

Avaliação da atividade mutagênica do Roundup® em *Astyanax altiparanae* (Chordata, Actinopterygii)

DISNER, Geonildo Rodrigo*; ROCHA, Mauro Vendruscolo da **; MIRANDA, Gustavo Borba de***

Resumo

Os herbicidas a base de glifosato, como o *Roundup*®, são amplamente empregados em todo o mundo. Dados sobre a capacidade que esses compostos tóxicos têm de interferir no DNA, causando mutações, são importantes para o monitoramento de populações naturais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a mutagenicidade do *Roundup*® por meio do teste de micronúcleo em peixes (*Astyanax altiparanae*), complementando-se com o teste para toxicidade de inibição do crescimento radicular em *Allium cepa*. Os peixes foram expostos a 5, 7,5 e 10 µl l⁻¹ por 24, 48, 72 e 96 horas; após esse período uma amostra de sangue foi retirada para análise de micronúcleos nos eritrócitos e aberrações nucleares: *lobed*, *notched* e *blebbed*. Os resultados obtidos, com os testes de micronúcleos, mostraram que o *Roundup*® não apresentou efeitos mutagênicos nos organismos testados (*A. altiparanae*), para as diferentes concentrações e tempos de exposição ($P > 0,05$). O teste de inibição do crescimento radicular, utilizando bulbos de cebola expostos às mesmas concentrações usadas nos peixes, forneceu importantes informações complementares. Neste teste, o *Roundup*® se mostrou tóxico na concentração de 10 µl l⁻¹ ($P = 0,003$). Apesar de o *Roundup*® não apresentar efeitos mutagênicos no presente estudo, não foi possível descartar seu efeito tóxico, pois, além da inibição de crescimento radicular em cebola, se mostrou-se letal aos peixes quando expostos a concentrações maiores (20 µl l⁻¹). Estudos adicionais, principalmente utilizando exposições crônicas, são necessários a fim de apurar com maior certeza os efeitos do *Roundup*® e do glifosato no organismo de seres vivos expostos a estes.

Palavras-chave: Glifosato. Micronúcleo. *Astyanax altiparanae*. Mutação.

* Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina; bolsista de Iniciação Científica do CNPq; geonildog@yahoo.com.br

** Mestre em Educação e Ensino; Matemático; Professor da Universidade do Oeste de Santa Catarina; mauro.darocha@unoesc.edu.br

*** Doutor em Genética e Biologia Molecular; Biólogo; Professor da Universidade do Oeste de Santa Catarina; Rua Oiapoc 211, S. M. do Oeste, SC, 89900-000; gustavo.miranda@unoesc.edu.br

Avaliação de Roundup® mutagênica em Astyanax altiparanae (Chordata; Actinopterygii)

Abstract

The glyphosate-based herbicides such as Roundup®, are widely used around the world. Data on the ability of these toxic compounds have to interfere in the DNA caused mutations are important for monitoring natural populations. The aim of this study was to evaluate the mutagenicity of Roundup® by micronucleus test in fish (*Astyanax altiparanae*), complementing with the toxicity test for inhibition of root growth in *Allium cepa*. Fish were exposed to 5, 7.5 and 10 µl l⁻¹ for 24, 48, 72 and 96 hours; after which a blood sample was taken for analysis of micronuclei in erythrocytes and nuclear aberrations: lobed, blebbed and notched. The results obtained with the micronucleus test showed that Roundup® is not mutagenic in the organisms tested (*A. altiparanae*) for different concentrations and exposure times ($P > 0.05$). The test of inhibition of root growth, using onion bulbs exposed to the same concentrations used in fish, provide important additional information. In this test, Roundup® proved to be toxic at the concentration of 10 µl l⁻¹ ($P = 0.003$). Although Roundup® does not have mutagenic effects in the present study, was impossible to discard its toxic effect, because, in addition to inhibition of root growth in onion, it proved lethal to fish when exposed to higher concentrations (20 µl l⁻¹). Further studies are needed, mainly using chronic exposures, to investigate the real effect of the Roundup® and glyphosate in the body of organisms exposed to these.

