

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DO FUNGICIDA RIDOMIL EM *Astyanax altiparanae* (PISCES, CHARACIFORMES)

Francielle Matozo¹

Juliane Aparecida Turek²

Rafael Bueno Noletto³

Resumo: O fungicida Ridomil é classificado como um agrotóxico muito perigoso ao meio ambiente (classe II), de alta persistência e alto potencial de deslocamento no solo, podendo atingir águas subterrâneas. É uma mistura do fungicida sistêmico, Metalaxil-M, e do fungicida de contato Mancozebe, cujos efeitos tóxicos já foram estudados em diversas espécies, porém até o momento nenhum estudo avaliou o potencial genotóxico deste agrotóxico em peixes. No Brasil, ainda são poucos os estudos visando estudar os efeitos dos agentes xenobióticos em espécies nativas, assim no presente estudo é avaliada a toxicidade do pesticida Ridomil na espécie *Astyanax altiparanae* vulgarmente conhecida como "lambari". Os efeitos genotóxicos de uma exposição aguda (96 h) em concentrações de 0,4 mg/L e 0,8 mg/L foram avaliados através do teste do micronúcleo pisceio em eritrócitos de 45 indivíduos. Os resultados apontaram para um efeito genotóxico, pois se observaram diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) frente à contaminação, uma vez que houve aumento na frequência de alterações morfológicas nucleares nos grupos contaminados em comparação ao grupo controle. Esses resultados mostram que a espécie nativa *Astyanax altiparanae* é um ótimo bioindicador para avaliar a toxicidade de compostos químicos no ambiente aquático, principalmente aqueles utilizados na agricultura, como é o fungicida Ridomil, reforçando assim a conscientização sobre o risco ambiental dos agrotóxicos.

Palavras-chave: Agrotóxicos, Peixes, Mutagênese.

EVALUATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF THE FUNGICIDE RIDOMIL ON *Astyanax altiparanae* (PISCES, CHARACIFORMES)

Abstract: The fungicide Ridomil is classified as a hazardous pesticide to the environment (class II), with high persistence and high potential shift in the soil and may reach groundwater. It is a mixture of systemic fungicide, Metalaxyl-M, with the contact fungicide Mancozeb, whose toxic effects have been studied in several species, but so far no studies have evaluated their genotoxic potential in fish. In Brazil, there are few studies that analyze the effects of xenobiotic agents on native species, so the aim of the present report was to evaluate the toxicity of the pesticide Ridomil in *Astyanax altiparanae* commonly known as "lambari". The genotoxic effects of acute exposure (96 h) at concentrations of 0,4 mg/L and 0,8 mg/L were evaluated using the

¹ Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Paraná - Campus União da Vitória, Paraná. E-mail: francielle.matozo@hotmail.com

² Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Paraná - Campus União da Vitória, Paraná.

³ Professor da Universidade Estadual do Paraná, campus de União da Vitória. União da Vitória. Caixa Postal 241. CEP 846000-00. E-mail: rafanoletto@yahoo.com.br

piscine micronucleus test in erythrocytes of 45 individuals. The results indicated a genotoxic effect, significant differences were found between groups ($p < 0,05$), since there was an increase in the frequency of nuclear morphological changes in the contaminated groups compared to the control group. These results show that native species *Astyanax altiparanae* is a good biomarker for assessing the toxicity of chemicals in aquatic environment, especially those used in agriculture, such as the fungicide Ridomil, thereby enhancing awareness of the environmental risk of pesticides.

Key words: Pesticides; Fishes; Mutagenesis.

INTRODUÇÃO

De acordo com a Lei Federal Nº 7.802/89 entende-se por pesticidas, defensivos agrícolas ou agrotóxicos, qualquer substância ou mistura de substâncias com intuito de destruir, repelir ou atenuar pragas e doenças de plantas. É verdade que sem estas substâncias a produção mundial de alimentos seria inferior à produção atual, mas em contrapartida a presença destas substâncias tem causado grandes problemas ambientais, em virtude de interferências nos ecossistemas.

