



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

THAIS GRACIANO SANTOS

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS PARA A
DETECÇÃO DOS EFEITOS DO HERBICIDA ATRAZINA NO
PEIXE NEOTROPICAL *Prochilodus lineatus***

Londrina
2010

THAIS GRACIANO SANTOS

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS PARA A
DETECÇÃO DOS EFEITOS DO HERBICIDA ATRAZINA NO
PEIXE NEOTROPICAL *Prochilodus lineatus***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, pelo curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Cláudia B. R. Martinez

Londrina
2010

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S237b Santos, Thais Graciano.

Biomarcadores bioquímicos e genéticos para a detecção dos
efeitos do herbicida Atrazina no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* /
Thais Graciano Santos. – Londrina, 2010.
71 f. : il.

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, 2010.

Inclui bibliografia.

THAIS GRACIANO SANTOS

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS PARA A
DETECÇÃO DOS EFEITOS DO HERBICIDA ATRAZINA NO PEIXE
NEOTROPICAL *PROCHILODUS LINEATUS***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, pelo curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marisa Narciso Fernandes
UFSCAR – São Carlos - SP

Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Sofia
UEL – Londrina - PR

Prof^a. Dr^a. Cláudia Bueno dos Reis Martinez
UEL – Londrina - PR

Londrina, 17 de dezembro de 2010.

AGRADECIMENTOS

À prof^a Cláudia Martinez, por ter aceitado me orientar, por ter me mostrado essa área maravilhosa da biologia que é a ecotoxicologia, por tudo que eu aprendi, pelos momentos de distração dentro e fora do laboratório, pelo meu amadurecimento profissional e pessoal durante esses dois anos. Meu muito obrigada pela confiança em mim e em meu trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade concedida.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UEL, pelo conhecimento adquirido.

Aos departamentos de Ciências Fisiológicas, Biologia Geral e Biologia Animal e Vegetal, pelos recursos oferecidos.

Aos funcionários da Piscicultura da UEL.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática do CNPq (INCT-TA), pela bolsa concedida (AT) e pelo apoio financeiro.

À Prof^a Dr^a Silvia Helena Sofia, por fazer parte da banca e pelos ensinamentos dados durante o curso.

À Prof^a Dr^a Marisa Narciso Fernandes, por se prontificar a participar da minha banca.

Ao Prof. Dr. Paulo Meletti e à Prof^a Dr^a Marta Marques de Souza, pelas contribuições, ainda que pequenas, que tiveram em meu trabalho.

A todos os integrantes do Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA). Obrigada pela ajuda durante os experimentos, as dicas na “pré-qualificação”, pelas confraternizações sempre recheadas de coisas gostosas, enfim,

obrigada por terem participado desses dois anos da minha vida. Não citarei nomes para não ter perigo de esquecer ninguém (afinal, são 20 e tantos colegas de laboratório), mas vocês foram fundamentais no desenvolvimento desse trabalho e também no meu desenvolvimento pessoal.

Aos meus pais, Silvio e Vera, por acreditarem em mim, e, com muito amor e carinho, me apoiarem sempre que eu precisei. Vocês são meu alicerce, meu tudo.

Aos meus avós, Mário e Celiza, pelo carinho que sempre me deram e por participarem da minha educação. Amo vocês!!!

Às minhas irmãs, Daiany e Fernanda, e ao meu sobrinho Victor, pelo apoio, pelo amor e por sempre me receberem às sextas-feiras com um sorriso no rosto. Vocês são meus amores.

Ao meu namorado Thiago, por sempre me incentivar e entender minhas escolhas. Você foi essencial durante esses anos.

E, principalmente, agradeço a Deus, que me guiou, me deu forças e sabedoria para alcançar todos os meus objetivos. Obrigada, meu Deus, por se fazer presente na minha vida!

*Quando a última árvore tiver caído,
Quando o último rio tiver secado,
Quando o último peixe for pescado,
Vocês vão entender que o dinheiro não se come.
(Greenpeace)*

SANTOS T. G. **Biomarcadores bioquímicos e genéticos para a detecção dos efeitos do herbicida atrazina no peixe neotropical *Prochilodus lineatus***. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração Zoologia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

A atrazina, um dos herbicidas mais utilizados mundialmente, é um potencial contaminante aquático, podendo alcançar corpos d'água e interagir com a biota local. Biomarcadores podem ser ótimas ferramentas para avaliação dos impactos da contaminação para os organismos aquáticos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos deste herbicida para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Para tanto, peixes jovens foram expostos somente água (CTR) ou a 2 ou 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina (ATZ 2 e ATZ 10, respectivamente) em exposições estáticas de 24 ou 48 horas. Após as exposições, os peixes foram amostrados para a coleta dos tecidos. Amostras de sangue, brânquias e fígado foram utilizadas no ensaio do cometa para avaliar os danos no DNA. Amostras de fígado também foram utilizadas para a determinação da atividade das enzimas de biotransformação CYP1A (pelo ensaio da EROD) e glutathione S-transferase (GST), e das enzimas de defesa antioxidante superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR); do conteúdo de glutathione reduzida (GSH); das gerações de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a ocorrência de peroxidação lipídica (LPO). Amostras de cérebro e músculo foram usadas para a análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE). Em comparação com o grupo CTR, os peixes expostos às duas concentrações de atrazina, durante 24 h, apresentaram diminuição na atividade da SOD, CAT e GPx e aumento na atividade da GR. Também foi observada redução na geração de ERO e na ocorrência de LPO. Ainda após 24 h, os peixes do grupo ATZ 2 apresentaram inibição da atividade da EROD e do grupo ATZ 10, aumento de danos no DNA nos eritrócitos. Após 48 horas de exposição a ambas concentrações do herbicida os peixes apresentaram redução significativa nas atividades da EROD, SOD, CAT e GPx, e aumento significativo na atividade da GR, em relação aos peixes do grupo CTR. A atividade da GST e a geração de ERO reduziram significativamente apenas no grupo ATZ 10, enquanto os níveis de GSH e LPO diminuíram apenas no grupo ATZ 2. Ocorreu aumento nos danos no DNA dos eritrócitos e hepatócitos dos peixes do ATZ 10 e das células branquiais dos peixes do grupo ATZ 2. Nenhuma das concentrações de atrazina testadas promoveu alteração significativa da atividade da AChE, em nenhum período experimental. Assim, fica evidente que a atrazina, mesmo em baixas concentrações, compromete as vias de biotransformação e as defesas antioxidantes de *P. lineatus* e promove danos no DNA de eritrócitos e células das brânquias e do fígado.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Antioxidantes. Biotransformação. Danos no DNA. Ensaio do cometa. Estresse oxidativo.

SANTOS T. G. **Biochemical and genetic biomarkers to detect the effects of the herbicide atrazine on neotropical fish *Prochilodus lineatus***. 2010. 71 f. Dissertation (Master on Biological Science – Concentration Area Zoology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Atrazine, one of the most herbicides used in the world, is a potential contaminant of water and may reach water bodies and interact with the local biota. Biomarkers can be useful tools to assess the impacts of contamination to aquatic organisms. Thus, the aim of this work was to evaluate the effects of this herbicide on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. For this, juveniles of *P. lineatus* were exposed to 2 or 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of atrazine (ATZ 2 and ATZ 10, respectively) or only to water (CTR) in static exposures of 24 or 48 hours. After exposure, fishes were sampled for the removal of tissues. Samples of blood, gills and liver were used to perform the comet assay in order to evaluate DNA damage. Liver samples were also used in biochemical assay to determine the activity of the biotransformation enzymes CYP1A (through EROD assay) and glutathione S-transferase (GST), and the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR); the content of reduced glutathione (GSH); the generation of reactive oxygen species (ROS) and the occurrence of lipid peroxidation (LPO). Samples of brain and muscle were used for the analysis of acetylcholinesterase (AChE) activity. In comparison to CTR group, fish exposed to both concentrations of atrazine, for 24 h, showed a decrease in SOD, CAT and GPx activities and an increase in the activity of GR, it was observed a reduction in ROS generation and LPO. Fish exposed to 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of atrazine showed inhibition of EROD activity and those exposed to 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of atrazine an increase in DNA damage in erythrocytes. After 48 hours of exposure to both herbicide concentrations fish showed a significant reduction in the activities of EROD, SOD, CAT and GPx, and a significant increase in GR activity, when compared to respective controls. GST activity and ROS generation decreased significantly only in fish exposed to 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of atrazine, while the levels of GSH and LPO decreased only in those exposed to 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of atrazine. There was an increase in DNA damage in liver and blood cells of fish exposed to the higher herbicide concentration and in gill cells of fish exposed to the lower one. Atrazine did not cause significant changes on AChE activity at any experimental period. Thus, it becomes clear that atrazine, even at low concentrations, disrupts biotransformation and antioxidant defenses of *P. lineatus* and promotes DNA damage in erythrocytes and gills and liver cells.

Keywords: Acetylcholinesterase. Antioxidants. Biotransformation. DNA damage. Comet assay. Oxidative stress.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	POLUIÇÃO AQUÁTICA	10
1.2	CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR AGROTÓXICOS	12
1.3	ATRAZINA	14
1.4	ECOTOXICOLOGIA	18
1.4.1	Biomarcadores Bioquímicos	20
1.4.2	Biomarcadores Genéticos	27
1.5	PROCHILODUS LINEATUS COMO MODELO EXPERIMENTAL	28
2	OBJETIVOS	30
2.1	OBJETIVO GERAL	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3	ARTIGO: ATRAZINA PROMOVE ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E DANOS NO DNA DE UMA ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL.	31
4	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 POLUIÇÃO AQUÁTICA

Os sistemas aquáticos são fundamentais, uma vez que qualquer organismo depende da água para sua sobrevivência, além das diversas atividades desenvolvidas a partir dos ambientes aquáticos, como, por exemplo, a geração de energia, o abastecimento de cidades, o transporte fluvial e marítimo, obtenção de alimentos, irrigação de agriculturas, entre outras (MORAES; JORDÃO, 2002). Infelizmente, mesmo com essa realidade, os ambientes aquáticos estão sendo cada vez mais prejudicados pela poluição decorrente do crescimento populacional contínuo e suas atividades: desenvolvimento industrial, produção, consumo e eliminação de produtos e resíduos (JHA, 2004).

O planeta Terra dispõe de uma grande quantidade de água, com um total de aproximadamente 1,4 bilhões km³, sendo 97,5% deste total representado por águas salgadas e apenas os 2,5% restantes por águas doces. Contudo, a quantidade de água doce no planeta que está realmente disponível para o consumo humano e dos ecossistemas é mínima, e corresponde a apenas 0,01% de toda água da Terra, por isso existe uma preocupação a mais com o problema de poluição nestes ambientes (Fig. 1)(UNEP, 2002).

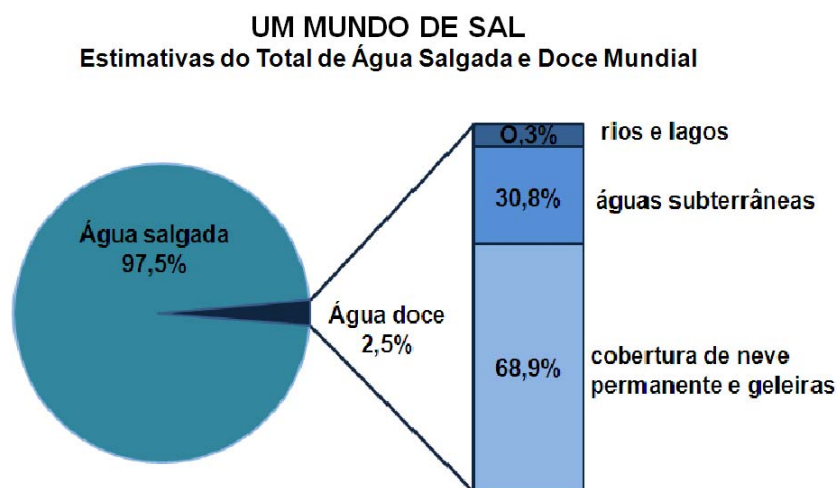


Figura 1 – Estimativa da quantidade total de água doce e salgada mundial (Adaptado de UNEP, 2002).

A poluição aquática pode ser definida como uma alteração química e/ou física de um corpo d'água decorrente do despejo de substâncias ou formas de energia que podem impossibilitar a utilização da água (PEREIRA, 2004). Segundo Niencheski (2000) entre os contaminantes produzidos pelo homem destacam-se: lixo, esgoto, metais, petróleo, produtos orgânicos sintéticos (dentre eles pesticidas e inseticidas de uso doméstico), nutrientes (quando estão acima do limite suportado pelo ambiente), elementos radioativos e operações de drenagem (que se classificam como contaminação física).

Assim, percebe-se que a contaminação aquática está intimamente ligada à industrialização, civilização e qualidade de vida. Porém, o nível econômico da população não pode ser mais importante que a sua própria saúde e do ambiente em que vive (GOEL, 2006). Um estudo realizado nos EUA mostrou que águas contaminadas por esgoto podem interferir na biota local causando a morte de peixes e o crescimento de algas, devido ao aumento de nutrientes, além da presença anormal de coliformes fecais, que prejudica a saúde humana e pode ocasionar infecções, demonstrando assim a importância do tratamento deste tipo de efluente antes de seu lançamento no ambiente aquático (MALLIN et al., 2007). Alguns metais, apesar de participarem da constituição de algumas moléculas e de reações nos organismos, também podem ser prejudiciais quando em excesso ou bioacumulados, interferindo nos processos fisiológicos normais e em altas concentrações sua presença pode ser fatal (GOEL, 2006). Derramamentos de petróleo e seus derivados são geradores de impactos ambientais de grandes proporções, uma vez que a remediação deste problema é cara e difícil. Exposições crônicas e agudas de organismos ao petróleo levam à alterações na reprodução, crescimento e alimentação de animais aquáticos, refletindo as consequências em todo o ecossistema local (ZIOILLI, 2002).

Entretanto, diante de diversas fontes de poluição, Agrawal et al. (2010) destacam que mais de 50% da poluição de córregos e rios é decorrente da lixiviação e mistura de produtos químicos usados nas práticas agrícolas. Quando em contato com o ambiente aquático, esses produtos podem se fixar na matéria em suspensão, se depositar no sedimento ou ser absorvidos pelos organismos e, com o fluxo contínuo entre agrotóxico e água/sedimento, esse tipo de poluente se torna um dos principais contaminantes de ambientes aquáticos por estar em contato com o meio por tempos relativamente longos (TOMITA; BEYRUTH, 2002).

1.2 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR AGROTÓXICOS

É considerado pesticida qualquer substância ou mistura de substâncias destinada a prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer organismo que possa causar danos a uma cultura (ARIAS-ESTÉVEZ et al., 2008). O uso de produtos químicos no controle de plantas, pragas e doenças invasoras de áreas cultivadas data desde a antiguidade, mas foi a partir da Segunda Guerra Mundial, com o avanço da tecnologia e o desenvolvimento das indústrias químicas, que houve um aumento no consumo de substâncias biocidas na agricultura (ALVES FILHO, 2002).

Estima-se que 3 milhões de toneladas de defensivos agrícolas são utilizados a cada ano na agricultura mundial, movimentando um comércio de cerca de 20 bilhões de dólares. O Brasil é responsável pelo consumo de aproximadamente 50% do total de pesticidas utilizados na América Latina, ocupando o quarto lugar no “ranking” dos países consumidores de agrotóxicos (PELAEZ, 2010). Essa atividade agrícola intensificada pode trazer consequências que geram graves problemas ao meio ambiente, pois os pesticidas utilizados geralmente são tóxicos e seus resíduos podem ocasionar contaminação de solos e águas, além de morte de peixes, falha na reprodução de aves e doenças em humanos (RAO et al., 1983; OCHI et al., 2006).

Os ambientes aquáticos e sua biota são os que mais sofrem com a contaminação por agrotóxicos, uma vez que a contaminação desses ambientes ocorre facilmente através da aplicação direta do produto na água, lavagem de resíduos e embalagens, além do escoamento superficial, deriva e infiltração, neste caso podendo alcançar os lençóis freáticos (Fig. 2)(TOMITA; BEYRUTH, 2002).

As características químicas e físicas dos próprios agrotóxicos bem como as características ambientais, tais como o tipo do solo, topografia e clima são essenciais para a determinação do potencial de contaminação destes produtos (FILIZOLA et al., 2002). O monitoramento dos níveis de agrotóxicos em ambientes aquáticos é muito importante para a avaliação dos riscos e proposição de medidas para a sua redução, e por isso existem diversos estudos destinados a investigação de resíduos de agroquímicos em águas superficiais ou subterrâneas (ARIAS-ESTÉVEZ et al., 2008).

