação de atividade enzimática em resposta a estressores ambientais tem sido observada por muitos autores (Valavanidis et

al., 2006; Craig et al., 2007; Winston, 1991). Por outro lado, a diminuição de atividade enzimática, sob estresse oxidativo, tem sido relacionada com a sua inativação pela ERO, como a SOD que pode ser inativada pelo peróxido de hidrogênio (Bray et al., 1974), CAT pelo ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Lardinois, 1995) e a GST é sensível a produtos da reação de Haber-Weiss (Hermes-Lima e Storey, 1993)

A exposição dos bivalves dulcícolas à mistura dos herbicidas, todavia, teve um efeito do tipo antagônico nas enzimas antioxidantes primárias SOD branquial e glandular, CAT glandular e GPx branquial. Isso porque, os efeitos observados para os testes com os agrotóxicos individualmente foram anulados quando na presença de ambos. Neste ponto, baseado em Wu et al. (2005), é possível que no tempo de exposição de 96 horas, as defesas antioxidantes que não apresentaram alterações significativas, já se apresentem em um estado de adaptação, onde a alteração enzimática (efeito da exposição ao contaminante) diminui ou retoma seus níveis de atividade semelhantes ao grupo controle. À exceção destes, da CAT branquial, GPx e GR glandular e GSH, a mistura promoveu um efeito sinérgico na atividade da GR na menor concentração dos herbicidas, o qual se torna não significativo na concentração mais elevada de herbicidas, como um reflexo de adaptação do organismo à presença do contaminante. Isso pode indicar que o animal está passando por uma situação de utilização excessiva da GSH, a qual tem seus níveis ideais mantidos pela reciclagem da glutatona redutase.

À primeira vista, a neutralização dos efeitos dos herbicidas observada em tratamentos da mistura, parece ser um efeito satisfatório, uma vez que as enzimas foram mantidas em suas concentrações iniciais. Todavia, este fato não representa, necessariamente, ausência de formação de espécies reativas de oxigênio. Uma vez que os herbicidas são capazes de promover um aumento na produção de ERO quando isolados, verificado pelo aumento de atividade da SOD, continuam a ter este papel pró-oxidante se adicionados simultaneamente ao ambiente. As defesas antioxidantes são responsáveis pela manutenção do balanço entre a formação e a remoção das ERO do organismo. A não alteração (adequação) da atividade enzimática pode ter como consequência o acúmulo de biomoléculas oxidativas e potencialmente capazes de promover danos oxidativos (Imlay, 2003). Este fato, aliado à inibição do MXR, que é considerado um potencial protetor de organismos aquáticos contra danos no DNA (Waldmann et al., 1995), e inibição da EROD, expõem os organismos aquáticos tratados com a mistura à situação de estresse oxidativo. Esta situação é potencialmente danosa ao material genético, como evidenciado pelo aumento na ocorrência de danos oxidativos em hemócitos de *C. fluminea* (Figura 17). Assim como para a fase III da

biotransformação, a toxicidade dos herbicidas sofreu o efeito de potencialização sobre a fragmentação do DNA, uma vez que, embora não sendo capazes de promover danos oxidativos quando isolados, ao atuarem conjuntamente tiveram sua toxicidade potencialmente aumentada. Tanto atrazina quanto Roundup[®] apresentam ação genotóxica. De acordo com Oliveira-Brett e Silva (2002), a atrazina, assim como outros herbicidas do grupo triazina, são capazes de se ligar diretamente no DNA, através de mecanismos de intercalação e formação de adutos entre adenina e guanina. Peluso et al (1998) indicou que a formação de adutos com o DNA são os responsáveis pela genotoxicidade do herbicida Roundup[®], induzida por produtos adicionados às formulações e não pelo glifosato. Todavia, Bolognesi et al. (1997) demonstrou que tanto o glifosato quanto o Roundup[®] podem induzir danos oxidativos no DNA no rim e fígado de ratos. Esta genotoxicidade é evidenciada em trabalhos como os de Santos e Martinez (2012) e Modesto e Martinez (2010), os quais apresentam atrazina e Roundup[®], respectivamente, como sendo agentes genotóxicos em *Prochilodus lineatus*. Todavia, misturas contendo atrazina também podem ter efeito antagônico sobre a ocorrência de danos no DNA, como observado por Lin et al. (2005), onde a mistura de atrazina e cádmio promoveu uma redução na ocorrência de quebras no DNA, apresentando intensidade de danificação semelhante à observada para a atrazina individual. Assim como o observado para o teste do cometa, estudos têm mostrado que a atrazina possui sinergismo com alguns inseticidas (Belden e Lydy, 2000; Lydy et al., 2004; Papelindstrom e Lydy, 1997; Schuler et al., 2005), onde pode atuar aumentando a permeabilidade aos outros agrotóxicos. Observando-se a distribuição dos danos de diferentes classes (Tabela 2), nota-se que, mesmo animais expostos apenas à água controle exibem uma taxa basal de danos no material genético, os quais são reparados pelo organismo. Todavia, a exposição a contaminante acentua a ocorrência destes danos, principalmente de classes mais elevadas. Embora não haja uma relação direta entre a exposição a contaminantes e o total de nucleóides danificados, exceto para os testes com a mistura, a observação de danos de classes 2 e 3 se tornam mais frequentes em organismos exposto ao Roundup[®] e à mistura. Uma vez que, a porcentagem de danos de classes 2 e 3 foram maiores em exposições ao Roundup[®], quando comparado com a atrazina, este se apresenta com maior potencial genotóxico, tendo, possivelmente, grande participação no dano oxidativo observado para a mistura.

