

Evaluación de la actividad mutagénica del Carbendazim [Formulación Comercial] en *Drosophila melanogaster* mediante el Test de Mutación Somática y Recombinación

Evaluation of the mutagenic activity of Carbendazim [Commercial Formulation] in *Drosophila melanogaster* by Somatic Mutation and Recombination Test

Elvio Gayozo Melgarejo^{1,*},  Cynthia Rivarola Sena¹,  & Luis Francisco Marín Insfrán^{1,*}, 

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, San Lorenzo, Paraguay.

*Autor correspondiente: luis.marinsfran@gmail.com.

Resumen: Las tierras empleadas para el cultivo en zonas rurales de Paraguay van en aumento durante el transcurso de los años, y esto generalmente va de la mano con el uso de plaguicidas, entre los que son de más uso son los fungicidas de acción sistémica como el 2-metoxicarbamoil-bencimidazol (carbendazim) empleado para controlar el ataque de hongos fitopatógenos. Se ha evidenciado en organismos modelos que el carbendazim podría presentar efectos sobre el sistema reproductor, sin embargo, los estudios genotóxicológicos son escasos. En este estudio se propone como objetivo principal evaluar la actividad mutagénica del carbendazim (Formulación Comercial) en *Drosophila melanogaster* mediante el ensayo SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*). Para ello se trataron larvas de tercer estadio (instar) transheterocigotas *ftr³+/+mwh* de *D. melanogaster* con distintas concentraciones (1%, 5% y 10%) por 72 horas hasta eclosión. La LD₅₀ fue determinada utilizando el análisis Probit a una concentración de 4,848% (R²=0,966). Los datos obtenidos fueron analizados empleando un modelo estadístico Binomial Condicional $\alpha=\beta=0,05$ (Test de Kastenbaum-Bowman), los resultados sugieren que el carbendazim (Formulación Comercial) no presenta efectos mutagénicos a dichas concentraciones, sin embargo, se pudo observar una considerable disminución en la cantidad de individuos eclosionados, lo cual podría indicar un efecto sobre la viabilidad de los individuos tratados.

Palabras claves: Genotoxicidad, carbendazim (Formulación Comercial), mutaciones, pesticida.

Abstract: The land used for cultivation in rural areas of Paraguay is increasing over the years, and this is usually accompanied by the use of pesticides, among the most commonly used are systemic fungicides such as 2-methoxycarbamoyl-benzimidazole (carbendazim) used to control the attack of phytopathogenic fungi. It has been evidenced in model organisms that carbendazim could have effects on the reproductive system, however, genotoxicological studies are scarce. In this study the main objective is to evaluate the mutagenic activity of carbendazim (Commercial Formulation) in *Drosophila melanogaster* through the SMART assay (*Somatic Mutation and Recombination Test*). For this purpose, third instar transheterozygous *ftr³+/+mwh* larvae of *D. melanogaster* were treated with different concentrations (1%, 5% and 10%) for 72 hours until eclosion. The LD₅₀ was determined using Probit analysis at a concentration of 4.848% (R²=0.966). Data obtained were analyzed using a Conditional Binomial statistical model $\alpha=\beta=0.05$ (Kastenbaum-Bowman test). Obtained results suggest that carbendazim (Commercial Formulation) does not present mutagenic effects at these concentrations, however, a considerable decrease in the number of surviving individuals was observed, which could indicate an effect on the viability of the treated individuals.

Keywords: Genotoxicity, carbendazim (Commercial Formulation), mutations, pesticide.

Introducción

Las grandes pérdidas en el rendimiento de los cultivos y en la producción total se deben en gran parte al ataque de hongos filamentosos que generalmente se encuentran en los suelos cultivables (Jansen *et al.*, 1995; Isidrón *et al.*, 2003). Debido a este fenómeno el empleo de sustancias fitosanitarias ha ido en

aumento en los últimos años en nuestro país, y uno de los plaguicidas mayormente utilizado en zonas rurales son los fungicidas (Grabowski *et al.*, 2014).