Os fungicidas estão entre os pesticidas mais utilizados para o controle de doenças de plantas. O Ridomil é uma mistura do fungicida sistêmico, Metalaxil-M e do fungicida de contato Mancozebe, desenvolvido principalmente para o tratamento da parte aérea de diferentes culturas. Derivados do ácido ditiocarbâmico, os etileno-bis-ditiocarbamatos apresentam riscos associados ao seu principal produto de metabolização, a etileno-tiouréia, que em camundongos provoca hipotireoidismo, hipertrofia da tireoide e em alguns casos tumores desta glândula (AZEVEDO, 2010). Seus efeitos ecotoxicológicos em peixes ainda não são muito bem entendidos (SRIVASTAVA e SINGH, 2013).

O ambiente aquático é atingido por poluentes através da evaporação e posterior precipitação, e sobretudo em áreas agrícolas, por escoamento superficial, infiltração da água intersticial ou despejo direto de efluentes nos corpos d'água. Muitas das substâncias tóxicas, como metais pesados e compostos orgânicos podem ser transferidas dos tecidos dos organismos para os seus predadores e chegar a concentrações de maiores magnitudes em níveis tróficos superiores (LEMOS e TERRA,

2003). Eles também não só põem em risco a sobrevivência e fisiologia dos organismos, como também induzem alterações genéticas que podem levar a mutações e/ou carcinogênese (FRENZILLI et al., 2004; KATSUMITI et al., 2009; ZEGURA et al., 2009). A utilização de peixes como organismos sentinelas no monitoramento do ambiente apresenta diversas vantagens: representam o maior grupo entre os vertebrados, respondem a baixas concentrações de mutagênicos, desempenham importante papel na rede trófica, podem ser utilizados *in vivo*, em bioensaios e ainda representam uma importante fonte de proteína para populações humanas (VAN DER OOST et al., 2003; ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). Peixes do gênero *Astyanax*, amplamente usados para consumo humano, possuem grande valor ecológico como espécie forrageira (GODOY, 1975). Têm papel essencial no equilíbrio dos ecossistemas, uma vez que são considerados transformadores de partículas orgânicas em proteína, que por sua vez alimentam aves e peixes situados em níveis tróficos superiores (SANTOS, 1981). São sensíveis a mudanças, apresentando-se como bons bioindicadores de alterações ambientais (SAMPAIO e ALMEIDA, 2009).

Entre marcadores citogenéticos, as anormalidades nucleares e os micronúcleos são considerados bons marcadores de citotoxicidade e mutagenicidade, respectivamente (LOBO et al., 2002). O teste do micronúcleo (BOLLER e SCHMID, 1970) em eritrócitos é um ensaio *in vivo* amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (induzem quebra cromossômica) e/ou aneugênicos (induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (HAYASHI et al., 1994). Sua aplicação em células de medula óssea e de sangue periférico é um dos mais estabelecidos ensaios citogenéticos *in vivo* no campo da genética toxicológica (FENECH, 2000).

Diante da ampla distribuição e relativa abundância do gênero *Astyanax*, o presente estudo utiliza *A. altiparanae* como bioindicador para avaliar a genotoxicidade do fungicida Ridomil. Adicionalmente, frente à escassez de dados de genotoxicidade em espécies nativas, esse trabalho se faz necessário na tentativa de gerar bancos de dados mais consistentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Os espécimes de lambari (*Astyanax altiparanae*: 11,12 ± 3,1g de média) foram adquiridos na piscicultura da Universidade Estadual do Paraná, campus de União da Vitória. Os peixes foram divididos aleatoriamente em três aquários (15 animais por tratamento) com 60 L de água filtrada (21 ± 2°C) sob aeração. Antes do início do bioensaio, os peixes foram aclimatados por um período de 24h. Os três grupos foram assim nomeados: (CTRL) controle negativo, (G1) concentração de 0,4 mg/L de Ridomil; (G2) concentração de 0,8 mg/L. Ambas as concentrações do contaminante foram administrados por via hídrica, ou seja, foram misturados à água do aquário, e a duração dos bioensaios foi de 96 horas, não havendo alimentação durante o período. O bioensaio foi semi-estático, trocando cerca de 1/3 da água com reposição do contaminante proporcional. Devido à ausência de dados sobre a toxicidade do Ridomil Gold® MZ em peixes, exceto sua CL50 (96h - 0,54 mg/L) em *Oncorhynchus mykiss*, informado pelo fabricante (Syngenta), a concentração administrada foi baseada em concentrações já testadas de outros fungicidas em bioensaios para avaliar a genotoxicidade em peixes (FERRARO, 2009; GOLDONI e SILVA, 2012) visando assim comparações.