Além de promover quebras no DNA, o Roundup[®] também se apresentou indutor de danos nas membranas celulares. Embora algumas defesas antioxidantes tenham sido ativadas, como a SOD e a GPx, visando manter a integridade do organismo, a concentração de 10 ppm de Roundup[®] promoveu significativo aumento na quebra de ácidos graxos poli-insaturados,

tanto na brânquia como na glândula digestiva. A elevada concentração de ânion radical superóxido e peróxido de hidrogênio, evidenciada pelo aumento de atividade da SOD e GPx, pode originar, através da Reação de Fenton e Reação de Haber-Weiss o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) (Buonocore et al., 2010; Cadenas, 1995). Este radical é o principal causador de lipoperoxidação e quando gerado próximo a membranas, ataca as cadeias de ácidos graxos da membrana de fosfolípidios (Aruoma, 1994). Um único $\cdot\text{OH}$ pode resultar na conversão de centenas de ácidos graxos da cadeia lateral em lípidios hidroperóxidos. A acumulação destes lípidios na membrana perturba a sua função e pode causar seu colapso. Além do que, pode decompor a membrana e produzir uma gama de produtos altamente citotóxicos como, por exemplo, o malondialdeído (MDA), que podem formar adutos com o DNA (Marnett, 1999; Esterbauer et al., 1988). O ânion radical superóxido pode não ser tão reativo quanto o $\cdot\text{OH}$, porém sua forma protonada ($\text{HO}_2\cdot$) é mais reativa, podendo iniciar o processo de peroxidação dos ácidos graxos. Além disso, quando é produzido no interior da membrana hidrofóbica pode aumentar seu potencial de causar danos, uma vez que o $\text{O}_2\cdot^-$ é altamente reativo em solventes orgânicos (Halliwell e Gutteridge, 1999). Além do já citado $\cdot\text{OH}$, a redução de GSH está relacionada com a indução de danos na membrana celular em moluscos expostos a contaminantes metálicos (Viarengo et al., 1988).

A exposição aos dois herbicidas simultaneamente, assim como o observado na maioria dos demais biomarcadores, teve efeito antagônico sobre a ocorrência de lipoperoxidação, tanto na brânquia quanto na glândula digestiva. Nesta, não só houve a neutralização do efeito tóxico observado para o Roundup[®], como houve uma diminuição de danos na membrana em organismos expostos à maior concentração da mistura de herbicidas. Quando comparados ao grupo CTR, esta diminuição no nível de MDA pode ser tida como uma reação do organismo ao estresse oxidativo promovido pela maior quantidade de herbicida e pode ser resultado da participação de diferentes defesas do organismo, não analisadas no presente estudo, como vitamina E, fosfolipases e a fosfolípido hidroperóxido glutathione peroxidase (PHGPx). A vitamina E, considerada o principal antioxidante lipossolúvel que previne o ataque oxidativo da membrana (Machlin, 1984), é muito efetiva em remover radicais que promovem a peroxidação (Burton e Ingold, 1981; Burton et al., 1983), interrompendo a cadeia de reações da peroxidação lipídica (Ehrenkranz, 1980; Palamanda e Kehrer, 1993). É amplamente distribuída na natureza, estando presente em muitas plantas, algas, micro-organismos e animais, incluindo moluscos (Dyatlov, 1991; Ernst et al., 2013; Harrington e Harley, 1988; Rudneva, 1999; Thomas e Nyberg, 1988; Vilasoa-Martínez et al., 2008). A fosfolipase A_2 é apresentada por Frederik et al. (1987) como protetora de membranas celulares contra a

peroxidação. Estas biomoléculas são encontradas em plantas (Lee et al., 2005), insetos (Kuchler et al., 1989; Ryu et al., 2003), moluscos (McIntosh et al., 1995; Zarai et al., 2010), répteis (Kini, 2003), mamíferos (Valentin e Lambeau, 2000), dentre outras classes, e são responsáveis por manter a composição das membranas celulares e está envolvida na reposição de ácidos graxos livres (FFA) de fosfolipídios (Takeuchi et al., 1991). O tipo específico de enzima da família das peroxidases que contém selênio (PHGPx) foi recentemente identificada na glândula digestiva do mexilhão *Perna perna* (Almeida et al., 2004). Neste estudo a atividade da PHGPx foi relacionada com os níveis de MDA, onde o aumento na atividade desta enzima teve ligação com a falta de alteração ou queda na concentração de MDA observada nos organismos expostos a diferentes metais essenciais. Assim, este tipo específico de GPx se apresenta com papel fundamental na proteção das membranas contra a lipoperoxidação, sendo um possível novo biomarcador de toxicidade (Almeida et al., 2004).

Assim, nota-se que ambos os herbicidas testados se mostraram potencialmente tóxicos a *C. fluminea*, interferindo tanto nas defesas antioxidantes e mecanismos de biotransformação do animal quanto promovendo a instauração da situação de estresse oxidativo com consequentes danos às membranas celulares e ao material genético. A mistura dos herbicidas teve efeitos diversos dependendo do mecanismo de que se trata, sendo observado tanto antagonismo, na EROD branquial e LPO branquial e glandular, quanto sinergismo, no MXR da brânquia e no teste do cometa. Assim, os efeitos promovidos por misturas é do tipo complexo e variável, se apresentando ora intensificadora ora atenuante de efeitos adversos, apresentando maior interferência no órgão de contato mais íntimo com o ambiente, a brânquia. Embora tenha sido analisado um quadro bastante completo dos possíveis pontos de interferência dos contaminantes, desde os mecanismos de biotransformação, defesas antioxidantes e ocorrência de danos oxidativo, análises complementares como fosfolipases, vitamina E e PHGPx, são necessárias para a melhor compreensão dos mecanismos de ação dos herbicidas, principalmente quando se trata de exposição a misturas. As defesas antioxidantes, embora bastante importantes em situações de exposição a xenobióticos, não apresentaram alteração relevantes que garantisse seu uso como biomarcadores. O bivalve dulcícola *Corbicula fluminea* se apresenta como um bom biomonitor de ambientes contaminados pelos herbicidas atrazina e Roundup[®], sendo a EROD e LPO potenciais biomarcadores para os herbicidas em questão, respectivamente. Já para exposição à mistura, o teste do cometa e de acúmulo de Rodamina (MXR), apresentaram-se como bons biomarcadores deste tipo de contaminação.

