

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Avaliação da genotoxicidade e estresse oxidativo em planárias  
aquáticas (*Dugesia schubarti*) tratadas com formulações do  
herbicida glifosato**

**DIANA LILIAN BORDIN**

**Caxias do Sul**

**2007**

**DIANA LILIAN BORDIN**

**Avaliação da genotoxicidade e estresse oxidativo em planárias  
aquáticas (*Dugesia schubarti*) tratadas com formulações do herbicida  
glifosato**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia da Universidade de  
Caxias do Sul, visando a obtenção do grau de Mestre  
em Biotecnologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Bernardo Erdtmann**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Mirian Salvador**

**Caxias do Sul**

**2007**

*Dedico este trabalho à minha mãe e irmãs,  
ao meu namorado e a Deus.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. Bernardo Erdtmann, pela orientação, incentivo e confiança;

À Profa Dra Mirian Salvador, pela co-orientação, confiança e amizade;

Ao Prof. Dr. Diego Bonatto, pelo incentivo, sugestões e amizade;

A CAPES, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e à Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade de Caxias do Sul;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia desta Universidade, especialmente ao coordenador do Curso, Prof. Dr. Aldo Dillon;

À Cláudia Marques, pela paciência e amizade e aos colegas do Laboratório de Genética Toxicológica e do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes;

À colega Deise Rech, pela amizade e incentivo;

À Ana Cristina Andreazza pelo auxílio estatístico, incentivo e amizade;

Ao agrônomo Jalel Bertotti por ceder amostras e informações dos herbicidas utilizados neste trabalho.

## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Glifosato.....	3
2.2 Planárias.....	5
2.3 Compostos genotóxicos.....	7
2.4 Estresse oxidativo.....	8
2.5 Monitoramento ambiental .....	11
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo geral.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4. RESULTADOS E DUSCUSSÃO.....	14
4.1 Artigo 1 Genotoxicity and oxidative stress in planarians ( <i>Dugesia schubarti</i> ) exposed to different formulations of glyphosate.....	15
4.2 Discussão Complementar.....	35
5. CONCLUSÕES.....	39
6. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR.....	42

## **LISTA DE TABELAS**

### **ARTIGO 1**

**Table 1 Summary information regarding glyphosate-based herbicides formulations.....30**

**Table 2 DNA damage index, superoxide dismutase and catalase activity and TBARS levels in planarians treated with 0.5 mg/L of glyphosate acid equivalent of different glyphosate formulations measured at 4, 8 and 16h.....31**

**Table 3 Spearman correlation among the parameters evaluated in planarians exposed to glyphosate formulations.....33**

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1 Fórmula estrutural do herbicida glifosato.....3**

## **ARTIGO 1**

**Figure 1 DNA damage induced by 0.5 mg/L of glyphosate acid equivalent of the formulations  
RO, RT and RR evaluated at 4, 8 and 16h.....34**

## RESUMO

Atualmente, diversas formulações de herbicidas a base de glifosato estão disponíveis no mercado. No entanto, diferentes surfactantes são também adicionados às formulações a fim de aumentar a eficácia do produto, o que pode contribuir significativamente para o aumento da toxicidade do herbicida aos organismos não alvos. Este estudo avaliou a genotoxicidade e o estresse oxidativo em planárias aquáticas (*Dugesia schubarti*) expostas às formulações de glifosato Roundup® Original, Roundup® Transorb e Roundup® Ready. As planárias foram expostas à soluções de 0.5 mg/L de equivalente ácido de glifosato das três formulações durante 4, 8 e 16h. A genotoxicidade foi avaliada através do ensaio cometa e o estresse oxidativo foi medido através da atividade das enzimas superóxido dismutase (Sod) e catalase (Cat) e pelas substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Todas as formulações foram capazes de induzir danos ao DNA e estresse oxidativo. A atividade de Sod aumentou entre 4 e 16h, enquanto os níveis de TBARS diminuíram entre 4 e 16h de tratamento. A atividade de Cat permaneceu diminuída em todos os tempos de exposição para as três formulações testadas. Esses resultados demonstram que formulações de herbicida contendo glifosato são capazes de causar dano ao DNA e alterar o balanço oxidativo em planárias indicando que a toxicidade deste herbicida não está restrita às plantas.



## **ABSTRACT**

Currently, several glyphosate-based herbicide formulations are available in the market. However, different surfactants are also added to the formulation in order to increase the effectiveness of the product, what it can contribute significantly to the toxic effect exerted by the herbicide to the non target organisms. This study evaluated the genotoxicity and the oxidative stress in freshwater planarians exposed to the glyphosate formulations Roundup<sup>®</sup> Original, Roundup<sup>®</sup> Transorb and Roundup<sup>®</sup> Ready. The planarians were submitted to 0.5 mg/L of glyphosate formulations during 4, 8, and 16h. The genotoxicity was evaluated through comet assay, and the oxidative stress was measured through the superoxide dismutase (Sod) and catalase (Cat) activity and by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). All three formulations were able to induce genotoxicity and to disturb the antioxidants activity in different ways. While Sod increased between 4 and 16h, TBARS decreased between 4 and 16h, and Cat stayed depressed during all time-points tested. These results demonstrate that herbicide formulations which contend glyphosate can induce damage to the DNA and to modify the oxidative balance in planarians, indicating that the toxicity of this herbicide is not restricted to the plants.

## 1. INTRODUÇÃO

Glifosato é o herbicida pós-emergente mais utilizado em todo mundo. No mercado estão disponíveis diversas formulações, das quais fazem parte diferentes surfactantes com a finalidade de aumentar a eficácia do herbicida. Por possuir um mecanismo de ação específico para plantas, o glifosato é considerado de baixa toxicidade ao homem e outros animais. Contudo, recentes estudos demonstram que o glifosato não pode ser considerado inócuo. O herbicida pode ser responsável pelo retardo do desenvolvimento de girinos, contribuindo assim, para a redução da população de anfíbios. O principal responsável pela toxicidade de Roundup®, herbicida que contém glifosato em sua formulação, é atribuído ao surfactante polioxietileno amina (POEA), o qual é considerado um ingrediente inerte pelos fabricantes. Estudos ainda não publicados em nosso laboratório demonstram que planárias são muito sensíveis à surfactantes. Estes dados sugerem que as planárias também poderiam ser afetadas pelo herbicida glifosato.

Alguns estudos têm reportado que a formulação técnica do glifosato pode causar danos ao DNA. No entanto, pouco se conhece sobre os efeitos genotóxicos de formulações do herbicida glifosato, especialmente em exemplares de invertebrados aquáticos. Além disso, estudos sobre geração de espécies reativas, defesas antioxidantes e danos oxidativos gerados pelo glifosato em invertebrados são inexistentes. Desta forma, torna-se importante a validação

de biomarcadores de estresse oxidativo como indicadores de toxicidade na biota aquática.

Dentre as técnicas mais rápidas e simples para detecção de dano genotóxico destaca-se o ensaio cometa. O ensaio cometa detecta lesões genômicas passíveis de reparo. No entanto, se não reparadas, ou reparadas erroneamente, podem resultar em mutações.

Algumas características tornam interessante a aplicação das planárias como modelo de estudo, como a sua posição filogenética basal, a grande sensibilidade a toxinas, a distribuição ampla com a possibilidade de espécies ou linhagens endêmicas da região de estudo, a capacidade de metabolizar substâncias complexas e o cultivo fácil e barato em laboratório.

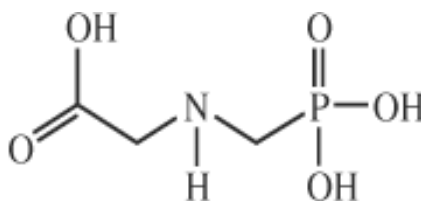
Levando em conta a extensa aplicação do teste cometa e as características das planárias, o objetivo deste trabalho foi avaliar o dano ao DNA em planárias expostas a diferentes formulações do herbicida glifosato, bem como medir os níveis de peroxidação lipídica e a atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase nos mesmos organismos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Glifosato

Glifosato [N-(fosfonometil) glicina] (Figura 1) é um herbicida pós-emergente, sistêmico e não-seletivo usado tanto em áreas agrícolas como não agrícolas. É usado para exterminar plantas como gramas, plantas lenhosas e perenes. O glifosato age inibindo a síntese de aminoácidos aromáticos em plantas (Bolognesi *et al.*, 1997). O glifosato é um ácido orgânico fraco derivado do aminoácido glicina tem como principal metabólito o ácido aminometil fosfônico (AMPA). É normalmente formulado como sal de isopropilamina de glifosato. Outros ingredientes conhecidos como inertes ou aditivos são também adicionados à formulação a fim de aumentar a eficácia do herbicida.

**Figura 1.** Fórmula estrutural do herbicida glifosato.



Glifosato representa 60% da venda mundial de herbicidas. Foi desenvolvido pela Monsanto Company em meados de 1970. Com a perda da patente de produção do glifosato, a qual ocorreu em 2000, muitos novos herbicidas baseados nesse composto ativo têm entrado no mercado. Cada um desses formulados contém diferentes surfactantes e, em comparação com a formulação original do Roundup<sup>®</sup>, alguns desses novos produtos podem apresentar menos toxicidade ao ambiente (Howe *et al.*, 2004).