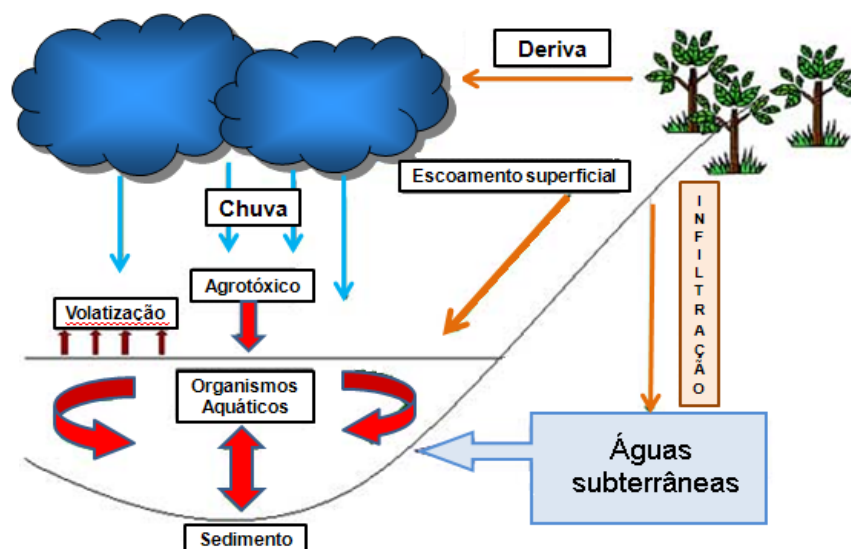


Figura 2 – Vias de contaminação de ambientes aquáticos por agrotóxicos (Adaptado de NIMMO, 1985; TOMITA E BEYRUTH, 2002).

Diversas técnicas são usadas na determinação de pesticidas em corpos d'água. Lanchote et al. (2000) e Bortoluzzi et al. (2007), utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), conseguiram detectar a presença de herbicidas da família triazina em águas de áreas agrícolas cultivadas com cana-de-açúcar e tabaco, respectivamente. Herbicidas triazínicos são muito reportados em estudos de ocorrência de resíduos agrícolas em ambientes aquáticos, principalmente a atrazina que é um herbicida consumido mundialmente. A atrazina é considerada um importante contaminante de ambientes aquáticos, uma vez que é um produto altamente persistente no solo e de mobilidade moderada e estas características são os principais indicadores do potencial da contaminação de corpos d'água e lençóis freáticos por esses químicos (FONTES et al., 2004; MAHÍA; DÍAZ-RAVIÑA, 2007; BECKER et al., 2009).

A presença de atrazina já foi registrada em estudos de vários países e, muitas vezes, em concentrações acima da permitida pela legislação local. Estudos feitos em Portugal (CEREJEIRA et al., 2003) mostraram a ocorrência da atrazina na concentração de $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ em bacias hidrográficas próximas a áreas de agricultura. Konstantinou et al. (2006) avaliaram a contaminação de rios e lagos da Grécia por pesticidas e constataram que a atrazina estava presente na maioria das

amostras, como, por exemplo, no rio Loudias, onde foi encontrada a concentração de $5,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina. Nos Estados Unidos, um estudo demonstrou que a concentração de atrazina encontrada no rio Platte e aquíferos adjacentes, que era de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ durante o outono e inverno, passou a ser de $18,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ nos meses de primavera e verão, associando esse aumento ao escoamento superficial que poderia estar ocorrendo em terras próximas a esses corpos d'água (DAVIS et al., 2007). No Brasil, também foram analisados resíduos de herbicidas em amostras de rios próximos a áreas agrícolas e constatou-se concentrações de atrazina de $2,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ ou seja, acima da concentração permitida pela legislação brasileira (ARMAS et al., 2007).

1.3 ATRAZINA

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) (Fig. 3), conhecida por diversos nomes comerciais, tais como Atranex, Atrazina Nortox, Atrazinax, Gesaprim, Herbitrim, Siptran, Stauzina, é um herbicida do grupo das triazinas, classificado como moderadamente tóxico ao ambiente e usado no controle de plantas invasoras de culturas como milho, sorgo, cana-de-açúcar, soja, abacaxi, trigo e diversas gramíneas (EISLER, 1989). Foi introduzida na agricultura por volta da década de 50 e destaca-se mundialmente no mercado de agrotóxicos com um consumo de 70.000 a 90.000 toneladas ao ano (GRAYMORE et al., 2001), sendo o segundo herbicida mais utilizado em uma região canavieira no Brasil entre os anos de 2000 a 2003 (ARMAS et al., 2005). Com aplicação pré e pós-emergente, esse herbicida atua inibindo o crescimento da planta alvo, interferindo no funcionamento normal da fotossíntese, mais especificamente no transporte de elétrons no fotossistema II (GRAYMORE et al., 2001; COUTINHO et al., 2005).

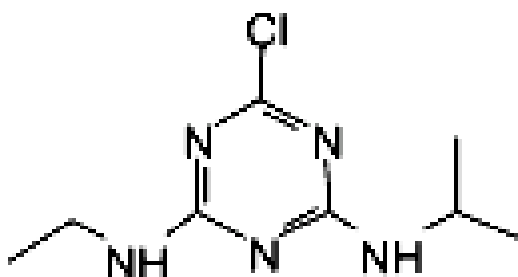


Figura 3 – Estrutura molecular da atrazina (SOLOMON et al., 2008).

Eisler (1989) descreve a atrazina como uma substância branca cristalina com peso molecular de 215,62; densidade de 1,187 g.cm⁻³ a 20°C; solubilidade em água de 33 µg.mL⁻¹ a 27°C; solubilidade em diversos solventes orgânicos, variando de 360 a 183.000 mg.L⁻¹; pressão de vapor de 2,89 x 10⁻⁷ mmHg à 25°C; e ponto de fusão entre 175 e 177°C. Além destas características, a atrazina possui meia vida no solo de 60 dias e na água de 1200 dias (KONSTANTINO et al., 2006), sendo considerada um contaminante aquático em potencial por possuir escoamento fácil, persistência no solo, hidrólise lenta e absorção moderada por matéria orgânica (UETA et al., 1999).

O anel de triazina torna a molécula da atrazina pouco resistente à degradação microbiológica em sistemas aquáticos, sua degradação química pode ocorrer por hidrólise e N-desalquilação e a fotólise não é capaz de acontecer na água em comprimentos de onda superior a 300 nm (SOLOMON et al., 2008). A salinidade também pode influenciar na degradação da atrazina. Lin et al. (2008) observaram a inibição da degradação da atrazina em solos com concentrações maiores de sal e correlacionaram estes resultados com a diminuição da comunidade microbiana, uma vez que a atrazina pode ser degradada parcial ou totalmente, resultando na formação de dióxido de carbono e amônia, por diversas espécies de bactérias, principalmente por bactérias do gênero *Pseudomonas* (SENE et al., 2010).

A degradação biológica ou química da atrazina pode resultar nos principais produtos: hidroxiatrazina, desetilatrazina e desisopropilatrazina (Fig. 4), dependendo da cadeia lateral que for quebrada (SMALLING; AELION, 2006). Mahía et al. (2007) constataram que os principais produtos da degradação da atrazina foram o hidroxiatrazina e o desisopropilatrazina, em dois tipos de solos estudados.

Em condições laboratoriais foi demonstrado que a hidroxiatrazina é mais persistente no solo que a atrazina e seus outros produtos de degradação clorados (MAHÍA et al., 2008). Tais resultados corroboram com estudos de Winkelmann e Klaine (1991) que reportaram a meia-vida da desetilatrastina, desisopropilatrastina e hidroxiatrazina no solo como 26 dias, 17 dias e 121 dias, respectivamente. Apesar da alta persistência desses produtos, sua toxicidade é menor que a da própria atrazina, não sendo preocupante para diversos organismos já testados (EISLER, 1989; SANDERSON et al., 2001; RALSTON-HOOPER et al., 2009).

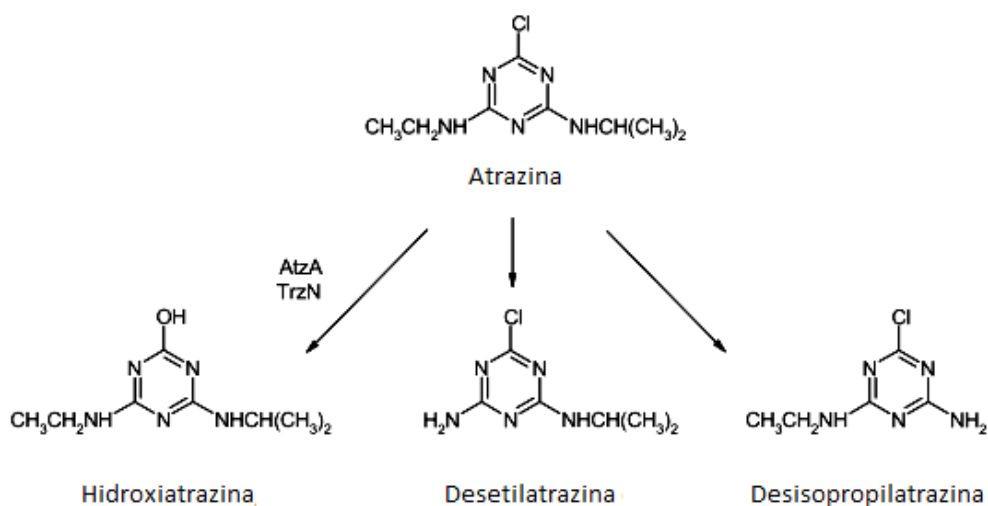


Figura 4 – Produtos da degradação da atrazina
Fonte: Adaptado de Sene et al. (2010).

Existem diversas vias de contaminação de organismos pela atrazina. Animais terrestres podem ser expostos à atrazina através do consumo de comida ou água contaminada enquanto as plantas absorvem-na principalmente pela raiz e secundariamente pela folhagem, e acumulam o herbicida nos meristemas apicais e folhas (EISLER, 1989; SOLOMON et al., 2008). Entretanto, assim como ocorre degradação biológica e/ou química da atrazina no ambiente resultando compostos menos tóxicos, para alguns organismos, como plantas (e acredita-se que também animais), a atrazina pode ter sua toxicidade mitigada dentro do organismo devido sua facilidade de conjugação com a glutathione reduzida (GSH), o qual é possível por causa da estrutura molecular deste herbicida e a ação da glutathione S-transferase

(GST), uma enzima responsável pela biotransformação de diversos compostos (Fig. 5) (WIEGAND et al., 2001).

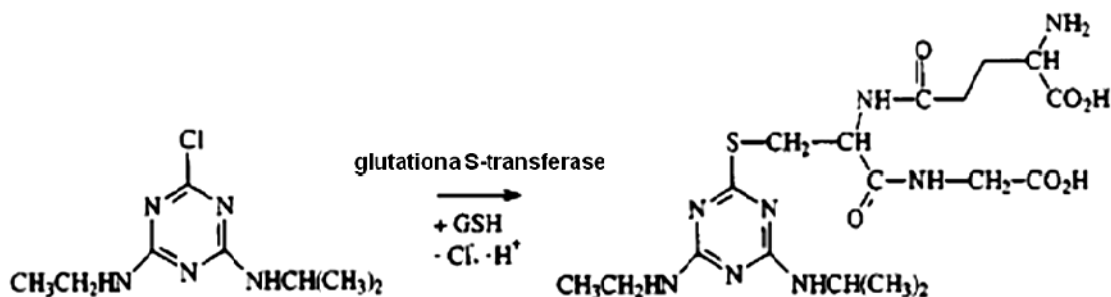


Figura 5 – Conjugação da atrazina com a GSH via catalisação da GST

Fonte: Adaptado de Wiegand et al. (2001).

Os efeitos da atrazina e seus metabólitos ainda não estão bem entendidos, porém muitos estudos relatam que impactos significativos podem ocorrer em baixas concentrações e em tempos longos de exposição (GRAYMORE et al., 2001). Por ter ação inibitória na fotossíntese, a atrazina demonstra-se bastante tóxica para algas, afetando diretamente as comunidades destes organismos e refletindo esses resultados na produtividade e populações da fauna (GRAYMORE et al., 2001; RALSTON-HOOPER et al., 2009). A toxicidade da atrazina para invertebrados é bastante reportada e os estudos mostram que, dentre diversos efeitos, a atrazina é capaz de causar danos histológicos no hepatopâncreas e rins de moluscos (ROSÉS et al., 1999; ZUPAN; KALAFATIĆ, 2003), aumentar o número de hemócitos de gastrópodes (RUSSO; LAGADIC, 2000; RUSSO; LAGADIC, 2004), alterar a atividade enzimática em insetos (LONDOÑO et al., 2004; RAKOTONDRAVELO et al., 2006) e alterar a osmorregulação de crustáceos (SILVESTRE et al., 2002).

Efeitos letais e subletais da atrazina em vertebrados são estudados desde a década de 1970 (PETERS; COOK, 1973; MACEK et al., 1976; EISLER, 1989), e atualmente a comunidade científica ainda procura entender os mecanismos de toxicidade desse herbicida (VENTURA et al., 2008; CHAPADENSE et al., 2009; YANG et al., 2010). Peixes são vertebrados bastante utilizados para testes de toxicidade, incluindo testes com a atrazina, por serem organismos sensíveis sob

diversos aspectos: comportamental (STEINBERG et al., 1995), fisiológico (NIEVES-PUIGDOLLER et al., 2007), bioquímico (DONG et al., 2009), genético (VENTURA et al., 2008), entre outros. Os efeitos da atrazina em anfíbios também são amplamente estudados, uma vez que as altas taxas de mortalidade e extinção de várias espécies de anfíbios nos Estados Unidos foram fortemente correlacionadas com dados do consumo da atrazina no país (SOLOMON et al., 2008). Já para os répteis existem poucos estudos sobre a sensibilidade do grupo à atrazina, porém isto não significa que eles não sejam susceptíveis a esse herbicida (COX, 2001; SOLOMON et al., 2008). Para aves, a atrazina em determinadas concentrações, como, por exemplo, valores menores que 2000 mg/kg deste herbicida ministrados por via oral, não apresentaram letalidade, e já se sabe que algumas aves domésticas são capazes de metabolizar esse herbicida rapidamente (EISLER, 1989); porém estudos demonstraram que a atrazina pode interferir nos hormônios sexuais de aves, diminuindo a concentração do hormônio luteinizante e atuando como disruptor endócrino (WILHELMS et al., 2005; WILHELMS et al., 2006; OTTINGER et al., 2008). Mamíferos também não sofrem com a letalidade aguda da atrazina, contudo seus efeitos bioquímicos, fisiológicos e genotóxicos para esses animais são constantemente investigados (GRAYMORE et al., 2001; ISLAM et al., 2002; SINGH et al., 2010).

1.4 ECOTOXICOLOGIA

Os efeitos da atrazina ou qualquer outro poluente pode ser avaliado através de testes toxicológicos que, de acordo com Costa et al. (2008), são ensaios realizados para mensurar a toxicidade de contaminantes em águas ou sedimentos através de situações experimentais monitoradas. Entretanto, a toxicologia em si leva em consideração apenas os efeitos adversos de uma determinada substância em um organismo, sem interesse nas relações entre os seres vivos e o ambiente, que é uma preocupação da ecologia. Então, em 1970, o toxicologista francês René Truhaut sugeriu a formação de um grupo de trabalho onde os conhecimentos dessas duas ciências fossem associados, criando uma nova área de pesquisas denominada

ecotoxicologia. Desde então, a ecotoxicologia vem se desenvolvendo com o propósito de estudar os efeitos de uma ou mais substâncias sobre organismos vivos (em nível populacional ou de comunidades) abrangendo a interação das substâncias com o ambiente e os organismos que ali habitam (ZAGATTO, 2006).

Por muitas décadas o monitoramento de ambientes aquáticos foi feito através de medidas de variáveis químicas e físicas, tais como: pH, temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, nutrientes e presença de contaminantes (SIMÕES et al., 2008; STROBL; ROBILLARD, 2008; LAM, 2009). No entanto, a resolução CONAMA (2005) já prevê que “a qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos, quando apropriado, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas”. Esses indicadores biológicos abrangem os bioindicadores, os biomarcadores e os indicadores ecológicos. Os bioindicadores são organismos sensíveis ou tolerantes a mudanças sofridas no ambiente em que vivem (BUSS et al., 2003). Os principais grupos de organismos usados como bioindicadores de ambientes aquáticos são: peixes, aves, macroinvertebrados, protozoários, macrófitas, algas, leveduras, fungos, bactérias e vírus (RAND et al., 1995). Já os biomarcadores são definidos por Lam (2009) como alterações suborgânicas, tais como aquelas que ocorrem nos níveis celular, bioquímico, molecular ou fisiológico, que podem ser mensuradas em células, fluidos corporais, tecidos e órgãos dentro do organismo e que podem ser indicativo de exposição e/ou efeito de um xenobiótico.

A eficiência dos biomarcadores como indicadores biológicos específicos para os estudos ecotoxicológicos já está bem defendida em diversos trabalhos, como, por exemplo, estudos demonstrando a toxicidade subletal de agrotóxicos em peixes (ORUC et al., 2004; DORVAL et al., 2005; RAMESH et al., 2009). Entretanto, recomenda-se a utilização de diversos tipos de biomarcadores simultaneamente, pois a avaliação de um único parâmetro pode resultar em interpretações errôneas, não demonstrando todos os danos que o contaminante ou o ambiente impactado pode causar ao organismo (ZORITA et al., 2008).