Cada indivíduo foi anestesiado com benzocaína 0,02% (etil-ester-3-ácido aminobenzóico). O sangue periférico foi então coletado a partir da veia caudal com uma seringa heparinizada de 1 mL, e cerca de 15 µL foram colocados sobre uma lâmina limpa para se fazer um esfregaço. Após secagem ao ar por uma hora, as lâminas foram fixadas em álcool 96% por 30 minutos e coradas com corante Giemsa 5% em tampão fosfato pH 6,8.

Teste do micronúcleo píceo

Conforme Heddle (1973) e Schmid (1975), 2000 eritrócitos de cada indivíduo foram examinados em aumento de 1000x e classificados conforme a presença de anomalias nucleares, manifestadas como mudanças da usual forma elíptica do núcleo. A frequência de micronúcleos e de outras anomalias morfológicas nucleares foi comparada entre os grupos contaminados e controle através do teste Kruskal-Wallis

(H). Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Para se comparar a média dos tratamentos utilizou-se o teste Student-Newman-Keuls.

RESULTADOS

Durante o curso do experimento (96 horas) não foi observada mortalidade de nenhum dos espécimes. Embora não tenha sido detectada a presença de micronúcleos, a frequência de alterações morfológicas nucleares foi estatisticamente diferente entre os grupos contaminados e o controle, mas não houve diferença estatística entre os grupos G2 e G3, concentrações de 0,4 mg/L e 0,8 mg/L, respectivamente (Figura 1a). Enquanto o grupo com maior concentração de Ridomil (G3) apresentou maior mediana na taxa de dano, o grupo G2 foi o que apresentou uma maior amplitude de variação, incluindo um *outlier* superior (Figura 1b).

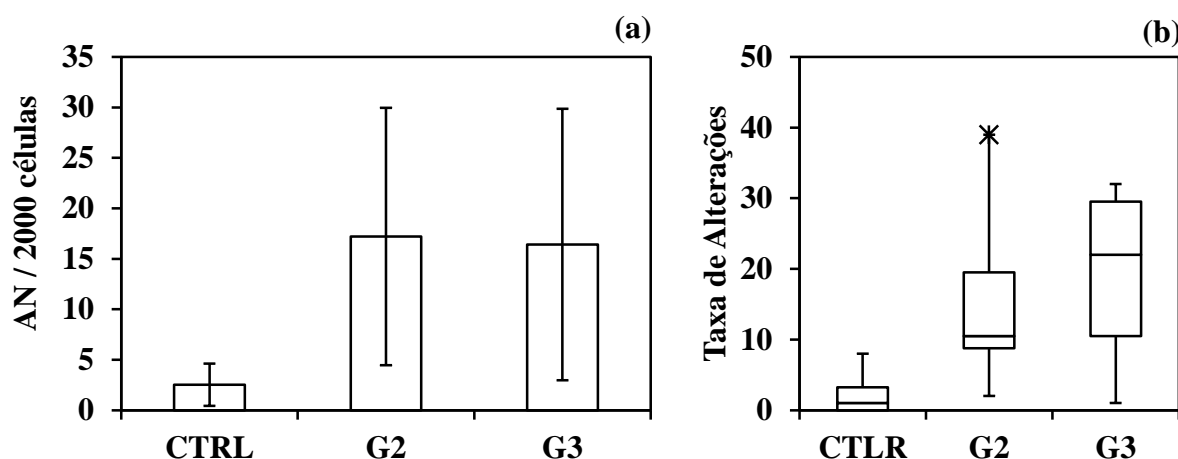


Figura 1. (a) Frequência de anomalias morfológicas nucleares (AN) em 2000 eritrócitos em *Astyanax altiparanae*. CTRL: controle negativo; G2: Ridomil 0,4 mg/L; G3: Ridomil 0,8 mg/L. * $p < 0,05$ estatisticamente significante comparado ao grupo controle ($H = 12,01$; $p = 0,0024$). (b) Comparação entre os diferentes tratamentos quanto ao número de alterações morfológicas nucleares.