Keywords: Glyphosate. Micronucleus. Astyanax altiparanae. Mutation.

1 INTRODUÇÃO

O surgimento da agricultura, ocorrido há aproximadamente 10 mil anos (KRÜGER, 2001), possibilitou o desenvolvimento das civilizações e marca o início de uma nova forma de domínio sobre o ambiente e diferentes formas de alterações negativas sobre este. A prática agrícola tornou-se um sério risco ambiental, a partir do momento em que os defensivos agrícolas passaram a ser utilizados em grande escala. Conforme Pinheiro (2006) e Londres

(2011), os agrotóxicos teriam surgido para serem utilizados como poderosas armas químicas de uso bélico destinadas à guerra. Posteriormente, os países industrializados desenvolveram um mercado para esses produtos.

O Roundup® é um conhecido herbicida à base de glifosato [N-(fosfometil) glicina], pós-emergente, sistêmico e não seletivo. Normalmente formulado com sal de isopropilamina de glifosato, e outros ingredientes conhecidos como inertes ou aditivos, adicionados à formulação a fim de aumentar a eficácia do herbicida (GALLI; MONTEZUMA, 2005). Segundo a Anvisa (BRASIL, 2011), o Roundup® está inserido na classificação toxicológica III - Medianamente tóxico, e na classificação do potencial de periculosidade ambiental categoria III - produto perigoso ao ambiente (BRASIL, 2011). O Roundup® induz disfunção do ciclo celular em razão do sinergismo entre o glifosato e surfactantes da fórmula comercial, indicando participação de outros componentes (FRANCABANDIERA et al., 2007).

Segundo Metcalfe (1989), a utilização de respostas biológicas como indicadoras de degradação ambiental é vantajosa em relação às medidas físicas e químicas da água, pois estas registram apenas o

momento em que foram coletadas. Nesse contexto, a mutagenicidade é a capacidade que uma substância química possui de induzir mutações genéticas, e que, sendo fixadas, poderão ser transmitidas durante a divisão celular (CARMELA; LINS; ALÉCIO, 2011).

O teste do micronúcleo é o ensaio, *in vivo*, mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos (NETO et al., 2005), este possibilita a detecção de efeitos mutagênicos provocados por vários agentes químicos e físicos, podendo ser utilizado para avaliação das condições ambientais (FERREIRA; NEPOMUCENO, 2008). Além de ser considerado como um teste rápido, simples e barato na detecção de mutagenicidade (SILVA; NEPOMUCENO, 2010). Micronúcleos são corpúsculos similares ao núcleo principal, formados por cromossomos ou partes destes que se encontram dispersos no citoplasma por não terem sido ligados ao fuso acromático durante a divisão celular (SILVA; NEPOMUCENO, 2010). A formação de alterações morfológicas no envelope nuclear foi descrita por Carrasco, Tilburg e Mayers (1990), que definiram as seguintes categorias de aberrações nucleares: *lobed*, *notched* e *blebbed*. Estas alterações também são relatadas em eritrócitos de peixes como uma consequência da exposição desses animais a contaminantes químicos tóxicos, genotóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos no meio ambiente.

O teste de toxicidade subaguda com *Allium cepa*, também conhecido como inibição do crescimento radicular, foi proposto por Fiskesjo (1993). Este teste indica a toxicidade da água e é realizado utilizando-se parâmetros morfológicos macroscópicos em cebola. Baseia-se no comprimento das raízes do bulbo induzido ao crescimento em água suplementada com o composto que se deseja avaliar.

Considerando a elevada atividade agrícola com o uso de agrotóxicos na região Oeste do Estado de Santa Catarina, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos mutagênicos e tóxicos do herbicida Roundup®, por meio do teste de micronúcleo písceo na espécie *Astyanax altiparanae*, e testar a toxicidade do herbicida em *A. cepa* mediante o do teste de inibição do crescimento radicular.

2 MATERIAIS E MÉTODO

Os procedimentos metodológicos foram realizados nos laboratórios de Zoologia e Biologia Molecular da Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus de São Miguel do Oeste.