El fungicida de mayor índice de uso es el carbendazim, también empleado en pinturas sintéticas como preservante al igual que en industrias textiles y de curtidores, pero el uso más relevante es en

Editor responsable: Fernando José Méndez*, 

*Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Dirección de Investigación, San Lorenzo, Paraguay.

Recibido: 27/02/2024

Aceptado: 02/07/2024



2078-399X/2024 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>).

frutos con el fin de preservarlos (Selmanoğlu *et al.*, 2001). Este es de acción sistémica, de contacto y amplio espectro, su aplicación es principalmente foliar, de rápida acción, interfiriendo en la síntesis de ADN en la mitosis fúngica, actúa impidiendo el desarrollo de hifas, formación de apresorios y crecimiento del micelio (Soissa Stephens *et al.*, 2005). Se ha demostrado que el carbendazim administrado en ratas posee una farmacocinética favorable donde la mayor concentración hallada fue en el estómago e intestino menor, las concentraciones en tejido y sangre fueron en el rango de 63 a 164 $\mu\text{g/g}^{-1}$ durante 4 horas, luego la concentración de este fungicida en sangre decía a niveles basales lo cual podría deberse a que el carbendazim posee un alto coeficiente de permeabilidad que va desde $7,74-8,06 \times 10^{-5}$ y $6,8-8,42 \times 10^{-5}$ cm/s^{-1} , también se evidenció que el mismo se elimina en orina y en heces (Jia *et al.*, 2003).

No obstante, en estudios realizados en dosis de 0, 2.5, 5, 7.5 y 10 mg.kg^{-1} de tierra, en *A. cepa*, el carbendazim ha inhibido el índice mitótico, generando anomalías cromosómicas en las células de dicho vegetal, esto es debido a los efectos citogenotóxicos del mismo (Paul *et al.*, 2013).

También se ha demostrado que este fungicida a dosis orales altas que se acercan a la dosis máxima tolerada de 1000 a 2000 $\text{mg.kg}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ durante 5 días en ratas Han-Wistar aumentaron los micronúcleos de la médula ósea y de las células de la sangre periférica, pero no causaron cometas en la sangre total o en el estómago (Bowen *et al.*, 2011). Otro trabajo ha confirmado el incremento en el número de óvulos abortados de *D. magna*, lo que, a su vez, eventualmente esté conectado con la inhibición de la mitosis durante la división de los huevos en la bolsa de cría, además de causar daños en el ADN de las dafnias (Ribeiro *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015).

Asimismo, usando embriones de *Danio rerio* expuestos a este fungicida, la expresión de genes que están involucrados en el eje hipotalámico-pituitario-gonadal / tiroideo (HPG / HPT) se reguló a la baja y los niveles de expresión de dos aromatasa del citocromo P450, CYP19a y CYP19b, aumentaron significativamente después de 20 y 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de

carbendazim respectivamente, lo cual denota el efecto de alteración endocrina de este compuesto (Jiang *et al.*, 2014). A su vez, tiene la capacidad de generar estrés oxidativo, comprobado con el aumento de la expresión de las enzimas CAT, GPX y Mn-SOD durante el desarrollo del pez cebra (Jiang *et al.*, 2015).

Sin embargo, los estudios donde se evalúa la mutagenicidad de dicho plaguicida son muy escasos, es por esto que el objetivo principal de este estudio es evaluar la acción mutagénica del carbendazim (formulación comercial) en *D. melanogaster* mediante el test de mutación somática y recombinación.

Materiales y métodos

Preparación de las diluciones

Se preparó las diluciones según el uso popular del carbendazim (Composición en g.L^{-1} : 2-metoxicarbamoil-bencimidazol 5 g, agentes dispersantes y solvente 100 mL), para ello se realizaron 3 diluciones (1%, 5% y 10%) a partir de una solución stock de carbendazim 50%, la preparación se llevó a cabo con las medidas de bioseguridad sugeridas para su manejo en campana de gases.

