



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - FISILOGIA ANIMAL COMPARADA



**Efeitos bioquímicos do herbicida Roundup no poliqueta estuarino *Laeonereis acuta*
(Polychaeta, Nereididae)**

Biólogo Fábio de Melo Tarouco

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Eduardo da Rosa e Co-orientação do Dr. Marcio Alberto Geihs.

Rio Grande, Setembro de 2015.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à minha mãe pelo carinho e apoio que foram muito importante em todas as etapas dessa caminhada.

Às minhas irmãs Luciana e Selma pelo incentivo ao longo desses mais de dois anos e por acreditar que tudo isso seria possível.

À minha esposa e em especial aos meus amados filhos que são uma fonte inspiradora, me impulsionando em cada escolha que faço. Quem sabe toda essa caminhada não sirva de exemplo a ser seguido por eles? Pois embora todas as dificuldades impostas ao longo da vida, é sempre possível seguir e completar os objetivos traçados. Obrigado por existirem e amo incondicionalmente cada um de vocês.

Aos meus colegas, Amanda, Robson e Filipe que se mostraram além de colegas, verdadeiros amigos, fazendo parte dessa jornada, formando uma equipe nota 10. Obrigado pelos risos, pela ajuda nas atividades de laboratório, mas principalmente pela atenção e pelo carinho que pude sentir durante esse tempo.

Aos amigos e colegas como a Fernanda Lopes, Fernanda Figueira, Lais, Regina e Marcelo pela companhia, pelos cafezinhos, pelas discussões polêmicas.

Não poderia deixar de agradecer ao meu orientador Nino, por ter aceitado fazer parte de mais esse desafio, por toda a dedicação que foram fundamentais no desenvolvimento desse trabalho. Saiba que te considero além de um profissional uma pessoa exemplar. Obrigado por me acompanhar em toda essa caminhada.

Ao meu co-orientador Marcio, por toda a atenção, pelas trocas de protocolos, pelo acompanhamento durante o desenvolvimento dessa dissertação e pela ajuda no laboratório.

Por fim gostaria de agradecer a FURG, ao Instituto de Ciências Biológicas – ICB e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada por toda a estrutura física e humana, que foram importantes para o desenvolvimento do trabalho.

Sumário

Resumo Geral.....	4
Introdução geral.....	5
Objetivo geral.....	14
Objetivos específicos.....	14
Manuscrito.....	15
Abstract.....	17
1. Introduction.....	18
2. Material and Methods.....	20
2.1. Animal collection and maintenance	20
2.2. Experimental Procedures.....	20
2.3. Oxygen Consumption.....	21
2.4. Biochemical Analysis.....	21
2.4.1. Reactive Oxygen Species (ROS) determination and Antioxidant Capacity Against Peroxylradicals (ACAP)	22
2.4.2. Antioxidant enzymes and GSH content	23
2.5. Lipid Peroxidation	24
2.6. Cholinesterase activity	25
2.7. Statistical analysis.....	25
3. Results.....	26
4. Discussion.....	31
5. Conclusion.....	37
6. Acknowledgements.....	37
Cited References.....	38
Discussão geral.....	46
Bibliografia geral.....	50

Resumo Geral:

O Roundup é um herbicida que utiliza como princípio ativo o glifosato e é empregado no controle de ervas daninhas. Resíduos destas substâncias podem contaminar corpos d'água e causar danos à vida aquática. O objetivo foi avaliar a toxicidade do Roundup no poliqueta estuarino *Laonereis acuta*, verificando a concentração que causa 50% de mortalidade e os efeitos relacionados com o balanço oxidativo e alterações na atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e propionilcolinesterase (PChE). Para os testes de toxicidade, os animais foram expostos por 96 horas em concentrações em ordem crescentes de Roundup, que variaram entre 0 (zero) L e 21,12 mg/L . Determinou-se que a CL₅₀ 96h é de 8,19 mg/L. Com base neste teste foram escolhidas duas concentração de Roundup (3,25 e 5,35 mg/L) para avaliar os demais parâmetros nos tempos 24 e 96h. Não foram observadas alterações no consumo de O₂, porém houve uma redução nos níveis de espécies ativas de oxigênio (EAO) na região posterior nos dois tempos analisados. Verificou-se também que na maior concentração houve uma redução de ACAP nas três regiões corporais de *L. acuta* no tempo de 24h sendo e que após 96h de exposição a ACAP foi semelhante ao grupo controle em todos as regiões. Não foram observadas alterações nas enzimas do sistema de defesas antioxidantes bem como nos níveis de GSH. Considerando-se a peroxidação lipídica, observou-se uma redução no tempo de 24h em todas as regiões analisadas. Já no tempo 96h houve uma redução na maior concentração testada na região anterior e um aumento na região média nos animais da menor concentração empregada. Uma redução na atividade da AChE e PChE foi observada após 96h de exposição à ambas concentrações na fração de membrana. Podemos concluir que o Roundup além de causar alterações no sistema colinérgico causa uma redução nos níveis de EAO e conseqüentemente da capacidade antioxidante, provavelmente devido a alterações no metabolismo intermediário.

Introdução geral:

Segundo o último censo realizado no Brasil, entre os anos 1872 e 2010 a população brasileira teve um crescimento de quase 20 vezes, ultrapassando 190 milhões de habitantes (IBGE, 2010). Como consequência desse crescimento populacional, houve um aumento na demanda de alimentos. Para suprir essa demanda, se faz necessário o uso de diferentes técnicas visando melhorar a eficiência na produção agrícola. Entre as técnicas empregadas está o uso de agrotóxicos. Estes podem ser definidos como os produtos químicos e agentes físicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (Lei Federal nº7.802/89).

Em 2008 o Brasil assumiu o primeiro lugar no consumo de agrotóxicos ultrapassando os EUA, se tornando assim o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (ANVISA, 2010). Entre os agrotóxicos, está a classe dos herbicidas, substâncias químicas que reduzem ou eliminam plantas daninhas, que competem por água e nutrientes, ocasionando perdas nos cultivos (IBAMA, 2010). O controle das ervas daninhas é de fundamental importância para a obtenção de produtividade em qualquer exploração agrícola, sendo tão antiga quanto a agricultura (EMBRAPA, 2003).

No Brasil, o crescente aumento no consumo de agrotóxicos, ocorre devido o aumento das áreas onde é praticado o plantio, sendo que os herbicidas lideram a lista de agrotóxicos mais consumidos, superando 127 mil toneladas em 2009 (IBAMA, 2010). Entre os herbicidas mais utilizados, estão os que utilizam o glifosato como princípio ativo, o qual ultrapassou 90 mil toneladas em 2009, representando 76% do total de

herbicidas utilizados no Brasil (IBAMA, 2010). Seu uso não está restrito ao agrícola, sendo empregado na silvicultura, horticultura e ainda nos espaços urbanos para o controle de ervas daninhas (USEPA, 2011).

O glifosato (figura 1) é um herbicida não seletivo que tem como alvo a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3 fosfatossintase (EPSPS). Esta enzima é chave na via do chiquimato, envolvida na biossíntese de aminoácidos aromáticos. Porém, esta via só está presente em plantas e micro-organismos e ausente em animais (Giesy *et al.*, 2000). Este herbicida está classificado na classe III, que leva em consideração o potencial de periculosidade ambiental, (IBAMA, 2009).

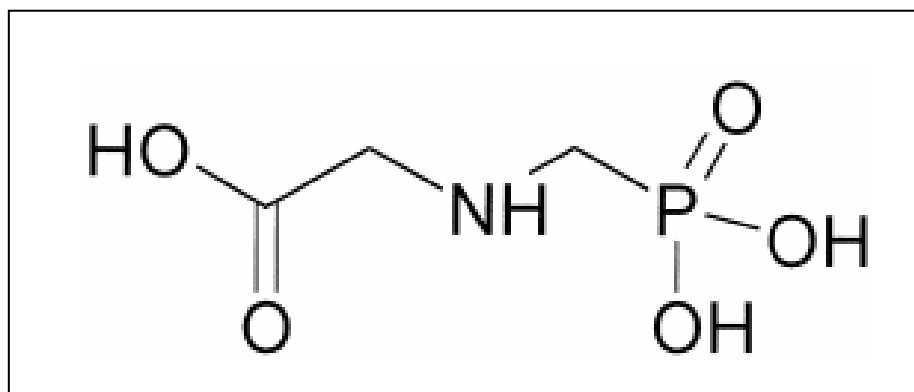


Figura 1 - Estrutura química do glifosato. Fonte: Dzygiel e Wiczorec, 2000.

Uma das preocupações pelo crescente uso de herbicidas é a contaminação dos corpos d'água, que pode ocorrer de diferentes formas como, por exemplo, devido o processo de lixiviação, erosão ou devido à aplicação de forma inadequada do produto. Segundo a resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005, o limite máximo de glifosato permitido em águas doces de classe 1, destinadas ao abastecimento para consumo humano, à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas e à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção e preservação da fauna e flora aquática é de 65 µg/L. No entanto já foram encontrados níveis ambientais superiores ao estabelecido pela resolução CONAMA. No trabalho de

Silva *et al.* (2003), na qual avaliaram a presença de glifosato 30 e 60 dias após a aplicação do herbicida, nas águas superficiais da microbacia hidrográfica arroio Passo do Pilão, localizado no Sul do Estado do Rio Grande do Sul foram encontrados concentrações em diferentes pontos, que variaram de 20 µg/L a 30 µg/L, até concentrações superiores a 100 µg/L, em pontos próximos a locais onde ocorre o cultivo de milho.

No mercado atualmente existem diferentes formulações comerciais, que utilizam o glifosato como princípio ativo. Entre essas formulações podemos destacar o Roundup, que além de princípio ativo, apresenta entre seus compostos, ingredientes, ditos inertes além de água e surfactantes. O surfactante mais utilizado nas formulações à base de glifosato é o polioxietilenoamino (POEA), utilizado para facilitar a absorção do glifosato através da cutícula das plantas, sendo que a quantidade do surfactante utilizado pode chegar em torno de 15% da formulação (Giesy *et al.*, 2000). O tempo estimado para meia vida do glifosato em ambientes aquáticos fica em torno de 7 a 14 dias (Giesy *et al.*, 2000).

Embora o glifosato não tenha um alvo específico em animais, já foi demonstrado que tanto puro quanto nas suas formulações comerciais podem afetar vários parâmetros como, por exemplo, efeitos em nível de metabolismo energético (Peixoto, 2005), dano de DNA (Nwani *et al.*, 2013) e no sistema reprodutivo (Lopes *et al.*, 2014). Além desses efeitos, já foi relatado que a exposição a herbicidas à base de glifosato, pode causar estresse oxidativo.

O estresse oxidativo pode ser definido como resultado de um desequilíbrio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos pró-oxidantes (Sies, 1991). No entanto Jones (2006) propôs uma nova definição levando em consideração a relação de que todos os sistemas biológicos contêm elementos redox, e esses elementos

possuem um importante papel na sinalização celular e assim na regulação fisiológica. Sendo assim, além do conceito clássico, o estresse oxidativo, é também definido como, qualquer perturbação da função sinalizadora que possuem essas espécies ativas de oxigênio (EAO).

As EAO são produzidas de forma natural durante o processo de respiração celular na cadeia transportadora de elétrons, na qual durante a redução do oxigênio a água, são gerando espécies intermediárias de oxigênio, como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (HO^{\cdot}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 2). Em situações normais, estima-se que cerca de 0,1 % do oxigênio consumido em mamíferos, possa gerar essas EAO (Fridovich, 2004). As EAO podem reagir com biomoléculas como proteínas, fosfolipídios e DNA, causando danos ao funcionamento celular (Meneghini, 1987).