Em proporção ao seu extenso uso, poucos estudos tem sido feitos sobre o impacto ambiental e na saúde humana causados pelo glifosato. A falta de interesse em estudo envolvendo glifosato é devida à sua difícil e dispendiosa detecção no ambiente (Buffin & Jewell, 2001).

Embora seja um herbicida considerado de pouca toxicidade, Relyea (2004) reportou um declínio de 70% na biodiversidade de anfíbios e 86% de morte no número total de girinos tratados com o herbicida Roundup®. Segundo Howe *et al.* (2004), que avaliaram seis formulações a base de glifosato, diferentes níveis de toxicidade foram encontrados, concluindo que o principal fator responsável pela toxicidade seria o surfactante polioxietileno amina (POEA) utilizado na formulação. O glifosato tem uma meia-vida aquática em torno de 2 a 14 dias, mas quando associado com o surfactante POEA este tempo tem sido estimado de 21 a 42 dias (Giesy *et al.*, 2000).

Clements *et al.* (1997) demonstraram que Roundup® e Sencor – 500F (metribuzin) causaram dano no DNA de girinos de *Rana catesbiana*, avaliado pelo ensaio cometa. Diversos estudos *in vitro*, realizados em cultura de linfócitos bovinos e medula óssea de camundongos, tem detectado atividade genotóxica tanto para o produto técnico do glifosato como para suas formulações (Sikikova & Dianovski, 2006; Dimitrov *et al.*, 2006; Lioi *et al.*, 1998; Rank *et al.*, 1993). Entretanto, resultados negativos ou apresentando fraca genotoxicidade das formulações ou do composto ativo também podem ser encontrados (Li & Long, 1988). É interessante notar que Li & Long (1988), pesquisadores da empresa Monsanto, fizeram uma revisão da literatura onde foram empregados seis diferentes testes de genotoxicidade. Os autores afirmaram que todos os testes foram negativos e que não existe risco para humanos. Deve-se tomar em conta a instituição destes autores e a data da revisão, pois atualmente não se pode fazer tal afirmação.

O herbicida Roundup® Ready, recentemente introduzido pela empresa Monsanto, é

utilizado em plantas resistentes ao glifosato, as quais foram desenvolvidas pela mesma empresa do herbicida. Além de seus efeitos tóxicos serem relativamente pouco conhecidos, o uso desse herbicida tem aumentado consideravelmente, o que é preocupante para espécies não alvo, como os animais aquáticos (Braush & Smith, 2007; Krogh, 2003). A preocupação com o aumento do uso de Roundup® Ready também se estende a outros herbicidas formulados com glifosato (Howe *et al.*, 2004). O aumento da quantidade de glifosato despejado no ambiente promove a inclusão simultânea de surfactantes, como o polioxietileno amina (POEA), o qual compõe aproximadamente 15% das formulações de Roundup® Original e Roundup® Transorb. Não estão disponíveis na literatura dados informando a quantidade de POEA presente em Roundup® Ready (Braush & Smith, 2007; Howe *et al.*, 2004).

Para avaliar o risco ambiental são necessários sistemas adequados, os quais refletem os efeitos de exposição qualitativamente e quantitativamente. Destes, os mais adequados são aqueles que mantêm contato direto com compartimentos contaminados (sedimento, água, ar) (De Boeck & Kirch-Volders, 1997). Portanto, exemplares de animais aquáticos são apropriados para examinar a toxicidade de várias formulações a base de glifosato, pois este parece ser mais persistente nestes ambientes devido a sua pouca dispersão e diluição na água (Giesy *et al.*, 2000).

## 2.2 Planárias

As planárias são platelmintos (Classe *Turbellaria*), possuem simetria bilateral, cefalização e, apesar de sua estrutura corporal relativamente simples, possuem células metabolicamente competentes, bem como tecidos e órgãos especializados. Cerca de treze tipos celulares foram descritos para a planária; quatro deles (neoblastos, células nervosas, epidérmicas e de parênquima) constituem aproximadamente 75% do número total de células (Baguñá & Romero, 1981).

Esses organismos apresentam uma posição evolutiva destacável, na base da árvore filogenética dos animais ditos superiores. Além disso, são os organismos mais primitivos ainda vivos a apresentar: a) simetria bilateral, b) três folhetos embrionários, c) cefalização, d) fecundação interna e e) comportamento de caça. As planárias pertencem a um dos poucos grupos que relembram as etapas mais ulteriores da evolução dos metazoários e, portanto, o marco inicial na complexificação da vida animal (Ruppert & Barnes, 1996).

As planárias instigam a curiosidade humana há pelo menos alguns milhares de anos. Em achados arqueológicos, datados do antigo Egito, foram encontradas claras menções a elas, através de desenhos em pergaminhos. Mais recentemente, nos últimos dois séculos este organismo tem sido foco de diversos estudos de regeneração, sendo inclusive elevado ao *status* de organismos-modelo, pela sua fantástica capacidade de recuperar partes perdidas do corpo (Ruppert & Barnes, 1996).

Planárias são facilmente coletadas, pois apresentam uma ampla distribuição natural, e mantidas com baixos custos em laboratório (Guecheva *et al.*, 2001). Bioensaios com planárias são ferramentas rápidas para determinação de vários tipos de respostas toxicológicas, incluindo mortalidade aguda, carcinogênese e neurocomportamento (Nano *et al.*, 2002; Triebkorn *et al.*, 1991; Best & Morita, 1991). Planárias também tem sido alvo de estudos de regeneração, fisiologia, percepção de luz e monitoramento ambiental (Horvat *et al.*, 2005; Calevro *et al.*, 1999; Rivera & Perich, 1994). Esses organismos também têm sido usados como modelo *in vivo* para estudos de geração de tumores como um teste adicional ou de substituição em mamíferos (Schaeffer, 1993). Além disso, recentemente planárias têm sido consideradas ótimos exemplares para realização de testes de genotoxicidade (Lau *et al.*, 2007; Horvat *et al.*, 2005; Guecheva *et al.*, 2001).

Em um estudo com *Dugesia schubarti*, Guecheva *et al.* (2003) demonstraram a atividade da enzima antioxidante catalase nesses organismos, portanto, atividades das enzimas

superóxido dismutase e glutathiona peroxidase também poderiam ser constatadas.

### 2.3 Compostos genotóxicos

A exposição a compostos genotóxicos pode produzir impactos ecológicos através do aumento da mortalidade de espécies ou interferência no evento reprodutivo das populações, os quais estão diretamente relacionados com a diminuição da biodiversidade das espécies tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos (Theodorakis, 2001). Compostos genotóxicos podem lesar a molécula de DNA através de diferentes mecanismos (Lindahl & Wood, 1999). Espécies reativas de oxigênio (ERO) podem contribuir diretamente ou indiretamente com os danos causados ao DNA. Quebras simples ou duplas nas cadeias do DNA podem ser provocadas pela interação de ERO com a deoxirribose. A oxidação de bases do DNA induzidas por ERO, também podem causar quebras de cadeias, as quais eventualmente, levam a mutagênese (Lindahl & Wood, 1999).

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para avaliar os possíveis riscos à integridade do DNA, causados por poluentes, agrotóxicos, medicamentos, radiação natural e outros agressores ambientais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Hartmann *et al.*, 2004; Villela *et al.*, 2003). Dentre as técnicas mais rápidas e simples para detecção de dano genotóxico destaca-se o ensaio cometa.

O ensaio cometa ou “Single cell gel eletrophoresis” (SCGE) vem sendo proposto como um teste de screening. O ensaio cometa é utilizado não para detectar mutações, mas sim lesões genômicas, que podem ser reparadas. Este teste também pode ser utilizado para estudos de reparo de DNA, visto que as lesões detectadas pelo ensaio cometa são passíveis de correção; embora impossibilite inferir a fidelidade do processo de reparo, pode trazer informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada (Contijo & Tice, 2003).

O ensaio cometa é uma técnica rápida, simples e sensível, de baixo custo, para



mensurar e analisar as lesões e detectar efeitos de reparo no DNA em células individuais expostas a agentes genotóxicos (Silva *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 1988). Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos alquil-lábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão (Silva *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 1988). Este teste apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, uma vez que pode ser utilizado para qualquer tipo de células, desde que individualizadas (em suspensão), sendo necessária apenas um pequeno número das mesmas e de não requerer células em divisão (Hartmann & Speit, 1994).

## 2.4 Estresse oxidativo

Em nosso organismo são produzidos radicais livres de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio, mas o que ganha mais destaque devido à reatividade e aos danos que podem causar são os radicais derivados do oxigênio. O termo espécies reativas do oxigênio (ERO) é um termo coletivo freqüentemente usado para incluir não apenas radicais livres de oxigênio, mas também alguns não radicais derivados do oxigênio capazes de gerar radicais livres (RL), como por exemplo, o peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso, entre outros (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria é conhecida como uma das principais fontes endógenas geradoras de RL durante o metabolismo oxidativo normal. Nesse processo, cerca de 2-5% do oxigênio consumido é responsável pela geração de ERO (Dröge, 2002). O peroxissoma é uma organela muito rica em oxidases, as quais geram peróxido de hidrogênio que é convertido por enzimas específicas (catalases) em água e oxigênio. Os leucócitos polimorfonucleares constituem uma importante fonte de ERO quando ativados por enzimas específicas. Estes possuem em suas membranas a enzima NADPH oxidase, geradora de radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) que em presença de íons ferro transforma-se no radical hidroxila

(OH<sup>•</sup>). Esta situação ocorre particularmente nos processos inflamatórios. Outro sítio de formação de RL é o citocromo P450, o qual catalisa reações que geram O<sub>2</sub><sup>•</sup> mediante mecanismos dependentes de NADPH.