Test de mutación y recombinación somática en alas de *Drosophila melanogaster*

Se obtuvieron 400 hembras vírgenes de cepas puras de *Drosophila melanogaster* (*flr³/In(3LR)TM3, ri p^{sep} I(3)89Aa bx^{34e} y Bd^S*, las cuales se encontraban bajo condiciones normales de temperatura ambiente (22-24 °C) y medio de cultivo convencional (Harina de maíz 42 g, Agar-agar 6 g, Sacarosa 24 g, Levadura 26,5 g, Agua destilada 500 mL, 2 mL de Ácido propiónico-Ácido ortofosfórico 1:1 y 2 mL de solución Nipagin 1%).

También se obtuvieron, de frascos con medio de cultivo convencional, 200 machos de cepa pura *mwh/mwh* de *D. melanogaster*. El cruce estándar (SC) se realizó depositando en cada frasco 80 hembras vírgenes cepa *flr³/In(3LR) TM3, ri p^{sep} I(3)89Aa bx^{34e} y Bd^S* con 40 machos de la cepa *mwh/mwh*, por 72 ± 5 horas (Graf *et al.*, 1984; Graf *et al.*, 1992). Y fueron cultivadas en medio ovopositor por 72 ± 5 horas a temperatura ambiente 22-24 °C (Graf

et al., 1984; Graf et al., 1992).

Transcurridas las 72 ± 5 horas se procedió a la extracción de cien larvas de tercer estadio de cada frasco, las cuales fueron depositadas en diferentes contenedores con medio instantáneo (1,5 gramos de puré de papa instantáneo rehidratado con 5 mL con las diluciones del carbendazim 1%, 5% y 10%, agua destilada como control y Ciclofosfamida 0,3%) preparado en el momento de traspaso, para tratamiento vía oral por 72 horas (Graf et al., 1984; Raman & Paul, 2011).

Una vez eclosionados los imágnes fueron seleccionados al azar 10 individuos trans-heterocigotas *mwh*⁺/*+flr*³ de cada tratamiento (5 individuos por sexo), de las cuales se extrajeron las alas con ayuda de una lupa estereoscópica Carl Zeiss y montadas (20 alas por lámina y por tratamiento) con Solución de Faüre (Goma arábica 300 g, Glicerol 20 mL, Hidrato de Cloral 50 g, y Agua destilada 50 mL).

La observación de las láminas se realizó con ayuda de un microscopio óptico compuesto donde se observaron las regiones de las alas analizadas que fueron solamente las A, B, C', C, D', D, E, y también los márgenes que separan a las mismas (Rodrigues de Andrade et al., 2004).

Se cuantificó el número de clones mutantes en las alas observadas y se los clasificó según el tipo de marcador expresado; Manchas Simples Pequeñas (MSP) con una o dos células (*mwh* o *flr*³), Manchas Simples Grandes (MSG) con más de tres células (*mwh* o *flr*³) y Manchas Gemelas (MG) con un

área *mwh* y otra *flr*³ adyacente (Graf et al., 1984; Rodrigues de Andrade et al., 2004).

Análisis estadístico de datos

La dosis letal 50 (DL_{50}) se determinó a partir de los datos obtenidos empleando el análisis Probit (Finney, 1952). También se analizaron mediante tablas estadísticas de acuerdo con Frei y Würgler (1988), que corresponde a un modelo estadístico Binomial Condicional (Test de Kastenbaum-Bowman) (Kastenbaum & Bowman, 1970), con niveles de significancia $\alpha = \beta = 0,05$ (Kastenbaum & Bowman, 1970), donde las frecuencias de mutaciones se utilizaron directamente en la determinación del valor mínimo de mutaciones. Los gráficos estadísticos fueron realizados empleando el programa Excel (Microsoft Office 2016, USA).