Alguns biomarcadores possuem diferentes graus de especificidade, um exemplo é a enzima ácido-aminolevulínico desidratase (ALAD) que é especificamente inibida pelo chumbo. Porém, a maioria deles responde a diversos tipos de contaminantes (metais, xenobióticos orgânicos, compostos organometálicos) e podem ser medidos através de diferentes abordagens

metodológicas, por exemplo: enzimas de biotransformação, defesas antioxidantes, inibição da atividade da acetilcolinesterase, integridade do DNA, entre outros (SARKAR et al., 2006; LAM, 2009).

1.4.1 Biomarcadores Bioquímicos

Biomarcadores bioquímicos, quando comparados a outros biomarcadores, são considerados ferramentas de resposta a contaminantes simples, rápidas, específicas, fáceis de determinar, de baixo custo, porém de baixa relevância ecológica, por se tratar de uma análise a nível individual (Fig. 6) (LAM, 2009). As substâncias neuroquímicas são biomarcadores que podem fornecer informações sobre os efeitos precoces da presença de contaminantes no ambiente (AMORIM, 2003). Um exemplo de neuroquímico bastante utilizado como biomarcador é a acetilcolinesterase (AChE), uma enzima presente em animais vertebrados e alguns invertebrados, responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético (SARKAR et al., 2006). A AChE encontra-se nas fendas sinápticas e evita a ação contínua da acetilcolina, mantendo assim o funcionamento normal dos sistemas sensorial e neuromuscular (VAN DER OOST et al., 2003). Em peixes, a AChE pode ser mensurada especialmente no cérebro e músculo, pois o sistema neuromuscular destes organismos é principalmente colinérgico e sua atividade é essencial para o funcionamento e comportamento normal dos músculos (PAYNE et al., 1996). A atividade da AChE é um dos principais biomarcadores utilizados para o monitoramento de ambientes aquáticos contaminados por agrotóxicos, uma vez que essa enzima é inibida por pesticidas organofosfatos e carbamatos e pode provocar a superestimulação das fibras musculares ocasionando paralisação e até morte do animal (FERRARI et al., 2007).

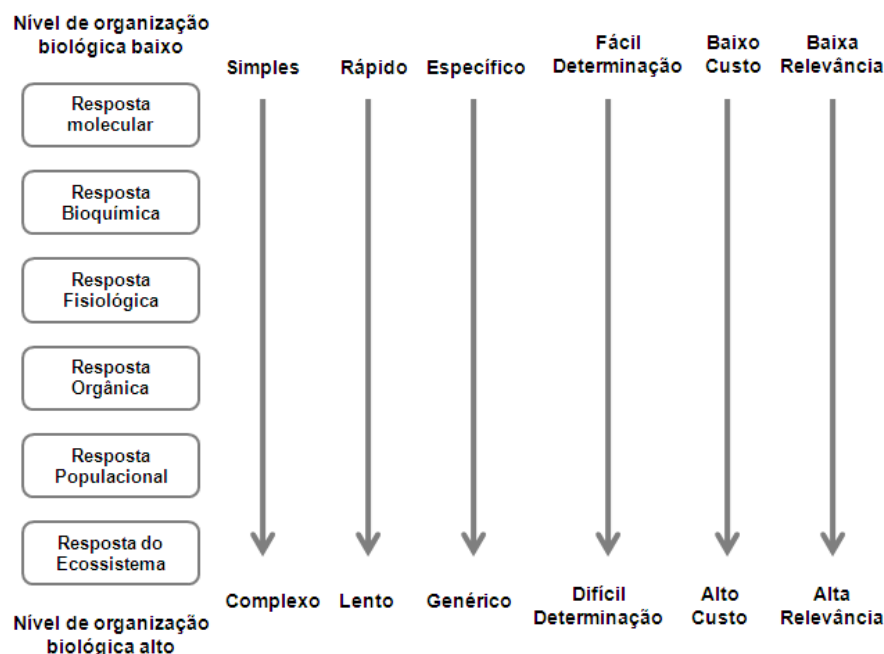


Figura 6 – Comparação dos prós e contras de biomarcadores em diferentes níveis organizacionais biológicos

Fonte: Adaptado de Lam (2009).

Os biomarcadores bioquímicos também podem expressar resultados importantes de como peixes processam a detoxificação de poluentes e sua biotransformação para facilitar a excreção de xenobióticos (VAN DER OOST et al., 2003). A avaliação desses processos de defesas do organismo pode ser feita através da mensuração das enzimas e proteínas envolvidas no processo de biotransformação e dos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, que neutralizam as espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas durante a biotransformação (MARTINEZ, 2006). A biotransformação pode ocorrer em três fases distintas: fase I, na qual, para peixes, as principais enzimas responsáveis são as enzimas da subfamília CYP1A; a fase II na qual, entre outras, atua a glutathione S-transferase; e a fase III, onde ocorre a excreção dos metabólitos das duas fases anteriores ou o próprio xenobiótico através de glicoproteínas P (P-gp) e proteínas associadas à resistência a multidrogas (MRP) (Fig. 7) (BARD, 2000; NEWMAN; CLEMENTS, 2008).

O uso de enzimas de biotransformação de fase I como biomarcador foi sugerido há mais de 30 anos por Burke e Mayer (RADENAC et al., 2004). Enzimas da família citocromo P450, em especial a subfamília CYP1A, tem papel fundamental no metabolismo de substâncias endógenas e xenobióticas. Elas são

capazes de catalisar reações de redução, oxidação e hidrólise tornando compostos lipofílicos em compostos hidrofílicos, facilitando sua excreção (FREIRE et al., 2008). Muitas vezes, a biotransformação de xenobióticos por essas enzimas pode resultar em compostos ainda mais tóxicos que se ligam em macromoléculas como o DNA e proteínas. Porém, esses compostos tóxicos ainda podem ser neutralizados através da ação de enzimas de biotransformação de fase II (SILVA et al., 2004).

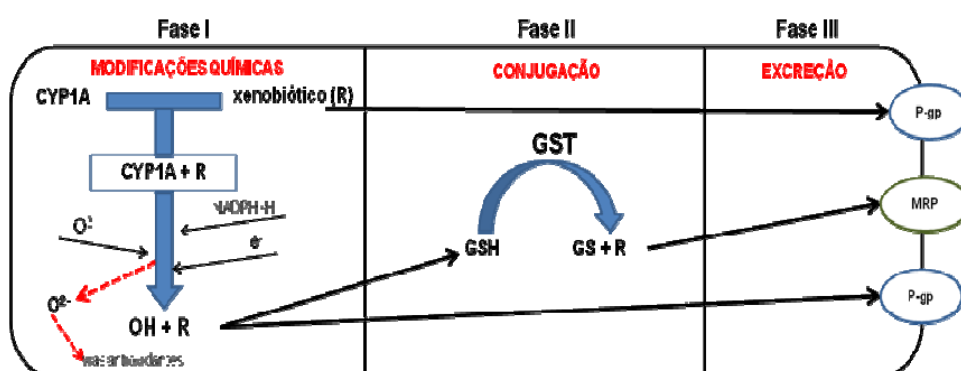


Figura 7 – Esquema simplificado das três fases da biotransformação de xenobióticos

Fonte: Baseado em Bard (2000); Van Der Oost et al. (2003).

As enzimas de biotransformação de fase II de maior interesse como biomarcador em testes toxicológicos são as glutathionas S-transferases (GST). Agrupadas em pelo menos 15 classes, as GSTs já foram identificadas na forma solúvel presente no citosol, ligadas a algumas membranas ou em isoformas mitocondriais (PARK et al., 2009). As GSTs estão envolvidas na conjugação da glutathion reduzida (GSH) a xenobióticos ou seus metabólitos provenientes da fase I de biotransformação e produtos da peroxidação lipídica, diminuindo a probabilidade de que esses compostos tóxicos se liguem a outras moléculas do organismo. Estudos demonstram que as GSTs podem servir de opção como biomarcador de poluentes que não induzem a atividade da CYP1A, como, por exemplo, compostos organoclorados e PCBs não planares (VAN DER OOST et al., 2003; HERMES-LIMA, 2004).

Os processos de biotransformação de fases I e II, bem como o metabolismo celular basal, podem gerar espécies reativas de oxigênio (ERO), tais

como ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Fig. 8), que são moléculas envolvidas em alguns processos fisiológicos, mas também capazes de causar danos ao organismo (VALAVANIDIS et al., 2006). A mensuração da concentração de ERO em um determinado órgão e a capacidade deste órgão de neutralizar esses radicais livres podem ser métodos eficientes de avaliação da toxicidade de determinado poluente (AMADO et al., 2009). A proteção do organismo contra as ERO pode ser feita através de: i) remoção catalítica de ERO por antioxidantes enzimáticos e tióis-específicos, ii) ligação de proteínas a íons metálicos pró-oxidantes, iii) proteção contra danos de macromoléculas por proteínas e, iv) redução de radicais livres por doadores de elétrons (Fig. 9) (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009).

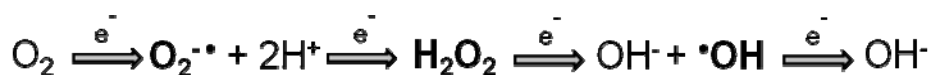


Figura 8 – Representação da geração de espécies reativas de oxigênio (HERMES-LIMA, 2004).

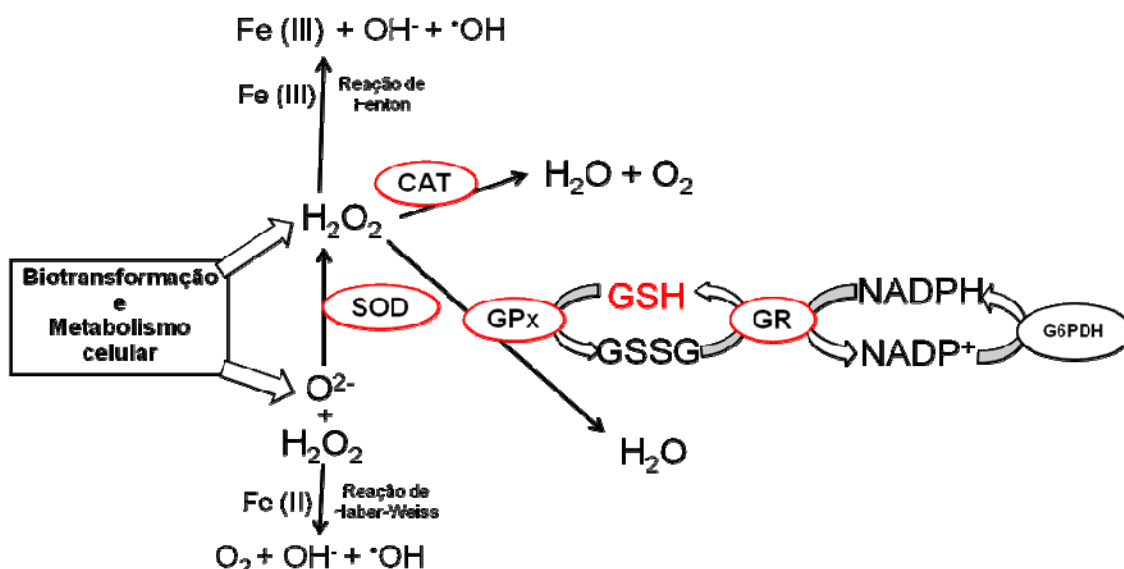


Figura 9 – Neutralização de espécies reativas de oxigênio através de algumas enzimas antioxidantes e antioxidante não-enzimático (em destaque os antioxidantes a serem estudados)

Fonte: Adaptado de Hermes-Lima (2004).

Uma das principais enzimas antioxidantes é a superóxido dismutase (SOD), uma metaloenzima responsável pela primeira linha de defesa da célula contra ERO, atuando na catalisação da reação do $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 . Pelo fato do $O_2^{\cdot-}$ resultar em várias outras espécies altamente reativas, o controle desse radical pela SOD constitui um importante mecanismo de defesa (TORRES et al., 2008). A SOD pode ser encontrada na forma CuZn-SOD, presente no citoplasma das células, lisossomos, peroxissomos, núcleo e espaço intermembranoso das mitocôndrias ou no espaço extracelular. Outra forma da SOD, responsável pela proteção mitocondrial contra o acúmulo de ERO, é a Mn-SOD encontrada na mitocôndria (HERMES-LIMA, 2004). Sua importância na defesa antioxidante é confirmada por sua presença em todos os organismos aeróbios e por sua taxa de catalisação próxima à difusão limite de dismutação do $O_2^{\cdot-}$. A vantagem da utilização da SOD como biomarcador em peixes é explicada pela tendência ao aumento de sua atividade na presença de xenobióticos e por essas alterações ocorrerem em poucas horas de exposição (VAN DER OOST et al., 2003; VALAVANIDIS et al., 2006).

A catalase (CAT) também é uma enzima primária da defesa antioxidante contra ERO. Sua função é eliminar o H_2O_2 catalisando a transformação desta espécie reativa em $H_2O + O_2$ (ATLI et al., 2006). Presente em diversos grupos de organismos, em vertebrados a CAT é encontrada nos perioxossomos, principalmente de eritrócitos e fígado, e participa da metabolização dos ácidos graxos; sendo assim, seu uso como biomarcador pode ser de difícil interpretação (VAN DER OOST et al., 2003). A CAT é bastante eficiente quando a concentração de H_2O_2 intracelular está em níveis elevados (COGO et al., 2009).

Ao contrário da catalase, que é específica para a degradação do H_2O_2 , a glutathione peroxidase (GPx), uma selenoenzima, é capaz de reduzir diversos tipos de peróxidos através da oxidação da GSH e é a principal peroxidase presente em peixes (VAN DER OOST et al., 2003). Outra diferença entre a CAT e a GPx é que esta pode ser encontrada no citosol e na matriz mitocondrial, não ficando restrita sua atividade apenas nos perioxossomos (MARTINEZ, 2006). De acordo com Hermes-Lima (2004) existem quatro formas desta selenoenzima que possuem funções similares. A primeira a ser identificada foi a GPx clássica, com atividade elevada em órgãos com altas taxas metabólicas como o fígado e rim, e capaz de decompor o H_2O_2 e outros hidroperóxidos utilizando a GSH como co-substrato. Outro tipo de GPx, a GPx fosfolipídeo hidroperóxido, caracteriza-se por estar

relacionada a peróxidos fosfolipídicos e sua habilidade em reagir com complexos lipídicos de membrana se dá ao seu pequeno tamanho e sua superfície hidrofóbica, contudo sua atividade é menor que da GPx clássica. Um terceiro tipo de GPx é a GPx plasmática, sintetizada principalmente nos rins, foi descoberta devido ao seu diferente modo de reintrodução do selênio. A quarta GPx é, talvez, a primeira linha de defesa contra hidroperóxidos ingeridos, uma vez que está presente no epitélio do trato gastrointestinal. A GPx é utilizada como biomarcador por demonstrar resultados sob diversas situações de estresse, seja por compostos orgânicos ou inorgânicos (COGO et al., 2009).

Apesar de não participar diretamente da neutralização de ERO, a glutathione redutase (GR) tem papel fundamental na defesa antioxidante do organismo, por isso, ela está presente em animais, plantas e microorganismos. A GR é considerada uma enzima antioxidante auxiliar, pois é responsável pela redução da glutathione oxidada pela GPx, através da oxidação do NADPH em NADP^+ , mantendo as concentrações adequadas de GSH (VAN DER OOST et al., 2003; HERMES-LIMA, 2004).

Além de todas as enzimas antioxidantes que o organismo apresenta para neutralizar as ERO, ainda existem antioxidantes não-enzimáticos que auxiliam na defesa contra radicais livres, sendo o principal deles a glutathione reduzida (GSH) (VAN DER OOST et al., 2003). Como já citado anteriormente, a GSH pode ser conjugada a xenobióticos pela GST na fase II de biotransformação, ou ainda sofrer reduções e oxidações pelas respectivas enzimas GR e GPx atuando diretamente na detoxificação. A GSH pode responder muito bem a contaminação ambiental, variando sua concentração de acordo com o tempo de exposição, sendo assim, considerada um ótimo biomarcador em peixes (MARTINEZ, 2006).

Contudo, se a capacidade antioxidante das defesas enzimáticas e não-enzimáticas não for suficiente para neutralizar a formação de ERO proveniente da metabolização de produtos endógenos e exógenos, isto causa ao organismo o estresse oxidativo, o qual afeta o funcionamento normal da célula, podendo gerar danos em proteínas, inativação de enzimas, peroxidação lipídica e quebras no DNA (AMADO et al., 2009). Para a ecotoxicologia, as consequências do estresse oxidativo, tais como a peroxidação lipídica e danos no DNA, podem servir como ferramenta para entender os efeitos de um poluente no organismo (VALAVANIDIS et al., 2006).

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia que se inicia quando um radical livre qualquer é suficientemente reativo para separar um hidrogênio do grupo metileno de ácidos graxos poli-insaturados da membrana, ocorrendo formação do radical lipídico ($R^\bullet$). Na etapa de propagação, o $R^\bullet$ reage rapidamente com o O_2 formando o radical peroxil ($ROO^\bullet$), sendo este capaz de capturar um hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado adjacente para formar o hidroperóxido lipídico ($ROOH$), resultando um novo $R^\bullet$ no ácido graxo poli-insaturado. A cadeia de peroxidação termina quando ocorre a reação entre dois radicais lipídicos ou quando esses radicais são decompostos por altas temperaturas ou na presença de íons metálicos (Fig. 10) (SÖDERGREN, 2000).