As principais fontes exógenas de formação de radical livre incluem a exposição de agressores ambientais, como luz ultravioleta, radiação gama, fumo, pesticidas, solventes orgânicos (Mates *et al.*, 2000) e alguns medicamentos, incluindo drogas anti-câncer, anestésicos e analgésicos (paracetamol) (Hug *et al.*, 1997).

A fim de combater o excesso de RL o organismo possui defesas antioxidantes, que podem ser enzimáticas ou não-enzimáticas. Entre as enzimas podem ser citadas a superóxido dismutase (Sod), catalase (Cat), glutathione-peroxidase (GPx) e glutathione-redutase (GR) (Dröge, 2002; Halliwell & Gutteridge, 1999).

A Sod é uma metaloenzima abundante em células aeróbicas. Cabe a ela a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a Cat ou GPx (Bonney *et al.*, 2002). Em células eucarióticas foram descritas quatro isoenzimas para Sod: a ECSOD, presente em fluidos extracelulares, incluindo plasma; CuZnSOD, encontrada quase exclusivamente no espaço citoplasmático; a MnSOD encontrada na mitocôndria e por fim a SodFe, a qual contém ferro e é encontrada em bactérias, algas e vegetais superiores (Zelko *et al.*, 2002).

A catalase é uma ferrihemoenzima cuja função é dismutar o peróxido de hidrogênio formando água e oxigênio molecular (Fridovich, 1998). Essa enzima é encontrada principalmente nos peroxissomas, mas pode aparecer também no plasma (Leff *et al.*, 1991). Em animais, a catalase está presente, praticamente, em todos os órgãos principais do corpo, principalmente fígado. Porém, alguns órgãos por não possuírem peroxissomas, estão mais expostos a danos provocados pela produção de espécies reativas de oxigênio, como coração, pulmões e cérebro (Inoue, 1994).

Outros antioxidantes não enzimáticos como o ascorbato, tocoferóis, carotenóides e flavonóides em geral, constituem importantes defesas contra os RL (Frei, 1999).

Em uma situação onde ocorre um aumento na produção de ERO ou uma diminuição dos níveis de enzimas antioxidantes, os RL podem lesar as células gerando o estresse oxidativo. Distúrbios entre a produção e a redução de ERO são importantes na patologia e fisiologia de doenças como aterosclerose, *diabetes mellitus*, catarata, doenças degenerativas, envelhecimento, carcinogênese, entre outras patologias (Lipinski, 2001; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), presente nas membranas celulares, são facilmente oxidados pelos RL levando à peroxidação lipídica (Llesuy, 2002; Fridovich, 1998). Nesse caso, a permeabilidade celular é alterada, podendo ocorrer morte celular e/ou oxidação de lipoproteínas, o que pode levar à formação de placa ateromatosa (Abuja & Albertini, 2001).

As técnicas que vem sendo mais utilizadas na detecção dos RL baseiam-se, fundamentalmente na detecção de produtos ou alterações fisiológicas provocadas pelo estresse oxidativo. Entre estes testes, um dos mais conhecidos é a determinação das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) resultante da peroxidação lipídica das membranas celulares (Beckman & Ames, 1998).

Entre os produtos finais da peroxidação lipídica estão compostos de baixo peso molecular, como hidrocarbonetos (etano e pentano) e aldeídos, por exemplo, o malondialdeído (MDA). *In vitro* o MDA pode lesar proteínas, DNA, RNA e outras biomoléculas (Esterbauer & Cheeseman, 1990). A dosagem do MDA através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um importante indicativo dos níveis de estresse oxidativo em indivíduos (Dröge, 2002).

No processo de carcinogênese química, os RL podem ativar o pró-carcinogênio e

promover a sua ligação ao DNA. Podem ainda gerar lesões diretas no material genético ou formar radicais genotóxicos. Desta forma, os RL se constituem em importantes promotores e progressores tumorais (Halliwell & Gutteridge, 1999).

## **2.5 Monitoramento ambiental**

Muitas substâncias químicas potencialmente danosas, tanto naturais como de origem antropogênica, são liberadas no ambiente constantemente. Monitorar o impacto ecológico e os riscos à saúde humana é problemático devido principalmente à complexidade e ao custo decorrente da identificação de substâncias químicas envolvidas, ou ainda às dificuldades nas investigações epidemiológicas que necessitam de um número elevado de dados (Silva *et al.*, 2003).

Em estudos ecotoxicológicos o maior objetivo é a detecção da causa-efeito entre sistemas biológicos e as misturas complexas de poluentes aos quais estão expostos. Muito dos contaminantes presentes em nosso ambiente afetam os organismos de forma direta, sendo que o efeito agudo é geralmente de mais fácil detecção, podendo causar distúrbios fisiológicos como o estresse oxidativo, problemas no desenvolvimento e/ou diminuindo o tempo de vida, e indução de doenças degenerativas. Alguns destes agentes também afetam o DNA dos organismos induzindo tumores e/ou mutações gênicas. Os efeitos tóxicos dos poluentes de efeito crônico, devido à complexidade e o tempo que levam para se expressar, são de mais difícil detecção, sendo muitas vezes difícil associar o efeito (dano/doença) a sua possível causa, que pode ter sido a poluição ou ingestão de toxinas sintéticas ou naturais por um longo prazo e de efeito cumulativo. Geralmente estes efeitos podem vir a ser detectados muitos anos depois da exposição, dificultando a associação com os agentes causadores (Pra *et al.*, 2005).

Sistemas de testes que detectam riscos antes que produzam um dano são importantes para a saúde pública. Neste sentido a avaliação do estresse oxidativo, o dano reparável no

DNA pelo ensaio cometa, o teste de micronúcleos que detecta mutagenicidade cromossômica, entre outros testes, são de fácil aplicação e bastante informativos ao nível toxicológico e genotóxico (Tice *et al.*, 2000).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral:**

Avaliar a genotoxicidade e níveis estresse oxidativo induzido por formulações do herbicida glifosato em planárias aquáticas da espécie *Dugesia schubarti*.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

**3.2.1** Determinar a sobrevivência de planárias em vinte e quatro horas de exposição a diferentes concentrações de três formulações de herbicidas à base de glifosato (Roundup® Original, Roundup® Transorb e Roundup® Ready).

**3.2.2** Avaliar o dano causado ao DNA em planárias tratadas com as diferentes formulações de herbicidas à base de glifosato, através do Ensaio Cometa.

**3.2.3** Avaliar o estresse oxidativo induzido em planárias pelas diferentes formulações de herbicidas à base de glifosato, através das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase.

**3.2.4** Correlacionar dos dados obtidos de genotoxicidade com os níveis de estresse oxidativo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo é apresentado na forma de um artigo científico, seguido por discussão complementar.

### 4.1 Artigo 1

O artigo constante nesse item, o qual foi submetido à revista *Ecotoxicology and Environmental Safety* (IF=2.0), tem como objetivo avaliar o dano ao DNA (ensaio cometa) e os níveis de estresse oxidativo (atividade das enzimas antioxidantes Sod e Cat e níveis de TBARS) em planárias (*Dugesia schubarti*) tratadas com diferentes formulações do herbicida glifosato.

**Genotoxicity and oxidative stress in planarians (*Dugesia schubarti*)  
exposed to different formulations of glyphosate**

D. L. Bordin<sup>1</sup>, D. R. dos Santos<sup>1</sup>, M. Salvador<sup>1</sup>, B. Erdtmann<sup>1\*</sup>

1-Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do  
Sul, Brazil

\*Corresponding Author:

Prof. Dr. Bernardo Erdtmann

Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia

Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130

95070-560 Caxias do Sul, RS - Brazil

Tel: +55 54 3218 2105 Fax +55 54 3218 2149 Brazil

E-mail: [berdtman@ucs.br](mailto:berdtman@ucs.br)



## ABSTRACT

Several glyphosate-based herbicides are available in the market, which contain different adjuvants to increase the effectiveness of the product. This study evaluated the genotoxicity and the oxidative stress in freshwater planarians exposed to the glyphosate formulations Roundup® Original, Roundup® Transorb and Roundup® Ready. The planarians were submitted to 0.5 mg/L of glyphosate formulations during 4, 8, and 16h. The genotoxicity was evaluated through comet assay, and the oxidative stress was measured through the superoxide dismutase (Sod) and catalase (Cat) activity and by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). All three formulations were able to induce genotoxicity and to disturb the antioxidants activity in different ways. While Sod increased between 4 and 16h, TBARS decreased between 4 and 16h, and Cat stayed depressed during all time-points tested. Thus, glyphosate formulations can induce DNA damage and modify the oxidative balance in planarians, indicating that the toxicity of this herbicide is not restricted to plants.