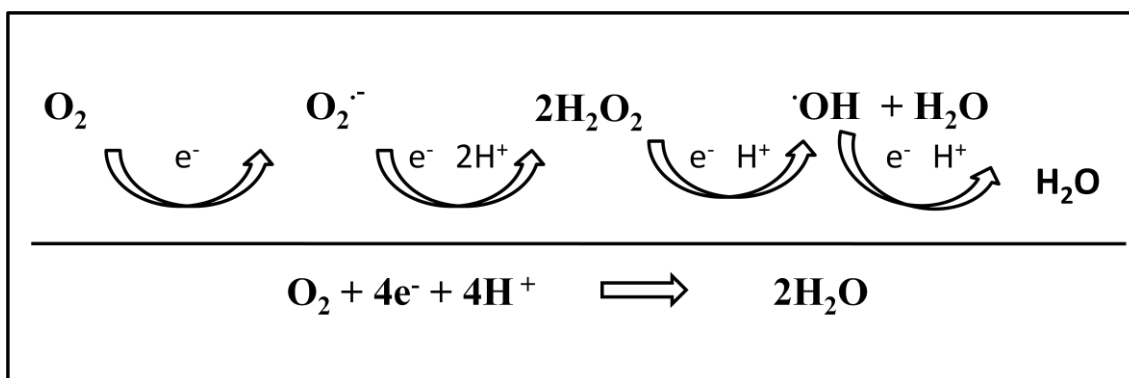


Figura 2 - Redução do O_2 a água com a formação de espécies ativas de oxigênio.
Fonte: Adaptado de Lushchak 2011.

Para neutralizar ou reduzir os efeitos indesejados das EAO os organismos possuem um sistema de defesas antioxidantes (SDA) (Vercesi, 2003). Essas defesas podem ser enzimáticas (figura 3) representadas, por exemplo, por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), que acelera a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, impedindo o efeito tóxico direto deste radical; a catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) que participam da metabolização do peróxido de

hidrogênio; a glutiona *S*-transferase (GST) que catalisa a conjugação de glutiona reduzida (GSH) com xenobióticos como, por exemplo produtos de dano oxidativo, como os lipídeos peroxidados, e a enzima glutamato-cisteína ligase (GCL) que participa da biossíntese da GSH, desempenhando um importante papel na defesa antioxidante e no metabolismo de xenobióticos (Dickinson & Forman, 2002). Além do SDA enzimático, os organismos também contam com defesas não enzimáticas representadas, por exemplo, pelo ácido ascórbico, o tocoferol, o tripeptídeo glutiona reduzida (GSH) entre outras (Storey, 1996).

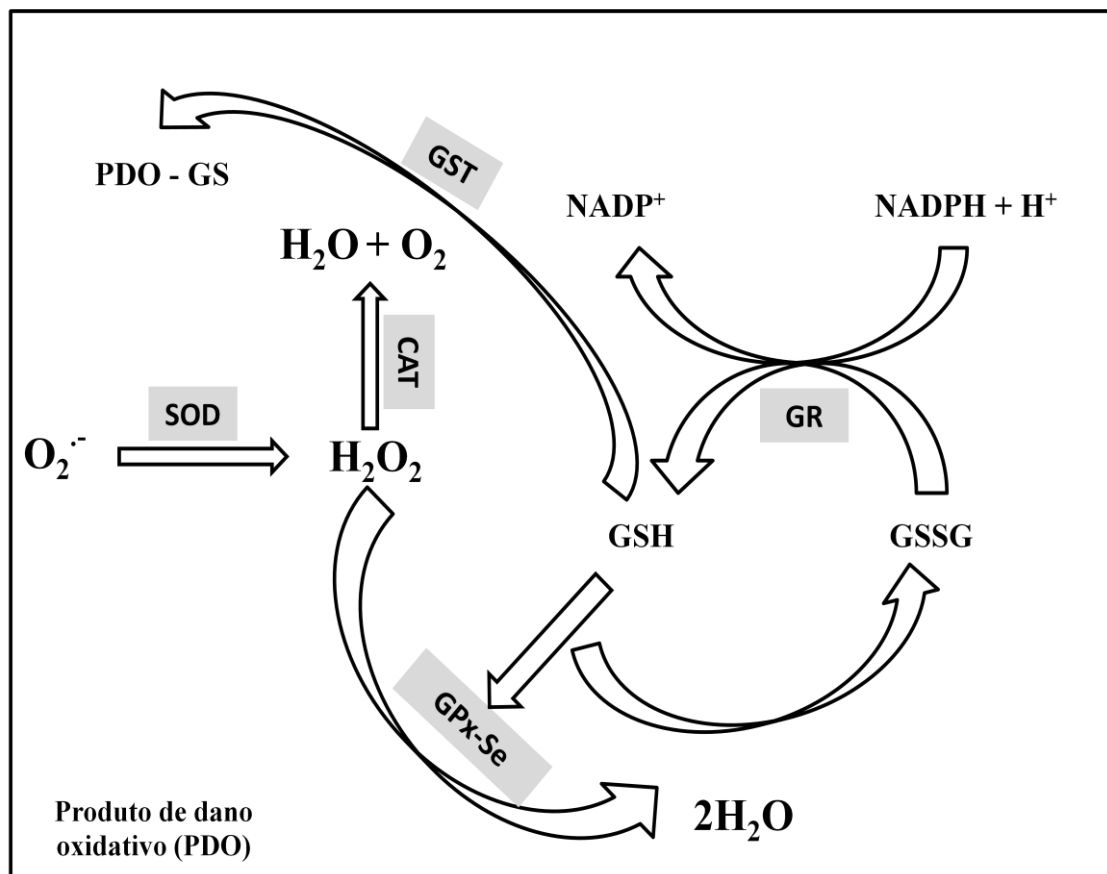


Figura 3 - Defesas antioxidantes enzimáticas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), Glutiona *S*-transferase (GST), glutiona peroxidase selênio dependente (GPx-Se), glutiona redutase (GR). Fonte: Adaptado da dissertação de Ferreira-Cravo, 2006.

No entanto em situações pró-oxidantes, pode ocorrer alterações em componentes do SDA, e com isso levar a um desbalanço no estado redox. Nesse contexto, já foi

descrito que o glifosato pode afetar a atividade de enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante (SDA), Contardo-Jara *et al.* (2009), verificaram aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e GST no anelídeo *Lumbriculus variegatus* exposto por 96h em concentrações que variaram de 0,05 à 5mg/L tanto de glifosato quanto a formulação Roundup, indicando com isso que a exposição ao glifosato pode levar a uma situação de estresse oxidativo. Modesto & Martinez (2010a, 2010b) observaram no peixe *Prochilodus lineatus* exposto em concentrações de 1, 5 e 10 mg/L de Roundup, uma inibição no SDA, através da redução na atividade das enzimas SOD, CAT e GST. Essa perturbação no SDA levou a um aumento nos níveis de lipídeos peroxidados. Resultados semelhantes, foram encontrados no trabalho de Lushchak *et al.*, (2009) na qual observaram alterações na atividade das enzimas SOD, CAT, GST e glutatona redutase (GR) no “goldfish” exposto a concentrações de Roundup que variaram de 2,5 a 20 mg/L de Roundup, reforçando assim a toxicidade do Roundup relacionado com balanço oxidativo.

Além de alterações no balanço oxidativo, já foi relatado que a exposição ao glifosato, embora este não seja um herbicida conhecido por afetar o sistema nervoso, (Amarante Junior *et al.*, 2002), pode levar a alterações na atividade de colinesterases. As colinesterases são importantes enzimas que possuem a função, de realizar a hidrólise de ésteres de colina (figura 4). Esses ésteres são importantes neurotransmissores que participam da regulação da transmissão do impulso nervoso na sinapse nervosa e na junção neuromuscular (Samadi *et al.*, 2007). Nesse sentido Sandrini *et al.*, (2013) observaram que a exposição ao glifosato *in vitro* pode inibir a atividade colinesterásica no mexilhão *Perna perna* e nos peixes *Danio rerio* e *Jenynsia multidentata*. Da mesma forma, Modesto & Martinez (2010a, 2010b) relataram uma redução na atividade da

enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e no músculo do peixe *Prochilodus lineatus* exposto por 96h em concentrações de 1 e 5 mg/L de Roundup.

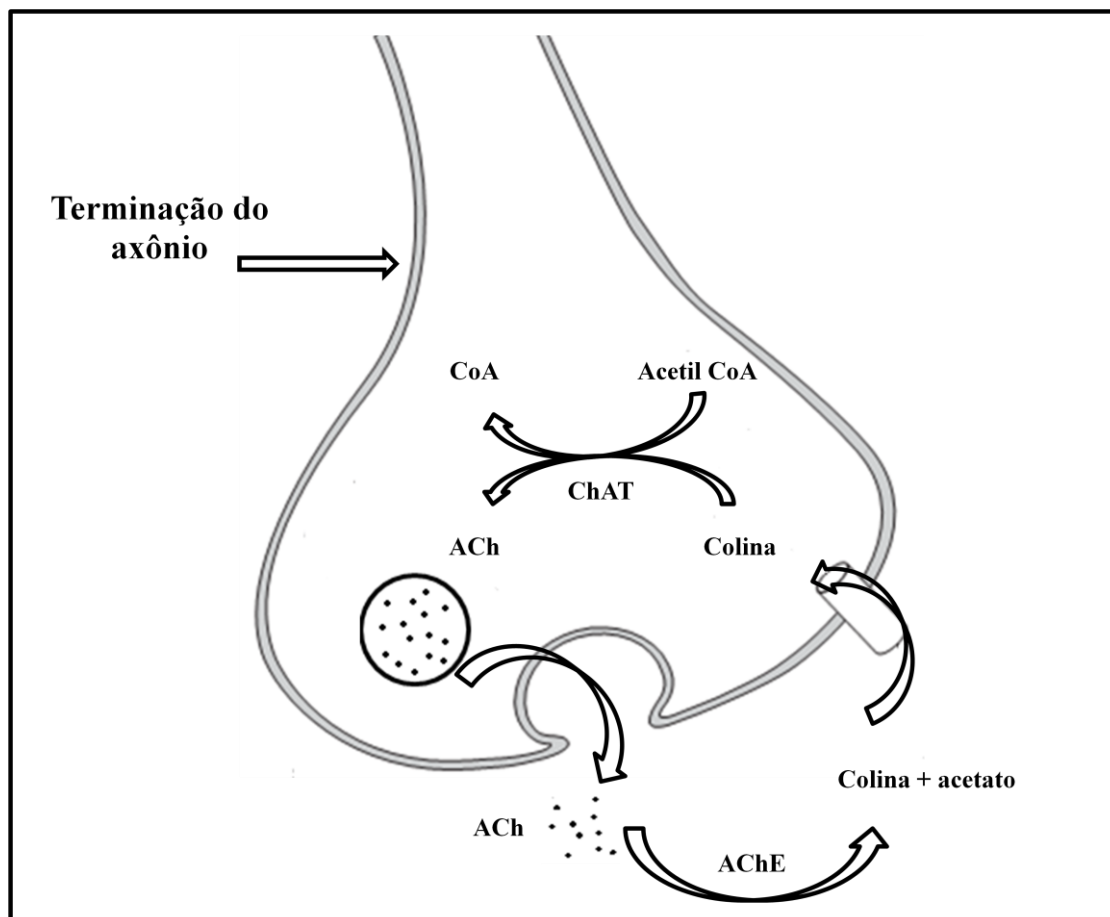


Figura 4 - Síntese, liberação e degradação da acetilcolina. Acetilcoenzima A (Acetil CoA), coenzima A (CoA), colina acetiltransferase (ChAT), acetilcolina (ACh), acetilcolinesterase (AChE). Fonte: Adaptado de Samad *et. al.*, 2007.

Como mencionado anteriormente, ambientes aquáticos podem ser o destino final de alguns contaminantes. Dentre esses ambientes suscetíveis a contaminações de origem antrópica estão os estuários, regiões de transição fazendo a ligação entre rios, lagos e os mares ou oceanos, essas regiões podem receber contaminantes decorrentes de atividades industriais, portuárias e da agricultura (Saiz-Salinas e González-Oreja, 2000). Além de serem receptores desses contaminantes vindos do continente, também são considerados ambientes naturalmente estressados devido a grande variação nas características físico-

químicas como, por exemplo, concentração de oxigênio dissolvido, salinidade, temperatura e pH (D’Incao *et al.*, 1992; Elliott e Quintino, 2007). Sendo assim, os organismos que vivem nesse ambiente, estão constantemente expostos a estes estressores naturais bem como aos estressores de origem antrópica. Dada esta característica, possuem mecanismos que permitem neutralizar ou reduzir os possíveis danos relacionados às variações desses fatores abióticos, possibilitando assim a vida nesses ambientes.