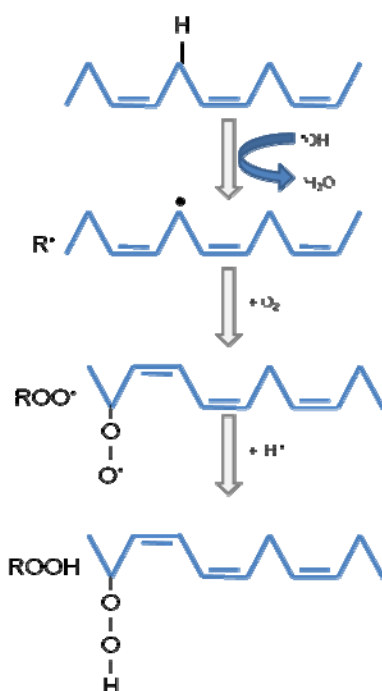


Figura 10 – Fases de iniciação e propagação da peroxidação lipídica
Fonte: Adaptado de Södergren (2000).

Este processo de lipoperoxidação é considerado um dos maiores causadores de injúria e morte celular. A gravidade dos danos às membranas biológicas consequentes da peroxidação lipídica pode variar, dependendo da natureza e da concentração do oxidante, desde a redução local na fluidez da membrana até o rompimento da integridade da bicamada (HERMES-LIMA, 2004).

Existem vários métodos para detectar e medir os produtos da peroxidação lipídica, em sua maioria, esses testes avaliam a perda de ácidos graxos insaturados, geração de produtos primários da peroxidação ou degradação dos produtos secundários. O teste TBARS é um ensaio simples e barato, comumente aplicado para a detecção da peroxidação lipídica por meio da mensuração da quantidade de malondialdeído (MDA), que é um produto da peroxidação lipídica (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

1.4.2 Biomarcadores Genéticos

Como citado anteriormente, o estresse oxidativo pode ocasionar danos nas moléculas de DNA. Danos oxidativos no DNA têm sido observados em vários tipos celulares, desde invertebrados até mamíferos, e podem acarretar condições de estresse e doenças, principalmente carcinogênese e envelhecimento (HERMES-LIMA, 2004). As lesões oxidativas no DNA são induzidas principalmente pelos radicais hidroxil ($\bullet\text{OH}$) que resultam da reação do H_2O_2 com o Fe^{2+} , conhecida como Reação de Fenton (BJELLAND; SEEBERG, 2003). As quebras nas ligações da molécula de DNA interferem na sua integridade e isto pode servir como uma ótima ferramenta no monitoramento dos efeitos subletais de poluentes em peixes, uma vez que existem testes, como por exemplo, o ensaio do cometa, que são sensíveis a esse tipo de dano (OHE et al., 2004).

O ensaio do cometa foi demonstrado pela primeira vez por Östling e Johanson em 1984 e desde então vem sofrendo modificações para adequação da técnica (COLLINS, 2004). Singh et al. (1988), por exemplo, perceberam que a versão alcalina do ensaio, além de detectar as quebras de fitas duplas, seria sensível suficiente para detectar também as quebras de fitas simples e sítios alcali-lábeis. O objetivo do ensaio do cometa não é revelar mutações, mas avaliar a genotoxicidade de substâncias através de alterações no material genético que, se não forem corrigidas, podem resultar em mutações (GONTIJO, 2003).

Uma das vantagens de se utilizar o ensaio do cometa para a análise de biomarcadores genéticos é que ele pode ser aplicado tanto em ensaios “in vivo” quanto “in vitro”, desde que sejam usadas células individuais (CEMELI et al., 2009).

O tecido sanguíneo tem a vantagem de já possuir células dissociadas e, por isso, é um dos principais tecidos escolhidos para o ensaio. Outra vantagem do ensaio do cometa é que este pode ser feito em células de tecidos de diversos organismos, tais como plantas, invertebrados e vertebrados, incluindo humanos (COTELLE; FERARD, 1999). Os peixes são animais bastante empregados no ensaio do cometa, isso porque além do sangue, tecidos como brânquias, rim, fígado, músculo, baço e gônadas já foram investigados utilizando-se o ensaio e os resultados foram satisfatórios (LEE; STEINERT, 2003).

1.5 PROCHILODUS LINEATUS COMO MODELO EXPERIMENTAL

Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1847) (Fig. 11) é uma espécie de peixe pertencente à família Prochilodontidae, ordem Characiformes e superordem Ostariophysi. O curimba ou curimbatá, como é chamado popularmente, é caracterizado por possuir o corpo relativamente alto, de cor prateada e dorso mais escuro. As nadadeiras são levemente escurecidas, a nadadeira adiposa está presente, a nadadeira anal é curta, a nadadeira caudal é bifurcada e a nadadeira dorsal apresenta-se precedida por um espinho procumbente. Esses peixes possuem escamas grandes e a sua boca tem o lábio carnudo e protrátil, com dentes pequenos e finos. Exemplares adultos de *P. lineatus* podem alcançar até 44 cm de comprimento e pesar 1 Kg (CASTRO; VARI, 2004).



Figura 11 – Foto de um indivíduo jovem de *Prochilodus lineatus*
Fonte: autoria própria.

Peixes desta espécie são nativos da região Neotropical, sendo encontrados em rios do Brasil, Colômbia, Peru, Venezuela, Bolívia, Argentina, Uruguai e Paraguai (ITUASSÚ et al., 2005). O curimba é considerado um peixe abundante nos rios brasileiros. De acordo com um estudo feito por Shibata et al. (2007), *Prochilodus lineatus* foi a 3ª espécie mais abundante de quatro trechos da bacia hidrográfica do rio Tibagi. Além da ampla distribuição, sua abundância em determinados rios pode ser explicada devido o comportamento migratório que esses peixes apresentam durante a época de reprodução. Capeleti e Petrere (2006) relatam que o curimba tem um ciclo migratório de 1.200 a 1.400 km, sugerindo que o metabolismo decorrente da natação migratória seja necessário para a maturação gonadal.

Comercialmente, o curimba representa uma espécie de peixe bastante relevante, por estar comumente presente na dieta humana. Por isso, sua criação em pisciculturas é indicada nas regiões tropicais e subtropicais, onde já está bem adaptado (LEONHARDT et al., 2002). Para seu sucesso em pisciculturas, os animais dessa espécie devem ter as condições do cativeiro sempre monitoradas, pois alterações bruscas em seus tanques podem prejudicar seu crescimento, sobrevivência, resistência a parasitas e reprodução (ITUASSÚ et al., 2005).

Esta espécie de peixe é adequada para estudos de monitoramento ambiental devido ao seu hábito alimentar detritívoro, que o deixa exposto a qualquer tipo de substância que possa estar depositada no sedimento, incluindo compostos tóxicos. Além disso, por tratar-se de um peixe sensível a vários tipos de contaminantes, essa espécie pode ser utilizada como espécie bioindicadora (MARTINEZ; CÓLUS, 2002). A sensibilidade desta espécie está comprovada em vários estudos de ecotoxicologia, que mostram que quando submetido a testes com vários contaminantes de ambientes aquáticos, o curimba apresenta variações em diversos tipos de biomarcadores (ALMEIDA et al., 2005; SIMONATO et al., 2006; VANZELA et al., 2007; CAVALCANTE et al., 2008; MADUENHO; MARTINEZ, 2008; CAMARGO et al., 2009; MODESTO; MARTINEZ, 2010a, 2010b).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos do herbicida atrazina para peixes da espécie *Prochilodus lineatus* por meio da análise de biomarcadores genéticos e bioquímicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar testes de toxicidade estáticos de 24 e 48 h, com *P. lineatus* expostos a duas concentrações de atrazina: $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.L}^{-1}$;
- b) Verificar se a atrazina estimula a geração de espécies reativas de oxigênio no fígado de *P. lineatus*;
- c) Analisar a atividade das enzimas de biotransformação (CYP1A e GST) no fígado de *P. lineatus* diante da exposição à atrazina;
- d) Determinar os efeitos da atrazina na atividade de antioxidantes enzimáticos (GPx, GR, CAT, SOD) e não enzimáticos (GSH) no fígado de *P. lineatus*;
- e) Verificar se a exposição à atrazina promove danos oxidativos em fígado de *P. lineatus* por meio da determinação da peroxidação lipídica;
- f) Avaliar se a exposição à atrazina aumenta a ocorrência de danos no DNA de eritrócitos, células branquiais e células hepáticas de *P. lineatus* utilizando-se o ensaio do cometa;
- g) Verificar se a atrazina interfere na atividade da acetilcolinesterase no músculo e cérebro de *P. lineatus*.

3 ARTIGO

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Chemosphere.

ATRAZINA PROMOVE ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E DANOS NO DNA DE UMA ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL

Thais G. Santos, Cláudia B.R. Martinez*

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, Paraná C.P. 6001, Brasil.

*autor para correspondência. Tel.: +55-43-33714650, fax: +55-43-33714207 endereço eletrônico: cbueno@uel.br (C. B. R. Martinez).

Resumo

A atrazina é um herbicida consumido mundialmente e considerado um potencial contaminante de ambientes aquáticos. Para avaliar seus efeitos para o peixe Neotropical *Prochilodus lineatus*, animais jovens foram expostos a 2 ou 10 µg.L⁻¹ de atrazina (ATZ 2 e ATZ 10) ou somente a água (CTR) durante 24 e 48 h. Peixes expostos a ambas concentrações de atrazina por 24 h apresentaram diminuição na atividade hepática dos antioxidantes enzimáticos superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) e aumento na atividade da glutathione redutase (GR), além de redução nos níveis de peroxidação lipídica (LPO) e na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Também após 24 horas, houve diminuição da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) do ATZ 2 e aumento de danos no DNA dos eritrócitos do ATZ 10. Após 48 h, os grupos ATZ 2 e ATZ 10 apresentaram redução na atividade da EROD, SOD, CAT e GPx e aumento da GR. Peixes do grupo ATZ 10 tiveram diminuição da atividade da glutathione-S-transferase (GST) e na geração de ERO e os animais do grupo ATZ 2 nos níveis de glutathione reduzida (GSH) e LPO. Houve também aumento de danos no DNA dos eritrócitos e hepatócitos do grupo ATZ 10 e das células branquiais do grupo ATZ 2. Alterações na atividade muscular e cerebral da acetilcolinesterase (AChE) não foram observadas. Estes resultados mostram que a atrazina reduz a atividade hepática das enzimas de biotransformação e antioxidantes de *P. lineatus* e promove danos no DNA de eritrócitos e células das brânquias e do fígado.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Antioxidantes. Biotransformação. Ensaio do cometa. Estresse oxidativo. *Prochilodus lineatus*.

INTRODUÇÃO

A atrazina é atualmente um dos herbicidas mais amplamente consumidos, classificado como moderadamente tóxico ao ambiente, pode apresentar efeitos tóxicos para animais aquáticos (Solomon et al., 2008; Ventura et al., 2008). Vários estudos já detectaram a presença de atrazina em corpos de água em níveis acima das concentrações permitidas pelas legislações locais (Cerejeira et al., 2003; Konstantinou et al., 2006; Davis et al., 2007). Entretanto, os efeitos deste herbicida e seus metabólitos ainda não estão bem entendidos (Graymore et al., 2001), e alguns estudos com peixes tem sido realizados para avaliar os mecanismos de toxicidade da atrazina para estes organismos (Yang et al., 2010), sob diversos aspectos: bioquímico (Dong et al., 2009), genético (Ventura et al., 2008), fisiológico (Nieves-Puigdoller et al., 2007) e comportamental (Steinberg et al., 1995).

A avaliação dos efeitos da atrazina pode ser feita através do uso de biomarcadores, que são alterações celulares, bioquímicas, moleculares ou fisiológicas decorrentes da exposição ou efeito de um xenobiótico, que podem ser mensuradas em células, fluidos corporais, tecidos e órgãos (Lam, 2009). A eficiência dos biomarcadores para os estudos ecotoxicológicos já foi demonstrada em diversos trabalhos sobre a toxicidade de agrotóxicos para peixes (Oruc et al., 2004; Dorval et al., 2005; Ramesh et al., 2009). Entretanto, recomenda-se a utilização de diversos tipos de biomarcadores simultaneamente, pois a avaliação de um único parâmetro pode resultar em interpretações errôneas, não demonstrando todos os danos que o contaminante ou o ambiente impactado pode causar ao organismo (Zorita et al., 2008).

A acetilcolinesterase (AChE) é um dos principais biomarcadores utilizados para o monitoramento de ambientes aquáticos contaminados por agrotóxicos, uma vez que essa enzima é inibida por pesticidas organofosfatos e carbamatos e pode provocar a superestimulação das fibras musculares ocasionando paralisação e até morte de animais (Ferrari et al., 2007).

Biomarcadores bioquímicos também podem trazer informações sobre o processo de detoxificação de contaminantes. Ao entrar em contato com o organismo, o agente tóxico pode ser biotransformado pela ação de enzimas, que atuarão para tornar a substância xenobiótica um composto menos tóxico e facilitar

sua excreção. Em peixes, as principais enzimas que atuam na biotransformação de xenobióticos são a CYP1A e a GST (Van Der Oost et al., 2003). Porém, esses processos de biotransformação podem gerar produtos intermediários mais tóxicos que o próprio contaminante, as espécies reativas de oxigênio (ERO), representadas pelo ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Valavanidis et al., 2006). Para a neutralização das ERO o organismo dispõe de defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas (Sampaio et al., 2008).

Uma das primeiras enzimas a atuar na defesa contra ERO é a superóxido dismutase (SOD), capaz de converter o ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, por sua vez, será eliminado pela ação da enzima catalase (CAT), transformando-se em oxigênio e água, ou então será neutralizado por outra enzima, a glutathiona peroxidase (GPx), capaz de degradar esse e outros tipos de peróxidos através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH), um dos antioxidantes não-enzimáticos mais importante da célula. Outra enzima importante na defesa antioxidante dos organismos é a glutathiona redutase (GR), responsável em reduzir a glutathiona oxidada (GSSG) e manter os níveis de GSH normais (Hermes-Lima, 2004).

Se a geração de ERO exceder a capacidade antioxidante do organismo ocorre o estresse oxidativo, que afeta o funcionamento normal da célula, podendo gerar danos em proteínas, inativação de enzimas, peroxidação lipídica e quebras no DNA (Amado et al., 2009). A peroxidação lipídica pode ser aplicada como um biomarcador, sendo uma das principais ferramentas na avaliação dos efeitos de um poluente (Valavanidis et al., 2006). Danos no material genético, decorrentes do estresse oxidativo ou não, podem ocasionar quebras na fita de DNA, que assim como os biomarcadores bioquímicos, podem ser utilizados no entendimento dos efeitos de xenobióticos (Ohe et al., 2004).

A espécie *Prochilodus lineatus*, conhecida popularmente como curimba, é uma espécie de peixe neotropical de grande importância econômica e que vem sendo empregada em estudos ecotoxicológicos. Estudos já mostraram a sensibilidade deste peixe a vários tipos de agrotóxicos (Cavalcante et al., 2008; Maduenho e Martinez, 2008; Modesto e Martinez, 2010a, 2010b).

Assim, o objetivo deste trabalho foi compreender os efeitos do herbicida atrazina para peixes, por meio de biomarcadores bioquímicos e genéticos.

Para tanto, foram avaliadas a atividade hepática das enzimas de biotransformação, as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, a atividade da AChE cerebral e muscular, a ocorrência de peroxidação lipídica e de danos no DNA de *P. lineatus* após a exposição aguda de a duas concentrações ecologicamente relevantes de atrazina.

MATERIAL E MÉTODOS

Aclimação dos Animais e Montagem do Experimento

Exemplares jovens de *Prochilodus lineatus* ($17,3 \pm 7,9$ g, $11,4 \pm 1,8$ cm, N = 175) fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina foram aclimatados, durante 7 dias, em tanques de 300 L contendo água descolorada e aeração constante. Durante esse período foram alimentados a cada 48 h com ração comercial e não receberam alimentação 48 h antes de serem expostos ao composto e durante os testes de toxicidade. Parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados durante toda aclimação e mantiveram-se constante (pH $7,18 \pm 0,5$, condutividade $118,25 \pm 8,7$ $\mu\text{S.cm}^{-1}$, oxigênio dissolvido $8,49 \pm 0,9$ $\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$, temperatura $21,96 \pm 2,7$ °C).

Após esse período, grupos de oito peixes foram transferidos para aquários de vidro de 100 L onde foram submetidos a testes de toxicidade aguda, do tipo estático, durante 24 e 48 horas. Um grupo de peixes foi exposto apenas à água descolorada (grupo controle) e dois grupos foram expostos à água contendo atrazina nas concentrações de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ATZ 2 e ATZ 10, respectivamente). A concentração de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ corresponde à concentração máxima de atrazina permitida pela resolução 357 do CONAMA (2005) para águas continentais e a concentração de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ corresponde à 40% da concentração de aplicação do produto na lavoura (Ventura et al., 2008).

Amostragem

Após os períodos de exposição, os peixes foram retirados do aquário e anestesiados em benzocaína (0,1g.L⁻¹) para a coleta de sangue pela veia

caudal. Após, os animais foram mortos por secção medular para a retirada das brânquias, fígado, cérebro e amostra de músculo. Os órgãos foram armazenados em ultrafreezer (-80° C) para análises posteriores.