*Keywords:* glyphosate, genotoxicity, comet assay, oxidative stress, planarian

## 1. Introduction

Glyphosate is a broad-spectrum post-emergent herbicide widely used around the world. There are many glyphosate-based formulations available in the market, improved with different adjuvants to stabilize the solution and to help the active ingredient penetrate the plant. A surfactant is always added to the formulations, being polyoxyethylene amine (POEA) the most widely used and the major cause of some of the acute and toxic effects observed (Braush and Smith, 2007; Howe et al., 2004). The use of glyphosate-based herbicides is increasing because of the introduction of genetically modified glyphosate-resistant crop plants.

However, in what concerns non-target species, the toxic effects of the glyphosate-based formulations are not well known (Braush and Smith, 2007; Krogh, 2003). The trouble is consistent mainly in shallow, lentic, and ephemeral water bodies in which it can rise to higher concentrations, being toxic to aquatic organisms (Giesy et al., 2000; Mann and Bidwell, 1999)

Some studies reported that glyphosate can also induce DNA damage *in vitro* and *in vivo* (Cavas and Konen, 2007; Sikikova and Dianovski, 2006; Dimitrov et al., 2006; Bolognesi et al., 1997), but few studies are known about the genotoxic effect of glyphosate formulations. Recently, evidences has shown that glyphosate – either as technical grade or in formulations – is able to increase the lipid peroxidation the levels of antioxidant enzymes (Gehin et al., 2006; Beuret et al.; 2005).

The use of native sentinel species allow a sensitive approach to study the potential risk of glyphosate to the environment, and it would be an advantage if they could be tested *in vivo*. Such organisms are the planarians, small aquatic invertebrates that live on the ground under stones and leaves and are easily adapted to be cultivated in the laboratory and sensitive to environmental toxins (Prá et al., 2005; Horvat et al., 2005; Guecheva et al., 2001). Planarians are distributed all over the world, thus allowing the comparison of data from different

countries (Guecheva et al., 2003; Guecheva et al., 2001).

In this study, three formulations of glyphosate were evaluated for genotoxicity by comet assay and for oxidative stress by the activity of enzymes superoxide dismutase (Sod) and catalase (Cat), as well as thiobarbituric acid reactive species (TBARS). Planarians of *Dugesia schubarti* species were used as test organisms.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Chemicals*

The following three glyphosate-based formulations: Roundup® Original (RO), Roundup® Transorb (RT), and Roundup® Ready (RR), obtained from Monsanto do Brasil Ltda. (São José dos Campos - SP, Brazil), were used in this study. The main characteristics of the formulations are presented in Table 1.

### *2.2. Planarians*

The *Dugesia schubarti* planarians used in the tests were originally collected at a small stream named Espelho (Mirror) near Caxias do Sul - RS, South Brazil, and adapted to the laboratory. The planarians were cultivated in glass vessels with artesian well water without chlorine and pH 7.3 at  $19 \pm 1$  °C. The water was changed weekly, after feeding the planarians with raw and frozen bovine liver. Three days before the experiments, adult planarians 5-8 mm long were selected from the culture population. During this period, as well as during the treatments, the planarians were not fed.

### *2.3. Experimental procedure*

First, a range finder was established, with five planarians staying 24h in different solutions (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, and 1.0 mg/L) of glyphosate acid equivalent for the three

formulations (RO, RT and RR). At 0.4 mg/L, all planarians survived and at 0.8 mg/L, all planarians died. Afterwards, five planarians were submitted to 0.5 mg/L of the three formulations, and the animals remained alive for 24h and died approximately at 30h. So, the maximum tolerated dose to be used in the tests was defined as 0.5 mg/L of glyphosate acid equivalent for the three formulations, and this concentration was used in the tests for 4, 8, and 16h. Each experiment was carried out with at least 60 planarians: I – five planarians for each glyphosate formulation for comet assay, and five more as their control; II- five planarians for each formulation for measuring the level of antioxidant enzymes superoxide dismutase (Sod) and catalase (Cat), and five as their control; III.-five planarians for each formulation for measuring thiobarbituric reactive substances (TBARS), and five as their control. All the experiments were performed at least in duplicate.

#### *2.4. Comet assay*

Five planarians were cut into pieces as small as possible in 800  $\mu$ L of cold PBS buffer (pH 7.4) and then gently mixed with Pasteur pipettes; next, 10  $\mu$ L of this cell suspension were mixed with 90  $\mu$ L of low melting agarose (0.75%), which was then spread on microscope slides previously coated with 300  $\mu$ L of normal agarose (1%). The remainder of the comet assay was performed as described by Singh et al. (1988) and reviewed by Tice et al. (2000).

#### *2.5. Antioxidant enzymes activity*

##### *2.5.1. Preparation of extracts for enzyme assays*

A cellular extract was obtained from five planarians, which were cut in small pieces in cold solution of 1 mL of phosphate-potassium buffer (50 mM, pH 7.2) with EDTA (0.5 mM) and 10  $\mu$ M of PMSF (protease inhibitor). The suspension was then vigorously mixed with a

3mL syringe. The solution was centrifuged at 1,600  $xg$  for 30 min and the supernatant used for determining Sod and Cat activity.

#### *2.5.2. Superoxide dismutase activity*

Superoxide dismutase activity was determined spectrophotometrically in cellular extract by measuring the inhibition of the auto-catalytic adrenochrome formation rate at 480 nm in a reaction medium containing 1 mM adrenaline (pH 2.0) and 50 mM glycine (pH 10.2) (Bannister and Calabrese, 1987). The reaction was conducted at a constant temperature of 25 °C during 3 min. The enzymatic activity is expressed as superoxide dismutase units per mg of protein. One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation in 50%.

#### *2.5.3. Catalase activity*

The assay was performed according to the method described by Aebi (1984). The assay principle is based on determining the rate of hydrogen peroxide decomposition at 240 nm. This reaction was conducted at a constant temperature of 25 °C for 1 min. The enzymatic activity is expressed as catalase units per mg of protein. One unit is defined as the amount of catalase that decomposes 1  $\mu$ mol of hydrogen peroxide per mg of protein per minute at pH 7.2.

#### *2.6. Determination of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)*

Five planarians were homogenized in 1 mL of 50 mM phosphate potassium buffer with 0.5 mM EDTA, pH 7.2. Immediately afterwards, 200  $\mu$ L of the homogenate were mixed

with 200  $\mu$ L of color reagent (TBA 1%, 50 mM NaOH and 0.1 mM BHT) and 100  $\mu$ L of phosphoric acid 7%. The mixture was placed in a boiling water bath (98 °C) for 15 min. After cooling, 3 mL of n-butanol was added to the mixture followed by centrifugation for 5 min at 1,600  $\times$ g. The absorbance of the supernatant was measured at 532 and 600 nm. For the blank, the TBA was substituted by 3 mM HCl. TBARS values were expressed in nmol/g of protein, using the coefficient of extinction 156 mM (Hermes-Lima and Storey, 1995).

### *2.7. Total protein*

Total protein in the cellular extracts was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

### *2.8. Statistical analysis*

Statistical evaluations were performed by using descriptive statistics and Kolmogorov-Smirnov test (verification of the normality). The one-way ANOVA and Duncan's post-hoc test were used to compare group means. The Spearman correlation was used to verify the interrelation of the data. Statistical significance was accepted as  $p \leq 0.05$ . All analyses were performed with the statistical program SPSS 14.0 for Windows.

## **3. Results**

### *3.1. Genotoxicity*

The results for the comet assay are present at Figure 1 and Table 2. All the glyphosate-based formulations increased DNA damage, but there are some differences in the timing. The formulations RO and RT presented similar effects: the highest DNA damage was observed at 4h, while it decreased at 8h and decreased even further at 16h. The formulation RR induced

significantly higher DNA damage at all time-points analyzed in relation to the control, but the highest damage occurred at 8h and it remained significantly higher at 16h in relation to all others (control, RO and RT).

### *3.2. Antioxidant enzymes and TBARS*

The results for oxidative stress are present at Table 2. All three glyphosate formulations depressed Sod activity at 4h, while at 8h, only the RT formulation increased it significantly; however, at 16h, all three formulations significantly increased enzymatic activity.

The Cat activity in general was depressed by all formulations at all time-points. However, it was significantly depressed only by RO and RR formulations at all time-points and by RT at 4h and 8h of treatment.

TBARS were increased by the three formulations at 4h, with the highest increase by RT. At 8h, TBARS levels remained similar to the control, and at 16h, they were significantly depressed by all formulations.

Table 3 presents the correlations among the results obtained in this study. A similarity of correlations can be observed among the results induced by RO and RT, whereas the RR formulation shows diverse correlations, even in non-significant correlations. In the treatments with RO and RT, the Sod activity was negatively correlated with DNA damage and TBARS levels, while the TBARS present a positive correlation with the DNA damage index. As for the treatment with RR, only one significant negative correlation was observed between Sod and Cat activity.

## **4. Discussion**

In this study, three glyphosate formulations (RO, RT, and RR) were tested. All of them increased genotoxicity and disturbed the three oxidative stress parameters in different ways in planarians. Glyphosate has been traditionally considered a low toxic product for animal species (Xie et al., 2005; Mann and Bidwell, 1999). However, in formulations as for example Roundup® 3 Plus, the toxicity increases in relation to technical grade glyphosate, perhaps due to the addition of other products, as refereed by Gehin et al., 2006. Since glyphosate is typically used in formulations, it is important to monitor it in this form.