Entre os organismos que vivem nas regiões estuarinas está o poliqueta *Laeonereis acuta* (Treadwell, 1923). Esta é uma espécie encontrada na costa atlântica da América do Sul (Omena e Amaral, 2001). Este animal vive em tocas construídas nos sedimentos destas regiões, destacando-se pela frequência de ocorrência tanto em locais poluídos quanto não poluídos (Ferreira-Cravo *et al.*, 2007). Além disso, é considerado um importante elo nas teias alimentares tendo em vista ser um consumidor de detritos não-seletivo, além de ser item de alimentação de invertebrados, peixes e aves (Botto *et al.*, 1998; Palomo e Iribarne, 2000; Palomo *et al.*, 2004). Esta espécie tem sido utilizada como modelo experimental, frente à exposição a diferentes agentes pró-oxidantes de origem natural como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na qual foi demonstrado que a exposição nas concentrações de 10 μ M e 50 μ M pode levar a uma perturbação no balanço oxidativo, causando alteração na atividade de enzimas antioxidantes como a SOD, CAT e GST bem como um aumento de LPO (Rosa *et al.*, 2005). Nesse mesmo trabalho, Rosa *et al.*, 2005 relataram para *L. acuta*, um gradiente corpóreo na atividade das enzimas CAT e SOD nesta espécie, sendo observado uma maior atividade dessas enzimas na região posterior, seguido pela região média e na região anterior na qual foi verificada uma menor atividade, demonstrando com isso, um padrão de resposta diferente ao longo do corpo. Há também relatos dos efeitos de contaminantes de origem

antrópica em *L. acuta*. Geracitano *et al.* (2002) verificaram que a exposição ao cobre nas concentrações de 250 µg/L e 500 µg/L por 48h (exposição aguda), causou um aumento de LPO. Além disso, Sandrini *et al.* (2008) observaram que a exposição a 100 µg/L de cádmio por 7 dias causa um aumento nos níveis de EAO e na atividade da GST além de redução na atividade da SOD. Resultados semelhantes relacionados ao estresse oxidativo foram observados por Ventura-Lima *et al.* (2011), os quais também relataram alterações em componentes do SDA, como a redução da GST em *L. acuta* exposto a 50 µg/L arsênico por 7 dias. Esses trabalhos mostram as respostas de *L. acuta* em nível do SDA frente à agentes pró-oxidantes de origem natural bem como de origem antrópica.

Levando em consideração o crescente aumento no uso dos herbicidas a base de glifosato e sabendo-se que embora este não apresente um alvo específico em animais, alguns estudos demonstram efeitos danosos à vida animal. Portanto, se fazem necessárias novos estudos visando elucidar os mecanismos de toxicidade desse herbicida em outras espécies. Para tanto, no presente trabalho avaliamos os efeitos do herbicida Roundup, para o poliqueta estuarino *L. acuta*, relacionados com parâmetros do SDA bem como na atividade das enzimas AChE e PChE.

Objetivo geral:

- Avaliar os efeitos do herbicida Roundup no balanço oxidativo bem como sua influência no sistema colinérgico no poliqueta *Laeonereis acuta*.

Objetivos específicos:

- Determinar a concentração de Roundup que causa 50% de mortalidade (CL₅₀) para *L. acuta*.
- Avaliar os efeitos da exposição à concentrações subletais de Roundup relacionadas ao consumo de O₂.
- Analisar o efeito do Roundup em concentrações subletais sobre a geração de espécies ativas de oxigênio, sistema de defesas antioxidantes e dano oxidativo nas diferentes regiões corporais de *L. acuta*.
- Avaliar *in vivo* os efeitos da exposição ao Roundup sobre a atividade colinesterásica de *L. acuta*.

Manuscrito

**Effects of the herbicide Roundup on oxidative balance and cholinesterase activity
of the polychaeta *Laeonereis acuta***

(a ser submetido à revista Comparative Biochemistry and Physiology - Part C)

Fator de Impacto 2,301

**Effects of the herbicide Roundup on oxidative balance and cholinesterase activity
of the polychaeta *Laeonereis acuta***

Fábio de Melo Tarouco^a, Filipe Guilherme Andrade de Godoi^b, Robson Rabelo Velasques^a, Amanda da Silveira Guerreiro^a, Marcio Alberto Geihs^a, Carlos Eduardo da Rosa^{a*}.

^aUniversidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil. Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada.

^bUniversidade Federal do Rio Grande, Av. Itália km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

e-mails:

fabiobio304@hotmail.com (Fábio de Melo Tarouco)

filipe_godoi92@hotmail.com (Filipe Guilherme Andrade de Godoi)

robson_velasques@yahoo.com.br (Robson Rabelo Velasques)

amandahg@gmail.com (Amanda da Silveira Guerreiro)

geihs@hotmail.com (Marcio Alberto Geihs)

carlosrosa@furg.br (Carlos Eduardo da Rosa)

Correspondence author: Carlos Eduardo da Rosa (carlosrosa@furg.br)

Abstract:

Glyphosate based herbicides, such as Roundup, are widely employed in agriculture, silviculture and urban spaces to control the growth of weeds. However, these products contaminate river and estuarine systems, affecting aquatic life. The objective of the present study was to evaluate the effects of Roundup on the estuarine polychaeta *Laonereis acuta*, considering oxidative balance as well as acetylcholinesterase (AChE) and propionilcholinesterase (PChE) activity. Animals were exposed to a range of Roundup concentrations in order to determine LC₅₀ at 96h, which was established as 8.19 mg/L. Based on this, the animals were exposed to two Roundup concentrations: 3.25 mg/L (NOEC) and 5.35 mg/L (LC₁₀) for 24h and 96h. Oxygen consumption (VO₂) was then determined and the animals were divided into three body regions (anterior, middle and posterior) for biochemical analysis. A significant reduction in ROS generation was observed in the posterior region of animals in both experimental periods, while antioxidant capacity was reduced in the posterior region of animals exposed for 24h. With respect to the antioxidant defense system, both GSH levels and enzymes (CAT, SOD, GST, GP_X and GCL) were not altered after exposure. Lipid peroxidation was reduced in all analyzed body regions in both Roundup concentrations after 24h. Animals exposed to the highest concentration of Roundup also presented a reduction in lipid peroxidation in the anterior region after 96h, while animals exposed to the lowest concentration presented a reduction in the middle region. A reduction in cholinesterase activity, including both AChE and PChE in animals exposed to both Roundup concentrations after 96h was observed. Overall results indicate that Roundup exposure presents toxicity to *L. acuta*, causing a disruption in ROS and ACAP levels as well as affects the cholinergic system of this invertebrate species.

Keywords: antioxidant defense, Roundup, invertebrate, Nereididae.

1. Introduction:

Agrichemicals are one of the most widespread contaminants observed in the aquatic environment (Silva *et al.*, 2003). Glyphosate based herbicides such as Roundup are the most employed in agriculture, comprising up to 40% of pesticides commercialized in Brazil (Carneiro *et al.*, 2015). Besides its use in agriculture, Roundup can be used in silviculture, horticulture and in various domestic cases (USEPA, 2011). Its primary action is as a non-selective herbicide employed in weed control by the inhibition of the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3 phosphate synthase (EPSPS), which is a key enzyme in the shikimate pathway and responsible for the biosynthesis of aromatic amino acids in plants and microorganisms (Giesy *et al.*, 2000).

Although animals do not possess the physiological targets for specific glyphosate toxicity, it has been demonstrated that both the active ingredient and its commercial formulations affect physiological and biochemical parameters in animals. These effects include: the inhibition of cell respiration due to a reduction in the mitochondrial membrane potential and the activity of ATP synthase in isolated mitochondrion of rats (Peixoto, 2005), a reduction in acetylcholinesterase activity in mollusks and fish (Sandrini *et al.* 2013) and reproduction impairment in fish (Lopes *et al.*, 2014). Besides these effects, it has been proposed that glyphosate exposure may cause alterations in enzymes of the antioxidant defense system in annelids (Contardo-Jara *et al.*, 2009). Such alterations to enzymes responsible for maintaining the cell redox state would lead to an imbalance between prooxidants and antioxidants in favor of the former. This then leads to a disturbance in cell redox signaling and oxidative damage, a situation called oxidative stress (Sies,1991; Jones, 2006). Based on this, Roundup exposure may lead to a similar situation in aquatic organisms such as the fish species *Carassius auratus* and *Prochilodus lineatus* leading to the alteration of antioxidant

enzyme activities such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR) (Lushchak *et al.*, 2009; Modesto e Martinez, 2010b).

Aquatic environments represent the final destination for a variety of anthropogenically based contaminants, including those introduced by industrial activity and agriculture (Saiz-Salinas e González-Oreja, 2000). Among these aquatic recipients, estuaries are considered highly stressful environments due to their great variability in salinity, dissolved oxygen, temperature and pH (D’Incao *et al.*, 1992; Elliott e Quintino, 2007), which may be exacerbated by contaminants. Consequently, organisms that live in such environment are exposed to both natural and anthropogenic stimulus. These organisms consequently possess adaptations in order to neutralize or reduce damage caused by such variation in abiotic factors.

Polychaetes are among the organisms that inhabit estuarine environments, and *Laeonereis acuta* represents one of the primary Brazilian species (Treadwell, 1923). This benthonic species occurs in the Atlantic shores of South America (Omena and Amaral, 2001), living in burrows constructed within sediment. Such organisms are important elements in the food chain since they are non-selective filter-feeders and represent a food source for invertebrates, fish and birds (Botto *et al.*, 1998; Palomo e Iribarne, 2000; Palomo *et al.*, 2004). This polychaete species has been employed as an experimental model for assessing the effects of pro-oxidant agents of both natural and anthropogenic sources, such as hydrogen peroxide (Rosa *et al.*, 2005), copper (Geracitano *et al.*, 2002), cadmium (Sandrini *et al.*, 2008) and arsenic (Ventura-Lima *et al.*, 2011).

Since polychaetes inhabit sediments from estuarine environments that represent a common recipient of pollutants, the objective of the present study was to evaluate

toxic effects of Roundup in *L. acuta* with respect to mortality, oxidative balance and cholinesterase enzyme activity.

2. Material and Methods:

2.1. Animal collection and maintenance

Laeonereis acuta were collected in the Patos Lagoon Estuary in Rio Grande, Southern Brazil and transferred in plastic bags containing cold water from the collection site. The license for collection was provided by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation – Brazil (ICM-Bio / license number 40868-1). Animals were acclimated for 7 days under lab conditions in plastic boxes containing sediment and saline water (10ppm), temperature $20 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 8.0 and photoperiod 12L:12D. Animals received commercial fish food every 2 days, and the water was renewed every second day.

2.2. Experimental Procedures:

Since Roundup Original is a complex mixture composed of both glyphosate (360 g/L) and inert ingredients, Roundup concentrations in the present study were based on the relative glyphosate equivalents. In order to define sub-lethal Roundup concentrations to *L. acuta* for further physiological and biochemical analyses, polychaetes were exposed to Roundup concentrations from 0.065 mg/L (representing the maximum commercial concentration with respect to the preservation of flora and fauna according to Brazilian legislation - CONAMA 357) to 65 mg/L. 10 animals per treatment in individual flasks (100mL) were exposed to herbicide for 96h. Initially, five test concentrations (in a geometric series) and a control group were used. The test was then repeated employing three concentrations (in a geometric series) ranging from the lowest concentration that resulted in 100% mortality and the highest concentration that did not cause any mortality. In all sets of experiments, mortality was verified daily and

the experimental water was renewed every 48h (semi-static system). Animals were exposed without sediment and water conditions and were maintained during the acclimation period. Results were analyzed by the Probit method (EPA Probit Analysis Program - version 1.5); the CL₅₀ and CL₁₀ 96h were determined as well as the non-observed effect concentration (NOEC). For the posterior tests, the animals were exposed to Roundup 3.25 and 5.35 mg/l, the NOEC and CL₁₀ respectively.

2.3. Oxygen Consumption:

Animal oxygen consumption was determined according to the methodology of Nithart *et al.* (1999). Animals (n=10) were transferred to glass flasks containing water (10mL) at the same characteristics of salinity, pH and temperature as the exposure period. The initial oxygen concentration was recorded with an oxymeter (DO-5519, Lutron Eletrônica – CO), after which the flasks were sealed for 20 minutes. Then, the flasks were opened and the final oxygen concentration was determined. The animals were weighed and flask volumes were verified. The oxygen consumption was expressed as mg O₂/mL/mg wet weight/hour.