DISCUSSÃO

Muitos estudos têm constatado que as espécies do gênero *Astyanax* apresentam uma boa sensibilidade para se analisar os efeitos genotóxicos de xenobióticos em peixes,

sendo dessa forma recomendados como bons bioindicadores para contaminação ambiental (RAMSDORF et al., 2012; CORT e GHISI, 2014; GHISI et al., 2014). Aliado a isso, se observa sua ampla distribuição geográfica e grande diversidade de ambientes aquáticos onde são encontrados. *Astyanax altiparanae*, no presente estudo, confirmou essa peculiaridade ao indicar maior frequência de alterações nucleares quando submetida às concentrações teste do fungicida Ridomil. No entanto, frente à ausência de informações na literatura sobre os efeitos mutagênicos dos ditiocarbamatos (DTC) em peixes, pode-se apenas especular que a ação de Metalaxil-M e/ou Mancozebe (presentes no Ridomil) sobre o material genético, depende de maiores concentrações dos fungicidas ou de um maior tempo de exposição.

No presente estudo a ausência de micronúcleos não necessariamente significa a ausência de efeitos mutagênicos da substância. Esta ausência pode estar relacionada ao efeito citotóxico do Ridomil, o qual ainda não é muito bem entendido. Segundo Ayllón e Garcia-Vazquez (2000), embora micronúcleos não sejam formados, alterações morfológicas nucleares ainda são induzidas devido à influência dos compostos genotóxicos sobre a integridade da lâmina nuclear, proteína responsável por conferir estabilidade e o formato oval regular do núcleo (ALBERTS et al., 2002). Ainda, para a detecção de micronúcleos é necessário que populações de células passem por pelo menos um ciclo celular completo ao longo do período de exposição ao contaminante, e tal período varia entre as espécies, necessitando assim, mais estudos sobre o ciclo celular nestes organismos (UDROIU, 2006).

Uma ação citotóxica pode mascarar a indução de lesões nucleares por agentes genotóxicos, por promover a apoptose de eritrócitos ao invés de formar danos celulares não letais (BRUNETTI et al., 1988). Isto pode acontecer por: (1) efeito inibitório sobre a divisão celular e subsequente impedir a passagem das células afetadas para a circulação periférica (NEPOMUCENO et al., 1997); (2) inibição da síntese do DNA (WILLIAMS e METCALFE, 1992); (3) inibição direta da eritropoiese (DINNEN et al., 1988). Assim frente a um risco de um resultado falso negativo, tais possibilidades devem ser cuidadosamente consideradas.

Quanto ao Ridomil, cujos princípios ativos são Metalaxil-M e Mancozebe, para a sua presença na água, o fabricante (Syngenta) informa: CL50 no peixe *O. mykiss* (96h - 0,54 mg/L), CE50 na alga *Selenastrum capricornutum* (72h - 0,99 mg/L) e CL50 no crustáceo *Daphnia magna* (48h - 1,20 mg/L). As intoxicações por fungicidas ditiocarbamatos frequentemente ocorrem através das vias oral, respiratória e via dérmica, provocando ataxia e hiperatividade, seguida de debilidade com perda do tônus muscular, além de danos renais e hepáticos, efeitos teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos (CARVALHO e BARBOSA, 2013).