Resultados y discusión

La contabilización de los adultos eclosionados por cada 100 larvas da como resultado para el tratamiento Control un total de 94 individuos y con la Ciclofosfamida al 0,3% un total de 40 individuos. Para las diferentes concentraciones del carbendazim los resultados fueron los siguientes: al 1% el número total de individuos fue de 87, al 5 % un total de 34 individuos y al 10% un total de 25 individuos contabilizados. A partir de estos datos se ha determinado la dosis letal 50 (Fig. 1) de la sustancia empleada para este estudio que fue la concentración de 4,848%, hallándose linealidad

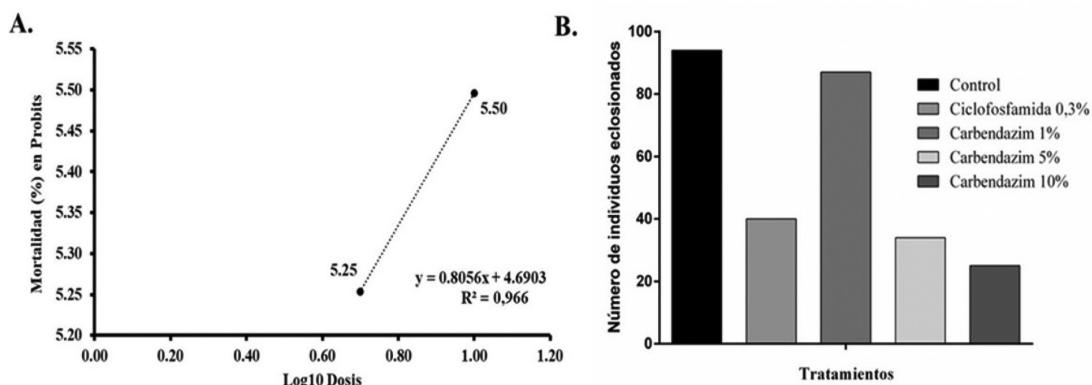


Figura 1. Dosis letal y contabilidad de moscas adultas. A) Análisis Probit DL_{50} de. B) Cantidad de imágnes de *Drosophila melanogaster* por unidad de tratamiento.

Tabla 1. Análisis estadístico del potencial mutagénico del carbendazim en individuos *mwh+/+flr³* de *Drosophila melanogaster*. Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988): +) positivo. -) negativo. i) inconclusivo. m) factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia $\alpha = \beta = 0,05$. ^{a)} Incluso las manchas simples *flr³* raras. Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para manchas gemelas. **MSP)** Manchas Simples Pequeñas. **MSG)** Manchas Simples Grandes. **MG)** Manchas Gemelas. **TM)** Total de Manchas.

Concentraciones (%)	Número de alas	MSP (1-2 céls) ^a m = 2		MSG (>2 céls) ^a m = 5		MG m = 5		TM m = 2	
		0.00	(00)	0.00	(00)	0.00	(00)	0.00	(00)
Control	20	0.00	(00)	0.00	(00)	0.00	(00)	0.00	(00)
Ciclofosfamida 0,3%	20	2.20	(44)	+	0.65	(13)	+	0.25	(05)
Carbendazim 1%	20	0.00	(00)	i	0.00	(00)	i	0.00	(00)
Carbendazim 5%	20	0.15	(03)	i	0.00	(00)	i	0.00	(00)
Carbendazim 10%	20	0.30	(06)	+	0.05	(01)	i	0.00	(00)
								0.35	(07)
									+

y ajuste a la curva $R^2 = 0,966$.

Estos resultados podrían indicar que a mayor concentración del fungicida se genera una disminución en la cantidad de individuos en la población tratada, cambiando la tasa de natalidad de imagos de las mismas, lo cual podría estar afectando también la estructura poblacional de estas. Esto concuerda con lo descrito por Slijkerman *et al.* (2004), quienes han demostrado en ensayos con organismos acuáticos como *Daphnia magna*, fitoplancton y zooplancton que altas concentraciones del fungicida produce cambios en la estructura poblacional de *Daphnia magna* y cambios en la estructura de las comunidades de zooplancton y fitoplancton.