2.4. Biochemical Analysis:

After the exposure periods, each animal was divided into anterior region (20 initial segments), middle region (next 20 segments) and posterior region (final segments). Such division was based on previous studies that determined differences in the antioxidant responses in distinct regions of the animal body (Rosa *et al.*, 2005). This division was employed for all the biochemical determinations, except for cholinesterase activity, in which the anterior region was the only one employed.

2.4.1. Reactive Oxygen Species (ROS) determination and Antioxidant Capacity Against Peroxylradicals (ACAP):

In order to determine ROS generation and ACAP, polychaeta were exposed for 24h and 96h, and immediately sacrificed in ice and divided as described above. Pools from each body region of two animals (n=5). Pools were homogenized (1:5 W/V) in cold buffer (100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂). Samples were then centrifuged for 20 minutes at 20,000 x g and 4°C. The supernatant was taken for subsequent analyses. The protein content from samples was determined according to the biuret method with a commercial kit employing bovine serum albumin as standard (Dole's Reagents). Consequently, all the samples were diluted with the homogenization buffer to a final protein concentration of 2 mg/mL.

In order to quantify ROS, sample aliquots were added to a microplate with cold buffer (HEPES 30mM, KCl 200mM and MgCl₂ 1mM). After, the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA, 16 μM, Molecular Probes) was added. Dichlorofluorescein diacetate is hydrolyzed by esterases to a non-fluorescent form, DCFH, which in turn is oxidized by ROS. This oxidation generates a fluorochrome detectable in a microplate reader (Victor 2, Perkin Elmer) at excitation and emission wavelengths of 488 nm and 525 nm, respectively (LeBel *et al.*, 1992).

ACAP determination followed the methodology of Amado *et al.* (2009). This procedure is based on the thermal decomposition (at 37°C) of 2,2'-azobis (2 methylpropionamide) dihydrochloride (ABAP 20mM; Sig-Aldrich), which generates peroxyradicals. These molecules react with H₂DCF-DA, subsequently forming a detectable fluorochrome which was analyzed using the methods of the above description. The antioxidants present in the sample react with the peroxyradicals, consequently reducing the fluorescence generation. ACAP was expressed as relative fluorescence area, and was determined as following:

$$\text{ACAP} = 1/(\text{fluorescence area with ABAP} - \text{without ABAP})/\text{area without ABAP}$$

2.4.2. Antioxidant enzymes and GSH content:

A total of 3 animals for each body region (n=5) were used for enzymatic determination. After the exposure period, animals were dissected on ice and samples were homogenized (1:5 W/V) in ice buffer (20 mM Tris base, 1mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 500 mM saccharose, 150 mM KCl e 0.1 mM PMSF, pH 7.6). An identical procedure was employed for glutamate cysteine ligase activity determination (γ GCL) and for reduced glutathione (GSH) content analysis; however a different buffer was used (100 mM tris-HCl, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂). Samples were then centrifuged for 20 minutes at 9,000 x g and 4°C. Protein concentration was determined as previously described and the supernatant was frozen for subsequent analysis (-80°C).

Catalase activity (CAT) was determined following the protocol described by Beutler (1975). This method is based on the degradation of hydrogen peroxide (50mM), which is spectrophotometrically monitored (240nm). Results were expressed in CAT units, which are defined as the amount of enzyme needed to hydrolyze 1 μ mol H₂O₂ per minute and per protein (mg) at 30°C and pH 8.0.

Superoxide dismutase activity (SOD) was analyzed using spectrophotometric monitoring of adrenochrome formation at 480nm. Adrenochrome formation occurs via the oxidation of epinephrine by the superoxide anion present in the buffer. Results were expressed as SOD units, with one unit representing the amount of enzyme needed to inhibit 50% of epinephrine oxidation (Misra and Fridovich, 1972).

Glutathione S-transferase (GST) activity was determined according to Habig and Jakoby (1981). This assay is based on the product formation by the conjugation of glutathione with 1-chloro, 2,4-dinitrobenzene (CDNB), which is determined by spectrophotometry (340nm). Results were expressed in GST units, which are defined

as the amount of enzyme needed to generate 1 μmol of product per minute and per mg of protein at 25°C and pH 7.00.

Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined according to Arun and Subramanian (1998). This method determines NADPH (0.12mM) oxidation in a reaction media containing phosphate buffer (100mM; pH 7.5), glutathione reductase (0.1U/ml), GSH (2mM), H₂O₂ (2mM) and sodium azide (1mM) via spectrophotometry (340nm). Results were expressed as GPx units, which are defined as the amount of enzyme necessary to oxidize 1 μmol of NADPH per minute and per mg of protein at 30°C.

γ GCL and GSH content were analyzed according to White *et al.* (2003). This method is based on the reaction of dicarboxialdehyde (NDA) with GSH or the γ -glutamylcysteine residues to form highly fluorescent cyclic products. Fluorescence intensity was measured at 472nm (excitation) and 528nm (emission) in a microplate fluorescence reader (Victor 2, Perkin Elmer). γ -GCL activity was expressed as GSH μmoles per hour and per mg of protein and GSH content was expressed as mg of GSH per mg of protein.

2.5. Lipid Peroxidation:

Lipid peroxidation was determined according to the protocol from Hermes-Lima *et al.* (1995). Pools from two animals for each body region were homogenized in cold methanol (100%) at a ratio of 1:9 (W/V). Thereafter, homogenates were centrifuged at 1,000 x g for 10 minutes at 4 °C. The resulting supernatant was taken for the quantification of lipid hydroperoxides (LPO), via the FOX method in a microplate reader at 550nm. Cumene hydroperoxide (CHP) was employed as a standard and the results were expressed as CHP equivalents per wet weight.

2.6. Cholinesterase activity:

In order to determine cholinesterase activity, animal tissue samples were prepared according to the methodology of Sandrini *et al.* (2013). Samples consisted of pools (n=6) from 4 anterior regions, homogenized in 200 μ L of cold phosphate buffer (100mM) mixed with glycerol 20%. Homogenates were centrifuged at 9,000 x g for 30 minutes at 30°C; the resulting supernatant was employed as the soluble fraction (SF). Pellets were re-suspended in homogenization buffer mixed with Triton X-100 (0.5%) and incubated for 30 minutes at room temperature. Following incubation, re-suspended pellets were centrifuged with the same conditions described above. The supernatant from this centrifugation was employed as the enzyme source for the membrane fraction (MF).

Enzyme activity was determined via the method described by Elman *et al.* (1961). DTNB (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid – Sigma-Aldrich) and acetylthiocholine (7.5 mM) or propionylthiocholine (4mM) were used. Enzyme activity was analyzed using a microplate reader (412nm). Results were expressed as η moles/mg of protein/min. Protein concentrations from supernatants were measured by the biuret method as described before.

2.7. Statistical analysis:

Statistical analyses included the one-way Anova test (assumptions of normality and homoscedasticity were validated) followed by the Newman-Keuls *post hoc* test ($p < 0.05$). Under circumstances in which the assumptions of Anova were not met, the non-parametric test of Kruskal-Wallis Anova was used. The values were presented as means \pm standard error.

3. Results:

Based on toxicological tests (Fig. 1) in which animals were exposed to a wide range of Roundup concentrations for 96h, concentrations that caused 10% and 50% mortality in polychaetes were determined as 5.35 mg/L and 8.19 (C.I. 6.69 -9.58 mg/L), respectively.

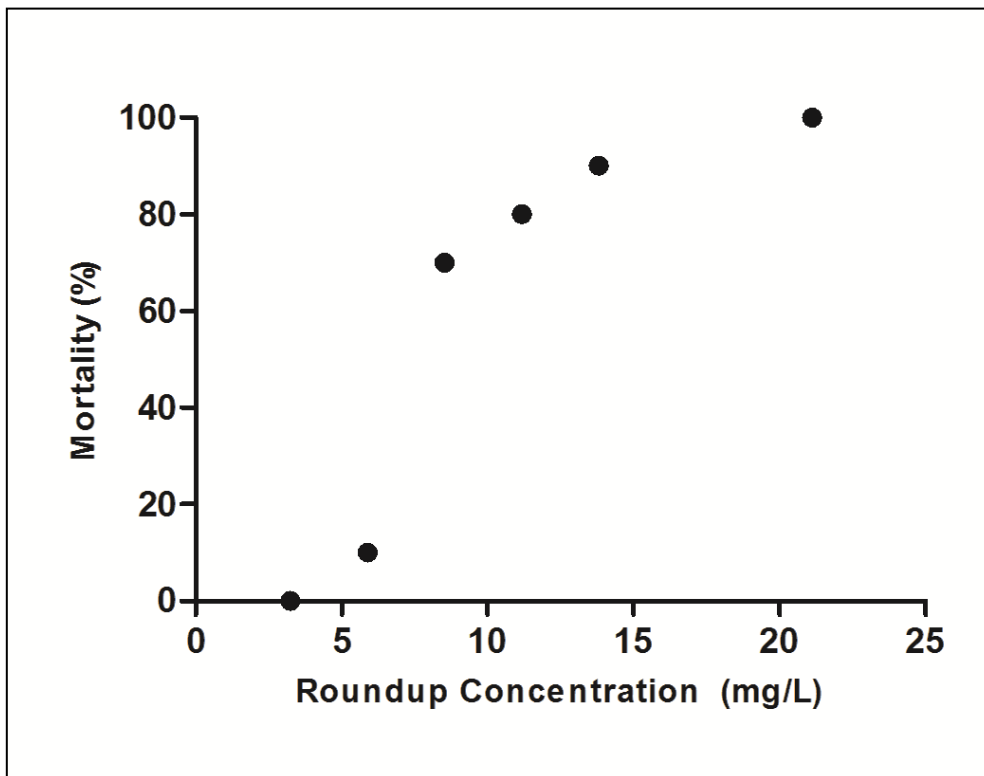


Figure 1- Percent mortality of the polychaeta *L. acuta* exposed to different Roundup concentrations for 96h (Results from the final test described in the material and methods section).

It is important to note that during the following experiments no significant mortality was observed. Concerning oxygen consumption (Fig. 2A and 2B), no alteration in both Roundup concentrations and both experimental periods relative to the control group animals ($p>0.05$) was observed.

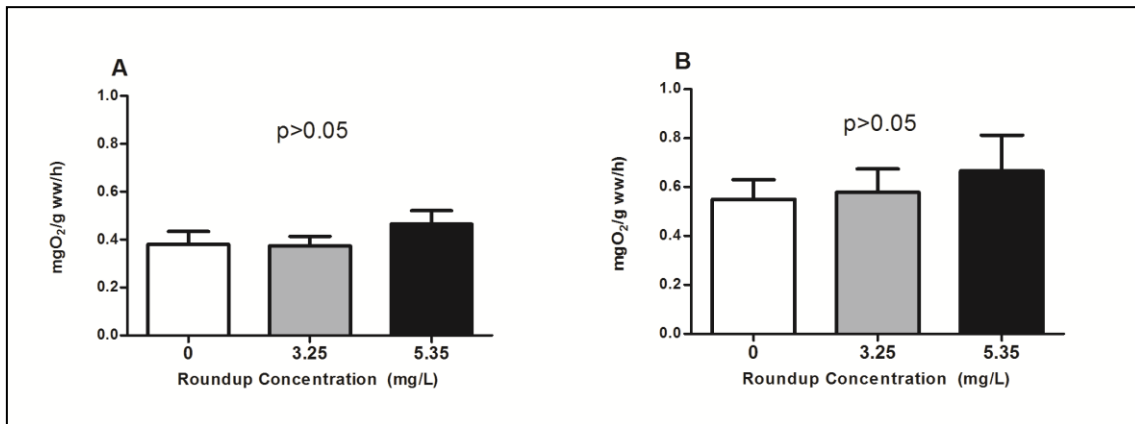


Figure 2- Oxygen consumption of *L. acuta* exposed to two Roundup concentrations (3.25 and 5.35 mg/L) for 24h (A) and 96h (B). Data are expressed as means \pm standard error.