The glyphosate concentration detected in the environment was 0.09–1.7 mg/L in water and 0.26–19.0 mg/L in sediments (Giesy et al., 2000). In the range finder of this study, the *D. schubarti* tolerated only 0.5 mg/L for 24h and died before 48h. The concentrations used in the study were lower than some of the concentrations detected in the environment. Although only one species of planarians was used in the test, it can be assumed that others may be affected in a similar way. Planarians, as tadpoles, have a protective mucus, and the herbicide Roundup® is also very toxic to tadpoles (Relyea, 2005), with the major effect being assigned to the surfactant POEA. In some of our unpublished experiments, the planarian was found to be the organism most sensitive to surfactants, even more than the *Daphnia*. Therefore, glyphosate formulations, as used in crop production, cannot be considered without risk for native animal species.

The results of positive genotoxicity of glyphosate formulations are similar to other studies found in literature. Mice dosed with technical grade glyphosate presented higher DNA damage, micronuclei frequency and sister chromatid exchanges (SCE) (Bolognesi et al., 1997). The frog *Rana catesbeiana* exposed to different Roundup® concentrations for 24h also presented increased DNA damage (Clements et al., 1997). Recently, evidences that Roundup® increases DNA damage and micronuclei in erythrocytes of the fish *Carassius auratus* (Cavas and Konen, 2007) were reported. The study of Peluso et al. (1998) indicated the formation of



DNA adducts as responsible for the genotoxicity by the herbicide Roundup<sup>®</sup>, induced by the products added to the formulations and not by the glyphosate itself. However, the study of Bolognesi et al. (1997) produced evidences that both glyphosate and Roundup<sup>®</sup> can induce DNA oxidative damage in the liver and kidney of mice.

The three glyphosate formulations tested in this study affected the levels of the three oxidative stress parameters, although in different ways. While Sod was depressed at 4h and increased until 16h, TBARS were increased at 4h and decreased afterwards, and Cat remained depressed. The Sod as TBARS increase are physiological response to the oxidative stress. So, the negative correlation between Sod and TBARS levels suggests a compensatory effect. A reduction of TBARS levels was also found in the brain of fishes of the *Rhamdia quelen* species treated with the herbicide clomazone (Crestani et al., 2007) and in fishes of the *Leporinus obtusidens* species exposed to the herbicides quinclorac, propanil, and metsulfuron methyl (Moraes et al., 2007).

A study with keratinocytes culture has shown similar results with different doses of glyphosate and Roundup<sup>®</sup> 3 Plus: while Cat presented dose-dependent reduction, Sod and TBARS increased in dose-dependent form (Gehin et al., 2006). In a study with pregnant rats dosed by drinking water with glyphosate, the pregnant dams and fetuses presented higher TBARS and similar Sod and Cat as the controls measured on day 21 of gestation (Beuret et al., 2005). In human lymphocytes, glyphosate induced a pro-oxidant state by increasing the glucose-6-phosphate-dehydrogenase activity (Lioi et al., 1998). In fishes (*Rhamdia quelen*), glyphosate increased the TBARS in muscle and not in brain, while the Cat activity did not change (Gluszczak et al., in press). No study that evaluated the time variation of oxidative stress induced by glyphosate has been found; however, some studies analyzed the effects of different doses and on different organisms.

The ability of glyphosate formulations to change the metabolism is expected, because

the reaction against xenobiotic chemicals results in highly reactive intermediary products, which often present free radical (Halliwell and Gutteridge, 1999). It is known that bipyridyl herbicides, as paraquat and diquat, can induce superoxide radical ( $O_2^{\bullet-}$ ) production (Halliwell and Gutteridge, 1999). Although no study evaluated the reactive oxygen species produced by glyphosate, the data referred suggest that herbicides could generate  $O_2^{\bullet-}$ . The ROS can contribute to the genotoxicity observed in the present study. The positive correlation between TBARS and genotoxicity corroborates this hypothesis.

The formulations RO and RT showed similar behavior in the timing of genotoxicity and in the correlations, while the formulation RR was dissimilar in these two aspects. It can be partially assigned to the other products in the formulations, as for example the surfactant POEA, present in RO and RT; however, until now, it was not possible to access the formulation of RR.

According to the scientific literature, as well as also found in the present study, glyphosate – and especially its formulations – present many toxic effects. This is especially true for aquatic organisms, since herbicides are carried to the water bodies by rainwater. The effect of glyphosate-based formulations on fish eggs seems to have not been evaluated yet, and we assume that it may have a similar effect as on tadpoles and planarians, and so the impact of glyphosate on the environment would mean real trouble. More studies are needed to understand the impact of herbicides on aquatic living systems and to improve the knowledge about these chemicals and their formulations and thus pave the way for the use of less harmful products.

## 5. Acknowledgements

This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). We thank also Ana Cristina Andreazza for help in statistics and Dr. Diego Bonatto for review of this work.

## 6. References

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Method. Enzimol.* 105, 121-126.
- Bannister, J.V., Calabrese, L., 1987. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem. Anal.* 32, 279-312.
- Beuret, C.J., Zirulnik, F., Giménez, M.S., 2005. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Repr. Toxicol.* 19, 501–504.
- Bolognesi, C., Bonatti, S., Degan, P., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R., Roggieri, P., Abbondandolo, A., 1997. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. *J. Agric. Food Chem.* 45 (5), 1957-1962.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brausch, J.M., Smith, P.N., 2007. Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 217–221.
- Cavas, T., Konen, S., 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22 (4), 263-8.

- Clements, C., Ralph, S., Petras, M., 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 29 (3), 277-288.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, D.S., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F.F., Zanella, R., Loro, V.L., 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67, 2305-2311.
- Dimitrov, B.D., Gadeva, P.G., Benova, D.K., Bineva, M.V., 2006. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. *Mutagenesis* 21 (6), 375-82.
- Gehin, A., Guyon, C., Nicod, L., 2006. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 22, 27–34.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Environ. Contam. Toxicol.* 167, 35-120.
- Gluszczak, L., Miron, D.D., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R., Morsh, V.M., Loro, M.L., in press. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Ramdhia quelen*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*
- Guecheva, T.N., Erdtmann, B., Benfato, M.S., Henriques, J.A.P., 2003. Stress protein and catalase activity in freshwater planarian *Dugesia (Girardia) schubarti* exposed to copper. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 56, 351-357.
- Guecheva, T.N., Henriques, J.A.P., Erdtmann, B., 2001. Genotoxicity effects of copper sulfate in freshwater planarian *in vivo*, studied with the single cell gel test (comet assay). *Mutat. Res.* 497, 19-27.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford,

New York.

- Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1995. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am. J. Physiol.* 268, 1386-1393.
- Horvat, T., Kalafatić, M., Kopjar, N., Kovacevic, M., 2005. Toxicity testing of herbicide norflurazon on an aquatic bioindicator species – the planarian *Polycelis felina* (Daly). *Aquat. Toxicol.* 73, 342-352.
- Howe, C.M., Berril, M., Pauli, B.D., Helbing, C.C., Werry, K., Veldohen, N., 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (8), 1928-1938.
- Krogh, K.A., Halling-Sorensen, B., Mogensen, B.B., Vejrup, K.V., 2003. Environmental properties and effect of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere* 50, 871-901.
- Lioi, M.B., Scarfi, M.R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Di Berardino, D., Ursini M.V., 1998. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. *Environ. Mol. Mutagen.* 32 (1), 39-46.
- Mann, R.M., Bidwell, J.R., 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36 (2), 193-199.
- Moraes, B.S., Loro, V.L., Gluszczak L., Pretto, A., Menezes C., Marchezan E., Machado, S.O., 2007. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 68, 1597-1601.
- Peluso, M., Munnia, A., Bolognesi, C., Parodi, S., 1998. <sup>32</sup>P-post-labeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup. *Environ. Mol. Mutagen.* 31 (1), 55-59.

- Prá, D., Lau, A.H., Knakiewicz, T., Carneiro, F.R., Erdtmann, B., 2005. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutat. Res.* 585, 79-85.
- Relyea, R.A., 2005. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecol. Appl.* 15, 1118–1124.
- Singh, N.P., Maccoy, M.T., Tice, R.R., Scheneider, E.L., 1988. A simple technique for quantifications of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175, 184-191.
- Sivikova, K., Dianovski, J., 2006. Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 209 (1), 15-20.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell/gel comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.
- Xie, L., Thripleton, K., Irwin, A.M., Siemering, G.S., Mekebri, A., Crane, D., Berry, K., Schlenk, D., 2005. Evaluation of estrogenic activities of aquatic herbicides and surfactants using an rainbow trout vitellogenin assay. *Toxicol. Sci.* 87 (2), 391–398.

**Table 1** Summary information on glyphosate-based herbicide formulations.

Product	Register number*	Glyphosate Acid Equivalent (%)	POEA ** (%)	Environmental Hazard Classification #
Roundup® Original (RO)	898793	36	~ 15 POEA	III
Roundup® Transorb (RT)	4299	48	~ 15 blend with POEA	III
Roundup® Ready (RR)	7604	48	unknown	III

\* Register established by the Brazilian Ministry of Agriculture and Food Supply.

\*\* Polyoxyethylene amine.

# I – Extremely hazardous; II – Highly hazardous; III – Moderately hazardous; IV – Slightly hazardous.

**Table 2** DNA damage index, superoxide dismutase and catalase activity and TBARS levels in planarians treated with 0.5 mg/L of glyphosate acid equivalent of different formulations measured at 4, 8 and 16h.

