

O inseticida Thiodan[®] sobre o desenvolvimento folicular de lambaris

Thiodan[®] insecticide on the follicular development of lambaris

Lucas Marcon¹ Paulo Burlamaqui da Silva Filho¹ Diego Senra Lopes¹ Ann Honor Mounteer^{II}
Laércio dos Anjos Benjamin^{*}

RESUMO

O Thiodan[®] é um organoclorado a base de endosulfan que pode causar alterações morfológicas nos tecidos de peixes, dependendo da concentração e tempo de exposição. Este estudo teve como objetivo determinar a LC_{50} -96h do Thiodan[®] (endosulfan 350g L⁻¹) para fêmeas de lambaris *Astyanax bimaculatus* em período de reprodução e analisar a morfologia do desenvolvimento folicular em diferentes concentrações do agrotóxico. Foram feitos quatro experimentos: 1) sem aclimação e sem alimentação; 2) sem aclimação e alimentados; 3) com aclimação de 10 dias e sem alimentação; 4) com aclimação de 10 dias e alimentados. A LC_{50} -96h determinada foi de 13,6µg L⁻¹, com intervalo de confiança de 10,1 a 18,4µg L⁻¹ (P<0,05). Em todos os experimentos, foram utilizadas três concentrações diferentes do Thiodan[®] inferiores à LC_{50} -96h pré-determinada em laboratório de acordo com a NBR 15088 (ABNT, 2007). Os lambaris foram expostos ao Thiodan[®] por 96 horas em três concentrações subletais de 1,15; 2,3 e 5,6µg L⁻¹ e um grupo controle, livre de agrotóxico. Morfologicamente, percebeu-se que a ação do Thiodan[®] nas concentrações subletais não alterou a morfologia do desenvolvimento folicular. Porém, o diâmetro folicular nos folículos secundários no experimento com aclimação/com alimentação expostos ao Thiodan[®] foi maior em relação ao grupo controle (P<0,05). Esses dados sugerem que a reprodução pode ser afetada pelo produto químico e pode causar comprometimento no desenvolvimento folicular.

Palavras-chave: *Astyanax bimaculatus*, meio ambiente, ovário, folículos.

ABSTRACT

Thiodan[®] is an organochlorine based in endosulfan which can cause morphological changes in fish tissues exposed to it depending on the concentration and exposure time. This study aimed to determine the LC_{50} -96h of Thiodan[®] (350g L⁻¹ endosulfan) for lambaris females of *Astyanax bimaculatus* in a reproduction period and analyze the morphology of follicular development in

different experiments. Four experiments were performed: without adaptation and no feeding, feeding without adaptation, with adaptation and without feeding, with adaptation and feeding. The LC_{50} -96h determined was 13.6µg L⁻¹, with a confidence interval from 10.1 to 18.4µg L⁻¹ (P<0.05). The lambaris were exposed to Thiodan[®] for 96 hours in three sub-lethal concentrations of 1.15, 2.3 and 5.6µg L⁻¹ and without pesticides control group. Morphologically, it was noted that the action of Thiodan[®] in sub-lethal concentrations did not alter the morphology of follicular development. However, the follicular diameter in secondary follicles in the experiment with adaptation and feeding exposed to Thiodan[®] was higher relative to the control group (P<0.05). These data suggest that reproduction may be affected by chemical and can cause impairment in the follicular development.

Key words: *Astyanax bimaculatus*, environment, ovary, follicles.

INTRODUÇÃO

O Thiodan[®] é um inseticida de uso comercial que consiste na mistura de dois isômeros ativos, sendo 70% α-endosulfan e 30% β-endosulfan. O endosulfan é um hidrocarboneto clorado usado como inseticida de amplo espectro, que controla insetos por ação de contato e ingestão (CHAKRABARTY et al., 2012). Atualmente, é um produto banido em vários países pela sua alta toxicidade (MOLINA, 2010). Seu uso é recomendado especialmente em culturas de algodão, cacau, café, cana-de-açúcar e soja (Bayer, 2014). A utilização de produtos a base de endosulfan no Brasil é estimada em 4,4 milhões de toneladas em uma área de 2,2 a 3,6 milhões de hectares, podendo representar cerca de 40% do consumo mundial

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: laercio@ufv.br. *Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Engenharia Civil, UFV, Viçosa, MG, Brasil.

deste organoclorado, segundo dados do Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP, 2010).