A reduction in ROS production in the posterior regions of animals exposed to both Roundup concentrations after 24h comparing to control group animals was observed (Fig. 3A). A reduction of 1.7 times was observed for the lowest concentrations in comparison with control group animals ($p < 0.05$), while a reduction of 2.6 times was observed for the highest concentrations. After 96h a significant alteration was observed between the posterior body region of worms exposed to Roundup ($p < 0.05$) such that ROS generation was 2.7 times lower in animals exposed to the higher concentration when compared to the lowest concentration (Fig. 3B). No significant alteration was observed between animals exposed to Roundup and control group animals in this exposure period ($p > 0.05$). Other body regions did not present any significant alteration in ROS generation for both periods analyzed ($p > 0.05$).

A significant reduction in ACAP levels was observed ($p < 0.05$) in the three body regions of animals exposed to the highest concentration of Roundup when compared with control group animals after 24h (Fig. 3C). Alterations of 1.8, 1.6 and 2.1 times in the anterior, middle and posterior region respectively were observed. On the other hand, no alteration in ACAP levels was observed in both experimental groups after exposure for 96h ($p > 0.05$); ACAP levels returned to values similar to that observed in control group animals (Fig. 3D).

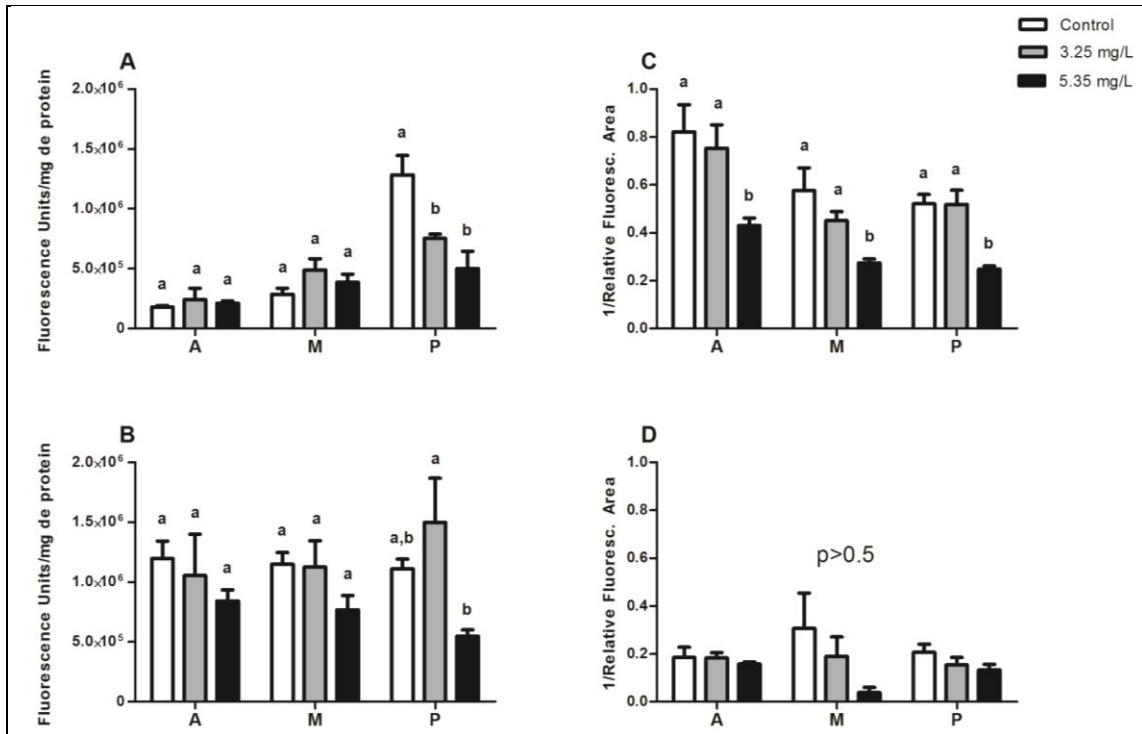


Figure 3- Reactive Oxygen Species (ROS) in the different body regions of *L. acuta* exposed to Roundup for 24h (A); 96h (B); Antioxidant Capacity Against Peroxylradicals after 24h (C); and 96h (D). Data are expressed as means \pm standard error. Different letters represent significant differences between treatments at the same body region and experimental period ($p < 0.05$).

No significant difference in the activity of CAT, GST and GPx enzymes was observed in both Roundup concentrations used in both exposure periods (Table 1). SOD enzyme activity was 1.7 times lower in the middle region from animals exposed to the higher Roundup concentration when compared to the lowest concentration after 24h ($p < 0.05$). Contrarily, SOD activity after 96h remained similar between all experimental groups ($p > 0.05$). No significant difference was observed between groups for GCL activity and GSH levels.

Table 1. Activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), glutamate cysteine ligase (GCL) and GSH levels in different regions of *L. acuta* exposed to Roundup. Data were expressed as means \pm standard errors.

Roundup (mg/L)	24hours			96hours		
	0	3.25	5.35	0	3.25	5.35
CAT						
Anterior	1.00 \pm 0.21	0.80 \pm 0.05	0.93 \pm 0.19	0.77 \pm 0.14	1.04 \pm 0.26	0.68 \pm 0.18
Middle	1.09 \pm 0.07	1.16 \pm 0.22	0.93 \pm 0.08	0.58 \pm 0.11	0.68 \pm 0.09	1.12 \pm 0.36
Posterior	1.59 \pm 0.32	1.08 \pm 0.12	1.13 \pm 0.05	1.05 \pm 0.20	1.33 \pm 0.34	1.41 \pm 0.51
SOD						
Anterior	0.65 \pm 0.05	0.49 \pm 0.05	0.50 \pm 0.03	0.47 \pm 0.06	0.59 \pm 0.05	0.59 \pm 0.02
Middle	0.51 \pm 0.04 ^{a,b}	0.65 \pm 0.06 ^a	0.40 \pm 0.02 ^b	0.53 \pm 0.05	0.65 \pm 0.05	0.62 \pm 0.06
Posterior	0.66 \pm 0.05	0.52 \pm 0.02	0.61 \pm 0.02	0.74 \pm 0.11	0.72 \pm 0.10	0.75 \pm 0.05
GPx						
Anterior	13.00 \pm 1.00	14.00 \pm 2.00	14.00 \pm 3.00	13.00 \pm 1.00	14.00 \pm 2.00	14.00 \pm 4.00
Middle	18.00 \pm 2.00	19.00 \pm 4.00	19.00 \pm 5.00	13.00 \pm 2.00	19.00 \pm 4.00	19.00 \pm 5.00
Posterior	18.00 \pm 2.00	18.00 \pm 1.00	19.00 \pm 2.00	18.00 \pm 2.00	18.00 \pm 2.00	19.00 \pm 2.00
GST						
Anterior	6.69 \pm 2.02	6.89 \pm 2.09	9.05 \pm 0.60	7.55 \pm 0.64	7.73 \pm 1.02	8.10 \pm 1.44
Middle	3.58 \pm 0.73	4.56 \pm 1.29	3.09 \pm 0.34	3.82 \pm 0.60	3.67 \pm 0.45	3.31 \pm 0.43
Posterior	4.90 \pm 0.82	3.33 \pm 1.17	3.34 \pm 0.37	2.66 \pm 0.62	3.87 \pm 0.73	3.36 \pm 0.38
GCL						
Anterior	88.00 \pm 15.00	71.00 \pm 6.00	92.00 \pm 7.00	86.00 \pm 15.00	85.00 \pm 10.00	126.00 \pm 34.00
Middle	67.00 \pm 12.00	76.00 \pm 3.00	78.00 \pm 12.00	76.00 \pm 9.00	72.00 \pm 7.00	86.00 \pm 17.00
Posterior	71.00 \pm 12.00	59.00 \pm 8.00	72.00 \pm 6.00	76.00 \pm 14.00	103.00 \pm 9.00	91.00 \pm 6.00
GSH						
Anterior	251.00 \pm 4.00	254.00 \pm 10.00	208.00 \pm 21.00	205.00 \pm 17.00	233.00 \pm 18.00	273.00 \pm 18.00
Middle	135.00 \pm 17.00	156.00 \pm 19.00	147.00 \pm 7.00	181.00 \pm 35.00	185.00 \pm 27.00	215.00 \pm 36.00
Posterior	150.00 \pm 9.00	127.00 \pm 7.00	132.00 \pm 4.00	139.00 \pm 15.00	152.00 \pm 9.00	179.00 \pm 14.00

Values are expressed as: CAT (U CAT), SOD (U SOD), GPx (U GPx), GST (U GST), GCL (μ M GSH), GSH (μ moles) Different letters represent statistical differences within the same region in the different treatments.

Significant differences in lipid peroxidation were observed, with results indicating reductions of 7.9, 6.7 and 4.8 times in the anterior, middle and posterior region, respectively, in animals exposed to the higher Roundup concentration when compared with the control group animals ($p < 0.05$). Similarly, LPO levels in the middle region of animals exposed to the lowest herbicide concentration were reduced by 2.7 times when compared with control group animals. LPO levels were reduced by 5.0 times for groups exposed to the highest concentration for 96h compared to control groups ($p < 0.05$). Animals exposed to the lowest herbicide concentration presented an increase of 3.5 times in LPO levels in the middle region. Lipid peroxidation in the posterior region was similar to control group animals in both Roundup concentrations ($p > 0.05$).

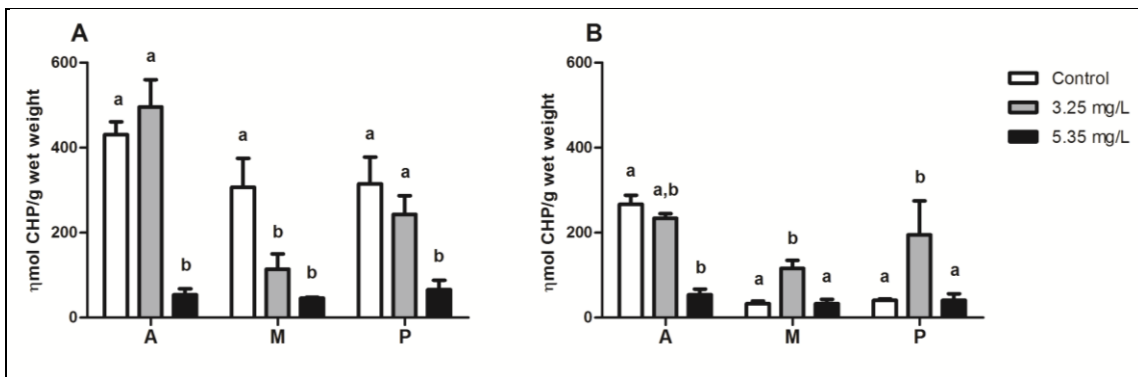


Figure 4- Lipid hydroperoxide levels in the anterior, middle and posterior region in the distinct body regions from *Laeonereis acuta* exposed to Roundup for 24h (A) and 96h (B). Data is represented as means \pm standard errors. Different letters represent significant differences between treatments at the same body region and experimental period ($p < 0.05$).

No significant alteration was observed for cholinesterase activity ($p > 0.05$) in animals exposed to both Roundup concentrations in both SF and MF (Fig 5A and 5C, respectively). However, after 96h of Roundup exposure a significant reduction of 1.5 times ($p < 0.05$) in AChE activity in animals exposed to both Roundup concentration in the MF (Fig. 5B) was observed. Similar results were observed to PChE activity,

wherein a significant reduction ($p < 0.05$) of 1.4 times was observed in the same fraction (MF) compared to the respective control group (Fig. 5D). SF, AChE and PChE activity was similar between all experimental groups ($p > 0.05$).