A su vez, Andrade *et al.* (2016), usando *Danio rerio* (pez cebra) demostraron que el carbendazim es moderadamente tóxica para los embriones con una CL_{50} de 1,76 mg.L⁻¹ a 96 horas de exposición, en tanto, han visualizado efectos en el desarrollo de los embriones al desencadenar una serie de anomalías como ser la incidencia de edema, deformaciones de la columna vertebral, la cabeza y la cola, reducción de la frecuencia cardiaca, la longitud del cuerpo y la tasa de consumo del saco vitelino.

A las 24 horas, no causó mortalidad significativa pero los embriones expuestos a concentraciones superiores a 1,3 mg.L⁻¹ exhibieron deformidades en la cola y columna vertebral que presentaban un EC_{50} de 1,48 mg.L⁻¹. A las 48 horas, se observó un incremento en la frecuencia de edemas, con una EC_{50}

de 1,26 mg.L⁻¹ y curvatura de la columna vertebral que presentaban una EC_{50} de 1,53 mg.L⁻¹. A las 72 horas, junto con el aumento de las malformaciones, se redujo la tasa de eclosión de embriones expuestos a una EC_{50} de mg.L⁻¹ y visualizaron malformaciones en la cabeza y los ojos, curvatura de la columna y edemas pericárdicos.

Los datos obtenidos en el tratamiento control evidenciaron un total de ocho clones mutantes, siendo estos siete del tipo MSP y uno del tipo MSG. Para el agente mutágeno empleado (Ciclofosfamida 0,3%) se contabilizó un total de 62 clones mutantes, 44 del tipo MSP, 13 del tipo MSG y 5 MG. En el tratamiento con el carbendazim 1% fueron nulos ya que no se observó ningún clon mutante (MSP, MSG y MG) en las alas de los individuos tratados. Para el tratamiento con carbendazim 5% se observaron un total de tres clones mutantes del tipo MSP, y ninguna del tipo MSG y MG. En el tratamiento del carbendazim 10% se observaron un total de siete clones mutantes, distribuidas en seis del tipo MSP, una del tipo MSG, y ninguna del tipo MG (Tabla 1, Fig. 2).

Estos resultados concuerdan con la hipótesis planteada en este estudio, ya que se encontraron una correlación entre el número de clones mutantes presentes y la concentración del fungicida, donde a bajas concentraciones no se observaron cantidades significativas de mutaciones lo que se ajusta a lo descrito por Ilyushina (2020), que empleando el