O experimento foi dividido em grupos de 10 lambaris jovens e saudáveis da espécie *A. altiparanae*, obtidos a partir de um criadouro comercial. Os animais foram mantidos em aquários com capacidade de 20 litros, sendo a água aerada constantemente e substituída a cada dois dias para garantir a manutenção da qualidade e a constância nas concentrações testadas. Para os ensaios de mutagenicidade foram configurados quatro grupos amostrais, o controle negativo, e outras diferentes concentrações do Roundup® diluído na água, sendo estas: Grupo 1: 5 µl l⁻¹; Grupo 2: 7,5 µl l⁻¹ e grupo 3: 10 µl l⁻¹. As concentrações foram estipuladas baseadas em uma dose passível de danos ao DNA, porém que não ocasionassem a morte precoce por intoxicação. Além disso, também se testou diferentes tempos de exposição para cada concentração. Os tempos de exposição ao composto foram: 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao agente químico.

Transcorrida a exposição dos organismos ao composto diluído na água, o sacrifício destes foi realizado inserindo algodão embebido com éter no opérculo, para anestesia, e uma incisão, com o auxílio de um bisturi, na região ventral. Extraíram-se amostras de sangue por pulsão cardíaca, usando-se

capilar de hematologia heparinizado, e foram realizados esfregaços sanguíneos em lâminas de vidro. Após 24 horas a lâmina foi submetida a um banho com Metanol absoluto por cinco minutos para fixação do material e então corada com Giemsa 5% por 15 minutos. Foram contados 1000 eritrócitos em microscópio óptico comum, no aumento de 1.000X observando a presença de micronúcleos e aberrações nucleares.

Para o teste de inibição do crescimento radicular foram utilizados bulbos de cebolas, de similar tamanho, que apresentavam catáfilos externos brancos. Antes do início do teste, as raízes velhas foram cortadas cuidadosamente evitando prejudicar a área radicular. Os bulbos, no número de cinco por grupo, foram dispostos em recipientes com capacidade de 180 ml, neste, a área radicular das cebolas permaneceu exposta às mesmas concentrações testadas nos peixes (5, 7,5 e 10 $\mu\text{l l}^{-1}$), além do grupo controle que não entrou em contato com o agrotóxico. A água foi renovada a cada dois dias para garantir a manutenção da concentração desejada e para restaurar o montante perdido por evapotranspiração. O crescimento radicular das cebolas foi observado após o sétimo dia de experimento, sendo considerado o tamanho da maior raiz de cada bulbo.

Para análise estatística de variância foi utilizado o teste paramétrico ANOVA, complementado com o Teste T e um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), utilizando-se o programa SPSS, versão 17.0.

3 RESULTADOS

Os resultados da análise dos eritrócitos dos peixes estão dispostos na Tabela 1. Nesta são apresentadas as frequências médias de micronúcleos e aberrações nucleares em 1.000 células analisadas, nas diferentes concentrações e tempos aos quais os exemplares de *A. altiparanae* foram expostos.

Tabela 1 – Dados médios de micronúcleos e aberrações nucleares encontradas em eritrócitos de peixes (*A. altiparanae*) expostos ao Roundup® em diferentes concentrações e tempos, sendo contados 1.000 eritrócitos por lâmina e tendo 10 peixes por grupo amostral

Concentração testada ($\mu\text{l l}^{-1}$)	Tempo de exposição (h)	Frequência média de lobed	Frequência média de notched	Frequência média de blebbed	Frequência média de MN
5	24	1,2	1,2	2,1	0,1
	48	1	1	1,1	0,4
	72	0,6	0,7	1,3	0,5
	96	0,3	1,3	1,6	0
	24	0,6	0,8	0,8	0
7,5	78	0	0,8	0,7	0
	42	0,2	1,2	0,8	0,2
	96	0,1	1,2	0,6	0,2
	24	0,1	0,8	0,8	0,2
10	48	0	0,1	0,5	0,1
	72	0,7	0,6	1	0,1
	96	0	1,1	1	0,3
Controle Negativo	96	0,8	0,7	0,8	0

Nota: Diferenças não significativas entre as concentrações testadas e o controle negativo ($P > 0,05$).