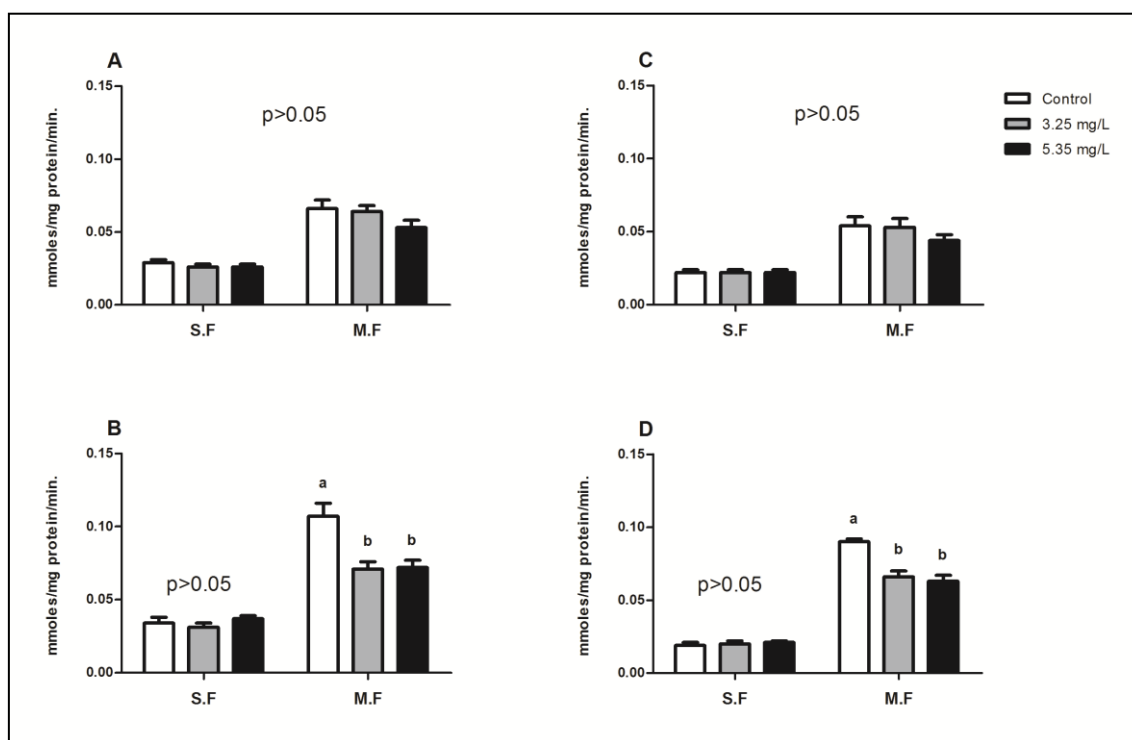


Figure 5- Acetylcholinesterase activity (AChE) (24h-A and 96h-B) and propionylcholinesterase activity (PChE) (24h-C and 96h-D) from *Laeonereis acuta* exposed to Roundup. Data is represented as means \pm standard errors. Different letters represent significant differences between treatments at the same body region and experimental period ($p < 0.05$).

4. Discussion:

The herbicide Roundup does not represent a substance that may specifically target animals, due to the absence of the EPSPS enzyme; however, studies have reported its toxicity to several organisms. In this sense, Mensah *et al.* (2013) described the LC_{50} for different vertebrate and invertebrate species: 12.24 mg/L for the insect *Tanytarsus flumineus*, 4.30 mg/L to the mollusk *Burnupia stenochorias*, 2.84 mg/L and 0.657 mg/L for the crustacean species *Caridina nilotica* and *Daphnia pulex* and 3.25 mg/L for the fish *Oreochromis mossambicus*. In addition, Yadav *et al.* (2013) reported

the Roundup concentration of 3.39 mg/L as the LC₅₀ for the amphibian species *Euflyctis cyanophlyctis*. Considering such studies, the LC₅₀ from those species are lower than that observed in the present study to *Laeonereis acuta* (8.19 mg/L), except for *T. flumineus*. These results demonstrated the higher resistance of *L. acuta* to this herbicide. Such resilience may be related to the natural abiotic environmental fluctuations characteristic of estuarine regions that this species inhabits (Elliot and Quintino, 2007).

Previous literature has described a specific toxicity mechanism of Roundup as the interference in aerobic metabolism, the main energy generation pathway for aerobic organisms. In this sense, Peixoto (2005) demonstrated that Roundup exposure elicits a reduction in membrane potential as well as a 91% reduction in isolated mitochondrion ATP synthase activity of rat liver. These results provide support that this herbicide would interfere with enzymes involved in energy generation. Moreover, it has previously been demonstrated that, when the mollusks *Bulinus truncatus* were exposed to Herfosate (2.13 mg/L) for two weeks, lactate and glucose levels increased while glycogen and pyruvate levels declined (Bakry *et al.*, 2015). Such effects suggest a possible metabolic switch towards anaerobic dependence, due to a reduction in cell respiration caused by herbicide exposure. Furthermore, exposure to 10 mg/L of Glyphosate II (Atanor) leads to an increase in AMP levels (99%), and causes a reduction in the adenylates energy charge in liver and muscle from the fish *Odontesthes bonariensis* (Menéndez-Helman *et al.*, 2015). These studies demonstrate that glyphosate based herbicides would cause perturbations to the energetic balance within animal tissues. As a result, such alterations would induce an overall reduction to the oxygen utilization by tissues. However, no observation in the present study indicated an alteration in the global oxygen consumption in the polychaete *L. acuta*. Such an alteration would occur in a particular tissue or animal body region that may have been

masked by an energetic imbalance in other parts of the animal. Regardless of no result being observed here regarding energetic balance differences, it remains important to consider ROS generation.

As ROS generation rates are directly linked with oxygen consumption (Storey, 1996), a possible alteration in oxidative metabolism would lead to differences in ROS levels. In the present study ROS levels in the posterior region from *L. acuta* were reduced following herbicide exposure. This observation may be related to the lower cuticle width; almost two times lower than other body regions (Rosa *et al.*, 2005). Such reduction suggests that this body region, that possesses a lower diffusion barrier to permit gas exchange, is also more susceptible to the introduction and damaging effects of xenobiotic compounds.

It has been suggested that posterior region maintains a higher antioxidant capacity in comparison to other body regions due to its importance regarding contaminant uptake. However, even with a higher capacity to mitigate ROS, higher production of pro-oxidant molecules was demonstrated in this species (Ferreira-Cravo *et al.*, 2007). In the present study, a reduction in ACAP levels following exposure to the higher herbicide concentration for 24h was observed in all body regions; however, these levels returned to normal after 96h. ACAP levels can be influenced by several factors, such as alterations in the components of the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system (Amado *et al.*, 2009). In this sense, studies indicate that exposure to glyphosate as well as its commercial formulation may cause alteration in some components of the antioxidant defense system. Contardo-Jara *et al.* (2009) verify that exposure for 96h to glyphosate or its formulations in concentrations ranging from 0.05 to 5 mg/L cause an increase in SOD, CAT and GST activity in the annelid *Lumbricus variegatus*. Alterations to the activity of several enzymes involved in the antioxidant

defense system such as SOD, CAT, GST and GPx in the fish species *Carassius auratus* (Lushchak *et al.*, 2009) and *Prochilodus lineatus* (Modesto e Martinez, 2010b), and SOD and CAT in the amazonian teleost surubim (*Pseudoplatystoma sp.*) exposed to Roundup (Sinhorin *et al.*, 2014) have been demonstrated previously. These results are different from those observed in the present study, which indicate that the antioxidant enzymes and GSH from *L. acuta* were not altered after Roundup exposure. The antioxidant defense system is composed of both enzymes and low molecular weight ROS scavengers. Ascorbic acid, glutathione and other molecules are among ROS scavengers which represent important cellular defenses. Abele-Oeschger *et al.* (1994) demonstrated an augmentation to biliverdin levels in the Polychaeta *Nereis diversicolor* exposed to a pro-oxidant situation, an alteration considered the main antioxidant response. Biliverdin and bilirubin are formed by hemoglobin metabolism, with reactions catalyzed by hemeoxygenase enzymes in aerobic conditions; both molecules are considered important antioxidant molecules for polychaete species. Therefore, possible alterations in non-enzymatic antioxidants such as biliverdin, would be related to the reduction in ACAP levels in the posterior region from *L. acuta* exposed to Roundup. However, in the present study, such molecules were not individually evaluated. Moreover, a reduction in ROS levels would cause an alteration in oxidative balance and consequently cause alterations related to ACAP.

Alterations in oxidative balance such as ROS generation and ACAP levels would cause oxidative damage. Modesto and Martinez (2010a) and Sinhorin *et al.* (2014) verified oxidative modifications in lipids and proteins in fish after glyphosate-based herbicide exposure. These authors suggest that damage induction would be related with ROS alterations as well as changes in antioxidant enzymes. Gluszczak *et al.* (2007) verify variation in lipid peroxidation in the fish *Rhamdia quelen* exposed to

Roundup. These authors described a tissue specific pattern with induction in muscle, reduction in the brain, and maintenance of normal levels in liver. The present study observed a reduction in lipid peroxidation in all body regions from *L. acuta* after 24h of Roundup exposure, which was maintained after exposure to 96h in the posterior region. However, an induction was observed in the middle region. Such a reduction would be directly related to a corresponding reduction in ROS production of tissues, as previously discussed. Although an alteration in ROS production and ACAP levels was caused by Roundup exposure, the absence of lipid damage demonstrates that *L. acuta* exposure to the highest Roundup concentration did not cause an oxidative stress situation. It is important to note that this animal species inhabits an estuarine region and this environment is naturally stressful for organisms due to oscillations in the physicochemical parameters such as oxygen availability, pH and temperature (D’Incao *et al.*, 1992; Elliott and Quintino, 2007). Such circadian variations demand that an animal possess an efficient antioxidant defense system, such as the maintenance of higher levels on its antioxidant components in order to neutralize such variations in metabolism. This stronger antioxidant defense system may promote resilience to the possible toxic effects of contaminants like Roundup. However, it has been demonstrated that Roundup possesses other toxicity mechanisms, such as impairment of the nervous system.

Cholinesterases are enzymes that possess important functions in the nervous system. In the present study the activity of acetylcholinesterase (AChE) and propionylcholinesterase (PChE) was analyzed. Roundup exposure for 96h caused a reduction in the activity of both enzymes present in the membrane fraction, although no difference was observed in the soluble fraction. In this context, glyphosate is an organophosphate pesticide (organophosphonate), which is classically described as

different from the others by its incapacity to inhibit cholinesterase (Amarante Júnior *et al.*, 2002). However, it was demonstrated that glyphosate and its commercial formulations would affect cholinesterase activity *in vivo* in fish species (Modesto e Martinez, 2010a) as well as *in vitro* (Sandrini *et al.*, 2013; Braz-Mota *et al.*, 2015). Information regarding glyphosate inhibitory mechanism in ChE is scarce. However, two factors in the present study may contribute to such an effect: possible alterations in the production and liberation of ChE, and/or direct interaction of ChE with xenobiotics, resulting in conformational alteration and impairment in its activity. Sandrini *et al.* (2013) provide further evidence for this in the bivalve mollusk *Perna perna* and in the fish species *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata* wherein *in vitro* glyphosate exposure of tissue extracts cause direct inhibition in acetylcholinesterase activity.

Few studies have investigated the activity of cholinesterase isoforms such as propionylcholinesterase and butyrylcholinesterase in animals under environmental stress. PChE is a pseudocholinesterase, representing an ancestral isoform which can break acetylcholine and other choline esters. Angelini *et al.* (2003) demonstrated the importance of PChE in acetylcholine breakdown in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Although highly important, there is no available information about glyphosate or Roundup in pseudocholinesterases; the present is study the first to demonstrate such effect.

It is important to note that herbicide effects in both AChE and PChE were observed only in the membrane fraction. This observation may be related with the intracellular environment in which the enzyme acts (membrane or soluble form). These cellular characteristics and enzyme cross-linking to cell structures would cause slight alterations in enzyme conformation and consequently alter its affinity to substrates or inhibitors. This effect was demonstrated in enzymes from other metabolic pathways,

where the linkage to membrane phospholipids alters kinetic parameters to glycolytic enzymes (Pour-Rahimi and Nemat-Gorgan, 1987; Michaelidis and Beis, 1990).

5. Conclusion:

Roundup exposure causes toxicity to the Polychaeta *Laeonereis acuta*, specifically causing alteration in both ROS and ACAP levels, the latter of which is likely related to non-enzymatic antioxidants. It was further observed that Roundup exposure causes a perturbation in the cholinergic system via the reduction in AChE and PChE in the membrane fraction. Such biochemical alteration leads *L. acuta* to be more susceptible to other pro-oxidant agents present in the environment.