Referências

- Abass, K., Turpeinen, M., Pelkonen, O., 2009. An evaluation of the cytochrome P450 inhibition potential of selected pesticides in human hepatic microsomes. *J. Environ. Sci. Health. B.* 44, 553-563.
- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaiee, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.* 10 (6), 141-147.
- Abdullah, M.P., Daud, J., Hong, K.S., Yew, C.H., 1995. Improved method for the determination of glyphosate in water. *J. Chromatogr.* 697, 363-369.
- Abou-Donia, M., Elmasry, E.M., Abu-Qare, A.W., 2002. Metabolism and toxicokinetics of xenobiotics, in: Derelanko, M.J., Hollinger, M.A. (Eds.), *Hand Book of Toxicology*, second ed. CRC Press, Boca Ranton, pp. 769-833.
- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourineaud, J.P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metal exposure. *Aquatic. Toxicol.* 67, 347-357.
- Ahmad, I., Shukla, S., Kumar, A., Singh, B.K., Patel, D.K., Pandrey, H.P., Singh, C., 2010. Maneb and paraquat-induced modulation of toxicant responsive genes in the rat liver: comparison with polymorphonuclear leukocytes. *Chem. Biol. Interact.* 188, 566-579.
- Almeida, E.A., Miyamoto, S., Bairy, A.C.D., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2004. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to diferente metals. *Mar. Pollut. Bul.* 49, 386-392.
- ANDEF 2012 [Associação Nacional de Defesa Vegetal]. <http://www.undef.com.br/defensivos>. Acesso em: 01.nov. 2012.
- Anderson, P.D., Weber, L.J., 1975. The toxicity to aquatic populations of mixtures containing certain heavy metals, in: *Proc. Int. Conf. on Heavy Metals in the Environment*, Toronto, 27-31, October 1975, pp. 933-954.
- Appleyard, S.J., 1995. Investigation of Ground Water Contamination by Fenamiphos and Atrazine in a Residential Area: Source and Distribution of Contaminant. *Ground Water Monit. Remediat.* 15, 110-113.
- Armas, E.D., Monteiro, R.T.R., 2005. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na Bacia do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. *Química Nova.* 28 (6), 975-982.
- Armas, E.D., Monteiro, R.T.R., Antunes, P.M., Santos, M.A.P.F., Camargo, P.B., Abakerli, R.B., 2007. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. *Química Nova.* 30 (5), 1119-1127.
- Arraes, A.A., Barreto, E.M.S., Araujo, J.C., 2008. Use of Atrazine and groundwater availability in Brazil: Case Study Tainguá. Trabalho apresentado ao 13° World Water Congress, International Water Resources Association, Montpellier.
- Aruoma, O.I., 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* 32 (7), 671-683.
- Backhaus, T., Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2000. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2348-2356.
- Balinova, A.M., Mondesky, M., 1999. Pesticides contamination of ground and surface water in Bulgarian Danube plain. *J. Environ. Sci. Health B.* 34, 33-46.
- Bard, S.M., 2002. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic. Toxicol.* 48, 357-389.
- Baturo, W., 1995. Etude des effets écotoxicologiques de l'atrazine et de l'hexachlorobenzène sur *Lymnaea palustris* (Müller) (Gastropoda, Pulmonata) maintenue em mésocosmes:

- identification et validation expérimentale de biomarqueurs. Thesis report. University of Paris-Sud, Orsay, France.
- Baturo, W., Lagadic, L., 1996. Benzo[a]pyrene hydroxylase and glutathione-S-transferase activities as biomarkers in *Lymnaea palustres* (Mollusca, Gastropoda) exposed to atrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 771-781.
- Belden, J.B., Lydy, M.J., 2000. Impact of atrazine on organophosphate insecticide toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2266-2274.
- Belluck, D.A., Benjamin, S.L., Dawson, T., 1991. Groundwater contamination by atrazine and its metabolites: risk assessment, policy and legal implications, in: Somasundaram, L., Coats, J.R. (Eds.), *Pesticides transformation products: fate and significance in the environment*. American Chemical Society, Washington.
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods*. Grune & Stratton, New York.
- Biagianti-Risbourg, S., Bastide, J., 1995. Hepatic perturbations induced by herbicide (atrazine) in juvenile grey mullet *Liza ramada* (Mugilidae, Teleostei): an structural study. *Aquatic Toxicol.* 31, 217-229.
- Bolognesi, C., Bonnati, S., Degan, P., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R., Roggieri, P., Abbondandolo, A., 1997. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. *J. Agric. Food Chem.* 45 (5), 1957-1952.
- Bouilly, K., McCombie, H., Leitao, A., Lapegue, S., 2004. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 145, 699-705.
- Bowles, D., Isayenkova, J., Lim, E., Poppenberg, B., 2005. Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 254-263.
- Bray, R.C., Cockle, S.A., Fielden, E.M., Roberts, P.B., Rotilio, G., Calabrese, L., 1974. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 139, 43-48.
- Buonocore, F., Randelli, E., Facchiano, A.M., Pallavicini, A., Modonut, M., Scapigliati, G., 2010. Molecular and structural characterization of the macrophage migration inhibitory factor from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) *Vet. Immunol. Immunopathol.* 136, 297-304.
- Burton, G.W., Ingold, K.U. 1981. Autoxidation of biological molecules. I. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 6472-6477.
- Burton, G.W., Joyce, A., Ingold, K.U. 1983. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membrane? *Arch. Biochem. Biophys.* 221, 281-290.
- Bushway, R.J., Hurst, H.L., Perkins, L.B., Tian, L., Guiberteau Cabanillas, C., Young, B.E.S., Ferguson, B.S., Jennings, H.S., 1992. Atrazine, Alachlor and Carbofuran contamination of well water in Central Maine. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 1-9.
- Cadenas, E., 1995. Mechanisms of Oxygen Activation and Reactive Oxygen Species Detoxification, in: Ahmad, S. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapman & Hall, New York.
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M., 1998. Analyses of Oxidation and Antioxidants using Microtiter Plates, in: Armstrong, D. (Ed.), *Free radical and antioxidants protocols*. Humana Press, New Jersey, pp.377-387.
- Carlberg, I., Mannervik, B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475-5480.
- Cataldo, D., Colombo, J.C., Boltovskoy, D., Landoni, P., 2001. Environmental toxicity assessment in the Paraná river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected

- pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles. *Environ. Pollut.* 112, 379-389.
- Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V.L., Menezes, C.C., Pretto, A., Baldisserotto, B., Santi, A., Avila, L.A., 2001. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing glyphosate. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 87, 597-602.
- Colombo, J.C., Bilos, C., Campanaro, M., Presa, M.J.R., Catoggio, J.A., 1995. Bioaccumulation of Polychlorinated Biphenyls and Chlorinated Pesticides by the Asiatic Clam *Corbicula fluminea*: Its use as sentinel organism in the Rio de La Plata Estuary, Argentina. *Environ. Sci. Technol.* 29, 914-927.
- Costa, M.J., Monteiro, D.A., Oliveira-Neto, A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2008. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. *Ecotoxicol.* 17, 153-163.
- Costa, L.L.F., Sant'ana, E.S., Suchara, E.A., Benato, V.S., Carasek, E., 2008. Determinação De Herbicidas Usados No Cultivo De Arroz Arrigado Na Região Sul Do Estado De Santa Catarina Através Da Spme-Gc-Ecd. *Química Nova.* 31 (1), 79-83.
- Cox, C., 2001. Atrazine: environmental contamination and ecological effects. *J. Pestic. Reform.* 21, 12 – 20.
- Craig, P.M., Wood, C.M., McClelland, G.B., 2007. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Am. J. Physiol.* 293, 1882–1892.
- Cuppen, J.G., Crum, S.J.H., Heuvel, H.H.V.D., Smidt, R.A., Brink, P.J.V.D., 2002. Effects of a mixture of two insecticides in freshwater microcosms: I. Fate of chlorpyrifos and lindane and responses of macroinvertebrates. *Ecotoxicol.* 11, 165–180.
- Da Silva, M.D., Peralba, M.C.R., Mattos, M.L.T., 2003. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do Arroio Passo do Pilão. *Agrotóxicos: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente.* 13, 19-28.
- Delaunay, A., Isnard, A.D., Toledano, M.B., 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* 19, 5157–5166.
- Demple, B., 1991. Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu. Rev. Genet.* 25, 315–337.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1103-1123.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Velp, P.A., 1995. Biochemical mechanism, adaptation and toxicity, in: Rang, G. (Ed.), *Fundamental of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate and Risk Assessment.* Taylor and Francis, London.
- Dong, X., Zhu, L., Wang, J., Wang, J., Xie, H., Hou, X., Jia, W., 2009. Effects of atrazine on cytochrome P450 enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* 77, 404–412.
- Dutra, B.K., Fernandes, F.A., Failace, D.M., Oliveira, G.T., 2011. Effect of Roundup (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). *Ecotoxicol.* 20, 255- 263.
- Dyatlov, V.A., 1991. Vitamin E regulates acetylcholine receptor function of molluscan neurons. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C (3), 665-669.
- Dyson, J.S., Beulke, S., Brown, C.D., Lane, M.C.G., 2002. Adsorption and degradation of the weak acid mesotrione in soil and environmental fate implications. *J. Environ. Qual.* 31 (2), 613-618.
- Eaton, D.L., Gilbert, S.G., 2008. General Principles of Toxicology, in: Casarret, L., Klaassen, C.D. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, seventh ed. Mc Graw Hill, United States of America.

- Eggens, M.L., Galgani, F., 1992. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish fast determination with fluorescence plate-reader. *Mar. Environ. Res.* 33, 213-221.
- Ehrenkranz, R., 1980. Vitamin E and the neonate. *Am. J. Dis. Child.* 134, 1157-1168.
- Eisler, R., 1989. Atrazine hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *Biol. Rep.* 85.
- El-Shenawy, N.S., Abdel-Nabi, I.M., Moaward, T.I., Taha, I.A., 2003. Physiological and behavioral responses of *Ruditapes decussatus* to Roundup and reldan. *Egypt. J. Biol.* 5, 108-119.
- El-Shenawy, N., Moawad, T.I., Mohallal, M.E., Abdel-Nabi, I.M., Taha, I.A., 2009. Histopathologic biomarkers responses of clam, *Ruditapes decussates*, to organophosphorous pesticides Reldan and Roundup: A laboratory study. *Ocean Sci J* 44, 27-34.
- Ernst, I.M.A., Pallauf, K., Bendall, J.K., Paulsen, L., Nikolai, S., Huebbe, P., Roeder, T., Rimbach, G., 2013. Vitamin E supplementation and lidespan in model organisms. *Ageing Res. Rev.* 12, 365-375.
- Esterbauer, H., Zollner, H., Schaur, R.J., 1988. Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation, *ISI Atlas Sci. Biochem.* 1, 311-315.
- Ezemonye, L., Tongo, I., 2010. Sublethal effect of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere.* 81, 214-217.
- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Komatsu, T., Morahashi, K., Hayes, T.B., Takayanagi, R., Nawata, H., 2007. Atrazine induced aromatase expression is sf-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans *Environ. Health Perspect.* 115 (5), 720-727.
- Fedato R.P., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2010. Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 700, 80-85.
- Ferreira, D., Motta, A.C., Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V.L., Barcellos, L.J.G., 2010. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemical. *Chemosphere.* 79, 914-921.
- Fitzpatrick, P.J., Sheeham, D., 1993. Separation of multiple forms of glutathione S-transferase from the Blue Mussel *Mytilus edulis*. *Xenobiotica.* 23, 851-861.
- Fitzpatrick, P., Krag, T.O.B., Højrup, P., Sheehan, D., 1995. Characterization of glutathione S-transferase and a related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biochem. J.* 305, 145-150.
- Flynn, K., Spellman, T., 2009. Environmental levels of atrazine decrease spatial aggregation in the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1228-1233.
- Gerard, C., Poullain, V., 2005. Variation in the response of the invasive species *Potamopyrgus antipodarum* (Smith) to natural (cyanobacterial toxin) and anthropogenic (herbicide atrazine) stressors. *Environ. Pollut.* 138, 28-33.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167, 35-120.
- Gojmerac, T., 1996. Seasonal Atrazine contamination of drinking water in pig-breeding farm surroundings in agricultural and industrial areas of Croatia. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 225-230.
- Goksoyr, A., Andersson, T., Buhler, D.R., Stegeman, J.J., Williams, D.E., 1991. Immunochemical cross-reactivity of β -naphthoflavone inducible cytochrome P450 (P450_{1A}) in liver microsomes from different fish species and rat. *Fish. Physiol. Biochem.* 9, 1-13.