Não houve diferença significativa nos valores encontrados, independente da concentração ou tempo de exposição, quando comparados ao controle negativo ($P > 0,05$). Porém, ao ser investigado o efeito do aumento da concentração ao qual os peixes entraram em contato, constatou-se a mortalidade de 75% dos animais quando expostos a 20 $\mu\text{l l}^{-1}$, e em 25 $\mu\text{l l}^{-1}$ ocorreu a morte de 100% dos peixes em menos de 24 horas.

Da mesma forma, aplicaram-se nas cebolas as concentrações às quais os peixes foram expostos, para se avaliar a toxicidade. Os resultados do comprimento médio das raízes expostas ao agrotóxico estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2 – Comprimento médio das raízes de *A. cepa* expostas ao Roundup® (concentrações de 5, 7,5 e 10 $\mu\text{l l}^{-1}$), para análise da inibição do crescimento radicular como teste de toxicidade

Concentração testada ($\mu\text{l l}^{-1}$)	Comprimento médio da raiz (cm)
5	9,84
7,5	9,78
10	6,38
	4,82

*Nota: Valor estatisticamente significativo ($P = 0,003$).

Houve diferença significativa no tamanho das raízes, em relação ao controle negativo, apenas no grupo que entrou em contato com 10 $\mu\text{l l}^{-1}$ de Roundup® ($P = 0,003$).

4 DISCUSSÃO

Entre os valores obtidos durante a análise de micronúcleos e aberrações nucleares, encontrou-se uma frequência extremamente baixa dessas modificações, não sendo possível atribuí-las à exposição ao herbicida. Não houve diferença significativa em nenhum dos valores relativos a aberrações celulares quando comparados ao controle negativo ($P > 0,05$), sugerindo que nas concentrações e tempos testados o agrotóxico foi incapaz de agir negativamente sobre o DNA, não podendo ser considerado mutagênico por meio desse experimento.

Quando a concentração do agrotóxico foi aumentada, a fim de verificar os efeitos decorrentes, constatou-se que leves aumentos acima das concentrações previamente testadas ocasionavam a mortalidade dos indivíduos. Em concentrações a partir de 25 $\mu\text{l l}^{-1}$ a morte de todos os peixes expostos foi evidenciada, reforçando a ideia de que mesmo o Roundup® não sendo mutagênico é tóxico, considerando que a quantidade administrada foi extremamente reduzida e ocasionou a morte dos indivíduos.

No trabalho de Ramsdorf (2007), utilizando duas espécies de lambaris, uma delas sendo a mesma do presente estudo, evidenciou a funcionalidade dos estudos de monitoramento com peixes, pois a saúde destes reflete a qualidade e a sustentabilidade dos ecossistemas, bem como dos indivíduos que deles fazem uso. No estudo, a autora utilizou os biomarcadores de genotoxicidade para contaminação por agrotóxico: teste de micronúcleo piscoe e ensaio cometa com células sanguíneas, do fígado e do rim em *Astyanax sp B* e *A. altiparanae*. Ao utilizar a espécie *A. altiparanae*, nenhum dos biomarcadores detectou diferença entre os grupos controle e contaminado. Esses resultados, como os do presente

estudo, sugerem que *A. altiparanae* possa ser resistente ao agente xenobionte, ou o teste de micronúcleos não se mostra sensível o suficiente para exposições agudas à substância teste.

Outros estudos também apresentaram resultados semelhantes. Ramsdorf et al (2009) testaram a genotoxicidade de diferentes doses de chumbo inorgânico em traíras (*Hoplias malabaricus*), tendo o teste de micronúcleo e cometa como biomarcadores. No teste de micronúcleo pisco não houve presença de micronúcleos, apenas alterações da morfologia nuclear e aberrações cromossômicas, porém estas não mostraram diferenças significantivas entre grupo exposto e controle. Já Ferraro (2009) utilizou em seu estudo de biomonitoramento outras três espécies de peixes: jundiá (*Rhamdia quelen*), lambari (*A. bimaculatus*) e carpa (*Cyprinus carpio*). Porém, o número de micronúcleos encontrados foi muito pequeno, sendo suas frequências estatisticamente iguais quando comparados grupos controle e expostos, não importando à qual concentração do composto a espécie tenha sido exposta, mesmo sendo analisadas 2.000 células em cada animal.