Treatment (hours)	Glyphosate formulation	DNA damage index	Superoxide dismutase (U/mg protein)	Catalase (U/mg protein)	TBARS (nmol/g protein)
4	Control	51.00 ± 2.30 <sup>a</sup>	3.55 ± 0.33 <sup>a</sup>	3.66 ± 0.68 <sup>a</sup>	6.74 ± 0.78 <sup>a</sup>
	RO	78.50 ± 0.57 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.80 ± 0.24 <sup>b</sup>	14.83 ± 2.92 <sup>b</sup>
	RT	81.00 ± 3.46 <sup>b</sup>	2.85 ± 0.40 <sup>c</sup>	2.50 ± 0.86 <sup>b,c</sup>	18.68 ± 0.54 <sup>c</sup>
	RR	65.00 ± 3.46 <sup>c</sup>	1.47 ± 0.10 <sup>d</sup>	2.89 ± 0.14 <sup>c</sup>	9.20 ± 0.83 <sup>d</sup>
8	Control	49.12 ± 2.00 <sup>a</sup>	3.03 ± 0.38 <sup>a</sup>	4.60 ± 0.11 <sup>a†</sup>	8.58 ± 0.77 <sup>a†</sup>
	RO	61.50 ± 12.12 <sup>b†</sup>	2.69 ± 0.16 <sup>b</sup>	2.13 ± 0.12 <sup>b</sup>	7.29 ± 0.39 <sup>a†</sup>
	RT	68.00 ± 4.61 <sup>b†</sup>	4.83 ± 0.19 <sup>c†</sup>	2.54 ± 0.32 <sup>b</sup>	7.19 ± 0.42 <sup>a†</sup>
	RR	72.00 ± 2.30 <sup>b†</sup>	1.43 ± 0.14 <sup>d</sup>	3.05 ± 0.45 <sup>c</sup>	6.14 ± 1.16 <sup>a†</sup>
16	Control	48.00 ± 4.10 <sup>a</sup>	1.96 ± 0.47 <sup>a†‡</sup>	3.40 ± 0.05 <sup>a‡</sup>	8.24 ± 0.05 <sup>a†</sup>
	RO	54.00 ± 3.46 <sup>a†</sup>	9.98 ± 3.11 <sup>b†‡</sup>	1.64 ± 0.33 <sup>b‡</sup>	3.26 ± 0.88 <sup>b†‡</sup>
	RT	58.50 ± 4.04 <sup>a,b</sup>	5.66 ± 0.77 <sup>c†</sup>	3.06 ± 0.83 <sup>a,c</sup>	2.94 ± 0.60 <sup>b†‡</sup>
	RR	68.50 ± 4.04 <sup>c†‡</sup>	11.31 ± 0.07 <sup>b†‡</sup>	2.43 ± 0.33 <sup>c‡</sup>	3.00 ± 0.27 <sup>b†‡</sup>

\* Different letters correspond to statistically significant differences by Duncan test among the same time-points of treatment ( $p \leq 0.05$ ).

† Significantly different in relation to 4h of treatment with same formulation.

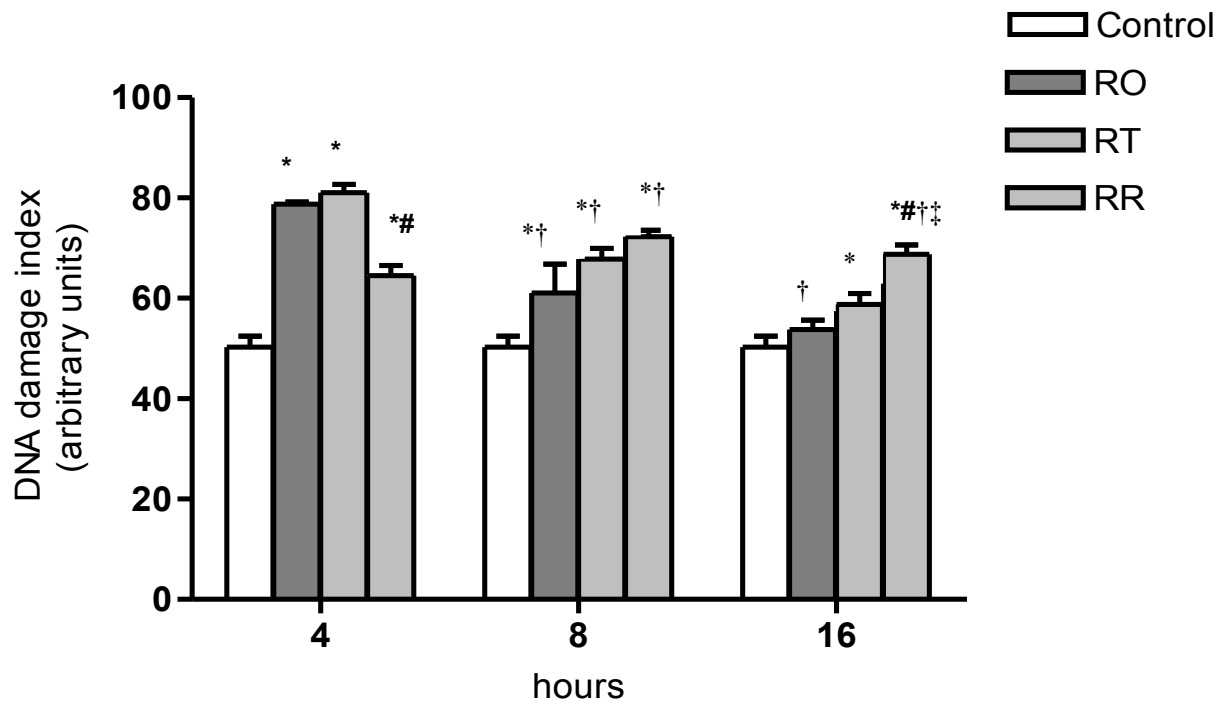
‡ Significantly different in relation to 8h of treatment with same formulation.



**Table 3** Spearman correlation among the parameters evaluated in planarians exposed to glyphosate formulations.

	DNA damage index	Sod (U/mg protein)	Cat (U/mg protein)	TBARS (nmol/g protein)
<b>Sod (U/mg protein)</b>				
RO	-0.776 (0.003)*			
RT	-0.905 (0.001)*	-	-	-
RR	-0.099 (0.760)			
<b>Cat (U/mg protein)</b>				
RO	0.007 (0.982)	-0.140 (0.664)		
RT	-0.290 (0.360)	0.326 (0.301)	-	-
RR	0.368 (0.239)	-0.802 (0.002)*		
<b>TBARS (nmol/g protein)</b>				
RO	0.819 (0.001)*	-0.858 (0.001)*	0.067 (0.837)	
RT	0.862 (0.001)*	-0.804 (0.002)*	-0.340 (0.280)	
RR	-0.353 (0.260)	0.531 (0.075)	0.420 (0.174)	

\* Significant Spearman correlation ( $p \leq 0.01$ ).



**Figure 1** DNA damage induced by 0.5 mg/L of glyphosate acid equivalent of the formulations RO, RT and RR evaluated at 4, 8 and 16h.

\* Significantly different from the control by Duncan test ( $p \leq 0.05$ ).

# Significant differences among formulations at same time-points by Duncan test ( $p \leq 0.05$ ).

† Significantly different in relation to 4h of treatment with same formulation.

‡ Significantly different in relation to 8h of treatment with same formulation.

## 4.2 Discussão Complementar

Microorganismos aquáticos, invertebrados e plantas são extremamente importantes para o funcionamento dos ecossistemas. Esses organismos são a base da cadeia alimentar e são responsáveis pela degradação de detritos para a produção primária de materiais orgânicos, os quais são requeridos por outros organismos (Giesy *et al.*, 2000). No entanto, poucos estudos de toxicidade e genotoxicidade são realizados utilizando microorganismos ou invertebrados aquáticos. Da mesma forma, pesquisas sobre produção e efeitos de espécies reativas de oxigênio (ERO) têm sido limitadas a poucas espécies de invertebrados aquáticos (para revisão ver Di Giulio *et al.*, 1995; Livingstone, 2001).

Planárias são invertebrados aquáticos que mantêm contato direto com ambientes potencialmente contaminados, como água e sedimento. Dessa forma, tornam-se exemplares úteis no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. Diferentes espécies de planárias têm sido tradicionalmente usadas como indicadores de poluição ambiental e estudos toxicológicos (Prá *et al.*, 2005; Guecheva *et al.*, 2001). Neste trabalho, planárias da espécie *Dugesia schubarti* foram expostas a diferentes formulações de herbicidas contendo glifosato em uma concentração menor (0,5mg/L) que as detectadas no ambiente. Em todos os tempos de tratamento, as planárias mostraram aumento no dano ao DNA e alterações no metabolismo oxidativo em comparação com planárias do grupo controle.