6. Acknowledgements

Fábio de Melo Tarouco, Robson Rabelo Velasques and Amanda da Silveira Guerreiro are graduate students fellow from the Brazilian agency CAPES - Brazil (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Filipe Guilherme Andrade de Godoi is an undergraduate student followed by the Scientific Initiation Program from CNPq (PIBIC - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Marcio Alberto Geihs is a Post-Doc fellow from CAPES. The authors would like to thank the financial support from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - process 480919/2013-5) and the National Institute of Science and Technology – Aquatic Toxicology (INCT-TA/CNPq).

Cited References:

- Abele-Oeschger, D., Oeschger, R., Theede, H., 1994. Biochemical adaptations of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) to temporarily increased hydrogen peroxide levels in intertidal sandflats. *Marine Ecology Progress Series*. 106, 101–110.
- Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. 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. *Science of the Total Environment*. 407, 2115-2123.
- Amarante Junior, O. P., Santos, T. C. R., 2002. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. 2002. *Química Nova*. 25, 589-593.
- Angelini, C., Amaroli, A., Falugi, C., Bella, G. D., Matranga, V., 2003. Acetylcholinesterase activity is affected by stress conditions in *Paracentrotus lividus* coelomocytes. *Marine Biology*. 143, 623–628.
- Arun, S., Subramanian, P., 1998. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 121, 273–277.
- Bakry, F. A., Ismail, S. M., El-Atti, M. S. A., 2015. Glyphosate herbicide induces genotoxic effect and physiological disturbances in *Bulinus truncatus* snails. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 123, 24-30.
- Beutler, E., 1975. The preparation of red cells for assay. In: Beutler, E. (Ed.), red cell metabolism: A manual of biochemical methods. Grune and Stratton, New York, USA. pp.8–18.

- Botto, F., Iribarne, O. O., Martínez, M. M., Delhey, K., Carrete, M., 1998. The effect of migratory shorebirds on the benthic species of three southwestern Atlantic Argentinean estuaries. *Estuaries*. 21, 4B, 700-709.
- Braz-Mota, S., Sadauskas-Henrique, H., Duarte, R. M., Val, A. L., Almeida-Val, V. M. F., 2015. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere*. 135, 53–60.
- Carneiro, F. F., Rigotto, R. M., Augusto, L. G. S., Friedrich, K., Búriço, A. C., 2015. Dossiê Abrasco - Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde., *Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/ Fundação Oswaldo Cruz, Editora Expressão Popular*. 628p.
- Contardo-Jara, V., Klingelmann, E., Wiegand, C., 2009. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*. 157, 57-63.
- D’Incao, F., Ruffino, M. L., Grubel, K., Braga, C., 1992. Responses of *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda: Grapsidae) to salt-marsh environmental variations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 161, 179–188.
- Elliott, M., Quintino, V., 2007. The Estuarine Quality Paradox, Environmental Homeostasis and the difficulty of detecting anthropogenic stress in naturally stressed areas. *Marine Pollution Bulletin*. 54, 640–645.
- Elman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7, 88–95.

- Ferreira-Cravo, M., Piedras, F. R., Moraes, T. B., Ferreira, J. L. R., Freitas, D. P. S., Machado, M. D., Geracitano, L. A., Monserrat, J. M., 2007. Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). *Chemosphere*. 66, 1367–1374.
- Geracitano, L., Monserrat, J. M., Bianchini, A., 2002. Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 277, 145–156.
- Giesy, J. P., Dobson, S., Solomon, K. R., 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 167,35-120.
- Gluszczak, L., Miron, D. S., Moraes, B. S., Simões, R. R., Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M., Loro, V. L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 146, 519–524.
- Habig, W. H., Jakoby, W. B., 1981. Assays for differentiation of glutathione-S-transferase. *Methods in Enzymology*. 77, 398–405.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology and Medicine*. 19, 3, 271– 280.
- Jones, D. P., 2006. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8, 9, 10, 1865-1879.

- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., Bondy, S. C., 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*. 5, 227-231.
- Lopes, F. M., Junior, A. S. V., Corcini, C. D., da Silva, A. C., Guazzelli, V. G., Tavares, G. and da Rosa, C. E., 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 155, 322-326.
- Lushchak, O. V., Kubrak, O. I., Storey, J. M., Storey, K. B., Lushchak, V. I., 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*. 76, 932-937.
- Menéndez-Helman, R. J., Miranda, L. A., Afonso, M. S., Salibián, A., 2015. Subcellular energy balance of *Odontesthes bonariensis* exposed to a glyphosate-based herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 114, 157–163.
- Mensah, P. K., Palmer, C. G., Muller, W. J., 2013. Derivation of South African water quality guidelines for Roundups using species sensitivity distribution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 96, 24–31.
- Michaelidis, B., Beis, I., 1990. studies on the anaerobic energy metabolism in the foot muscle of marine gastropod *Patella caerulea* (L.) *Comparative Biochemistry and Physiology*. 95, 3, 493-500.
- Misra, H. P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*. 247, 10, 2170-3175.

- Modesto, K. A., Martinez, C. B. R., 2010a. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemospher.* 78, 294-299.
- Modesto, K. A., Martinez, C. B. R., 2010b. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere.* 81, 781-787.
- Nithart, M., Alliot, E., Salen-Picard, C., 1999. Production, respiration and ammonia excretion of two polychaete species in a north Norfolk saltmarsh. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.* 79, 1029–1037.
- Omena, E.P., Amaral, A.C.Z., 2001. Morphometric study of the nereidid *Laeonereis acuta* (Annelida: Polychaeta). *Journal of the Marine Biological Association United Kingdom.* 81, 423-426.
- Palomo, G., Iribarne, O., 2000. Sediment bioturbation by polychaete feeding may promote sediment stability. *Bulletin of marine science.* 67(1), 249–257.
- Palomo, G., Martinetto, P., Iribarne, O., 2004. Changes in the feeding behavior of the deposit-feeding polychaete *Laeonereis acuta* on soft sediments inhabited by burrowing crabs. *Marine Biology.* 145, 657–667.
- Peixoto, F., 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere.* 61, 1115–1122.
- Pour-Rahimi, F., Nemat-Gorgan, M., 1987. Reversible association of ox liver glutamate dehydrogenase with the inner mitochondrial membrane. *International Journal of Biochemistry.* 19, 1, 53-61.

- Rosa, C. E., Iurman, M. G., Abreu, P. C., Geracitano, L. A., Monserrat, J. M., 2005. Antioxidant mechanisms of the Nereidid *Laeonereis acuta* (Anelida: Polychaeta) to cope with environmental hydrogen peroxide. *Physiological and Biochemical Zoology*. 78,4, 641–649.
- Saiz-Salinas, J. I., González-Oreja, J. A., 2000. Stress in estuarine communities: lessons from the highly-impacted Bilbao estuary (Spain). *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 7, 43–55.
- Sandrini, J. Z., Ventura-Lima, J., Regoli, F., Fattorini, D., Notti, A., Marins, L., Monserrat, J. M., 2008. Antioxidant responses in the nereidid *Laeonereis acuta* (Annelida, Polychaeta) after cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 70, 115–120.
- Sandrini, J. Z., Rola, R. C., Lopes, F. M., Buffon, H. F., Freitas, M. M., Martins, C. M. G., Rosa, C. E., 2013. Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In vitro studies. *Aquatic Toxicology*. 130-131, 171-173.
- Sies, H., 1991. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *The American Journal of Medicine*. 91, 31-38.
- Silva, M. D., Peralba, M. C. R., Mattos, M. L. T., 2003. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio Passo do Pilão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 13,19-28.
- Sinhorin, V. D. G., Sinhorin, A. P., Teixeira, J. M. S., Miléski, K. M. L., Hansen, P. C., Moreira, P. S. A., Kawashita, N. H., Baviera, A. M., Loro, V. L., 2014. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters

- and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma sp.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 106, 181–187.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 29, 1715–1733.
- Treadwell, A. L., 1923. Two new species of polychaetous annelids of the genus *Nereis* from Brazil. *Revista do Museu Paulista*. 13, 1237-1243.
- USEPA 2011. United States Environmental Protection Ambiental. Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. Washington, DC.
- Ventura-Lima, J., Ramos, P. B., Fattorini, D., Regoli, F., Ferraz, L., Carvalho, L. M., Monserrat, J. M., 2011. Accumulation, biotransformation, and biochemical responses after exposure to arsenite and arsenate in the estuarine polychaete *Laeonereis acuta* (Nereididae). *Environmental Science and Pollution Research*. 18, 1270–1278.
- White, C. C., Viernes, H., Krejsa, C. M., Botta, D., Kavanagh, T. J., 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. *Analytical Biochemistry*. 318, 175–180.
- Yadav, S. S., Giri, S., Singha, U., Boro, F., Giri, A., 2013. Toxic and genotoxic effects of Roundup on tadpoles of the Indian skittering frog (*Euflectis cyanophlyctis*) in the presence and absence of predator stress. *Aquatic Toxicology*. 132–133, 1– 8.

Discussão geral:

Pode-se perceber que o Roundup é tóxico para o poliqueta *L. acuta* sendo que sua CL_{50} 96h foi de 8,19 mg/L. Quando comparamos com a CL_{50} para outros grupos animais como, por exemplo, o molusco *Burnupia stenochorias*, os crustáceos *Caridina nilotica* e *Daphnia pulex*, o peixe *Oreochromis mossambicus*, (Mensah *et al.*, 2013) e o anfíbio *Euflictis cyanophlyctis* (Yadav *et al.*, 2013), podemos observar uma maior resistência desse poliqueta. Essa resistência pode estar relacionada com o ambiente estuarino onde este animal vive, no qual ocorrem variações em diversos parâmetros como, por exemplo, a disponibilidade de oxigênio, pH, temperatura, (D’Incao *et al.*, 1992; Elliott e Quintino, 2007). Essas variações diárias exigem que os organismos que vivem nessas condições apresentem mecanismos fisiológicos, que os tornem adaptados a viver nesses locais, podendo assim, torná-los mais resistentes a exposição de contaminantes como o Roundup.

Na literatura há relatos que a exposição ao Roundup pode levar a uma alteração da função mitocondrial. Peixoto (2005) verificou uma redução no potencial de membrana mitocondrial bem como a redução de 91% na atividade da enzima ATP sintase em mitocôndrias isoladas de fígado de rato exposto ao Roundup, mas não ao glifosato de forma isolada. Este fato demonstra que o Roundup pode afetar importantes enzimas envolvidas no metabolismo energético aeróbico. Alterações nas taxas da respiração aeróbica poderiam levar a variações no consumo de O_2 . No entanto, no presente trabalho não observamos alterações nesse parâmetro, sendo que possíveis alterações referentes a uma determinada região podem ter sido mascaradas.

Sabendo-se que a geração de EAO está diretamente relacionada com o consumo de oxigênio (Storey, 1996) e portanto uma redução no metabolismo oxidativo poderia

levar a uma diminuição nos níveis de EAO. O fato de que o Roundup pode acarretar uma redução no metabolismo energético pode estar relacionado com a diminuição na geração de EAO na região posterior de *L. acuta* observado em nossos resultados. O fato desta alteração ter sido verificada na região posterior pode ter relação com uma menor espessura da cutícula, que nessa região, é cerca de duas vezes mais fina (Rosa *et al.*, 2005). Essa redução na espessura sugere que pode haver uma facilitação na difusão de O₂ e conseqüentemente ser mais susceptível a alterações nos níveis de EAO. Além disso, por ser mais fina essa região pode ser mais permeável à entrada de contaminantes presentes no meio e por isso seus efeitos diretos poderiam ser maiores nesta região corpórea.

No trabalho de Ferreira-Cravo *et al.*, 2007 foi relatado uma maior ACAP na região posterior de *L. acuta* quando comparado as regiões anterior e média, essa maior capacidade antioxidante pode estar relacionado com o fato dessa região ser uma provável via de entrada para diferentes contaminantes. Porém, mesmo apresentando maior ACAP, os autores observaram maiores níveis de EAO na região posterior. No entanto observamos uma redução na ACAP, após 24h de exposição à maior concentração de Roundup em todas as regiões analisadas. Tal fato é corroborado por uma redução das EAO.