Os resultados quanto ao potencial genotóxico do fungicida Mancozebe são conflitantes. Georgian et al. (1983) encontraram um aumento nas frequências de aberrações cromossômicas de modo dose-dependente em ratos e em linfócitos humanos. Calviello et al. (2006) também relatou um aumento significativo de danos ao DNA em células de ratos Wistar expostas *in vitro* ao Mancozebe. Por outro lado, Vasudev e Krishnamurthy (1994) não constataram genotoxicidade significativa em camundongos expostos *in vivo* a uma formulação comercial a base de Mancozebe. Krüger (2009) revelou um aumento na frequência de anormalidades da anáfase-telófase em bulbos de *Allium cepa* expostos a uma formulação comercial do produto. Goldoni e Silva (2012) estudou os efeitos mutagênicos de uma exposição aguda (120 h) a quatro diferentes concentrações (0,3 mg/L, 0,7 mg/L, 1,5 mg/L e 2,5 mg/L) de uma formulação comercial à base de Mancozebe em *Astyanax jacuhiensis*, não encontrando diferenças significativas na frequência de micronúcleos/anormalidades nucleares entre o grupo controle e os quatro tratamentos à base de Mancozebe. Já os resultados do presente estudo indicam que Metalaxil-M e Mancozebe (Ridomil) podem agir sinergicamente sobre *Astyanax altiparanae* causando relevantes danos em nível genotóxico. Igualmente, espécies podem responder diferentemente à presença de xenobióticos, de modo que essas diferenças de toxicidade podem ser explicadas pelas diferenças na biotransformação dos compostos químicos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Ferraro (2009) estudando a espécie *Astyanax bimaculatus* exposta ao fungicida Folicur® corrobora com os resultados do presente estudo a partir das mesmas concentrações de

Ridomil aqui testadas. A concentração de 0,8 mg/L também se mostrou mais danosa após dez dias de exposição, onde o fungicida usado também induziu aumento no número de alterações morfológicas nucleares. O autor sugere que seu efeito possa ser acumulativo, pois estes danos apareceram somente após certo período de tempo agindo diretamente nas células circulantes ou nos eritrócitos em formação. Como estes últimos chegam à circulação após um determinado período de tempo, isto justificaria o fato de que somente depois de certo tempo de exposição, se percebem seus efeitos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a utilização mundial deste fungicida, é de extrema importância a caracterização dos possíveis efeitos genotóxicos deste produto. Estudos sobre a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dessa classe de substâncias são fundamentais para determinar respostas de um dado organismo à contaminação por estes. Adicionalmente, as análises de seus efeitos sobre o material genético são importantes na avaliação de seu papel mutagênico e/ou carcinogênico e ainda seus possíveis efeitos sobre as populações, uma vez que estas substâncias podem atuar de maneira a diminuir a variabilidade genética. Devido à total falta de informações a respeito da genotoxicidade dos etileno-ditiocarbamatos em peixes, novos estudos são necessários para a avaliação dos riscos ao meio ambiente, associados ao uso indiscriminado desta classe de pesticidas.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research** 467, p. 177-186, 2000.

AZEVEDO, M.F.A. Abordagem inicial no atendimento ambulatorial em distúrbios neurotoxicológicos. Parte II - agrotóxicos, **Revista Brasileira Neurologia** 46(4), p. 21-28, 2010.

BOLLER, K.; SCHIMID, W. Chemical mutagenesis in mammals. **Humangenetik** 11(1) p. 35-34, 1970.

BRUNETTI, R.; MAJONE, F.; GOLA, I.; BELTRAME, C. The micronucleus test: examples of application to marine ecology. **Marine Ecology Progress Series** 44, p. 65-68, 1988.

CALVIELLO, G.; PICCIONI, E.; BONINSEGNA, A.; TEDESCO, B.; MAGGIANO, N.; SERINI, S.; WOLF, F. I.; PALOZZA, P. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology** 211, p. 87-96, 2006.

CARVALHO, R.D.E.; BARBOSA, F.H.F. Resíduos de agrotóxicos organofosforados e ditiocarbamatos presentes na cultura de tomate consumidos no estado de Minas Gerais nos anos de 2006, 2007 e 2008: avaliação da exposição humana. **Revista de Biologia e Ciências da Terra** 13(1), 2013.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology** 74, p. 264-271, 2005.

CORT, C.C.W.D.; GHISI, N.C. Uso de alterações morfológicas nucleares no peixe *Astyanax* spp. para avaliação da contaminação aquática. **O Mundo da Saúde (Online)** 38, p. 31-39, 2014.

DINNEN, R.D.; TOMLINSON, S.M.; HART, D.; CHOPRA, C.; HEDDLE, J.A. Application of a micronucleus assay to the peripheral blood cells of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences** 1607, p. 69-78, 1988.