Análises Bioquímicas

Os órgãos foram homogeneizados (10X volume) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0) e centrifugados (20 min, 13000 g, 4°C) para as análises bioquímicas.

Enzimas de biotransformação no fígado

A atividade catalítica da CYP1A foi determinada pela atividade da EROD (etoxiresorufina-O-desetilase) através da conversão da 7-etoxiresorufina, fornecida no meio de reação (tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,6 + NADH 2 mM + 7-etoxiresorufina 0,1 mM), em resorufina pela ação da EROD, de acordo com Eggens e Galgani (1992). O aumento progressivo da fluorescência, resultante da formação de resorufina, foi medido a cada minuto, durante 10 minutos (excitação: 530 nm, emissão: 590 nm). A porção inicial linear da curva foi utilizada para avaliar a taxa de reação e a atividade da EROD foi expressa em pmol de resorufina.minuto⁻¹.mg de proteína⁻¹, baseada em uma curva padrão de resorufina.

A atividade da GST foi determinada pela complexação da GSH com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em espectrofotômetro em 340 nm (Keen et al., 1976) e expressa em nmol de CDBN conjugados.minuto⁻¹.mg de proteína⁻¹.

Antioxidante não-enzimático no fígado

A quantidade de GSH na amostra foi determinada de acordo com o método de Beutler et al. (1963) e utilizado por Monteiro et al. (2006) e Thomaz et al. (2009), através da reação da glutatona com o substrato 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB), que foi quantificado em 412 nm e expressa em µg de GSH.mg de proteína⁻¹.

Antioxidantes enzimáticos no fígado

A atividade da SOD foi estimada pela taxa de redução do citocromo c inibida pelo $O_2^{\cdot -}$ (resultante da oxidação da xantina pela xantina oxidase), 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 (McCord e Fridovich, 1969). A atividade da CAT foi determinada através da velocidade da decomposição de H_2O_2 pela enzima, onde foi avaliado o decréscimo de absorbância em 240 nm (Beutler, 1975) e essa atividade foi expressa em $\mu\text{mol de } H_2O_2.\text{minuto}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$. A atividade de GPx foi estimada através da oxidação do NADPH em presença de H_2O_2 , em espectrofotômetro em 340 nm e expressa em $\mu\text{mol de NADPH oxidado.minuto}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$ (Hopkins e Tudhope, 1973). A atividade da GR foi mensurada de forma indireta através da redução do NADPH promovida pela glutatona oxidada (GSSG) (Carlberg e Mannervik, 1975), em 340 nm e expressa em $\mu\text{mol NADPH oxidado} . \text{minuto}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$.

Geração de espécies reativas de oxigênio no fígado

A quantidade de ERO foi estimada através de ensaio no qual foi mensurado a fluorescência do dicloro-fluoresceína (DCF) resultante da oxidação da 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH) por radicais livres de oxigênio (Amado et al., 2009). O nível de ERO foi expresso em unidades de fluorescência (UF) por mg de proteína⁻¹.

Peroxidação lipídica no fígado

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação do malondialdeído (MDA), que é um dos produtos finais da peroxidação lipídica. Foi empregado o ensaio TBARS, que mede as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), em espectrofotômetro a 530 nm (Federici et al., 2007). A peroxidação lipídica foi expressa em equivalentes de MDA como $\mu\text{mol de MDA.mg de proteína}^{-1}$.

Atividade cerebral e muscular da acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi determinada por meio da quantificação do produto da reação da acetilcolina com o DTNB (Alves Costa et al., 2007). A medida obtida de absorbância em 415 nm foi expressa em nmol de DTNB.minuto⁻¹.mg de proteína⁻¹.

Concentração de proteínas

A concentração de proteínas totais das amostras utilizadas nos ensaios bioquímicos foi medida através do método de Lowry et al. (1951), baseando-se em uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), em espectrofotômetro a 700 nm. Para determinar a concentração total de proteínas das amostras utilizadas no ensaio de determinação da geração de espécies reativas de oxigênio foi escolhido o método de Bradford (1976), que também utiliza uma curva referência de BSA, em espectrofotômetro a 595 nm, porém seus resultados são obtidos mais rapidamente.

Análises Genéticas – Ensaio do cometa

A metodologia para a realização do ensaio do cometa com células branquiais e hepáticas foi baseada respectivamente em Cavalcante et al. (2008) e Kilemade et al. (2004), com algumas modificações. Partes das brânquias e do fígado foram limpas com solução salina. Para a dissociação celular os tecidos seccionados permaneceram em tripsina 0,05% por 15 min, então foi adicionado soro bovino fetal (10%) e após mais 15 min a mistura foi filtrada (30 µm) e centrifugada (10 min, 1000 g). O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuspendido em PBS (NaCl 126,6mM, KCL 4,8mM, CaCl 1,5mM, NaHCO₃ 3,7mM, Na₂HPO₄ 8,9mM, NaH₂PO₄ 2,9 mM) para obtenção da suspensão celular a ser utilizada no ensaio do cometa. As amostras sanguíneas não sofreram nenhum tipo de preparo prévio, sendo apenas as células sanguíneas armazenadas em solução salina. Tanto para o sangue,

brânquia e fígado, só foram utilizadas amostras com viabilidade celular maior que 80%, determinada pelo teste de exclusão do azul de Trypan.

O ensaio alcalino do cometa foi realizado de acordo com Singh et al. (1988) com algumas modificações (Vanzella et al., 2007). Após determinação das amostras viáveis, alíquotas da suspensão celular foram adicionadas à agarose de baixo ponto de fusão 0,5% e esta mistura foi distribuída em duas lâminas previamente recobertas com agarose normal 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas resfriadas (4°C). Após 30 minutos as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em cubas contendo solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, pelo menos, 1 hora, também sob refrigeração. Em seguida, as lâminas foram acondicionadas durante 30 minutos em tampão de desnaturação (0,3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13), dentro de cubas horizontais envoltas por gelo, para posterior corrida de eletroforese (1 V.cm⁻¹; 300mA) durante 20 minutos. Após a eletroforese, as lâmina foram recobertas com tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos, com renovação completa do tampão a cada 5 minutos. Após a terceira neutralização as lâminas secaram em posição inclinada e foram fixadas em etanol durante 10 minutos.

Para as análises, as lâminas coradas com gelRed (Uniscience) foram examinadas ao microscópio de fluorescência na objetiva de 100x e foram analisados 100 nucleóides por animal. De acordo com Kobayashi et al. (1995), os danos no DNA foram classificados considerando-se o tamanho da cauda do cometa, em 4 classes: classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = cauda curta menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo. A partir dessa classificação foi calculado o escore de danos no DNA para cada tecido, de cada indivíduo, pela soma do valor da multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo valor da classe.

Análises Estatísticas

Os resultados dos diferentes parâmetros analisados, em cada período de exposição, para peixes do grupo controle (CTR) e dos grupos exposto à atrazina (ATZ 2 e ATZ 10) foram comparados entre si através de análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não-paramétrica (Kruskall-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Nos casos em que houve indicação de diferenças, elas foram localizadas por testes de comparações múltiplas. Quando utilizado ANOVA, foi realizado o método de comparação de Student-Newman-Keuls, e, para as análises utilizando-se Kruskall-Wallis, os grupos foram comparados por meio do método de Dunn, sendo considerado para ambos os casos $P \leq 0,05$. A análise estatística foi feita com auxílio do software SigmaPlot 11.0.

RESULTADOS

Atividade Hepática das Enzimas de Biotransformação

Nos peixes expostos a $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ do herbicida, por 24 horas, a atividade da EROD diminuiu significativamente, em relação ao respectivo controle. Após 48 horas de exposição às duas concentrações de atrazina, a atividade da EROD foi significativamente menor em relação aos animais do grupo controle (Fig. 1A). Os animais expostos a maior concentração de atrazina, por 48 horas, apresentaram redução significativa da atividade da GST (Fig. 1B).

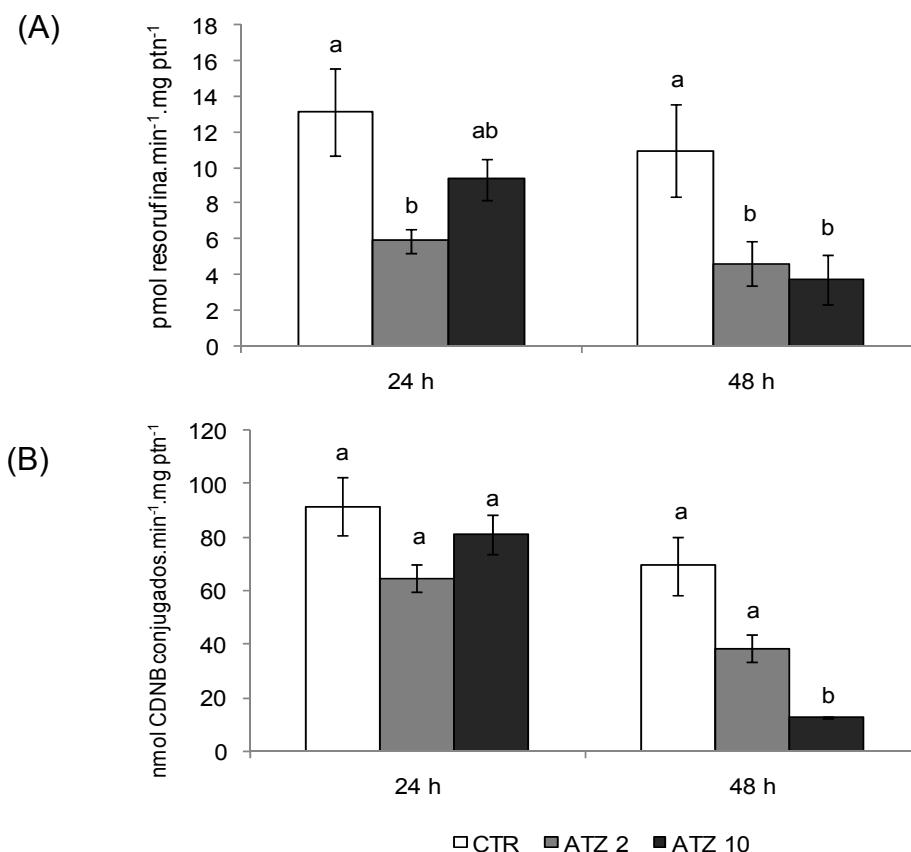


Figura 1 – Atividade hepática da (A) etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e (B) glutathione-S-transferase (GST) em *P. lineatus* expostos a 2 e 10 µg.L⁻¹ de atrazina (ATZ 2 e ATZ 10) ou somente a água (CTR), durante 24 e 48 horas. As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Para cada tempo experimental letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Os resultados de geração de ERO pelo tecido hepático de *P. lineatus* mostraram que nos animais expostos a 2 e 10 µg.L⁻¹ de atrazina, por 24 horas, houve redução significativa na geração de ERO em relação aos animais do grupo CTR. Em 48 horas, apenas os peixes do grupo ATZ 10 apresentou redução significativa na geração de ERO, em relação ao CTR (Fig. 2).

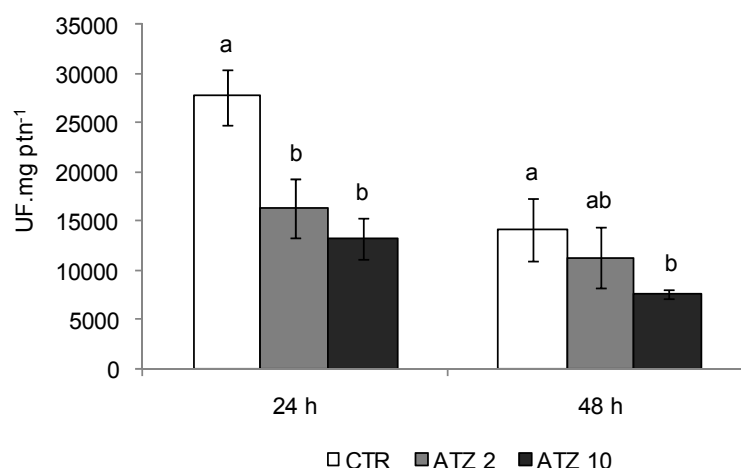


Figura 2 – Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) no fígado de *P. lineatus* expostos a 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ do herbicida atrazina (ATZ 2 e ATZ 10) ou somente a água (CTR) durante 24 e 48 horas. As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Para cada tempo experimental letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Atividade Hepática das Enzimas Antioxidantes

As atividades hepáticas das enzimas antioxidantes SOD e CAT apresentaram-se reduzidas significativamente, em relação aos seus respectivos controles, nos peixes dos grupos ATZ 2 e ATZ 10 em ambos os tempos experimentais (Fig. 3A e 3B). Nos peixes expostos às duas concentrações de atrazina, nos dois períodos experimentais, apresentaram a atividade hepática da GPx significativamente menor em relação aos respectivos controle (Fig. 3C). Por outro lado, a atividade hepática da GR apresentou aumento significativo nos peixes expostos às duas concentrações de atrazina, nos dois períodos experimentais, em relação ao controle (Fig. 3D).

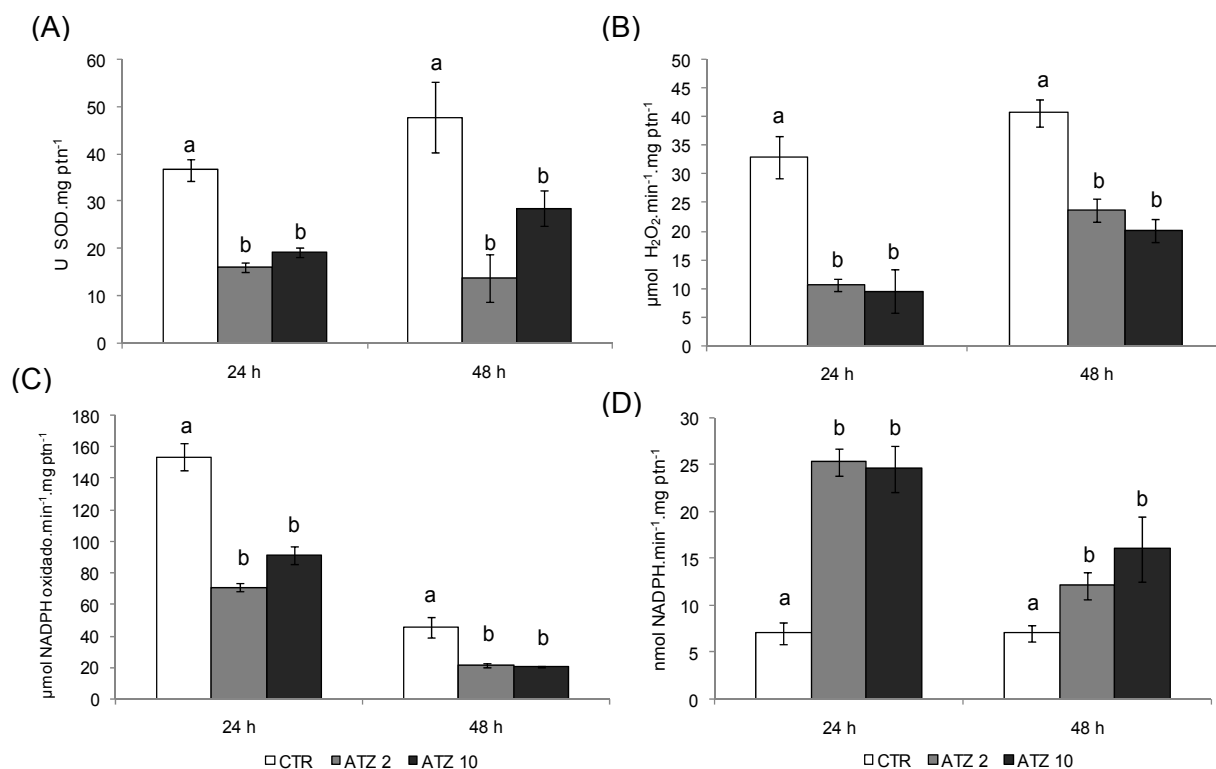


Figura 3 – Atividade hepática das enzimas antioxidantes (A) superóxido dismutase (SOD), (B) catalase (CAT), (C) glutathiona peroxidase (GPx) e (D) glutathiona redutase (GR) em *P. lineatus* expostos a 2 e 10 µg.L⁻¹ de atrazina (ATZ 2 e ATZ 10) ou somente a água (CTR), durante 24 e 48 horas. As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Para cada tempo experimental letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (P ≤ 0,05).

Conteúdo Hepático de GSH

A exposição à atrazina promoveu redução no conteúdo hepático de GSH. Entretanto, essa redução foi significativa apenas nos peixes expostos por 48 horas à menor concentração do herbicida (2 µg.L⁻¹), em comparação ao respectivo grupo CTR (Fig. 4).