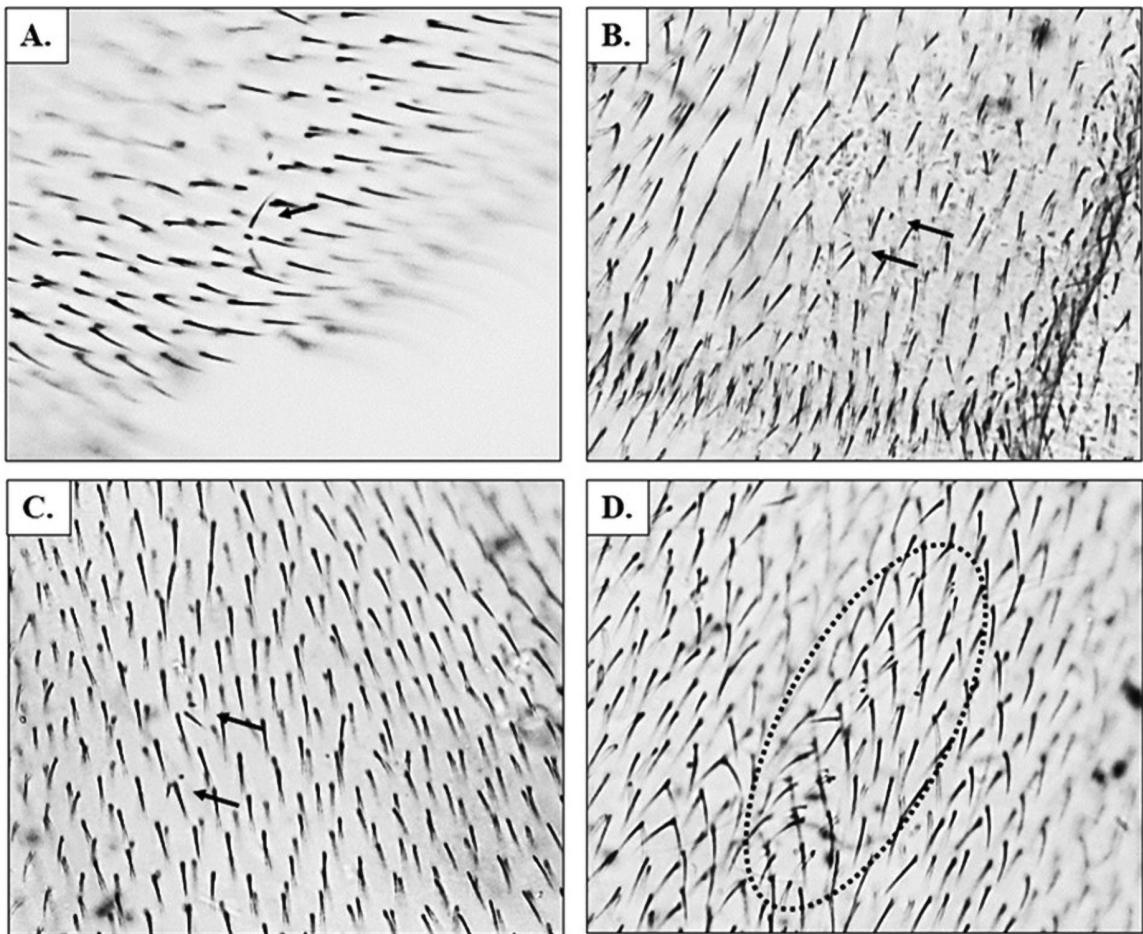


Figura 2. Clones mutantes observados en alas de individuos *mwh*^{+/+}*ftr*³ de *Drosophila melanogaster* tratadas con carbendazim. A) Mancha simple pequeña de tipo *mwh* (flecha), tratamiento al 5%. B-C) Manchas simple pequeña tipo *mwh* (flechas), tratamiento al 10%. D) Mancha simple grande tipo *mwh* (elipse), tratamiento al 10%.

método de electroforesis alcalina en gel unicelular (ensayo cometa), demostró que este fungicida de grado técnico no inducía daño al ADN en la médula ósea y las células hepáticas de ratones CD-1 en el rango de dosis de 62,5 a 2000 mg.kg⁻¹ de peso corporal.

En tanto, el carbendazim al 10% presenta efecto mutagénico tanto para los clones MSP y TM, lo que también fue demostrado por Palanikumar *et al.* (2014), mediante la observación de un aumento de los micronúcleos en los eritrocitos de Chanos (pez de leche) a mayor dosis de carbendazim, lo cual se ajusta a lo reportado por Verma *et al.* (2018) que mediante el estudio de raíces de *Allium cepa*

observaron un incremento del daño citogenético relacionado con los días después de la aplicación y de la exposición al fungicida.

A su vez, Salihu *et al.* (2015) empleando 50 mg.kg⁻¹ en ratas Wistar machos adultos encontraron una disminución significativa en el recuento total de glóbulos rojos, linfocitos y plaquetas, pero hubo un aumento en el conteo de neutrófilos, además, observaron una elevación en todos los marcadores de daño hepático y renal en el plasma de ratas. El hígado de estas ratas mostró área focal de necrosis, leve dilatación de sinusoides con presencia de células inflamatorias, donde las células que recubren el conducto mostraban núcleos vesiculares y un

aumento en la relación núcleocitoplasmática.