O tóxico pode chegar ao meio aquático pelo escoamento superficial e infiltração no solo por meio da irrigação agrícola e das chuvas, colocando em risco os organismos que ali residem (CAPKIN et al., 2006; GLOVER et al., 2007). Conseqüentemente, o endossulfan pode se acumular nos tecidos dos organismos, como já observado por HENRY & KISHIMBA (2006) na espécie de peixe *Oreochromis niloticus*. A sensibilidade ao endossulfan em organismos aquáticos tem sido descrita na literatura (CAPKIN et al., 2006; BALLESTEROS et al., 2007; PEREIRA et al., 2012). O produto é tóxico para os peixes e outros organismos aquáticos, mesmo em doses muito pequenas (PEREIRA et al., 2012), assim como verificado por BALLESTEROS et al. (2007), com peixes adultos da espécie *Jenynsia multidentata*.

Em peixes, o desenvolvimento folicular tem sido bem descrito (GRIER et al., 2007) e, como nos animais em geral, compreende os períodos pré-meiótico, perinucleolar, vitelogenético e maturação final. Estas fases ocorrem no interior de folículos, cuja parede, constituída por zona radiata, camada folicular, membrana basal e teca (GRIER, 2007), desempenha importante papel durante a ovogênese e na fertilização. Quando a qualidade da água é alterada devido a poluentes, a foliculogênese pode ser alterada, comprometendo o desenvolvimento folicular (CHATTERJEE et al., 1997). Assim, os peixes, quando expostos aos inseticidas, podem apresentar alterações morfológicas no ovário (CHATTERJEE et al., 1997; MAXWELL & DUTTA, 2005; DUTTA & DALAL, 2008).

O lambari *A. bimaculatus* foi escolhido como a espécie experimental, pois é muito representativo no ecossistema, sendo encontrado desde o Nordeste brasileiro até a bacia do rio da Prata na Argentina (BARBIERI et al., 1982). É um peixe de pequeno porte e fácil manutenção em laboratório, com importância econômica na alimentação e também na prática de pesca (CARVALHO et al., 2009). Este estudo teve como objetivo determinar a CL_{50} em fêmeas de lambaris *A. bimaculatus* e analisar a histologia do desenvolvimento folicular em peixes expostos ao Thiodan® em quatro regimes de manutenção dos animais em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Fêmeas de lambari *A. bimaculatus* em maturação avançada foram coletadas de tanques de terra na Piscicultura da Prata, Eugenópolis/

MG, apresentando peso médio de $11,52 \pm 2,0g$ e comprimento total médio de $9,12 \pm 0,64cm$. As características para a escolha das fêmeas de lambaris em maturação avançada se basearam em aspectos corporais, como ventre abaulado, poro genital dilatado e vascularizado. Os peixes foram transportados para o Biotério de Peixes do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, onde foram mantidos em aquários com capacidade de 50 litros numa densidade de 0,5g de peixe por litro de água. Foi utilizada água livre de cloro, temperatura controlada ($26 \pm 1^\circ C$) e monitoramento duas vezes ao dia. Todos os aquários possuíam sistema de filtração ($250L h^{-1}$) e aeração contínua de água para garantir o bem-estar dos peixes. Os peixes foram alimentados com ração comercial contendo 35% de proteína bruta, duas vezes ao dia.

A primeira etapa do estudo foi o teste de toxicidade aguda do Thiodan® para fêmeas de lambari em sistema estático, a fim de determinar a concentração letal (CL_{50}), que avalia mortalidade de 50% dos animais por 96 horas, de acordo com a NBR 15088 (ABNT, 2007). A alimentação dos peixes foi suspensa 24 horas antes do início do experimento e perdurou durante todo o teste (96 horas). Essa restrição alimentar foi realizada para evitar acúmulo de matéria orgânica, que poderia interferir na ação do agrotóxico. Para o teste, foram selecionadas 120 fêmeas adultas em maturação avançada. O agrotóxico utilizado foi o Thiodan® (Bayer), com $350g L^{-1}$ de endossulfan. Para cada concentração de Thiodan® ($1,5\mu g L^{-1}$, $3,0\mu g L^{-1}$, $6,0\mu g L^{-1}$, $12,0\mu g L^{-1}$, $24,0\mu g L^{-1}$, $48,0\mu g L^{-1}$ e $96,0\mu g L^{-1}$) e para o grupo controle sem tóxico ($0\mu g L^{-1}$), foram utilizadas três repetições em recipientes de 1,5L de água com cinco peixes cada (Tabela 1). Foram feitas as verificações de mortalidade a cada seis horas até 96 horas, removendo-se os animais mortos, o que proporcionou menores interferências pela decomposição dos peixes. Para acompanhamento da temperatura, foi acondicionado 1,5L de água, em um recipiente idêntico, de forma que qualquer variação na temperatura pudesse ser medida sem provocar estresse adicional a nenhum grupo. O programa utilizado para o cálculo da CL_{50} foi o TOXCALC, determinando o valor e o intervalo de confiança pelo método PROBITUS ($P < 0,05$).