Os resultados positivos para genotoxicidade encontrados nesse trabalho estão de acordo com outros autores (Bolognesi *et al.*, 1997; Clements *et al.*, 1997; Cavas & Konen, 2007), os quais testaram o glifosato puro e sua formulação Roundup® em diferentes sistemas *in vivo*. O estudo de Peluso *et al.* (1998) sugere que o principal mecanismo de genotoxicidade induzido pelo herbicida Roundup® é a formação de adutos à molécula de DNA. Os autores verificaram que o responsável pela formação de adutos não é o glifosato e sim outros componentes presentes na formulação. A

formação de adutos ocorre quando um composto genotóxico, ou seus metabólitos, ligam-se diretamente ao DNA, distorcendo a dupla hélice, impedindo a transcrição e podendo levar à mutações. Além disso, Bolognesi *et al.* (1997) detectaram a presença de 8-hidróxi-2-deoxiguanosina, um marcador de dano oxidativo ao DNA, em fígado e rim de camundongos expostos ao glifosato puro e sua formulação Roundup®. A geração de ERO pelas formulações de glifosato podem ter causado dano oxidativo ao DNA, sendo pelo menos, parcialmente responsável pela genotoxicidade observada neste trabalho. É sabido que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é permeável à membrana, podendo difundir-se até o núcleo, aonde em presença de metais é capaz de gerar o radical livre OH•, altamente reativo e capaz de gerar danos ao DNA (Halliwell & Gutteridge, 1999).

As alterações no metabolismo oxidativo de planárias tratadas com os herbicidas RO, RT e RR foram constatadas pelas mudanças nas atividades das enzimas Sod e Cat e nos níveis de TBARS ao longo dos tempos de tratamento. A atividade de Sod mostrou-se diminuída em relação ao controle em quatro e oito horas de tratamento, enquanto que em dezesseis horas a sua atividade está estatisticamente maior que o controle. Já a atividade de Cat permanece diminuída em relação ao controle em todos os tempos de tratamento. É importante salientar que além da Cat, principal defesa para detoxificação de altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a enzima glutathione peroxidase (não determinada neste trabalho) pode ter atuado como uma enzima secundária reduzindo as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerados pela Sod.

Os níveis de TBARS mostram-se aumentados no tempo inicial de tratamento (4 horas), decrescendo em oito horas e mostrando níveis abaixo do controle em dezesseis horas de tratamento. Níveis de TBARS diminuídos em relação ao controle também foram encontrados no cérebro de peixes da espécie *Rhamdia quelen* tratados com o herbicida clomazone (Crestani *et al.*, 2007) e em peixes (*Leporinus obtusidens*) expostos aos herbicidas quinclorac, propanil e metil metsulfuron (Moraes *et al.*, 2007). A redução nos níveis de TBARS pode indicar uma resposta adaptativa das planárias ao estresse oxidativo induzido pelas formulações de glifosato.

As três formulações utilizadas nesse estudo foram capazes de induzir genotoxicidade e estresse oxidativo em planárias. No entanto, pode-se observar uma similaridade na cinética do dano ao DNA em planárias tratadas com os herbicidas RO e RT. Essas diferenças e/ou semelhanças entre as formulações podem depender da quantidade de POEA e outros surfactantes, até então desconhecidos, presentes nas formulações. Esse fato demonstra que se devem levar em consideração os efeitos que outros componentes presentes em formulações de pesticidas podem causar ao meio ambiente.

O glifosato é o herbicida de maior participação no mercado mundial de agrotóxicos, caracterizando-se pelo amplo espectro de ação e por não ser seletivo. Por inibir a síntese da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase, a molécula de glifosato bloqueia a síntese de aminoácidos aromáticos em plantas. Tem sido amplamente divulgado que o glifosato seria de baixo risco para os animais. Quando o herbicida é aplicado ou introduzido em ecossistemas aquáticos, diretamente ou por meio de partículas do solo carregadas pelas chuvas, a comunidade aquática pode sofrer efeitos diretos e indiretos resultantes da ação do produto (Giesy *et al.*, 2000). Como efeito direto, pode-se citar o aumento na mortalidade das espécies, como os anfíbios (Relyea, 2005), interferência no evento reprodutivo e conseqüentemente diminuição da biodiversidade.

Considerando que a dose de glifosato utilizada neste estudo está abaixo de concentrações detectadas no ambiente, pode-se dizer que para as planárias, este composto pode produzir um impacto significativo na sua sobrevivência, podendo até exterminá-las em determinadas bacias aquáticas. Outros organismos aquáticos podem sofrer igual impacto, produzindo um efeito em cadeia e resultando da redução da biodiversidade e da qualidade das águas. As planárias, assim como os girinos de anfíbios possuem um muco protetor e os girinos igualmente são muito sensíveis. Seria interessante avaliar se outros organismos ou embriões, como as ovas de peixe, poderiam ser afetados. Por enquanto, pelos dados da literatura, concordantes com os resultados deste estudo, já se pode afirmar que o glifosato e suas formulações não são totalmente inócuos para certos organismos

acuáticos.

## 5. CONCLUSÕES

Herbicidas contendo glifosato como princípio ativo possuem substâncias adjuvantes em sua formulação além do composto ativo. O uso de tais substâncias visa aumentar a absorção do produto pela planta, contribuindo para a eficácia do herbicida. No entanto, alguns estudos tem revelado que tanto o glifosato puro quanto suas formulações, são capazes de causar efeitos tóxicos a organismos não alvo, como por exemplo, os invertebrados aquáticos. O glifosato tem sido encontrado na superfície e no sedimento de corpos d'água, o qual ocorre principalmente através do carregamento de partículas do solo pela água da chuva. No entanto, o monitoramento de glifosato no ambiente a fim de medir os riscos de toxicidade aos ecossistemas aquáticos não é considerado rotina.

A fim de avaliar os efeitos genotóxicos e de estresse oxidativo potencialmente induzidos por formulações de herbicidas contendo glifosato, planárias da espécie *Dugesia schubarti* foram expostas a soluções de 0,5 mg/L de equivalente ácido de glifosato e avaliadas em 4, 8 e 16h quanto à genotoxicidade (ensaio cometa) e estresse oxidativo (Sod, Cat e TBARS). Para tanto, foram utilizadas as formulações Roundup® Original (RO), extensivamente usada em diversos tipos de cultivos (cana-de-açúcar, maçã, café e arroz, por exemplo), Roundup® Transorb (RT), utilizada em cultivo de algodão, arroz e trigo, por exemplo e Roundup® Ready (RR), formulação específica para cultivares resistentes ao glifosato. A partir dos resultados obtidos, as principais conclusões foram as seguintes:

### 1. Quanto a genotoxicidade:

- a) Todas as formulações estudadas foram capazes de induzir danos significativos ao DNA de planárias tratadas com 0,5 mg/L de equivalente ácido de glifosato em todos os

tempos avaliados.

- b) Planárias tratadas com RR mostraram aumento do dano ao DNA em relação ao tempo de tratamento, enquanto que RO e RT induziram maior dano ao DNA em menor tempo de exposição (4h).

## 2. Quanto ao estresse oxidativo:

- a) Em 4h de tratamento, as planárias mostraram redução significativa na atividade de Sod e Cat, enquanto que os níveis de TBARS mostraram-se estatisticamente aumentados em relação ao controle. Esses dados demonstram que houve geração de espécies reativas, modulação enzimática, aparentemente insuficiente, e peroxidação lipídica em planárias expostas ao menor período de exposição às formulações.
- b) Em 8h de tratamento, as atividades de Sod e Cat permanecem diminuídas em relação ao controle. No entanto, os valores de TBARS voltaram aos níveis basais. Esse resultado demonstra que as planárias foram capazes de reverter os danos aos lipídios provavelmente devido a ação das enzimas Sod e Cat bem como outros mecanismos antioxidantes, como por exemplo, a enzima glutathione peroxidase, não avaliada nesse estudo.
- c) Em 16h, a atividade de Sod aumenta significativamente em comparação ao controle enquanto que a atividade de Cat permanece diminuída. Os níveis de TBARS mostram-se diminuídos em relação ao controle. Essa pode ser uma resposta adaptativa das planárias ao estresse oxidativo severo induzido pelas três formulações.

Foram obtidas correlações positivas entre o dano ao DNA e os níveis de TBARS e negativas entre Sod x TBARS e Sod x dano ao DNA nos tratamentos dos herbicidas RO e RT, o que mostra



um comportamento similar na ação dos danos. O herbicida RR mostrou apenas uma correlação negativa entre Sod e Cat. A partir das correlações obtidas, pode concluir que o dano ao DNA causado em planárias pode ter sido, pelo menos em parte, induzido por espécies reativas geradas pelas formulações de glifosato.

De modo geral, pode-se concluir que as três formulações estudadas são capazes de induzir dano ao DNA, a peroxidação lipídica e modular a atividade das enzimas antioxidantes Sod e Cat na espécie de planárias testadas. No entanto, ao decorrer do tempo de exposição, as planárias foram capazes de diminuir o dano oxidativo abaixo do nível basal através do aumento da atividade de Sod e provavelmente outros mecanismos antioxidantes não avaliados neste trabalho.

Podemos afirmar que formulações baseadas em glifosato não podem ser consideradas inócuas para o ambiente, pelo menos para alguns organismos aquáticos.

## 6. BIBLIOGRAFICA COMPLEMENTAR

Abuja, P.M.; Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clin. Chim. Acta.** 306: 1-17.

Baguñá, J.; Romero, R. (1981). Quantitative analysis of cell types during growth, de-growth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. **Hydrobiologia**, 84: 181-194.