- Graymore, M., Stagnitti, F., Allinson, G., 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. Int.* 26, 483-495.
- Grosvick, B.E., Jonsson, H., Rodríguez-Ortega, M.J., Roepstorff, P., Goksoyr, A., 2006. CYP1A-immunopositive proteins in bivalves identified as cytoskeletal and major vault proteins. *Aquatic Toxicol.* 79, 334-340.
- Hall, J.K., Pawlus, M., Higgins, E. R., 1972. Losses of atrazine in runoff water and soil sediment. *J. Environ. Qual.* 1, 172-176.
- Hall, J.K., 1974. Erosional losses of s-triazine herbicides. *J. Environ. Qual.* 3 (2), 174-180.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Rad. Biol. Med.* third ed. Oxford University Press, New York.
- Hanioka, N., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T., Ando, M., 1998. Changes in rat liver cytochrome P450 enzymes by atrazine and simazine treatment. *Xenobiotica.* 28 (7), 683-698.
- Harrington, L.A., Harley, C., 1988. Effect of vitamin E on lifespan and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* 43, 71-78.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A., 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99, 5476-5480.
- Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haefele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjuoa, Y., Parker, J., Tsui, M., 2006. Pesticides mixtures, endocrine disruption and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environ. Health. Perspect.* 114, 140-150.
- Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1993. In vitro oxidative inactivation of glutathione S-transferase from a freeze tolerant reptile. *Mol. Cell. Biochem.* 124, 149-158, 1993.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals, in: Storey, K.B. (Ed.), *Functional metabolism: regulation and adaptation*. John Wiley & Sons, New York, pp. 319-368.
- Hietanen, E., Linnainmaa, K., Vainio, H., 2009. Effects of phenoxyherbicides and glyphosate on the hepatic and intestinal biotransformation activities in the rat. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 53, 103-112.
- Holeck, K.T., Mills, E.L., Macisaac, H.J., Dochoda, M.R., Colautti, R.I., Ricciardi, A., 2004. Bridging troubled waters: biological invasions, transoceanic shipping, and the Laurentian Great Lakes. *BioSci.* 54, 919-929.
- Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J. Haematol.* 25, 563 - 575.
- Howard, P.H., 1991. *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals*. V. 3. Lewis, Chelsea.
- Hultberg, M., 2007. Cysteine turnover in human cell lines is influenced by glyphosate. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 19-22.
- Hussein, S.Y., El-Nasser, A., Ahmed, M., 1996. Comparative Studies on the Effects of Herbicide Atrazine on Freshwater Fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysithyes auratus* at Assiut, Egypt. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 503-510.
- IBAMA 2010 [Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis] *Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: Uma abordagem ambiental*. Rebelo, R.M. (Coord.), Vasconcelos, R.A., Buys, B.D.M.C., Rezende, J.A., Moraes, K.O.C., Oliveira, R.P. IBAMA, Brasília.
- Imlay, J.A., 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395-418.
- Jablonowski, N.D., Koepchen, S., Hofmann, D., Schaeffer, A., Burael, P., 2009. Persistence of ¹⁴C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22 years. *Environ. Pollut.* 157 (7), 2126-2131.

- Jachetta, J.J., Radosevich, S.R., 1981. Enhanced degradation of corn by (*Zea mays*). Weed Sci. 29, 37-44.
- Kelly, S.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., Levin, E.D., 1998. Oxidative stress: established mammalian and emerging piscine model systems. Environ. Health Perspect. 106, 375-384.
- Kini, R.M. 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. Toxicon J. 42 (8), 827-840.
- Kleinschmidt, A.R.B. 2007. Transporte e retenção de triazinas em compartimentos ambientais terrestres e aquáticos em área de milho do sistema de plantio direto. 2007. 136f. (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- Kookana, R.S., Baskaran, S., Naidu, R., 1998. Pesticide fate and behavior in Australian soils in relations to contamination and management of soil and water: a review. Aust. J. Soil Res. 36 (5), 715-764.
- Kross, B.C., Selim. M.I., Hallberg, G.R., Bruner, D.R., 1992. Cherryholmes, K. Pesticide contamination of private well water, a growing rural health concern. Environ. Intern. 18, 231-241.
- Kuchler K., Gmachl, M., Sippl, M.J., Kreil, G., 1989. Analysis of the cDNA for phospholipase A₂ from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. Eur. J. Biochem. 184, 249-254.
- Kurelec, B., Pivcevic, B., 1991. Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicol. 19, 291-302.
- Kurelec, B., Smital, T., Pivcevic, B., Eufemia, N., Epel, D., 2000. Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein and Chemosensitizers. Ecotoxicol. 9, 307-327.
- Lavorenti, A., 1996. Comportamento dos herbicidas no solo, in: Workshop sobre Biodegradação. Campinas. Jaguariúna, Sp. Embrapa –CNPMA, pp. 81-115.
- Lee, H.Y., Bahn, S.C., Shin, J.S., Hwang, I., Back, K., Doelling, J.H., Beungtae, S., 2005. Multiple forms of secretory phospholipase A₂ in plants. Prog. Lipid Res. J. 44, 52-67.
- Lemaire, P., Livingstone, D.T., 1993. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organism, in particular the flounder *Platichthys flesus* and mussel *Mytilus edulis*. Trends Comp. Biochem. Physiol. 1, 1119-1150.
- Lin, A.J., Zhu, Y.G., Tong, Y.P., Geng, C.N., 2005. Evaluation of genotoxicity of combined pollution by cadmium and atrazine. Bul. Environ. Contam. Toxicol. 74, 589-596.
- Livingstone, D.R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in aquatic environment. J. Chem. Technol. Biotechnol. 57, 195-211.
- Livingstone, D.R., 1998. The fate of the organics xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comp. Biochem. Physiol. 120, 43-49.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. Pollut. Bul. 42, 656-666.
- Livingstone, D.R., Förlin, L., George, S., 1994. Molecular biomarkers and toxic consequences of impact by organic pollution in aquatic organisms. In: SUTCLIFFE, D.W. (ed.) Water quality and stress indicators in marine and freshwater systems: linking levels of organization. Freshwater Biological Association, United Kingdom.
- Livingstone, D.R., Nasci, C., Montserrat, S., Da Ros, C., O'hara, S., Peters, L., Fossato, V., Wootton, A., Goldfarb, P., 1997. Apparent induction of a cytochrome P450 with immunochemical similarities to CYP1A in digestive gland of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) with exposure to 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl and Arochlor 1254. Aquatic Toxicol. 38, 205-224.