Por su parte, Jiang *et al.* (2015) expusieron larvas de pez cebra a concentraciones de 4, 20, 100 y 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de carbendazim para 4 y 8 días, donde hallaron que los niveles de ARNm de catalasa, glutatión peroxidasa y manganeso superóxido dismutasa (Gato, GPX, Manganeso/SOD) aumentaron después de la exposición a diferentes concentraciones del fungicida durante estos días. La regulación al alza de P53, Apaf1, Cas 8 y la regulación a la baja de Bcl2, Mdm2, Cas 3 en la vía de la apoptosis, así como el aumento en la expresión de citoquinas y quimioquinas, incluyendo CXCL-C1C, CCL1, IL-1b, IFN, IL-8 y TNF α , sugirieron que este fungicida podría desencadenar la apoptosis y la respuesta inmunitaria durante el desarrollo de las larvas de pez cebra. Con estos datos, se podría decir que el carbendazim induce simultáneamente múltiples respuestas durante el desarrollo de las larvas del pez cebra y que podrían estar presentes en interacciones bidireccionales entre el estrés oxidativo, la vía de la apoptosis y los sistemas inmunitarios.

Los resultados obtenidos en este estudio también se ajustan a lo descrito por Kara *et al.* (2019) quienes determinaron que no hubo diferencias significativas entre los grupos con exposición a este fungicida en las células SHSY5Y, sin embargo, en las células NRK, el daño al ADN aumentó significativamente dependiendo de la dosis empleada.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que al aumentar las dosis de concentraciones de carbendazim empleadas se puede observar una correlación entre las concentraciones del carbendazim y la cantidad de clones mutantes, detectándose a una alta concentración de 10% un potencial mutagénico a los individuos de *D. melanogaster* para dos de sus marcadores empleados (MSP y TM).

Se recomienda realizar una mayor exposición de los tratamientos a las larvas de *D. melanogaster*, también realizar otros bioensayos (test de micronúcleos en sangre periférica de *Danio rerio*, test cometa en *D. melanogaster*, y el análisis de alteraciones nucleolares en células meristemáticas

de *Allium cepa*) a modo de reconfirmar con otros ensayos los resultados encontrados en este estudio.

Agradecimiento

Expresamos nuestro agradecimiento a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y al Rectorado de la UNA, por el apoyo otorgado para el desarrollo de esta investigación.

Fuente de financiamiento

Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Nacional de Asunción, mediante la firma en el año 2017.

Contribución de los autores

Los autores contribuyeron de igual manera en el desarrollo de la investigación y en la elaboración de este artículo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Literatura citada

- Andrade, T.S., Henriques, J.F., Almeida, A.R., Machado, A.L., Koba, O., Giang, P.T., Soares, A.M.V.M. & Domingues, I. (2016). Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 170: 390–399.
- Bowen, D.E., Whitwell, J.H., Lillford, L., Henderson, D., Kidd, D., McGarry, S., Pearce, G., Beevers, C. & Kirkland, D.J. (2011). Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 722(1): 7–19.
- Grabowski, C., Orrego, A. & Soilán, L. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en Paraguay. Pp. 309–319, *in* Bettoli, W., Rivera, M.C., Mondino, P., Montealegre, J.R. & Colmenárez, Y.C. (Eds.), *Control biológico de enfermedades de plantas en*