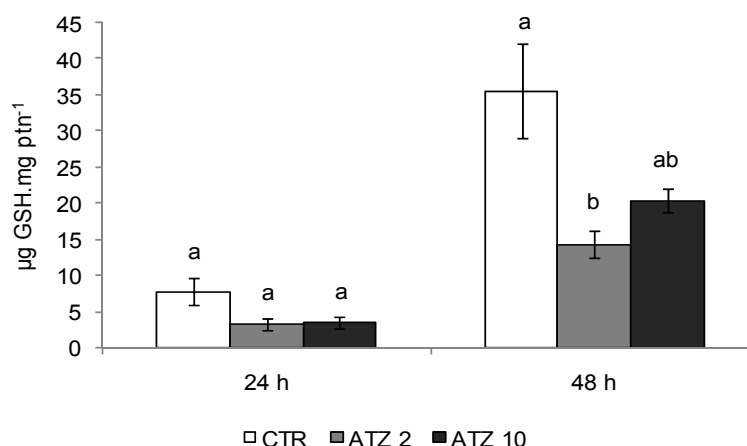


Figura 4 - Conteúdo hepático de glutathiona reduzida (GSH) em *P. lineatus* expostos a 2 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina (ATZ 2 e ATZ 10) ou somente a água (CTR), durante 24 e 48 horas. As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Para cada tempo experimental letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Peroxidação Lipídica

Os peixes expostos à atrazina apresentaram redução no conteúdo hepático de MDA, quando comparados com os respectivos grupos controle. Esse decréscimo foi significativo nos animais expostos às duas concentrações do herbicida, por 24 horas, e também naqueles expostos à menor concentração de atrazina, durante 48 horas (Fig. 5).

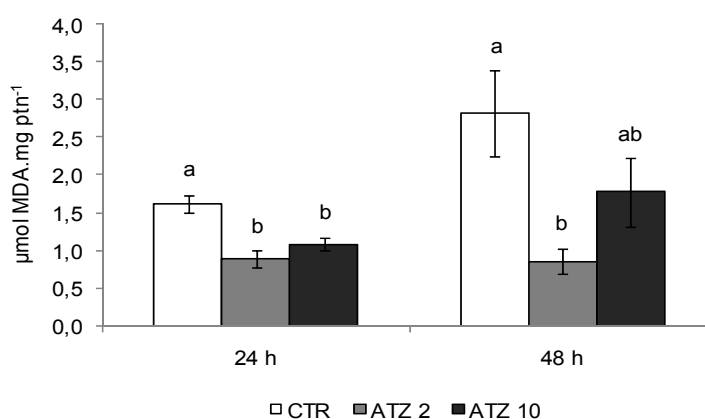


Figura 5 – Conteúdo de malondialdeído (MDA), subproduto da peroxidação lipídica, no fígado de *P. lineatus* expostos a 2 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina (ATZ 2 e ATZ 10) ou somente a água (CTR), durante 24 e 48 horas. As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Para cada tempo experimental letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Danos no DNA – Ensaio do Cometa

Os peixes expostos a atrazina por 48 horas apresentaram um aumento concentração-dependente na ocorrência de danos no DNA dos eritrócitos e das células hepáticas. No caso do sangue, um aumento no escore de danos no DNA, concentração-dependente, também ocorreu para o tempo de 24 horas (Fig. 6A e 6B). No caso das células branquiais, apenas peixes expostos à menor concentração do herbicida por 48 horas apresentaram escore de danos significativamente maior em relação ao CTR (Fig. 6C).

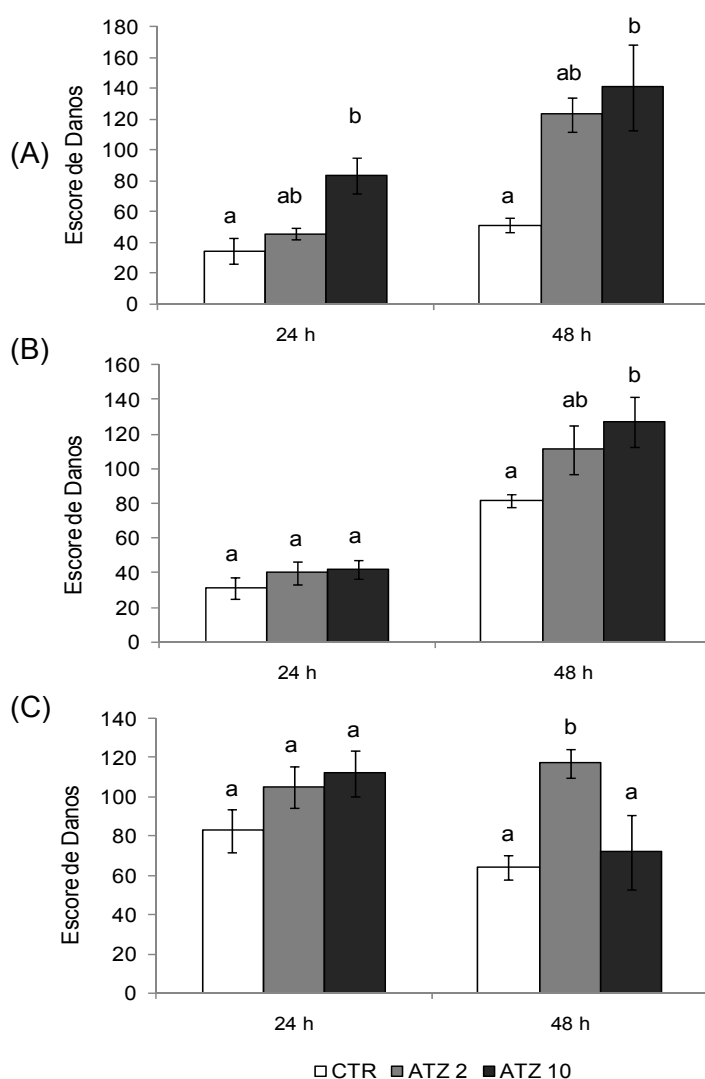


Figura 6 – Escore de danos no DNA de células (A) sanguíneas, (B) hepáticas e (C) branquiais de *P. lineatus* expostos a 2 e 10 µg.L⁻¹ de atrazina (ATZ 2 e ATZ 10) ou somente a água (CTR), durante 24 e 48 horas. As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Para cada tempo experimental letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (P ≤ 0,05).

Acetilcolinesterase

A exposição à atrazina não alterou a atividade cerebral e muscular da acetilcolinesterase de *P. lineatus* em nenhum dos tempos de exposição (Fig. 7A e 7B).

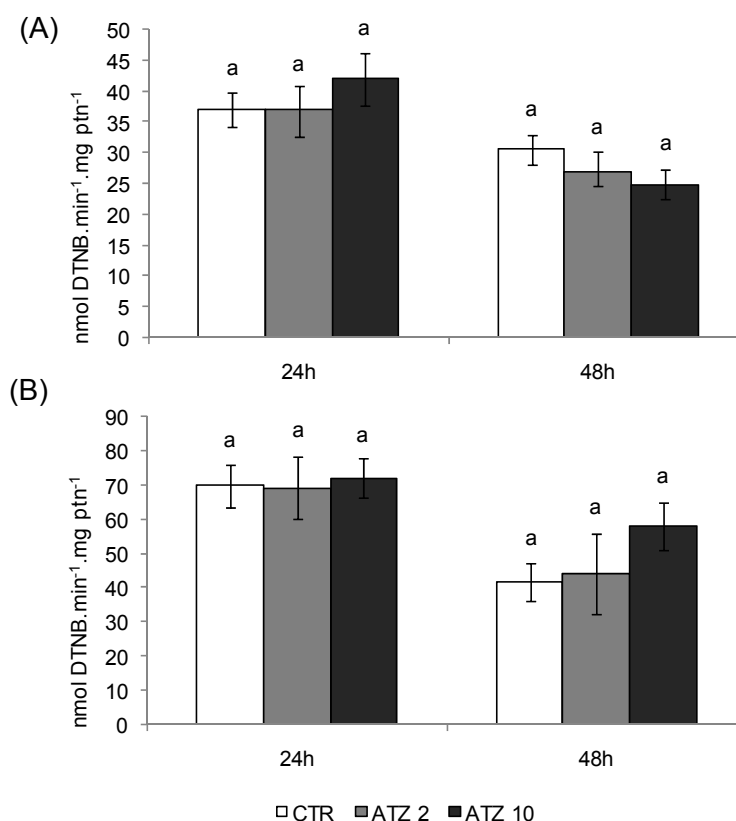


Figura 7 – Atividade da acetilcolinesterase no (A) cérebro e (B) músculo de *P. lineatus* expostos a 2 e 10 µg.L⁻¹ de atrazina (ATZ 2 e ATZ 10) ou somente a água (CTR), durante 24 e 48 horas. As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Para cada tempo experimental letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$).

DISCUSSÃO

Agrotóxicos, em geral, podem ser modificados e se tornarem menos tóxicos ao organismo através das vias de biotransformação. Sabe-se que em diversas espécies de peixes, a enzima de biotransformação de fase I, CYP1A, pode

ter sua atividade alterada na presença de agrotóxicos e outros poluentes presentes no ambiente aquático (Agradi et al., 2000; Van Der Oost et al., 2003). No presente estudo, a atrazina foi responsável pela redução da atividade hepática da EROD (uma das formas de se medir a atividade da CYP1A) no peixe *Prochilodus lineatus* após 24 e 48 horas de exposição. Esse resultado pode estar relacionado a uma redução na quantidade da enzima no fígado do animal por não estar sendo sintetizada, e não propriamente a uma interferência na sua atividade, como já foi comprovado por Salaberria et al. (2009), que constataram que a atrazina nas concentrações de 2 e 200 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ foi capaz de diminuir a expressão do gene da CYP1A no peixe *Oncorhynchus mykiss*.

A ação da atrazina sobre a CYP1A pode comprometer a metabolização de compostos endógenos, como os hormônios sexuais, influenciando assim a homeostase endócrina do organismo, e por isso este herbicida é considerado um importante disruptor endócrino (Spanò et al., 2004; Salaberria et al., 2009). Entretanto, a CYP1A pode ter pouco destaque na detoxificação da atrazina, visto que este herbicida, em plantas, se conjuga facilmente à GSH devido sua estrutura química e o mesmo pode ocorrer em animais, onde provavelmente a metabolização da atrazina se inicia na segunda fase da biotransformação através da GST (Wiegand et al., 2001).

A GST, uma das principais enzimas de biotransformação de fase II, neste caso, atuaria na metabolização da atrazina, desempenhando seu papel e compensando a inatividade da EROD. Tal situação já foi reportada por Sanchez et al. (2006), que obtiveram um aumento na atividade da GST concomitantemente à inibição da EROD, quando expuseram peixes da espécie *Gasterosteus aculeatus* ao herbicida Diquat durante 21 dias. Entretanto, a atividade da GST de *P. lineatus* expostos a atrazina foi reduzida, assim como a da EROD, após 48 horas de exposição a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina. Esta redução na atividade da GST deve ser interpretada juntamente com os baixos níveis de GSH no fígado do animal, uma vez que a GSH é o principal substrato para a ação da GST na metabolização da atrazina, e ambos se apresentaram diminuídos, provavelmente devido a grande demanda de conjugação do herbicida com a GSH (Wiegand et al., 2001).

A biotransformação da atrazina em compostos hidrofílicos para facilitar sua excreção é de extrema importância. A atrazina dificilmente é bioacumulada devido sua fácil metabolização (Solomon et al., 2008). Porém, em *P.*

lineatus, pode estar ocorrendo o oposto, uma vez que a atrazina, mesmo em concentrações baixas (2 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$), poderia exaurir as possíveis vias para sua detoxificação e, conseqüentemente, o herbicida estaria permanecendo dentro do hepatócito. Tal afirmação pode ser corroborada pelos resultados do ensaio do cometa, no qual foi observado danos no DNA de células hepáticas dos peixes expostos à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina em 48 horas, portanto, o mesmo grupo que apresentara redução na atividade da GST. A atrazina já é reconhecida na literatura como potencial agente genotóxico para vários tecidos de diversos organismos (Lin et al., 2005; Singh et al., 2008; Ventura et al., 2008) e, neste caso, também está causando danos no material genético dos hepatócitos do *P. lineatus*.

Outro resultado que deve ser destacado para melhor entendimento dos efeitos da atrazina em *P. lineatus* é a diminuição significativa da geração de ERO no tecido hepático. A produção de espécies reativas de oxigênio é proveniente da metabolização de compostos endógenos e exógenos, da própria respiração celular e de outros processos celulares (Hermes-Lima, 2004). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as enzimas de biotransformação apresentam-se com a atividade reduzida, ou seja, não estaria ocorrendo geração de ERO através desta via. Outro meio para a geração de ERO é a própria respiração. Neste caso, a atrazina poderia dificultar a respiração devido aos seus efeitos no sangue, como a redução no número de eritrócitos circulantes e no conteúdo de hemoglobina, o que poderia causar hipóxia tecidual e conseqüente diminuição na geração de ERO no tecido hepático. Não há dados na literatura sobre a redução da geração de ERO em peixes expostos à atrazina, porém, estudos comprovam que a atrazina é capaz de alterar parâmetros hematológicos como: quantidade de células vermelhas, hematócrito e concentração de hemoglobina em algumas espécies de peixes (Hussein et al., 1996; Ramesh et al., 2009).

A geração de ERO pelo organismo é uma consequência natural do metabolismo celular e por isso, peixes e demais seres aeróbios são providos de defesas antioxidantes (Hermes-Lima, 2004). Neste trabalho, os resultados demonstram que indivíduos expostos às duas concentrações de atrazina em ambos os tempos experimentais tiveram a atividade de suas enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx inibidas. Estas enzimas podem ser inibidas por diferentes causas. A SOD, por exemplo, pode se encontrar inibida frente a um excesso de H_2O_2 na célula. Por sua vez, a CAT pode ter sua atividade inibida quando os níveis de $\text{O}_2^{\cdot-}$ são altos.

Ou seja, o excesso de substrato de uma enzima influencia na atividade da outra e vice-versa. Tais observações foram feitas por Modesto e Martinez (2010b), que utilizaram a mesma espécie de peixe exposto ao herbicida Roundup Transorb®, e estes resultados poderiam explicar os efeitos obtidos nos *P. lineatus* expostos à atrazina. Contudo, no presente trabalho não houve aumento na geração de ERO para que isto possa estar ocorrendo. Poder-se-ia, então, inferir que, mais uma vez, a atrazina estaria atuando sobre a expressão gênica destas enzimas. Porém, estudos feitos por Jin et al. (2010) demonstraram que peixes da espécie *Danio rerio* expostos também à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina durante 14 dias tiveram os níveis de RNAm de SOD e CAT no fígado aumentados. Portanto, a causa mais provável para a inibição destas duas enzimas no fígado de *P. lineatus* expostos à 2 e $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina é a baixa concentração de ERO no tecido. No caso da GPx, outro fator que estaria contribuindo para sua inibição seria a falta de seu cofator, a GSH, cujo conteúdo também apresentou-se reduzido nos peixes expostos ao herbicida.

Os peixes expostos à atrazina apresentaram redução no conteúdo hepático de GSH e esses resultados provavelmente se refletem na redução da atividade da GPx e GST e no aumento da atividade da GR, enzima responsável pela redução da glutatona oxidada (GSSG). A atividade da GR, por sua vez, aumentou em todos os tempos experimentais nos peixes expostos às duas concentrações de atrazina, indicando a tentativa do organismo de manter os níveis de GSH normais. A manutenção dos níveis de GSH pela GR, neste caso, deve-se à importância que a GSH tem na diminuição da toxicidade da atrazina através de sua conjugação com a molécula do herbicida (Wiegand et al., 2001).

Como já demonstrado em diversos trabalhos utilizando a atrazina como xenobiótico (Elia et al., 2002; Nwani et al., 2010; Jin et al., 2010), quando ocorrem alterações nas defesas antioxidantes de peixes e a concentração de ERO se torna excessiva, os animais podem sofrer um estresse oxidativo, que pode resultar em danos ao organismo, como por exemplo, a peroxidação lipídica (LPO). O ensaio escolhido neste trabalho para avaliar se houve peroxidação lipídica ou não consiste em um teste onde se mede os níveis de malondialdeído (MDA), que é um subproduto da LPO (Federici et al., 2007). Porém, os níveis de MDA das amostras dos peixes expostos à atrazina diminuíram em relação aos respectivos controles, ou seja, os animais expostos somente à água estariam sofrendo mais danos em suas membranas lipídicas que os animais expostos à atrazina. Contudo, deve-se lembrar

que o metabolismo celular promove a geração de ERO (as quais são responsáveis pelo desencadeamento da LPO) e, por isso, os grupos controles apresentam concentrações de MDA em seu tecido hepático. Os peixes expostos à atrazina durante 24 horas são os que apresentam diminuição significativa de MDA em relação ao controle, exatamente os mesmos grupos que apresentaram uma concentração de ERO diminuída significativamente quando comparados ao CTR.

Danos no DNA podem ocorrer em consequência do estresse oxidativo, dos metabolitos de um xenobiótico ou do próprio xenobiótico. No caso de *P. lineatus*, a própria atrazina demonstra-se genotóxica para os três tecidos analisados (sangue, brânquia e fígado), visto que não há indícios de que esteja ocorrendo metabolização da mesma. Os resultados obtidos no material genético de hepatócitos de peixes expostos a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ do herbicida em 48 horas, como discutido anteriormente, podem ser consequência do acúmulo de atrazina no fígado devido à redução na atividade da GST. Ensaio para avaliar os danos causados no material genético de células hepáticas devem ser considerados em pesquisas de toxicologia, uma vez que o fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de xenobióticos e, portanto, está mais susceptível a danos devido a presença desses compostos tóxicos em suas células (Rajaguru et al., 2003).