- Luedeking, A., Koehler, A., 2004. Regulation of expression of multixenobiotic resistance(MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicol.* 69, 1-10.
- Lushchak, V.I., 2001. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochem.* 66, 476-489.
- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere.* 76, 932-937.
- Lydy, M.J., Austin, K.R., 2004. Toxicity assessment of pesticide mixtures typical of the Sacramento-San Joaquin delta using *Chironomus tentans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 49-55.
- Machlin, L.J., 1984. *Handbook of Vitamins*. Marcel Dekker, New York, p. 99-146.
- Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 424, 83-95.
- Mattos, M.L.T., Peralba, M.C.R., Dias, S.L.P., Prata, F., Camargo, L., 2002. Monitoramento ambiental do glifosato e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigada. *Agrotóxicos: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente.* 12, 145-154.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: An enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- McIntosh, J.M. F., Ghomashchi, M.H., Gelb, D.J., Dooley, S.J., Stoehr, A.B., Giordani, S.R., Naisbitt, B.M., 1995. Conodipine-M, a novel phospholipase A2 isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J. Biol. Chem.* 270, 3518-3526.
- McMahon, R.F., 2002. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: R selection versus resistance. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 59, 1235-1244.
- Menezes, C.C., Loro, V.L., Fonseca, M.B., Cattaneo, R., Pretto, A., Miron, D.S., Santi, A., 2011. Oxidative parameters of *Rhamdia quelen* in response to commercial herbicide containing clomazone and recovery pattern. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100, 145-150.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Roundup[®] causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lienatus*. *Chemosphere.* 78, 294-299.
- Muir, D.C.G., Yoo, J.Y., Baker, B.E., 1978. Residues of atrazine and N-deethylated atrazine in water from five agricultural watersheds in Québec. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 7, 221-235.
- Oliveira-Brett, A.M., Silva, L.A., 2002. A DNA-electrochemical biosensor for screening environmental damage caused by s-triazinederivates. *Anal. Bioanal. Chem.* 137C, 43-51.
- Pal, R., Ahmed, T., Kumar, V., Suke, S.G., Ray, A., Banerjee, B.D., 2009. Protective effects of different antioxidants against endosulfan-induced oxidative stress and immunotoxicity in albino rats. *Indian. J. Environ. Biol.* 47, 723-729.
- Palamanda, J.R., Kehrer, J.P., 1993. Involvement of vitamin E and protein thiols in the inhibition of microsomal lipid peroxidation by glutathione. *Lipids.* 28, 427-431.
- Papchenkova, G.A., Golovanova, I.L., Ushakova, N.V., 2009. The parameter of reproduction, sizes and activities of hydrolases in *Daphnia magna* straus of successive generations affected by Roundup herbicide. *Aquatic Toxicol.* 2 (3), 286-291.
- Papelindstrom, P.A., Lydy, M.J., 1997. Synergistic toxicity of atrazine and organophosphate insecticides contravenes the response addition mixture model. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2415-2420.
- Peebua, P., Kosiyachinda, P., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., 2007. Evaluation of Alachlor herbicide impacts on the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) using Biochemical Biomarkers. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 78, 138-141.

- Peluso, M., Munnia, A., Bolognesi, C., Parodi, S., 1998. ³²P-post-labeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup. *Environ. Mol. Mutagen.* 31 (1), 55-59.
- Pennec, G.L., Pennec, M.L., 2001. Evaluation of the toxicity of chemical compounds using digestive acini of the bivalve mollusk *Pecten maximus* L. maintained alive in vitro. *Aquatic Toxicol.* 53, 1-7.
- Pimentel, D., Levitan, L., 1986. Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *Biosci.* 36, 86-91.
- Pionke, H.B., Glotfelty, D.E., 1989. Nature and extent groundwater contamination by pesticides in an agricultural watershed. *Water Res.* 23, 1031-1037.
- Porte, C., Lemaire, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R., 1995. Partial purification and properties of cytochrome P450 from digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Environ. Res.* 39, 27-31.
- Possamai, F.P., Fortunato, J.J., Feier, G., Agostinho, F.R., Quevedo, J., Wilhelm Filho, D., Dal-Pizzo, F., 2007. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 198-204.
- Ramljak, S., Hackenberger, B.K., Smital, T., Britvic, S., 2000. Evaluation of genotoxic and cytochrome P450 monooxygenase inhibitory potential of Dicuran on prokaryotic and eukaryotic test systems. *J. Environ. Sci. Health B.* 35 (6), 751-770.
- Ricciardi, A., Rasmussen, J.B., 1999. Extinction rates of North American freshwater fauna. *Conserv. Biol.* 13, 1220-1222.
- Ritter, W.F., 1990. Pesticides contamination of ground water in the United States- A review. *J. Environ. Sci. Health B.* 25 (1), 1-29.
- Rudneva, I.I., 1999. Antioxidant system of Black Sea animals in early development. *Comp. Biochem. Physiol.* 122 C, 265-271.
- Russo, J., Madec, L., Brehélin, M., 2009. Haemocyte lysosomal fragility facing an environmental reality: A toxicological perspective with atrazine and *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) as a test case. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1719-1726.
- Ryu, Y., Oh, Y., Yoon, J., Cho, W., Baek, K., 2003. Molecular characterization of a gene encoding the *Drosophila melanogaster* phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta.* 1628, 206-210.
- Santos, T.G., Martinez, C.B.R., 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA Damage in the Neotropical fish species. *Chemosphere.* 89, 1118-1125.
- Schuler, L., Trimble, A., Belden, J., Lydy, M., 2005. Joint toxicity of triazine herbicides and organophosphate insecticides to the midge *Chironomus tentans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 173-177.
- Sheeham, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 123, 193-199.
- Shoults-Wilson, W.A., Peterson, J.T., Unrine, J.M., Richark, J., Black, M.C., 2009. The Asian clam *Corbicula fluminea* as a biomonitor of trace element contamination: Accounting for different sources of variation using an hierarchical linear model. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2224-2223.
- Sie, H., 2003. Strategies of antioxidant defense. Review. *Eur J Biochem* 215, 213-219.
- Singh, M., Sandhir, R., Kiran, R., 2010. Oxidative stress induced by atrazine in rat erythrocytes: mitigating effect of vitamin E. *Toxicol. Mech. Methods.* 20, 119-126.
- Smith, N.J., Martin, R.C., Croix, R.G., 1996. Levels of the herbicide glyphosate in well water. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 759-765.
- Solomon, K.R., Thompson, D.G., 2003. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *J. Toxicol. Environ. Health B.* 6, 289-324.