Logo após determinar a CL_{50} -96hs, as fêmeas foram expostas ao Thiodan® por 96 horas em quatro diferentes tratamentos, em sistema estático: experimento sem aclimação e sem alimentação; experimento sem aclimação e com alimentação; experimento com aclimação de 10 dias e sem alimentação; e experimento com aclimação de

Tabela 1 - Valores registrados para mortalidade de lambaris *A. bimaculatus* expostos ao Thiodan® para determinação da CL₅₀-96 horas.

Thiodan® (µg L ⁻¹)	(n) expostos	(n) mortos
0	15	0
1,5	15	0
3	15	1
6	15	3
12	15	4
24	15	11
48	15	15
96	15	15

10 dias e com alimentação. Foram utilizadas três concentrações do Thiodan® (1,15; 2,3 e 5,6 µg L⁻¹) inferiores à CL₅₀ pré-determinada em laboratório, de acordo com a NBR 15088 (ABNT, 2007), além de um grupo controle sem tóxico, com três repetições sobre as mesmas condições para cada concentração.

As características da água utilizada no teste subletal em sistema estático foram mantidas de acordo com as recomendações da NBR 15088 (ABNT, 2007), com temperaturas de 26,0±1,0°C, livre de cloro, pH 7,2±0,3; oxigênio dissolvido de 6,9±0,6 mg L⁻¹, e dureza total de 28,15±5,94 mg L⁻¹ (CaCO₃) de acordo com os procedimentos dispostos no Standard Methods (EATON et al., 2005), cujas leituras foram monitoradas no início e no final de cada experimento, juntamente com a temperatura, que também foi monitorada diariamente, utilizando-se de um kit de teste para aquário.

Após 96 horas de exposição ao Thiodan®, foram coletados 96 peixes, sendo seis animais de cada concentração em cada experimento. Para não causar efeitos indesejáveis nos peixes expostos ao Thiodan®, como aumentar o estresse e comprometer a definição do estágio de maturação, os folículos ovarianos não foram coletados pela técnica de canulação. Os peixes foram anestesiados com benzocaína (1/10000) e submetidos à eutanásia por meio de secção transversal da coluna vertebral na região do opérculo. Logo em seguida, os ovários dos peixes foram coletados para as análises histológicas.

Para o estudo histológico, os ovários foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 por 24 horas, e incluídos em glicolmetacrilato (Leica, Historesin). Em seguida, secções 3 µm de espessura foram coradas, utilizando hematoxilina/eosina para análises morfológicas. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck®), analisadas em microscópio de luz CX31 (Olympus), e

as imagens foram obtidas com câmera digital SC 020 por meio do *software* Analysis GETIT (*Olympus*).

Nos estudos morfológicos foram analisados os ovários de seis animais por grupo. As secções histológicas foram analisadas em toda sua extensão em busca de alterações morfológicas foliculares que pudessem ser representativas do efeito do Thiodan® no tecido ovariano, sempre comparando estas alterações com o padrão de organização dos ovários das lâminas do grupo controle. Além disso, foram realizadas medições de diâmetros em 10 folículos vitelogênicos para cada animal, sendo os folículos o mais esféricos possível, com corte passando pelo núcleo. Estas medidas foram obtidas por meio do programa Image-Pro Plus, traçando-se duas linhas perpendiculares sobre núcleo e respeitando-se os limites do folículo. Os diâmetros dos folículos vitelogênicos foram apresentados como média±desvio padrão e avaliados pelo *Software* Statistica 7.0, por meio da análise de variância. Após o teste de distribuição normal, os dados dos grupos controle foram comparados àqueles dos grupos expostos ao Thiodan®, usando análise de variância *one-way* pelo teste de Tukey. P<0,05 foi utilizado como critério de significância.