FERRARO, M.V.M. Avaliação de três espécies de peixes - *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research** 455, p. 81-95, 2000.

FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; DEL BARGA, I.; NIGRO, M.; FÖRLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. **Mutation Research** 552, p. 187-195, 2004.

GEORGIAN, L.; MORARU, I.; DRAGHICESCU, T.; DINU, I.; GHIZELEA, G. Cytogenetic effects of alachlor and mancozeb. **Mutation Research** 116, p. 341-348, 1983.

GHISI, N.C.; DE OLIVEIRA, E.C.; FÁVARO, L.F.; DE ASSIS, H.C.S.; PRIOLI, A.J. In Situ Assessment of a Neotropical Fish to Evaluate Pollution in a River Receiving Agricultural and Urban Wastewater. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 93, p. 699-709, 2014.

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil**. Subordem Characidae. Ed. Franciscana. São Paulo, v. 4, p. 847, 1975.

GOLDONI, A.; SILVA, L.B. Potencial mutagênico do fungicida mancozebe em *Astyanax jacuhiensis* (Teleostei: Characidae). **Bioscience Journal** 28 (2), p. 297-301, 2012.

HAYASHI, M.; TICE, R.R.; MACGREGOR, J.T.; ANDERSON, D.; BLakey, D.H.; KIRSCH-VOLDERS, M.; OLESON, Jr. F.B.; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; VANNIER, B. In Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. **Mutation Research** 312, p. 293-304, 1994.

HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research** 18, p. 187-190, 1973.

KATSUMITI, A.; VALDEZ DOMINGOS, F.X.; AZEVEDO, M.; DA SILVA M.D.; DAMIAN, R.C.; ALMEIDA, M. I. M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; CESTARI, M.M.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FREIRE, C.A. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. **Environmental and Monitoring Assessment** 152, p. 209-222, 2009.

KRÜGER, R.A. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa***. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) – Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS. 2009.

LEMOS, C.T.; TERRA, N.R. Poluição: Causas, efeitos e controle. **Genética Toxicológica**. p. 119-137, 2003.

LOBO, E.A.; CALLEGARO, V.L.; BENDER, E.P. **Utilização de algas diatomáceas epilíticas como indicadores da qualidade da água em rios e arroios da região hidrográfica do Guaíba, RS, Brasil**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002.

NEPOMUCENO, J.C.; FERRARI, I.; SPANO, M.A.; CENTENO, A.J. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 30, p. 293-297, 1997.

RAMSDORF, W.A.; VICARI, T.; ALMEIDA, M.I.M.; ARTONI, R.F.; CESTARI, M.M. Handling of *Astyanax* sp. for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. **Environmental Monitoring and Assessment** (Dordrecht. Online) 184, p. 5841-5849, 2012.

SAMPAIO, W.M.S.; ALMEIDA, F.B. **Lambari ("Astyanax bimaculatus") Universidade Federal de Viçosa**. Edição 10 - Agosto de 2009. Disponível em: <<http://www.museudezoologia.ufv.br/bichodavez/edicao10.htm> acesso em: 09/06/2012.

SANTOS, E. **Peixes de água doce**. Ed. Itatiaia. Belo Horizonte, 1981.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research** 31, p. 9-15, 1975.

SRIVASTAVA, P.; SINGH, A. In-vivo study of effects of dithiocarbamates fungicide (Mancozeb) and its metabolite ethylenethiourea (ETU) on fresh water fish *Clarius batrachus*. **Journal of Biology and Earth Sciences** 3(2), p. 228-235, 2013.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology** 79, p. 201-204, 2006.

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

VASUDEV, V.; KRISHNAMURTHY, N.B. In vivo cytogenetic analyses of the carbamate pesticides Dithane M-45 and Baygon in mice. **Mutation Research Letters** 323(3), p. 133-135, 1994.

WILLIAMS, R.C.; METCALFE, C.D. Development of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout. **Aquatic Toxicology** 23, p. 193-202, 1992.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1a edição, 2006.

ZEGURA, B.; HEATH, E.; CERNOSA, A.; FILIPIC, M. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere** 75, p. 1453-1460, 2009.