- América Latina y el Caribe.* Montevideo: Facultad de Agronomía de la Universidad de la República. 404 pp.
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. & Kale, P.G. (1984). Somatic Mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, 6: 153–188.
- Graf, U. & Singer, D. (1992). Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 8(1): 15–21.
- Frei, H. & Würgler, F.E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 203(4): 297–308.
- Finney, D.J. (1952). Probit Analysis. Segunda Edición. *Journal of the Institute of Actuaries*, 78(3): 388–390.
- Ilyushina, N.A. (2020). Cytogenetic effects of carbendazim on mouse bone marrow cells. *Russian Journal of Genetics*, 56(10): 1193–1202.
- Isidrón, M.P., Allaert, K., Isla, L.H., Suárez, N., García, S.T., Navarro, C.P. & García, M.R. (2003). Determinación de la actividad alelopática de extractos vegetales sobre algunos hongos fitopatógenos del suelo. *Centro Agrícola*, 30(1): 64–69.
- Jansen, D.M., Stoorvogel, J.J. & Schipper, R.A. (1995). Using sustainability indicators in agricultural land use analysis: an example from Costa Rica. *NJAS Wageningen Journal of Life Sciences*, 43(1): 61–82.
- Jia, L., Wong, H., Wang, Y., Garza, M. & Weitman, S.D. (2003). Carbendazim: disposition, cellular permeability, metabolite identification, and pharmacokinetic comparison with its nanoparticle. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(1): 161–172.
- Jiang, J., Wu, S., Wu, C., An, X., Cai, L. & Zhao, X. (2014). Embryonic exposure to carbendazim induces the transcription of genes related to apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2): 493–500.
- Jiang, J., Wu, S., Wang, Y., An, X., Cai, L., Zhao, X. & Wu, C. (2015). Carbendazim has the potential to induce oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption during zebrafish larvae development. *Toxicology In Vitro*, 29(7): 1473–1481.
- Kara, M., Jannuzzi, A.T. & Yön, S. (2019). In-vitro investigation of the cytotoxic and genotoxic effects of benzimidazole group pesticides benomyl and carbendazim. *J. Toxicol. Cur. Res.*, 3: 7.
- Kastenbaum, M.A. & Bowman, K.O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*, 9: 527–549.
- Palanikumar, L., Kumaraguru, A.K., Ramakritnan, C.M. & Anand, M. (2014). Toxicity, biochemical and clastogenic response of chlorpyrifos and carbendazim in milkfish *Chanos chanos*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(3): 765–774.
- Paul, A., Nag, S. & Sinha, K. (2013). Cytological effects of Blitox on root mitosis of *Allium cepa* L. *IJSRP Int J Sci*, 3: 1–7.
- Raman, S. & Paul, S.F. (2011). Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in Drosophila*, 11(3): 22–24.
- Ribeiro, F., Ferreira, N.C., Ferreira, A., Soares, A.M. & Loureiro, S. (2011). Is ultraviolet radiation a synergistic stressor in combined exposures? The case study of *Daphnia magna* exposure to UV and carbendazim. *Aquatic Toxicology*, 102(1–2): 114–122.
- Rodrigues De Andrade, H.H., Reguly, M.L. & Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test. Pp. 389–412, in Henderson, D.S. (Ed.). *Drosophila cytogenetics protocols*. Totowa: Humana Press. xiii + 468.
- Salihu, M., Ajayi, B.O., Adedara, I.A. & Farombi,

- E.O. (2015). 6-Gingerol-Rich Fraction from *Zingiber officinale* Prevents Hematotoxicity and Oxidative Damage in Kidney and Liver of Rats Exposed to Carbendazim. *Journal of Dietary Supplements*, 13(4): 433–448.
- Selmanoğlu, G., Barlas, N., Songür, S. & KocS-
kaya, E.A. (2001). Carbendazim-induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats. *Human & Experimental Toxicology*, 20(12): 625–630.
- Silva, A.R.R., Cardoso, D.N., Cruz, A., Lourenço, J., Mendo, S., Soares, A.M. & Loureiro, S. (2015). Ecotoxicity and genotoxicity of a binary combination of triclosan and carbendazim to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115: 279–290.
- Soissa Stephens, H., Maige, W., Molinos Beltran, S. & Aguayo González, F. (2005). *Prevención de riesgos en el uso de plaguicidas: por un trabajo sano y seguro*. Santiago: Asociación Chilena de Seguridad. 48 pp.
- Slijkerman, D.M., Baird, D.J., Conrad, A., Jak, R.G. & Van Straalen, N.M. (2004). Assessing structural and functional plankton responses to carbendazim toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(2): 455–462.
- Verma, S. & Srivastava, A. (2018). Cyto-genotoxic consequences of carbendazim treatment monitored by cytogenetical analysis using Allium root tip bioassay. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(4): 1–10.