RESULTADOS

O valor registrado para a CL₅₀-96h do Thiodan® para as fêmeas de *A. bimaculatus*, com base na mortalidade ocorrida durante o período de realização do teste (Tabela 1), foi de 13,67 µg L⁻¹, com intervalo de confiança de 10,1 a 18,4 µg L⁻¹ (p<0,05) e temperatura média da água de 23,3±0,72°C.

Os folículos ovarianos dos lambaris nos diferentes experimentos apresentaram morfologia normal, tanto nos grupos expostos ao Thiodan® nas concentrações subletais, quanto nos grupos controle (Figuras 1A-D), nos quatro diferentes experimentos.

Durante o desenvolvimento folicular primário inicial, os ovócitos apresentam citoplasma fortemente basófilo, núcleo esférico, nucléolos dispersos pelo nucleoplasma. Os ovócitos estão envoltos por algumas células foliculares pavimentosas (Figura 1A). No folículo primário avançado, a camada de células foliculares é pavimentosa e o núcleo elíptico. Entre as células foliculares e o citoplasma, surge a zona radiata delgada (Figura 1B).

O folículo secundário inicial possui citoplasma granular e fracamente basófilo, e presença de vesículas corticais pequenas e claras na periferia do citoplasma. O núcleo é central, ligeiramente acidófilo, com nucléolos pequenos e dispersos pelo nucleoplasma (Figura 1C). No folículo secundário

intermediário, assim como na etapa anterior, os ovócitos têm núcleo central e acidófilo. No citoplasma, inicia-se a deposição de vitelo a partir da região periférica do folículo (Figura 1D). No folículo secundário avançado (vitelogênico), o diâmetro e o volume citoplasmático aumentam mais em relação ao núcleo, apresentando os folículos neste estágio, vesículas corticais na periferia dos folículos e glóbulos de vitelo dispersos por todo citoplasma. A membrana basal é delgada e a zona radiata é mais espessa que nas fases anteriores (Figura 1D), com células foliculares apresentando forma de pavimentosa a cúbica.

Os valores médios dos diâmetros dos folículos secundários avançados nas fêmeas do experimento com aclimação/com alimentação demonstraram aumento ($P < 0,05$) nas concentrações

$1,15\mu\text{g L}^{-1}$ ($578,37 \pm 59,77\mu\text{m}$) e $5,6\mu\text{g L}^{-1}$ ($573,11 \pm 61,78\mu\text{m}$) de Thiodan® em relação às fêmeas do grupo controle ($516,06 \pm 57,57\mu\text{m}$). Nos demais experimentos, não foram registradas diferenças entre os folículos ($P > 0,05$), apesar de ter sido observada, na maioria dos grupos, essa mesma tendência de aumento do diâmetro folicular (Tabela 2).

DISCUSSÃO

No presente estudo, o lambari, apesar de ser pequeno porte, apresentou CL_{50} de $13,67\mu\text{g L}^{-1}$ em 96 horas, sendo mais resistente que adultos de tilápia nilótica, cujas CL_{50} 96, 48 e 24 horas determinadas por MUSANHI (1987) foram de 1,42, 3,80 e $10,3\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Nas primeiras 24 horas de ação