- Sousa, R., Nogueira, A.J.A., Gaspar, M.B., Antunes, C., Guilhermino, L., 2008a. Growth and extremely high production of the non-indigenous invasive species *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): Possible implications for ecosystem functioning. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 80, 289-295.
- Sousa, R., Rufino, M., Gaspar, M.B., Antunes, C., Guilhermino, L., 2008b. Abiotic impacts on spatial and temporal distribution of *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in the River Minho Estuary, Portugal. *Aquatic Conserv. Mar. Fresh. Ecosyst.* 18, 98-110.
- Sousa, R., Antunes, C., Guilhermino, L., 2008c. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *Annales de Limnologie – Int. J. Limnol.* 44, 85-94.
- Spanò, L., Tyler, C.R., Van Aerle, R., Devos, P., Mandiki, S.N., Silvestre, F., Thomé, J.P., Kestemont, P., 2004. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult gold fish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicol.* 66 (4), 369–379.
- Steinberg, C.E.W., Lorenz, R., Spieber, O.H., 1995. Effect of atrazine on swimming behavior of zebrafish *Brachydanio rerio*. *Water Res.* 29, 981-985.
- Takeuchi, Y., Morii, H., Tamura, M., Hayaishi, O., Watanabe, Y., 1991. A possible mechanism of mitochondrial dysfunction during cerebral ischemia: Inhibition of mitochondrial respiration activity by arachidonic acid. *Arch. Biochem. Physiol.* 289, 33-38.
- Taysse, L., Chambras, C., Marionnet, D., Bosgiraud, C., Deschaux, P., 1998. Basal level and induction of cytochrome P450, EROD, UDPGT and GST activities in carp (*Cyprinus carpio*) immune organs (spleen and head kidney). *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 6, 300-305.
- Thomas, J., Nyberg, D., 1988. Vitamin E supplementation and intense selection increase clonal life span in *Paramecium tetraurelia*. *Exp. Gerontol.* 23, 501-512.
- Torres, M.A., Testa, C.P., Gaspari, C., Masutti, M.B., Panitz, C.M.N., Curi-Pedrosa, R., De Almeida, E.A., Di Mascio, P., Filho, D.W., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bul.* 44, 923–932.
- Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere.* 52, 1189-1197.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189.
- Valentin, E., Lambeau, G., 2000. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1488, 59–70.
- Van Den Brink, P.J., Hartgers, E.M., Gylstra, R., Bransen, F., Brock, T.C.M., 2002. Effects of a mixture of two insecticides in freshwater microcosms: II. Responses of plankton and ecological risk assessment. *Ecotoxicol.* 11, 181–197.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- Ventura, B.C., Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A., 2008. Mutagenic and genotoxic effects of the atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and comet assay. *Pestic. Biochem. Physiol.* 90, 42-51.
- Viarengo, A., Pertica, M.C., Biasi, F., Cecchini, J., Orunesu, M., 1988. Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussel tissues. *Mar. Environ. Res.* 24, 354- 364.
- Vilasoa-Martínez, M., Calaza-Ramos, C., López-Hernández, J., Lage-Yusty, M.A., Losada, P.P., Quirós, A.R.B., 2008. Determination of vitamin E and carotenoid pigment by high

- performance liquid chromatography in shell of *Chionoecetes opilio*. *Anal. Chim. Acta.* 617, 225-229.
- Waldmann, P., Pivcevic, B., Müller, W.E.G., Zahn, R.K., Kurelec, B., 1995. Increased genotoxicity of acetylamino-fluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Mutat. Res.* 342, 113-123.
- White, A. W., Barnett, A. P., Wright, B. G., Holladay, J. H., 1967. Atrazine losses from fallow land caused by runoff and erosion. *Environ. Sci. Tech.* 1 (9), 740-744.
- WHO 1994 [World Health Organization] Glyphosate. Environment health criteria no 159. 1994.
- WHO 1993 [World Health Organization] International Programme on Chemical Safety (IPCS). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155. Geneva: World Health Organization, 1993.
- Winston, G.W., 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 100, 173-176, 1991.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1992. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicol.* 19, 137-161.
- Woodburn, A.T., 2000. Glyphosate: Production, pricing, and use worldwide. *Pest Manag. Sci.* 56, 309-312.
- Wu, R.S.S., Siu, W.H.L., Shin, P.K.S., 2005. Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring. *Mar. Pollut. Bul.* 51, 623-634.
- Xiao, N., Liu, X., Li, W., Ge, F., 2006. Effect of herbicide acetochlor on cytochrome P450 monooxygenases and GST of earthworms *Eisenia fetida*. *J. Environ. Sci.* 18 (1), 135-140.
- Zarai, Z., Bacha, A.B., Horchani, H., Bezzine, S., Zouari, N., Gargouri, Y., Mejdoub, H., 2010. A novel hepatopancreatic phospholipase A₂ from *Hexaplex trunculus* with digestive and toxic activities. *Arch. Biochem. Biophys.* 494, 121-129.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com a realização deste trabalho estão sintetizados na Tabela 3. Observou-se que tanto atrazina quanto Roundup[®] são potencialmente tóxicos ao bivalve dulcícola *Corbicula fluminea*, especialmente em tempos de exposição de 96 h, onde foram observadas alterações mais significativas, e quando em mistura. Tempos de exposição mais curtos (6 e 24 h) são necessários para auxiliar a compreensão do comportamento das defesas antioxidantes do animal ao longo do tempo e do próprio organismo na tentativa de biotransformar os contaminantes, bem como, quais dos diversos mecanismos envolvidos na exposição ao xenobiótico atuam primariamente, além de possibilitar a identificação de possíveis alterações que levaram a instauração da situação de estresse oxidativo em tempos de exposição mais longos. Embora as defesas antioxidantes e mecanismos de biotransformação objetivem proteger o organismo contra injúrias promovidas por xenobióticos, no presente trabalho, estas não se mostraram capazes de evitar danos mais severos como lipoperoxidação e quebras no material genético. A maioria destas alterações, como as quebras no DNA, são passíveis de reparo. Todavia, em situações ambientais reais, os organismos ficam expostos cronicamente aos contaminantes, ou seja, a observação de danos oxidativos em tempos relativamente curtos de exposição alerta para o perigo e consequências do contato da biota aquática com contaminantes no meio.

Alterações bioquímicas e genéticas, como as analisadas neste trabalho, podem interferir, a logo prazo, em níveis mais elevados de organização e de maior relevância ecológica como alterações comportamentais, reprodutivas e de sobrevivência que, direta ou indiretamente, interferem na manutenção da espécie no ambiente. Embora menos sensível que outras espécies de animais, como o peixe *Prochilodus lineatus*, *Corbicula fluminea* se apresentou como um bom organismo teste para estudos de toxicidade dos herbicidas atrazina e Roundup[®], uma vez que além de ter apresentado alterações importantes do efeito dos herbicidas, apresenta características biológicas, como alta densidade e fácil coleta, manuseio e amostragem, que auxiliam e facilitam a realização de testes ecotoxicológicos.

Os biomarcadores analisados são ferramentas de extrema valia em estudos de biomonitoramento, entretanto, estas são complementares, e por isso é importante uma análise conjunta de vários biomarcadores para um diagnóstico adequado da toxicidade de poluentes, bem com, da consideração de diversos fatores interferentes como a variação tecidual. Ao observar a Figura 18, que apresenta uma comparação entre brânquia e glândula digestiva quanto aos biomarcadores analisados, é possível notar que a brânquia é um órgão que tem

especial importância na defesa primária dos organismos. Já a glândula digestiva, além do seu papel central na metabolização e eliminação de contaminantes, ao apresentar-se como principal local de atividade/concentração dos biomarcadores, se torna um órgão de grande importância em estudos toxicológicos.