Estes mesmos trabalhos também utilizaram o teste cometa para analisar a genotoxicidade de agentes xenobiontes. Em ambos os trabalhos este teste se mostrou mais sensível que o teste de micronúcleo, sendo observadas diferenças significantivas entre os grupos controle e expostos. Os resultados obtidos por Ferraro (2009) indicaram que em bioensaio com exposição de 5 a 10, em uma concentração de 1,58 mg l⁻¹, o Roundup® não foi capaz de induzir alterações nas frequências de eritrócitos policromáticos em nenhuma das espécies analisadas. No entanto, quando analisada a exposição de 15 dias, duas espécies (*R. quelen* e *A. bimaculatus*) mostraram diferenças estatísticas significantivas ($P < 0,05$). Estes resultados evidenciam que mesmo a exposição a pequenas concentrações, quando relacionadas com um tempo de ação mais prolongado, podem vir a acarretar algum tipo de dano.

Segundo Bolognesi e Hayashi (2011), a resposta dos peixes a agentes tóxicos é similar a dos mamíferos, o que pode permitir a avaliação de substâncias potencialmente perigosas aos humanos. Porém, a pequena quantidade de DNA por célula e a baixa atividade mitótica em muitas espécies de peixes podem prejudicar análises de danos cromossomais.

Apesar de a mutagenicidade não ter sido evidenciada nos testes anteriormente apresentados, não é possível afirmar que o Roundup® não provoque efeitos adversos aos organismos, pois se observou a toxicidade em *A. cepa* por meio do teste complementar de inibição de crescimento radicular, sendo o princípio do ensaio quanto maior a concentração do composto em contato com os bulbos, menor a divisão celular nas raízes. A partir da concentração de 10 µl l⁻¹, as cebolas apresentaram diferenças significantivas no tamanho radicular, quando comparadas ao controle negativo ($P = 0,003$), comprovando que até mesmo concentrações, que já são demasiadamente reduzidas, podem vir a acarretar algum grau de toxicidade aos organismos. Resultados semelhantes foram relatados por Krüger (2009), nos quais, a autora observou inibição no crescimento radicular de *A. cepa* entre concentrações de 1 a 20 µl l⁻¹, comprovando o alto grau de toxicidade do composto testado. Além disso, a autora observou um aumento significantivo no número de micronúcleos nas células das raízes que estavam em contato com o glifosato.

O teste de toxicidade usando *A. cepa* fornece importantes dados complementares em relação à toxicidade do agrotóxico em estudo, mesmo que o herbicida não tenha apresentado atividade mutagênica. Esse ensaio é bastante aplicado no monitoramento de águas contaminadas, como de efluentes, rios ou outras fontes (SCALON et al., 2008).

Mesmo havendo diversos relatos da capacidade que os agrotóxicos, especificamente o glifosato, têm em causar danos e alterações no material genético de animais, incluindo a espécie humana (PAZ-Y-MIÑO, 2007), no presente experimento não houve efetiva evidência de potencial mutagênico. As concentrações testadas foram demasiadamente baixas, na razão de microlitros. Enquanto eritrócitos micronucleados de órgãos hematopoiéticos refletem um dano genotóxico ocorrido durante o tempo equivalente ao do ciclo celular, aqueles da circulação periférica refletem eventos que ocorreram em um momento igual ao tempo de vida dos eritrócitos em circulação (RAMSDORF et al., 2009). Portanto, a aplicação do teste de micronúcleo a partir de amostras de sangue periférico é particularmente indicada para condições de exposição crônica. Muitas vezes é necessária uma prolongada exposição a fim de acumular a substância tóxica no organismo até uma concentração capaz de causar alterações (BEDOR et al., 2009). O tempo máximo de exposição do presente trabalho foi de 96 horas (exposição aguda), considerando o curto período de tempo, a visualização de um pequeno número de células micronucleadas pode ser justificada.