No presente trabalho não identificamos alterações na atividade das enzimas CAT, SOD, GST, GPx e GCL, bem como nos níveis de GSH, quando comparados ao controle, que poderiam justificar essa redução na ACAP. No entanto, levando em consideração que a ACAP pode ser influenciada por vários fatores como, por exemplo, alterações em componentes do SDA enzimático e também do SDA não enzimático (Amado *et al.*, 2009), possíveis alterações em componentes do SDA não enzimáticos poderiam estar relacionados com a redução na ACAP encontrada nesse trabalho.

Abele-Oeschger *et al.* (1994) relataram que o aumento nos níveis de biliverdina, foi uma importante resposta antioxidante não enzimática observada para o poliqueta *Nereis diversicolor*. Além disso, a redução nos níveis de EAO pode causar alterações no balanço oxidativo. Sendo assim uma provável redução nos níveis desse antioxidante não enzimáticos frente à exposição ao Roundup bem como uma perturbação no balanço oxidativo poderiam justificar a queda observada na capacidade antioxidante em *L. acuta*.

Perturbações no balanço oxidativo, pode vir a causar dano oxidativo. Nesse contexto, Modesto e Martinez (2010a) e Sinhorin *et al.* (2014) relataram aumento nos níveis de dano oxidativo em peixes expostos a herbicidas à base de glifosato. Segundo esses autores, esse dano observado pode estar relacionado com alterações de EAO bem como na atividade de enzimas antioxidante como a SOD e CAT. Em *L. acuta* observamos uma redução nos níveis de lipídeos peroxidados em todas as regiões testadas em resposta à exposição por 24h na maior concentração de Roundup. Essa redução nos níveis de lipídeos peroxidados pode estar relacionada com uma possível redução do metabolismo desse organismo, o que justificaria a redução de EAO e consequentemente nos níveis de lipídeos peroxidados.

Além de causar um desbalanço oxidativo em *L. acuta* através da redução de EAO e da ACAP, um outro mecanismos de toxicidade do glifosato e/ou herbicidas à base de glifosato, como o Roundup, é a de causar alterações na atividade de enzimas colinesterases. Essas enzimas possuem um importante papel no sistema nervoso, participando da regulação da transmissão do potencial de ação em sinapses nervosas na junção neuromuscular. Sandrini *et al.* (2013), verificaram, no molusco *Perna perna* e nos peixes *Danio rerio* e *Jenynsia multidentata*, que a exposição *in vitro* ao glifosato leva à uma inibição direta na atividade acetilcolinesterásica. No presente trabalho

verificamos que a exposição por 96h de Roundup nas duas concentrações analisadas causou a redução na atividade das enzimas AChE e PChE na FM. O fato de terem sido observadas diferenças somente na atividade das colinesterases na FM pode estar relacionado com a característica do meio onde a enzima se encontra, pois tais condições podem causar pequenas alterações na conformação dessas enzimas e como consequência, alterar a afinidade pelo substrato ou inibidores. Situações similares já foram relatadas previamente, aonde foi demonstrado que a ligação aos fosfolipídios de membrana pode alterar a atividade de enzimas envolvidas, por exemplo, na via glicolítica (Pour-Rahimi e Nemat-Gorgan, 1987; Michaelidis e Beis, 1990). Apesar de já ter sido relatado a importância da PChE para invertebrados como o ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Angelini *et al.*, 2003), não existem informações sobre a atividade desta enzima em qualquer animal exposto ao glifosato ou à suas formulações comerciais, sendo portanto este o primeiro a relatar tal alteração.

Com base nos resultados podemos perceber que a exposição de *L. acuta* ao herbicida Roundup leva a alterações na geração de EAO e no sistema de defesas antioxidantes, sendo que essas alterações podem estar relacionadas com uma desregulação a nível energético. Além disso, a redução na atividade de importantes enzimas do sistema colinérgico pode levar a um acúmulo de ACh na fenda sináptica e com isso acarretar uma super estimulação desse sistema. Tais modificações bioquímicas poderiam levar a uma maior susceptibilidade desta espécie a agentes ou situações pro-oxidantes de origem natural e antrópica presentes no ambiente.

Bibliografia Geral:

- Abele-Oeschger, D., Oeschger, R., Theede, H., 1994. Biochemical adaptations of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) to temporarily increased hydrogen peroxide levels in intertidal sandflats. *Marine Ecology Progress Series*. 106, 101–110.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2010. Gestão 2005-2010. Principais realizações, first ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.
- Almeida, F. S. 1992. Herbicidas Residuais em diferentes sistemas de preparo do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 27, 595-601.
- Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. 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. *Science of the Total Environment*. 407, 2115-2123.
- Amarante Junior, O. P., Santos, T. C. R., 2002. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. 2002. *Química Nova*. 25, 589-593.
- Angelini, C., Amaroli, A., Falugi, C., Bella, G. D., Matranga, V., 2003. Acetylcholinesterase activity is affected by stress conditions in *Paracentrotus lividus* coelomocytes. *Marine Biology*. 143, 623–628.
- Botto, F., Iribarne, O. O., Martínez, M. M., Delhey, K., Carrete, M., 1998. The effect of migratory shorebirds on the benthic species of three southwestern Atlantic Argentinean estuaries. *Estuaries*. 21, 4B, 700-709.
- BRASIL, 1989. Presidência da República – Casa Civil, subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989.

- CONAMA, 2005 Ministério do Meio Ambiente – Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA Resolução N°357 de 17 de março de 2005. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.
- Contardo-Jara, V., Klingelmann, E., Wiegand, C., 2009. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*. 157, 57–63.
- D’Incao, F., Ruffino, M. L., Grubel, K., Braga, C., 1992. Responses of *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda: Grapsidae) to salt-marsh environmental variations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 161, 179–188.
- Dickinson, D. A., Forman, H. J., 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*. 64, 1019-1026.
- Dzygiel, P e Wieczorek, P., 2000. Extraction of glyphosate by a supported liquid membrane technique. *Journal of Chromatography A*, 889, 93–98.
- Elliott, M., Quintino, V., 2007. The Estuarine Quality Paradox, Environmental Homeostasis and the difficulty of detecting anthropogenic stress in naturally stressed areas. *Marine Pollution Bulletin*. 54, 640–645.
- EMBRAPA. Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/controle.htm>>. Acesso em: 28 julho 2015.
- Ferreira-Cravo, M., Piedras, F. R., Moraes, T. B., Ferreira, J. L. R., Freitas, D. P. S., Machado, M. D., Geracitano, L. A., Monserrat, J. M., 2007. Antioxidant responses

- and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). *Chemosphere*. 66, 1367–1374.
- Fridovich, I., 2004. Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging Cell*. 3,13–16.
- Geracitano, L., Monserrat, J. M., Bianchini, A., 2002. Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 277, 145–156.
- Giesy, J. P., Dobson, S., Solomon, K. R., 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 167,35-120.
- IBAMA. 2009. Manual para requerimento de avaliação ambiental - agrotóxicos e afins<<http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/manualde-procedimento-para-registro-de-agrotoxicos/>>. Acesso em 30 de julho 2015.
- IBAMA. Registro de NA. 2009 Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/areastematicas/agrotoxicos/registro-de-na/>>. Acesso em: 28 julho 2015.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico 2010. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.
- Jones, D. P., 2006. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8, 9, 10, 1865-1879.
- Lopes, F. M., Varela Junior, A. S., Corcini, C. D., Silva, A. C., Guazzelli, V. G., Tavares, G., Rosa, C. E., 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*. 155, 322–326.

- Lushchak, O. V., Kubrak, O. I., Storey, J. M., Storey, K. B., Lushchak, V. I., 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*. 76, 932-937.
- Meneghini, R., 1987. A Toxicidade Do Oxigênio. *Ciência Hoje*. 28, 57-62.
- Mensah, P. K., Palmer, C. G., Muller, W. J., 2013. Derivation of South African water quality guidelines for Roundups using species sensitivity distribution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 96, 24–31.
- Michaelidis, B., Beis, I., 1990. *studies on the anaerobic energy metabolism in the foot muscle of marine gastropod Patella caerulea (L.) Comparative Biochemistry and Physiology*. 95, 3, 493-500.
- Modesto, K. A., Martinez, C. B. R., 2010a. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemospher*. 78, 294-299.
- Modesto, K. A., Martinez, C. B. R., 2010b. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*. 81, 781-787.
- Nwani, C. D., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W.S., 2013. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environmental toxicology and pharmacology*. 36, 539-547.
- Omena, E.P., Amaral, A.C.Z., 2001. Morphometric study of the nereidid *Laeonereis acuta* (Annelida: Polychaeta). *Journal of the Marine Biological Association United Kingdom*. 81, 423-426.

- Palomo, G., Iribarne, O., 2000. Sediment bioturbation by polychaete feeding may promote sediment stability. *Bulletin of marine science*. 67(1), 249–257.
- Palomo, G., Martinetto, P., Iribarne, O., 2004. Changes in the feeding behavior of the deposit-feeding polychaete *Laeonereis acuta* on soft sediments inhabited by burrowing crabs. *Marine Biology*. 145, 657–667.
- Peixoto, F., 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere*. 61, 1115–1122.
- Pour-Rahimi, F., Nemat-Gorgan, M., 1987. Reversible association of ox liver glutamate dehydrogenase with the inner mitochondrial membrane. *International Journal of Biochemistry*. 19, 1, 53-61
- Rosa, C. E., Iurman, M. G., Abreu, P. C., Geracitano, L. A., Monserrat, J. M., 2005. Antioxidant mechanisms of the Nereidid *Laeonereis acuta* (Anelida: Polychaeta) to cope with environmental hydrogen peroxide. *Physiological and Biochemical Zoology*. 78,4, 641–649.
- Saiz-Salinas, J. I., González-Oreja, J. A., 2000. Stress in estuarine communities: lessons from the highly-impacted Bilbao estuary (Spain). *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 7, 43–55.
- Samadi, P., Rouillard, C., Bédard, P. J., Paolo, T. D., 2007. Handbook of Clinical Neurology. Chapter 2- Functional neurochemistry of the basal ganglia. 83, 19-48.
- Sandrini, J. Z., Ventura-Lima, J., Regoli, F., Fattorini, D., Notti, A., Marins, L., Monserrat, J. M., 2008. Antioxidant responses in the nereidid *Laeonereis acuta* (Annelida, Polychaeta) after cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 70, 115–120.

- Sandrini, J. Z., Rola, R. C., Lopes, F. M., Buffon, H. F., Freitas, M. M., Martins, C. M. G., Rosa, C. E., 2013. Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In vitro studies. *Aquatic Toxicology*. 130-131, 171-173.
- Sies, H., 1991. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *The American Journal of Medicine*. 91, 31-38.
- Silva, M. D., Peralba, M. C. R., Mattos, M. L. T., 2003. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio Passo do Pilão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 13,19-28.
- Sinhorin, V. D. G., Sinhorin, A. P., Teixeira, J. M. S., Miléski, K. M. L., Hansen, P. C., Moreira, P. S. A., Kawashita, N. H., Baviera, A. M., Loro, V. L., 2014. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma sp.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 106, 181–187.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 29, 1715–1733.
- Treadwell, A. L., 1923. Two new species of polychaetous annelids of the genus *Nereis* from Brazil. *Revista do Museu Paulista*. 13, 1237-1243.
- USEPA 2011. United States Environmental Protection Ambiental. Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. Washington, DC.
- Ventura-Lima, J., Ramos, P. B., Fattorini, D., Regoli, F., Ferraz, L., Carvalho, L. M., Monserrat, J. M., 2011. Accumulation, biotransformation, and biochemical responses after exposure to arsenite and arsenate in the estuarine polychaete

Laeonereis acuta (Nereididae). *Environmental Science and Pollution Research*. 18, 1270–1278.

Vercesi, A.E., 2003. Mitocôndria ATP, calor e morte. *Ciência Hoje*. 34, 16-23.

Yadav, S. S., Giri, S., Singha, U., Boro, F., Giri, A., 2013. Toxic and genotoxic effects of Roundup on tadpoles of the Indian skittering frog (*Euflyctis cyanophlyctis*) in the presence and absence of predator stress. *Aquatic Toxicology*. 132–133, 1– 8.