Beckman, K.B.; Ames, B.N. (1998). The free theory of aging matures. **Physiol. Rev.** 78(2): 547-581.

Best, J.B.; Morita, M. (1991). Toxicology of planarias. **Hydrobiologia.** 277: 375-383.

Bolognesi, C.; Bonatti, S.; Degan, P.; Gallerani, E.; Peluso, M.; Rabboni, R.; Roggieri, P., Abbondandolo, A. (1997). Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. **J. Agric. Food Chem.** 45 (5): 1957-1962.

Bonnefoy, M.; Draï, J.; Kostka, T.; (2002). Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse. Med.** 31(25): 1174-84.

Brausch, J.M.; Smith, P.N. (2007). Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. **Arch.**

**Environ. Contam. Toxicol.** 52: 217–221.

Buffin, D.; Jewell, T. (2001). Health and environmental impacts of glyphosate: The implications of increased use of glyphosate in association with genetically modified crops. **Pesticide Action Network UK**, 2001.

Calevro, F.; Campani, S.; Filippi, C.; Batistoni, R.; Deri, P.; Bucci, S.; Raghianti, M.; Mancino, G. (1999). Bioassays for testing effects of Al, Cr and Cd using development in the amphibian *Pleurodeles waltl* and regeneration in the planarian *Dugesia etrusca*. **Aquat. Ecosys. Health Manag.** 2: 281-288.

Clements, C.; Ralph, S.; Petras, M. (1997). Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. **Environ. Mol. Mutagen.** 29 (3): 277-288.

Contijo, A.M.M.; Tice R. (2003). Teste cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: **Mutagênese Ambiental**. Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK (org.). Canoas: ULBRA.

De Boeck, M.; Kirsch-Volders, M. (1997). *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) is not adequate sentinel species to assess the genotoxic risk (comet assay) of PAH exposure to the environment. **Environ. Mol. Mutagen.** 30: 82-90.

Di Giulio, R.T.; Benson, W.H.; Sanders, B.M.; Van Veld, P.A. (1995). Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: Rand, G. (Ed.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology, Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. London: Taylor & Francis. pp 523– 561.

Dimitrov, B.D., Gadeva, P.G., Benova, D.K., Bineva, M.V. (2006). Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. **Mutagenesis** 21(6): 375-82.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** 82: 47-95.

Esterbauer, H.; Cheeseman, K. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Method. Enzymol.** 186: 407-408.

Frei, B. (1999). Antioxidant action I: Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. **FASEB J.** 13(9): 963-964.

Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.** 201:1203-1209.

Giesy, J.P.; Dobson, S.; Solomon, K.R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. **Environ. Contam. Toxicol.** 167: 35-120.

Guecheva, T.N.; Erdtmann, B.; Benfato, M.S.; Henriques, J.A.P. (2003). Stress protein and catalase activity in freshwater planarian *Dugesia (Girardia) schubarti* exposed to copper. **Ecotoxicol. Environ. Safe.** 56: 351-357.

Guecheva, T.N.; Henriques, J.A.P.; Erdtmann, B. (2001). Genotoxicity effects of copper sulfate in freshwater planarian *in vivo*, studied with the single cell gel test (comet assay). **Mutat. Res.** 497: 19-27.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.C. (1999). **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3rd ed. Oxford, New York.

Hartmann, A.; Schumacher, M.; Plappert-Helbig, U.; Lowe, P.; Suter, W.; Mueller, L. (2004). Use of the Alkaline in vivo Comet Assay for mechanistic genotoxicity investigations. **Mutagenesis**. 19(1): 51-59.

Hartmann, A.; Speit, G. (1994). Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). **Mutat. Res.** 346: 49-56.

Horvat, T.; Kalafatić, M.; Kopjar, N.; Kovacevic, M. (2005). Toxicity testing of herbicide norflurazon on an aquatic bioindicator species – the planarian *Polycelis felina* (Daly). **Aquat. Toxicol.** 73: 342-352.

Howe, C.M.; Berril, M.; Pauli, B.D.; Helbing, C.C.; Werry, K.; Veldohen, N. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. **Environ. Toxicol. Chem.** 23 (8): 1928-1938.

Hug, H.; Strand, S.; Grambihler, A.; Galle, J.; Hack, V.; Stremmel, W.; Krammer, P.H.; Galle, P.R. (1997). Reactive oxygen intermediates are involved in the induction CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. **J. Biol. Chem.** 272: 28191-28193.

Inque, M. (1994). Protective mechanism against reactive oxygen species. In: **The Liver. Biology**

**and Pathology.** Boyer, J.L.; Fausto, N.; Jacoby, W.B.; Schachter, D.A.; Shafritz, D.A. New York: Raven Press. pp 443-460.

Krogh, K.A.; Halling-Sorensen, B.; Mogensen, B.B.; Vejrup, K.V. (2003). Environmental properties and effect of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. **Chemosphere** 50: 871-901.

Lau, A.; **Knakievicz, T.; Prá, D.; Erdtmann, B.** (2007). Freshwater planarians as novel organisms for genotoxicity testing: Analysis of chromosome aberrations. **Environ. Mol. Mutagen.** 48(6): 475-82.

Leff, J.A.; Oppegard, M.A.; Terada, L.S.; McCarty, E.C.; Repine, J.E. (1991). Human serum catalase decreases endothelial cell injury from hydrogen peroxide. **J. Appl. Physiol.** 71(5): 1903-1906.

Li, A.P.; Long, T.J. (1988). An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate. **Fundam. Appl. Toxicol.** 10(3): 537-46.

Lindahl, T.; Wood, R.D. (1999). Quality control by DNA repair. **Science** 286: 1897-1905.

Lioi, M.B.; Scarfi, M.R.; Santoro, A.; Barbieri, R.; Zeni, O.; Di Berardino, D.; Ursini, M.V. (1998a). Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures *in vitro*. **Mutat. Res.** 403: 13-20.

Lipinski, B. (2001). Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. **J. Diabetes Compl.** 15: 203-210.

Livingstone, D.R., 2001. Contaminated-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656– 666.

Llesuy, S.F. (2002). **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Canoas:ULBRA. Pp 23-28.

Mates, J.M.; Sanchez-Jimenes, F.M. (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32: 157-170.

Nano, G.M.; Binello, A.; Bianco, M.A.; Ugazio, G.; Burdino, S. (2002). *In vitro* tests to evaluate potential biological activity in natural substances. *Fitoterapia.* 73: 140-146.

Prá, D.; Lau, A.H.; Knakiewicz, T.; Carneiro, F.R.; Erdtmann, B. (2005). Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutat. Res.* 585: 79-85.

Rank, J.; Jensen, A.G.; Skov, B.; Pedersen, L.H.; Jensen, K. (1993). Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, *Salmonella* mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. *Mutat. Res.* 300(1):29-36.

Relyea, R.A. (2004). Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(7): 1737-1742.

Rivera, V.R.; Perich, M.J. (1994). Effects of water quality on survival and reproduction of four species of planaria (Turbellaria: Tricladida). *Invertebr. Reprod. Dev.* 25: 1-7.

Ruppert, E.; Barnes, R. (1996). **Zoologia dos invertebrados**. 6 ed. São Paulo: Roca.

Schaeffer, D.J. (1993). Planarian as a model system for *in vivo* tumorigenesis studies. **Ecotoxicol. Environ. Safe.** 25: 1-18.

Silva, J.; Freitas, T.R.O.; Marinho, J.R.; Erdtmann, B. (2000). Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet Assay) to environmental *in vivo* biomonitoring with native rodents. **Genet. Mol. Biol.** 23(1): 241-245.

Silva, J.; Heuser, V.; Andrade, V. (2003). Biomonitoramento Ambiental. In.: **Genética Toxicológica**. Silva, J.; Erdtmann; B.; Henriques, J.A.P. (org). Porto Alegre: Alcance.

Singh, N.P.; Maccoy, M.T.; Tice, R.R.; Scheneider, E.L. (1988). A simple technique for quantifications of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.** 175: 184-191.

Sivikova, K.; Dianovski, J. (2006). Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes. **Int. J. Hyg. Environ. Health.** 209 (1): 15-20.

Theodorakis, C.W. (2001). Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. **Ecotoxicology.**10: 245–256.



Tice, R.R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.C.; Sasaki, Y.F. (2000). Single cell/gel comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221.

Triebkorn, R.; Kohler, H.R.; Zahn, T.; Vogt, G.; Ludwig, M.; Rumpf, S.; Kratzmann, M.; Alberti, G.; Storch, V. (1991). Invertebrate cells as target for hazardous substances. *Z. Angew. Zool.* 78(3): 277-285.

Villela, I.V.; Lau, A.; Silveira, J.; Prá, D.; Rolla, H.C.; Silveira, J. (2003). Bioensaios para Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: **Genética Toxicológica**. Silva, J.; Erdtmann; B.; Henriques, J.A.P. (org). Porto Alegre: Alcance.

Xie, L.; Thrippleton, K.; Irwin, A.M.; Siemering, G.S.; Mekebri, A.; Crane, D.; Berry, K.; Schlenk, D. (2005). Evaluation of estrogenic activities of aquatic herbicides and surfactants using an rainbow trout vitellogenin assay. *Toxicol. Sci.* 87(2): 391–398.

Zelko, I.N.; Mariani, T.J.; Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CU-Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structure, evolution and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33(3): 337-49.