As células sanguíneas de *P. lineatus* também se demonstraram sensíveis à genotoxicidade da atrazina, visto que peixes dos grupos expostos a maior concentração de atrazina nos dois tempos experimentais apresentaram aumento de danos no DNA. Ventura et al. (2008), testando diferentes concentrações deste mesmo herbicida em *Oreochromis niloticus* também observaram os efeitos genotóxicos da atrazina para eritrócitos, após 72 horas de exposição, confirmando que a atrazina pode afetar o material genético de eritrócitos de diferentes espécies de peixes. O sangue é um dos tecidos mais utilizados para avaliar a genotoxicidade de xenobióticos, devido seu papel importante no transporte desses compostos e à fácil obtenção de amostras (Vrzoc e Petras, 1997).

Para as células branquiais, só houve aumento significativo na ocorrência de danos no DNA nos peixes expostos a menor concentração de atrazina durante 48 horas. A concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina apresentou-se genotóxica para os demais tecidos de *P. lineatus* e, provavelmente, também é genotóxica para as células branquiais. Contudo, essa maior concentração da atrazina pode ter causado apoptose das células branquiais e, por isso, os peixes do grupo ATZ 10

apresentaram um escore de danos menor que o ATZ 2, já que as células apoptóticas não são incluídas no cálculo do escore de danos. Por serem resultados obtidos a partir de análises visuais, sem auxílio de programas específicos, pode-se observar em determinadas lâminas a ocorrência das células apoptóticas devido a aparência dos nucleóides, que apresentavam-se sem núcleo definido. Estes nucleóides não foram incluídos na classificação, pois apresentavam danos além do que são contabilizados pela metodologia utilizada. As brânquias constituem o órgão que está em contato direto com o ambiente externo, ou seja, o contato com a atrazina é íntimo e isso a torna mais susceptível aos efeitos genotóxicos da atrazina.

Os danos causados no DNA de *P. lineatus* expostos ao herbicida atrazina não foram de origem oxidativa, já que não foi detectado aumento na geração de espécies reativas de oxigênio no fígado e, provavelmente, não estaria ocorrendo nos demais órgãos testados. De acordo com Oliveira-Brett e Silva (2002), herbicidas triazínicos, incluindo a atrazina, são capazes de se ligarem diretamente ao DNA, através de mecanismos de intercalação e formação de aductos entre as bases adenina e guanina. Uma das principais vias para se evitar danos no DNA é a conjugação do xenobiótico com a GSH catalisada pela ação da GST (Chakraborty et al., 2009). Assim, como já foi discutido anteriormente, a atrazina necessita da atividade da GST para se conjugar com a GSH e se tornar menos tóxica ao organismo. Deste modo, sua genotoxicidade possivelmente se agrava como resultado tanto da redução no conteúdo de GSH, como do decréscimo na atividade da GST e o ensaio do cometa foi sensível o suficiente para detectar estes danos causados pela exposição à atrazina.

Apesar de ter demonstrado diversos efeitos sobre *P. lineatus*, a atrazina não apresentou efeitos na atividade da acetilcolinesterase no cérebro e músculo desta espécie de peixe. Agroquímicos, principalmente organofosforados e carbamatos, são compostos reconhecidamente capazes de alterar a atividade dessa enzima (Payne et al., 1996). Estudos comprovam que peixes submetidos a concentrações subletais de agrotóxicos podem apresentar alterações na atividade da acetilcolinesterase, principalmente a inibição da mesma (Ferrari et al., 2007; Miron et al., 2005; Modesto e Martinez, 2010a). Já foram reportados os efeitos anticolinesterásicos da atrazina em diversas espécies de peixe, podendo ser uma das causas o excesso do substrato acetilcolina nas fendas sinápticas (Hussein et al., 1996; Pugazhendy et al., 2007; Xing et al. 2010). Uma das conseqüências das

alterações no estado normal da acetilcolinesterase no sistema neuromuscular é a mudança comportamental, como as observadas por Steinberg et al. (1995) e Saglio e Trijasse (1998) que estudaram os efeitos da atrazina no comportamento de *Danio rerio* e de *Carassius auratus*. Entretanto, a espécie *P. lineatus* demonstrou-se menos sensíveis a esses efeitos, mesmo sendo uma espécie que pode ter sua atividade colinérgica alterada por outros agroquímicos, como, por exemplo, o Diflubenzuron®, Roundup® e Roundup Transorb® (Maduenho e Martinez, 2008; Modesto e Martinez, 2010a, 2010b).

Com os resultado obtidos neste trabalho pode-se concluir que a atrazina foi tóxica para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, mesmo em baixas concentrações (2 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$), uma vez que promoveu alterações significativas nos parâmetros bioquímicos e genéticos avaliados. Um dos efeitos da atrazina foi a redução da atividade hepática da GST, principal responsável por sua metabolização, que deve ter levado ao acúmulo do herbicida nos hepatócitos do peixe. Os peixes expostos a atrazina também apresentaram inibição da via de biotransformação de fase I, como demonstrado pela redução na atividade da EROD, o que estaria contribuindo diretamente para a diminuição da geração de espécies reativas de oxigênio no fígado e consequente redução na atividade hepática das enzimas antioxidantes. Por outro lado, a atrazina estimulou a ação da GR que é responsável pela manutenção dos níveis de GSH normais, que se encontram diminuídos neste trabalho. Mesmo com os antioxidantes reduzidos, a atrazina não causou peroxidação lipídica no fígado de *P. lineatus*, visto que os níveis de MDA foram menores nos animais dos grupos experimentais. Além dos efeitos bioquímicos, a atrazina causou danos no DNA dos três tecidos avaliados, sangue, brânquias e fígado, que não devem ter tido origem oxidativa, já que não foi detectado aumento na geração de espécies reativas de oxigênio. Esses resultados mostram que 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina, concentração permitida para as águas doces pela legislação brasileira (resolução CONAMA, 2005), não é uma concentração segura para a espécie de peixe *Prochilodus lineatus*.

REFERÊNCIAS

- Agradi, E., Baga, R., Cillo, F., Ceradini, S., Heltai, H. 2000. Environmental contaminants and biochemical response in eel exposed to Po river water, *Chemosphere* 41, 1555–1562.
- Almeida, J.A., Meletti, P.C., Martinez, C.B.R., 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140C, 3-4, 356-363.
- Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 82–88.
- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms. Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 409, 2115–2123.
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods*. Grune & Straton, New York.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 882-890.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Camargo, M.M.P., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 94, 40–46.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 260, 14, 25, 5475 – 5480.
- Cavalcante, D. G. S. M., Martinez, C. B. R., Sofia, S. H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.* 655, 41-46.
- Cerejeira, M.J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Vallerio, M.J., Silva, A., Ferreira, M., Silva-Fernandes, A.M., 2003. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Wat. Res.* 37, 1055–1063.
- Chakraborty, A., Ferk, F., Simic, T., Brantner, A., Dusinská, M., Kundi, M., Hoelzl, C., Nersesyan, A., Knasmülle, S., 2009. DNA-protective effects of sumach (*Rhus coriaria*

L.), a common spice: Results of human and animal studies. *Mutat. Res.* 661, 10–17.

CONAMA. 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. 2009.

Davis, R.K., Pederson, D.T., Blum, D.A., Carr, J.D., 2007. Atrazine in a stream-aquifer system: estimation of aquifer properties from atrazine concentration profiles. *Ground Water Monit. Remediat.* 13, 2, 134-141.

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.

Dorval, J., Leblond, V., Deblois, C., Hontela, A., 2005. Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. *Environm. Toxicol. Chem.* 24, 5, 1273–1280.

Eggens, M.L., Galgani, F., Klungøyr, J., Everts, J., 1992. Hepatic EROD activity in dab, *Limanda limanda*, in the German Bight using an improved plate-reader method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91, 71-75.

Elia, A. C., Waller, W. T., Norton, S. J., 2002. Biochemical responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 68, 809-16.

Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R. D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 84, 415–430.

Ferrari, A., Venturino, A., D'angelo, A.M.P., 2007. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* 146C, 308–313.

Graymore, M., Stagnitti, F., Allinson, G., 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. Intern.* 26, . 483-495.

Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radical. In: Storey, K. B. (ed.) *Functional metabolism: regulation and adaptation*. John Wiley & Sons Inc., New York, Cap. 12, pp. 319–368.

Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J. Haematol.* 25, 563-575.

Hussein, S.Y., El-Nasser, M.A., Ahmed, S.M., 1996. Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, Egypt. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 503–510.

- Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z., 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 78, 846–852.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W. B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183-6188.
- Kilemade, M.F., Hartl, M.G.J., Sheehan, D., Mothersill, C., Van Pelt, F.N.A.M., O'halloran, J., O'brien, N.M., 2004. Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from cork harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the comet assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 44, 56-64.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T.A., 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Commun.* 3, 103-115.
- Konstantinou, I.K., Hela, D.G., Albanis, T.A., 2006. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environ. Pollut.* 141, 555-570.
- Lam, P.K.S. 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean Coast. Manage.* 52, 348–354.
- Lin, A. J., Zhu, Y. G., Tong, Y. P., Geng, C. N., 2005. Evaluation of genotoxicity of combined pollution by cadmium and atrazine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74, 589–596.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Maduenho, L.P., Martinez, C.B.R., 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 148C, 3, 265-272.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- Miron, D., Crestani, M., Schetinger, M.R., Morsch, V.M., Baldisserotto, B., Tierno, M.A., Moraes, G., Vieira, V.L.P., 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 398-403.
- 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 lineatus*. *Chemosphere* 78, 3, 294-299.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 6, 781-787.

- Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol.* 143, 141-149.
- Nieves-Puigdoller, N., Björnsson, B.T., McCormick, S.D., 2007. Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in Atlantic salmon. *Aquat. Toxicol.* 84, 27–37.
- Nwani, C.D., Lakra, W.S., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., Srivastava, S. K. 2010. Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (bloch). *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 3298–3312.
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res.* 567, 109–149.
- Oliveira-Brett, A.M., Silva, L.A., 2002. A DNA-electrochemical biosensor for screening environmental damage caused by s-triazine derivatives. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 717–723.
- Oruc, E.O., Sevgiler, Y., Uner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comp. Biochem. Physiol.* 137C, 43–51.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 225–231.
- Pugazhendy, K., Jayachandran, K., Divyavelayuthan, I., Jayanthi, C., 2007. Impact of atrazine on acetylcholinesterase activity in freshwater fish *Labeo rohita* (Linn.) fingerlings. *Environ. Ecol.* 25S, 4A, 1391-1393.
- Rajaguru, P., Suba, S., Palanivel, M., Kalaiselvi, K., 2003. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environ. Mol. Mutagen.* 41, 85–91.
- Ramesh, M., Srinivasan, R., Saravanan, M., 2009. Effect of atrazine (Herbicide) on blood parameters of common carp *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes). *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* 3, 12, 453-458.
- Saglio, P., Trijasse, S., 1998. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 484–491.
- Salaberria, I., Hansen, B.H., Asensio, V., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., Jenssen, B.M., 2009. Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234, 98–106.

Sampaio, F.G., Boijink, C.L., Oba, E.T., Santos, L.R.B., Kalinin, A.L., Rantin, F.T., 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* 147C, 43–51.

Sanchez, W., Palluel, O., Lagadic, L., Aït-Aïssa, S., Porcher, J.M., 2006. Biochemical effects of nonylphenol polyethoxylate adjuvant, Diquat herbicide and their mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Mar. Environ. Res.* 62, S29–S33.

Simonato, J.D., Albinati, A.C., Martinez, C.B.R., 2006. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus Lineatus Valenciennes*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76, n. 3, p. 505-511.

Singh, M., Kaur, P., Sandhir, R., Kiran, R., 2008. Protective effects of vitamin E against atrazine-induced genotoxicity in rats. *Mutat. Res.* 654, 145–149.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice R.R., Schneider E.L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.

Solomon, K. R., Carr, J. A., Du Preez, L. H., Giesy, J. P., Kendall, R. J., Smith, E. E., 2008. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 721–772.

Spanò, L., Tyler, C.T., Aerle, R., Devos, P., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Thomé, J.P., Kestemont, P., 2004. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat. Toxicol.* 66, 369 –379.

Steinberg, C.E.W., Lorenz, R., Spieser, O.H., 1995. Effects of atrazine on swimming behavior of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Water Res.* 29, 3, 981-985.

Thomaz, J.M., Martins, N.D., Monteiro, D.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2009. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVONs). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1413–1424.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189.

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.

- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mut. Res.* 631, 36-43.
- Ventura, B.C., Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A., 2008. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Peciformes, Cichlidae) detected by micronuclei test and the comet assay. *Pestic. Biochem. Physiol.* 90, 42-51.
- Vrzoc, M., Petras, M., 1997. Comparison of DNA damage in peripheral blood and spleen lymphocytes using the single-cell gel assay. *Mut. Res.* 379, 263-269.
- 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.
- Xing, H., Wang, J., Li, J., Fan, Z., Wang, M., Shiwen Xu, S., 2010. Effects of atrazine and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and carboxylesterase in brain and muscle of common carp. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30, 26-30.
- Yang, L., Zha, J., Li, W., Li, Z., Wang, Z., 2010. Atrazine affects kidney and adrenal hormones (AHs) related genes expressions of rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Aquatic Toxicol.* 97, 204-211.
- Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Apraiz, I., Cancio, I., Orbea, A., Soto, M., Marigómez, I., Cajaraville, M.P., 2008. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. *Environ. Pollution* 153, 157-168.

4 CONCLUSÕES

- A atrazina em concentrações baixas (2 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) foi tóxica para espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, visto que a maioria dos parâmetros bioquímicos e os parâmetros genéticos testados tiveram alterações;
- Com exceção da atividade da acetilcolinesterase, os demais parâmetros bioquímicos e genéticos avaliados em *P. lineatus* responderam a baixas concentrações da atrazina e, portanto podem ser considerados bons biomarcadores para avaliação da contaminação aquática por este herbicida;
- Um dos principais efeitos da atrazina para *P. lineatus* foi a inibição das enzimas de biotransformação, que pode levar ao acúmulo deste herbicida nos hepatócitos do peixe, e, conseqüentemente, causar os danos observados no DNA destas células;
- A inibição da atividade da CYP1A pela atrazina refletiu-se na diminuição da geração de espécies reativas de oxigênio no tecido hepático, o que também fez com que as enzimas antioxidantes apresentassem suas atividades diminuídas significativamente;
- Apenas a glutathione redutase apresentou sua atividade aumentada, provavelmente na tentativa de recuperar os níveis de GSH que também foram diminuídos;
- Não houve indicativo de peroxidação lipídica causada pela atrazina na espécie *P. lineatus*, mesmo com as defesas antioxidantes alteradas, os níveis de malondialdeído apresentaram-se menores nos peixes dos grupos experimentais;

- A ação genotóxica da atrazina foi confirmada pelos resultados do ensaio do cometa realizados com células sanguíneas, branquiais e hepáticas. Os danos causados no DNA de *P. lineatus* expostos ao herbicida atrazina não foram de origem oxidativa, já que não foi detectado aumento na geração de espécies reativas de oxigênio no fígado e, provavelmente, não estaria ocorrendo nos demais órgãos testados.
- A exposição à atriazina não alterou a atividade da acetilcolinesterase no cérebro e músculo de *Prochilodus lineatus*;
- A concentração de atrazina de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$, concentração permitida para as águas doces pela legislação brasileira (resolução CONAMA, 2005), não é uma concentração segura para a espécie de peixe *Prochilodus lineatus*.

REFERÊNCIAS

- AGRADI, E. et al. Environmental contaminants and biochemical response in eel exposed to Po river water. **Chemosphere**, v. 41, p. 1555–1562, 2000.
- AGRAWAL, A.; PANDEY, R. S.; SHARMA, B. Water pollution with special reference to pesticide contamination in India. **Journal of Water Resource and Protection**, v. 2, p. 432–448, 2010.
- ALMEIDA, J. A.; MELETTI, P. C.; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 3–4, p. 356–363, 2005.
- ALVES COSTA, J. R. M. et al. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 82–88, 2007.
- ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no brasil**: controle social e interesses corporativos. São Paulo: Annablume; Fapesp, 2002.
- AMADO, L. L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms. Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 2115–2123, 2009.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, supl. 1, 2003.
- ARIAS-ESTÉVEZ, M. et al. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 123, p. 247–260, 2008.
- ARMAS, E. D. et al. 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. et al. 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.
- ATLI, G. et al. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 218–224, 2006.
- BARD, S. M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 48, p. 357–389, 2000.

BECKER, A. G. et al. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1734-1739, 2009.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. New York: Grune & Straton, 1975.

BEUTLER, E., DUROM, O., KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-890, 1963.

BJELLAND, S.; SEEBERG, E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. **Mutation Research**, v. 531, p. 37–80, 2003.