5 CONCLUSÃO

No presente estudo, o *Roundup*® não apresentou potencial mutagênico em nenhuma das concentrações testadas, ainda assim, o composto mostrou-se tóxico mesmo em ínfimas quantidades. Estudos complementares que utilizem testes de maior sensibilidade na detecção de genotoxicidade, como o teste de cometa, são importantes para que alterações iniciais no organismo sejam detectadas.

O teste de inibição do crescimento radicular em *A. cepa* mostrou-se de grande valia na contribuição de resultados adicionais em relação à toxicidade do composto testado, pois em contato com o composto na concentração de 10 µl l⁻¹, o agrotóxico apresentou relevante potencial tóxico.

REFERÊNCIAS

BEDOR, C. N. G. et al. Vulnerabilidades e situações de riscos relacionadas ao uso de agrotóxicos na fruticultura irrigada. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 12, n. 1, p. 39-49, 2009.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205-213, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Sistemas de Informações sobre agrotóxicos**. Disponível em : <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: out. 2011.

CARMELA, A.; LINS, D.; ALÉCIO, E. **Riscos químicos+EPI+EPC**. Curso Técnico em Química Industrial, Centro de Educação Tecnológica de Pernambuco. Disponível em: <http://recife.ifpe.edu.br/recife/riscos_quimicos.pdf>. Acesso em: 7 nov. 2011.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MAYERS, M. S. Assessment of the piscine micronuclei test as *in situ* biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990.

FERRARO, Marcos Vinícius Mocellin. **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.** 2009. Tese (Doutorado em Genética)–Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FERREIRA, G. R.; NEPOMUCENO, J. C. Poluição do Rio Santa Catarina no Município de Vazante (MG) detectada por meio do Teste do Micronúcleo em Peixes. **Perquirere**, 5. ed., ano 5, jun. 2008.

FISKESJO, G. The Allium test – a potential standard for the assessment of environmental toxicity. In: GORSUCH, J. W. (Ed.); AMERICAN SOCIETY OF TESTING MATERIALS. Special technical publication 1216. **Environmental Toxicology**, p. 331-345, 1993.

FRANCABANDIERA, A. I. et al. Genotoxicidade da associação entre glifosato e extrato celular de *Microcystis aeruginosa* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Biosaúde**, Londrina, v. 9, n. 1-2, p. 3-16, 2007.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do glifosato na agricultura.** São Paulo: ACADCOM, 2005.

KRÜGER, Eduardo L. Uma abordagem sistêmica da atual crise ambiental. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, Ed. UFPR, v. 4, p. 37-43, jul./dez. 2001.

KRÜGER, Rosângela Angelise. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa*.** 2009. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental)–Universidade FEEVALE, Novo Hamburgo, 2009.

LONDRES, Flavia. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida.** Rio de Janeiro: ASPTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190 p.

METCALFE, J. L. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe. **Environmental Pollution**, v. 60, n. 1-2, p. 101-139, 1989.

NETO, J. X. A. et al. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) *in vivo*, **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 2, 2005.

PAZ-Y-MIÑO, C. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 456-460, 2007.

PINHEIRO, S. **Contaminação.** Artigo publicado na Rede de agricultura sustentável. 2006. Disponível em: <<http://www.agrisustentavel.com/toxicos/belico.html>>. Acesso em: 25 out. 2011.

RAMSDORF, Wanessa; et al. M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 158, p. 77-85, 2009.

RAMSDORF, Wanessa. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax* sp. B e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri-UFPR).** Dissertação (Mestrado em Genética)–Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SCALON, M. C. S. et al. Testes de Toxicidade e Genotoxicidade no Rio dos Sinos. ENCONTRO DE GENETICISTAS DO RIO GRANDE DO SUL, 16. , 2008, Porto Alegre. *Anais...Porto Alegre 2008*. Disponível em: <<http://w3.ufsm.br/sbgrs/xviegrs/inv/file/inv52.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2011.

SILVA, A. C.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Perquirere**, Patos de Minas: UNIPAM, v. 7, n. 1, p. 167-179, 2010.

Recebido em 3 de fevereiro de 2012

Aceito em 14 de março de 2012