A potencialização observada para exposição simultânea a atrazina e Roundup[®] alerta para a necessidade de mais estudos que verifiquem a atuação conjunta de contaminantes, uma vez que, além de muito complexas e incompreendidas, um composto, que isoladamente não é tóxico, pode apresentar potencialidade em causar danos aos organismos quando na presença de outro contaminante. A exposição simultânea a diversos contaminantes é uma situação extremamente comum no ambiente, uma vez que diariamente uma grande quantidade e diversidade de substâncias químicas são lançadas nos corpos d'água por atividade antrópica. Assim, ao estabelecer os limites máximos permitidos para um determinado contaminante, as legislações ambientais brasileiras devem considerar não apenas a toxicidade do composto isolado no ambiente, mas sim, e principalmente, o perigo de sua toxicidade quando na presença de outras substâncias. Desta forma, o limite de 2 ppb de atrazina, permitido pela Resolução CONAMA 357, não se mostrou uma concentração ambientalmente segura para manutenção do bem-estar da biota aquática, como *Corbicula fluminea*. O Roundup[®], considerado menos perigoso que a atrazina, pode ser encontrado no meio ambiente e se apresentar potencialmente tóxico ao bivalve em questão, devendo ganhar maior atenção quando na elaboração de Leis de defesa ao Meio Ambiente.

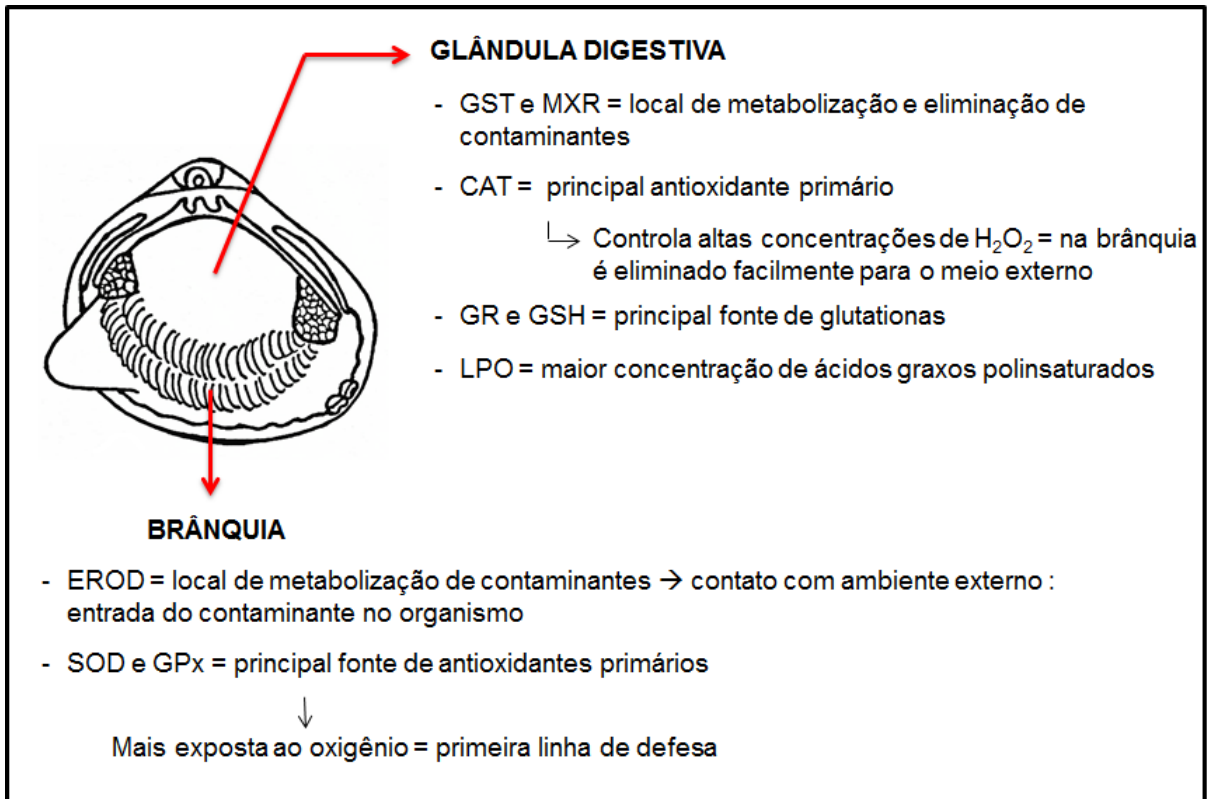


Figura 18. Esquema dos principais biomarcadores observados em cada órgão analisado: comparação entre brânquia e glândula digestiva.

Tabela 3. Resultados obtidos para os parâmetros analisados em brânquia (BRQ) e glândula digestiva (GL) de *Corbicula fluminea* expostos por 6, 24 e 96 h a atrazina (ATZ) e Roundup® (RD), isoladamente, e em mistura (ATZ + RD). As setas para cima e para baixo indicam, respectivamente, aumento e diminuição de atividade ou concentração dos biomarcadores, sendo que os efeitos apresentados na última coluna se referem apenas aos experimentos da mistura (96 h). [2] e [10] representam alteração na menor e maior concentração do herbicida ou mistura, respectivamente.

BIOMARCADOR	ÓRGÃO	ATZ			RD			ATZ + RD	EFEITO
		6h	24h	96h	6h	24h	96h	96h	
EROD	BRQ		↓[2]	↓[2 e 10]				↓[2 e 10]	Antagonismo
	GL		↑[2]						
MXR	BRQ	↓[2]						↓[10]	Potencialização
	GL					↓[10]			
SOD	BRQ		↑[2]	↑[10]	↑[10]	↑[2 e 10]	↑[10]		Antagonismo
	GL		↑[2 e 10]	↑[2 e 10]	↑[10]				Antagonismo
CAT	BRQ	↓[10]							Antagonismo
	GL				↓[2 e 10]		↓[10]		
GPx	BRQ			↑[2]				↑[10]	Antagonismo
	GL		↑[2]		↑[10]				
GR	BRQ					↓[10]		↑[2]	Potencialização
	GL				↓[10]	↓[2 e 10]			
GSH	BRQ	↑[10]	↑[10]						
	GL								
LPO	BRQ			↓[2]				↑[10]	Antagonismo
	GL							↑[10]	Antagonismo
COMETA	Hemócitos		↑[2]					↑[2 e 10]	Potencialização