BORTOLUZZI, E. C. et al. Investigation of the occurrence of pesticide residues in rural wells and surface water following application to tobacco. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1872-1876, 2007.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Caderno da Saúde Pública**, v. 19, n. 2, p. 465-473, 2003.

CAMARGO, M. M. P.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 94, p. 40–46, 2009.

CAPELETI, A. R.; PETRERE JÚNIOR, M. Migration of the curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Pisces, Prochilodontidae) at the waterfall “cachoeira de emas” of the Mogi-guaçu river - São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2B, p. 651-659, 2006.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 14, p. 5475 – 5480, 1975.

CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, n. 622, p. 1-189, 2004.

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.

CEMELI, E.; BAUMGARTNER, A.; ANDERSON, A. Antioxidants and the comet assay: review. **Mutation Research**, v. 681, p. 51–67, 2009.

CEREJEIRA, M. J. et al. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. **Water Research**, v. 37, p. 1055–1063, 2003.

CHAKRABORTY, A., et al. DNA-protective effects of sumach (*Rhus coriaria* L.), a common spice: Results of human and animal studies. **Mutation Research**, v. 661, p. 10–17, 2009.

CHAPADENSE, P. F. G.; CASTRO, F. J.; ALMEIDA, J. A.; MORON, S. E. Toxicidade do herbicida atrazina em *Colossoma macropomum*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 2, p. 398-405, 2009.

COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009. Disponível em: <<http://www.naturezaonline.com.br>>. Acesso em: 2 jul. 2010.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-261, 2004.

CONAMA. 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: 5 maio. 2009.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COTELLE, S.; FÉRARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, n. 4, p. 246-255, 1999.

COUTINHO, C. F. B. et al. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

COX, C. Atrazine: environmental contamination and ecological effects. **Jornal of Pesticides Reform**, v. 21, n. 3, p. 12 – 20, 2001.

DAVIS, R. K.; PEDERSON, D. T.; BLUM, D. A.; CARR, J. D. Atrazine in a stream-aquifer system: estimation of aquifer properties from atrazine concentration profiles. **Ground Water Monitoring & Remediation**, v. 13, n. 2, p. 134-141, 2007.

DONG, X. et al. Effects of atrazine on cytochrome P450 enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 77, p. 404–412, 2009.

DORVAL, J. et al. Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 1273–1280, 2005.

EGGENS, M. L. et al. Hepatic EROD activity in dab, *Limanda limanda*, in the German Bight using an improved plate-reader method. **Marine Ecology Progress Series**, v. 91, p. 71-75, 1992.

EISLER, R. Atrazine hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. **Contaminant Hazard Reviews**, v. 18, p. 1-8, 1989.

ELIA, A. C.; WALLER, W. T.; NORTON, S. J. Biochemical responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, p. 809-16, 2002.

FEDERICI, G.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415–430, 2007.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; D'ANGELO, A. M. P. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 146, p. 308–313, 2007.

FILIZOLA, H. F.; FERRACINI, V. L.; SANS, L. M. A. Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guaíra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 659-667, 2002.

FONTES, J. R. A.; SILVA, A. A.; VIEIRA, R. F.; RAMOS, M. M. Lixiviação de herbicidas no solo com água de irrigação em plantio direto. **Planta Daninha**, v. 22, n. 4, p. 623-631, 2004.

FREIRE, M. M.; SANTOS, V. G.; GINUINO, I. S. F.; ARIAS, A. R. L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 347-354, 2008.

GOEL, P. K. **Water pollution: causes, effects and control**. 2.ed. New Delhi: New Age International, 2006. p.2. Disponível em: <<http://books.google.com.br>>. Acesso em: 5 jul. 2010.

GONTIJO, A. M. M. C. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. cap. 10, p. 247-271, 2003.

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

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 715-725, 1993.

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

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

HUSSEIN, S. Y.; EL-NASSER, M. A.; AHMED, S. M. Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthys auratus* at Assiut, Egypt. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, p. 503 – 510, 1996.

ISLAM, M. O.; HARA, M.; MIYAKE, J. Induction of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase and cytochrome P450 in rat liver by atrazina. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.12, p.1–6, 2002.

ITUASSÚ, D. R.; CAVERO, B. A. S.; FONSECA, F. A. L.; BORDINHON, A. M. Cultivo de curimatã (*Prochilodus* spp). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria – RS: UFSM, cap. 3, p. 67-77, 2005.

JHA, A. N. Genotoxic studies in aquatic organisms: an overview. **Mutation Research**, v. 552, p. 1-17, 2004.

JIN, Y. et al. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 78, p. 846–852, 2010.

KEEN, J. H., HABIG, W. H., JAKOBI, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KILEMADE, M. F et al. Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from cork harbor, ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, p. 56-64, 2004.

KOBAYASHI, H. et al. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Communications**, v. 3, p. 103-115, 1995.

KONSTANTINOOU, I. K.; HELA, D. G.; ALBANIS, T. A. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. **Environmental Pollution**, v. 141, p. 555-570, 2006.

LAM, P. K. S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean & Coastal Management**, v. 52, p. 348–354, 2009.

LANCHOTE, V. L.. et al. HPLC screening and GC-MS confirmation of triazine herbicides residues in drinking water from sugar cane area in Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 118, p. 329–337, 2000.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v. 544, p. 43–64, 2003.

LEONHARDT, J. H. et al. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M. E. Medri, 2002. cap. 30, p. 579-589.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v. 674, p. 137-147, 2009.

LIN, A. J. et al. Evaluation of genotoxicity of combined pollution by cadmium and atrazine. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 74, p. 589-596, 2005.

LIN, T.; et al.. Study of atrazine degradation in subsurface flow constructed wetland under different salinity. **Chemosphere**, v. 72, p. 122-128, 2008.

LONDOÑO, D. K.; SIEGFRIED, B. D.; LYDY, M. J. Atrazine induction of a family 4 cytochrome P450 gene in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Chemosphere**, v. 56, p. 701-706, 2004.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurements with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACEK, K. J.; BUXTON, K. S.; SAUTER, S.; GNILKA, S.; DEAN, J. W. **Chronic toxicity of atrazine to selected aquatic invertebrates and fishes**. EPA 600/3-76-047. U.S. 1976. Disponível em: <<http://www.epa.gov>>. Acesso em: 29 jun. 2010.

MADUENHO, L. P.; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 265-272, 2008.

MAHÍA, J.; DÍAZ-RAVIÑA, M. Atrazine degradation and residues distribution in two acid soils from temperate humid zone. **Journal of Environmental Quality**, v. 36, p. 826-831, 2007.

MAHÍA, J.; MARTÍN, A.; CARBALLAS, T.; DÍAZ-RAVIÑA, M. Atrazine degradation and enzyme activities in an agricultural soil under two tillage systems. **Science of the Total Environment**, v. 378, p. 187-194, 2007.

MAHÍA, J.; MARTÍN, A.; DÍAZ-RAVIÑA, M. Extractable atrazine and its metabolites in agricultural soils from the temperate humid zone. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 30, p. 147-152, 2008.

MALLIN, M.A. et al. Impacts of a raw sewage spill on water and sediment quality in an urbanized estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 81-88, 2007.

MARTINEZ, C. B. R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: SILVA-SOUZA, Ângela Teresa (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringá: ABRAPOA, 2006. p. 43-62.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E. et al. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M. E. Medri, 2002. cap. 29, p. 551-557.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MIRON, D.; et al. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 398-403, 2005.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 294-299, 2010.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 81, n. 6, p. 781-787, 2010.

MONTEIRO, D. A. et al. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry Physiology, part C**, v. 143, p. 141-149, 2006.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 370-374, 2002.

MOREIRA, J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência da Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 299-311, 2002.

NEWMAN, M. C.; CLEMENTS, W. H. **Ecotoxicology**: a comprehensive treatment. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 25-28, cap. 3.

NIENCHESKI, L. P. H. Recursos vivos do mar e poluição. **Revista do Centro de Estudos Judiciários do Conselho da Justiça Federal**, n. 12, p. 58-62, 2000.

NIEVES-PUIGDOLLER, N.; BJÖRNSSON, B. T.; MCCORMICK, S. D. Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in Atlantic salmon. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 27-37, 2007.

NIMMO, D. R. Pesticides. In: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R., (ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology**: methods and applications. New York: Hemisphere, 1985. p. 335-373.

NWANI, C. D. et al. Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (bloch). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 3298-3312, 2010.

OCHI, B. C.; BRITO, V. F.; MEDEIROS, M. A. C. Avaliação da contaminação de águas superficiais por herbicidas e nutrientes e em áreas com o cultivo de cana-de-

açúcar no município de Iracemápolis, SP, Brasil. In: JORNADAS DE JOVENS PESQUISADORES DA AUGM: EMPREENDEDORISMO, INOVAÇÃO, TECNOLÓGICA E DESENVOLVIMENTO REGIONAL, 14, 2006, Campinas-SP. Disponível em: <<http://www.cori.unicamp.br/jornadas/completos/resumos-jornadas.pdf>>. Acesso em: 27 abr. 2009.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v. 567, p. 109–149, 2004.

OLIVEIRA-BRETT, A. M., SILVA, L. A. A DNA-electrochemical biosensor for screening environmental damage caused by s-triazine derivatives. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p. 717–723, 2002.

ORUC, E. O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 137, p. 43–51, 2004.

OTTINGER, M. A. et al. Neuroendocrine and behavioral effects of embryonic exposure to endocrine disrupting chemicals in birds. **Brain Research Reviews**, v. 57, p. 376–385, 2008.

PARK, H.; AHN, I. Y.; KIM, H.; LEE, J.; SHIN, S. C. Glutathione S-transferase as a biomarker in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* after exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 150, p. 528–536, 2009.

PAYNE, J. F., MATHIEU, A., MELVIN, W., FANCEY, L. L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, p. 225–231, 1996.

PELAEZ, V. Monitoramento do mercado de agrotóxicos. In: SEMINÁRIO SOBRE O MERCADO DE AGROTÓXICOS E REGULAÇÃO, 2010, Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>>. Acesso em: 10 jun. 2010.

PEREIRA, R. S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**, v. 1, n. 1, p. 20-36, 2004.

PETERS, J. W.; COOK, R. M. Effects of atrazine on reproduction in rats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 9, p. 301-304, 1973.

PUGAZHENDY, K.; JAYACHANDRAN, K.; DIVYAVELAYUTHAN, I.; JAYANTHI, C. Impact of atrazine on acetylcholinesterase activity in freshwater fish *Labeo rohita* (Linn.) fingerlings. **Environment and Ecology**, v. 25S, Suppl. 4A, p. 1391-1393, 2007.

RADENAC, G. et al. Measurement of EROD activity: caution on spectral properties of standards used. **Marine Biotechnology**, v. 6, p. 307–311, 2004.

RAJAGURU, P.; SUBA, S.; PALANIVEL, M.; KALAISELVI, K. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 41, p. 85–91, 2003.

RAKOTONDRAVELO, M.L. et al. Sublethal Effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, p. 360–366, 2006.

RALSTON-HOOPER, K. et al. Acute and chronic toxicity of atrazine and its metabolites deethylatrazine and deisopropylatrazine on aquatic organisms. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 899–905, 2009.

RAMESH, M.; SRINIVASAN, R.; SARAVANAN, M. Effect of atrazine (Herbicide) on blood parameters of common carp *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes). **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 3, n. 12, p. 453–458, 2009.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. 2.ed. Florida: Taylor & Francis, 1995.

RAO, P. S. C., BELLIN, C. A., BRUSSEAU, M. L. In sorption and degradation of pesticides and organic chemicals in soil. **SSSA Special Publication**, n. 32, p. 1–26, 1983.

ROSÉS, N.; POQUET, M.; MUÑOZ, I. Behavioural and histological effects of atrazine on freshwater molluscs (*Physa acuta* drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll. gastropoda). **Journal of Applied Toxicology**, v. 19, n. 5, p. 351–356, 1999.

RUSSO, J.; LAGADIC, L. Effects of parasitism and pesticide exposure on characteristics and functions of hemocyte populations in the freshwater snail *Lymnaea palustris* (Gastropoda, Pulmonata). **Cell Biology and Toxicology**, v. 16, p. 15–30, 2000.

RUSSO, J.; LAGADIC, L. Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). **Environmental Pollution**, v. 127, p. 303–311, 2004.

SAGLIO, P.; TRIJASSE, S. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, p. 484–491, 1998.

SALABERRIA, I. et al. Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 234, p. 98–106, 2009.

SANCHEZ, W.; et al. Biochemical effects of nonylphenol polyethoxylate adjuvant, Diquat herbicide and their mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). **Marine Environmental Research**, v. 62, p. S29–S33, 2006.

SANDERSON, J. T. et al. Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. **Environmental and Health Perspect.**, v. 109, p. 1027–1031, 2001.

SARKAR, A. et al. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 333–340, 2006.

SENE, L. et al. New aspects on atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 487–496, 2010.

SHIBATTA, O. A.; GEALH, A. M.; BENNEMANN, S. T. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, 2007.

SILVA, M.E.F. et al. A new method to purify hepatic CYP1A of *Prochilodus scrofa*, a Brazilian freshwater fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 138, p. 67–74, 2004.

SILVESTRE, F. et al. Effects of atrazine on osmoregulation in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 132, p. 385–390, 2002.

SIMÕES, F. S. et al. Water quality index as a simple indicator of aquaculture effects on aquatic bodies. **Ecological indicators**, v. 8, p. 476–484, 2008.

SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A. C.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus Lineatus Valenciennes*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, n. 3, p. 505–511, 2006.

SINGH, M.; SANDHIR, R.; KIRAN, R. **Effects on antioxidant status of liver following atrazine exposure and its attenuation by vitamin** : experimental and Toxicologic Pathology, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 29 jun. 2010.

SINGH, N. P. et al. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184–191, 1988.

SMALLING, K. L.; AELION, M. C. Biological and chemical transformation of atrazine in coastal aquatic sediments. **Chemosphere**, v. 62, p. 188–196, 2006.

SÖDERGREN, E. Lipid peroxidation in vivo: evaluation and application of methods for measurement. Acta Universitatis Upsaliensis. **Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine**, Uppsala, v. 949, 2000.

SOLOMON, K. R. et al. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, p. 721–772, 2008.

SPANÒ, L. et al. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 369–379, 2004.

STEINBERG, C. E. W.; LORENZ, R.; SPIESER, O. H. Effects of atrazine on swimming behavior of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Water Research**, v. 29, n. 3, p. 981-985, 1995.

STROBL, R. O.; ROBILLARD, P. D. Network design for water quality monitoring of surface freshwaters: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 87, p. 639–648, 2008.

THOMAZ, J. M., et al. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVONS). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1413–1424, 2009.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.

TORRES, M. A.; BARROS, M. P.; CAMPOS, S. C. G.; PINTO, E.; RAJAMANI, S.; SAYRE, R. T.; COLEPICOLOR, P. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 1–15, 2008.

UETA, J.; et al. Biodegradação de herbicidas e biorremediação. Microrganismos degradadores do herbicida atrazina. **Biotecnologia**, v. 10, p. 10-13, 1999.

UNEP (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY). Vital water graphics: an overview of the state of the world's fresh and marine waters. Edição: Diop, S.; M'mayi, P.; Lisbjerg, D.; Johnstone, R. Kênia: UNEP/Earthprint, 2002, 43 p. Disponível em: <<http://books.google.com.br>>. Acesso em: 2 jul. 2010.

VALAVANIDIS, A.; et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178–189, 2006.

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

VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, v. 631, p. 36-43, 2007.

VENTURA, B. C.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazina herbicide in *Oreochromis niloticus* (Peciformes, Cichlidae) detected by micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 42-51, 2008.

VRZOC, M.; PETRAS, M. Comparison of DNA damage in peripheral blood and spleen lymphocytes using the single-cell gel assay. **Mutation Research**, v. 379, p. 263 – 269, 1997.

WIEGAND, C. et al. Toxicokinetics of Atrazine in Embryos of the Zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 199 – 205, 2001.

WILHELMS, K. W. et al. Atrazine and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in sexually maturing precocial birds: studies in male Japanese quail. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 152–160, 2005.

WILHELMS, K. W.; FITZPATRICK, K. F.; SCANES, C. G.; ANDERSON, L. L. In ovo exposure to a triazine herbicide: effects of atrazine on circulating reproductive hormones and gonadal histology in young japanese quail. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, p. 117–122, 2006.

WINKELMANN, D. A.; KLAINE, S. J. Degradation and bound residue formation of four atrazine metabolites, deethylatrazine, deisopropylatrazine, dealkylatrazine and hydroxyatrazine, in a western Tennessee soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 10, p. 347–354, 1991.

XING, H. et al. Effects of atrazine and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and carboxylesterase in brain and muscle of common carp. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 26–30, 2010.

YANG, L. et al. Atrazine affects kidney and adrenal hormones (AHs) related genes expressions of rare minnow (*Gobiocypris rarus*). **Aquatic Toxicology**, v. 97, p. 204–211, 2010.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006.

ZIOLLI, R. L. Aspectos ambientais envolvidos na poluição marinha por petróleo. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 3, n. 2, 2002.

ZORITA, I. et al. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. **Environmental Pollution**, v. 153, p. 157-168, 2008.

ZUPAN, I.; KALAFATIC, M. Histological effects of low atrazine concentration on zebra mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, p. 688 – 695, 2003.