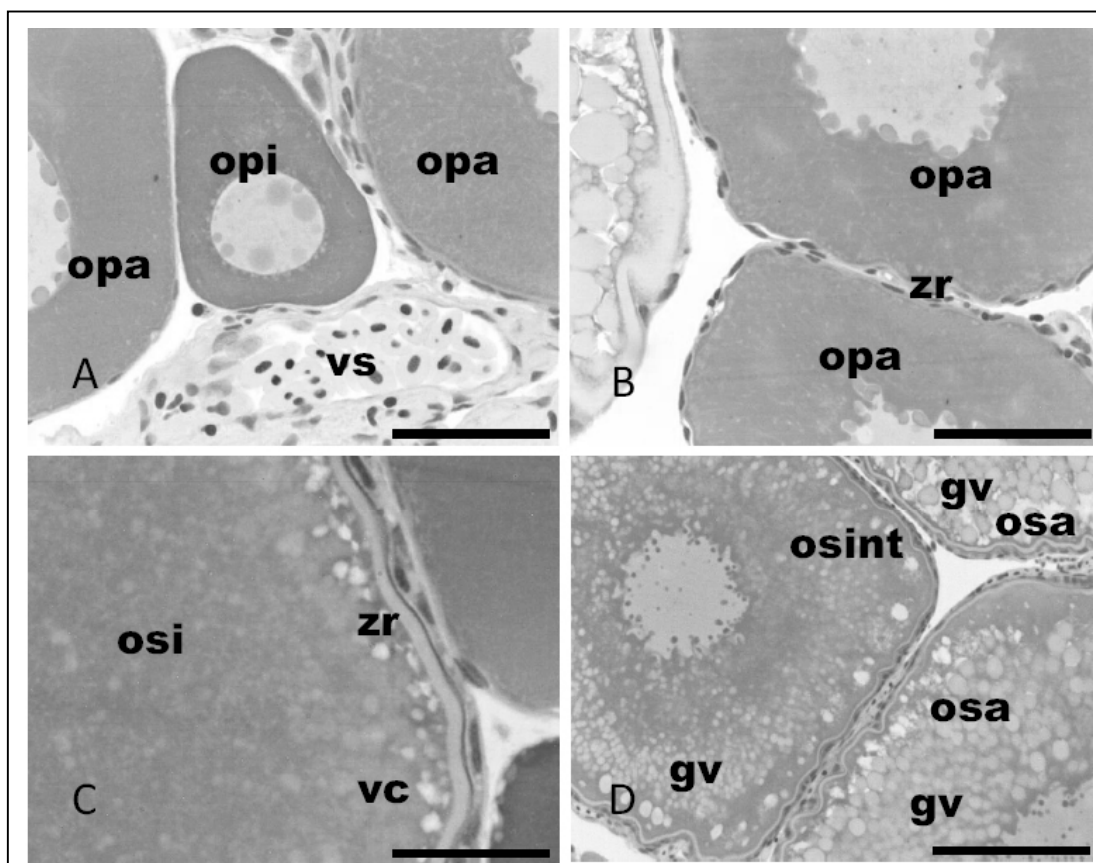


Figura 1 - Desenvolvimento folicular ovariano de *Astyanax bimaculatus*. A: Estroma ovariano com folículos em desenvolvimento primário inicial (opi) e primário avançado (opa). B: Folículo em desenvolvimento primário avançado (opa) com células foliculares pavimentosas e zona radiata delgada (zr). C: Folículo em desenvolvimento secundário inicial (osi), envolto por zona radiata espessa (zr) e células foliculares pavimentosas. D: Folículo em desenvolvimento secundário intermediário (osint) iniciando deposição dos glóbulos de vitelo, e folículos em desenvolvimento secundário avançado (osa) com glóbulos de vitelo (gv) por todo o ooplasma. vs: vaso sanguíneo. vc: vesículas corticais claras na periferia do ovócito. Coloração: Hematoxilina-eosina. Barra: A e B ($50\mu\text{m}$); C ($30\mu\text{m}$); D ($100\mu\text{m}$).

Tabela 2 - Diâmetro médio (μm) dos folículos em desenvolvimento secundário avançado de lambaris *A. bimaculatus* expostos ao Thiodan® por 96 horas.

Experimento	Controle	1,15 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,3 $\mu\text{g L}^{-1}$	5,6 $\mu\text{g L}^{-1}$
sem aclimatação sem alimentação	534,43 \pm 74,14 ^a	537,96 \pm 77,46 ^a	532,73 \pm 83,00 ^a	500,46 \pm 56,10 ^a
sem aclimatação com alimentação	568,07 \pm 66,47 ^a	575,17 \pm 58,49 ^a	590,4 \pm 58,89 ^a	584,49 \pm 68,49 ^a
com aclimatação sem alimentação	538,16 \pm 56,84 ^a	518,94 \pm 60,65 ^a	553,93 \pm 61,93 ^a	547,49 \pm 68,49 ^a
com aclimatação com alimentação	516,06 \pm 57,57 ^a	578,37 \pm 59,77 ^b	557,74 \pm 78,70 ^{ab}	573,11 \pm 61,78 ^b

Valores expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos do mesmo experimento ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

do Thiodan®, com as concentrações subletais de 1,15, 2,3 e 5,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, as fêmeas do presente estudo apresentaram comportamento agitado e batimento opercular acelerado, assim como foi observado na espécie *Danio rerio*, exposta ao endossulfan por 96 horas na concentração de 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, além desta espécie ter apresentado uma diminuição do nível de acetilcolinesterase (AChE) (PEREIRA et al., 2012).

Por outro lado, em estudo realizado por HERNAN DA CUÑA et al. (2011) com a espécie *Cichlasoma dimerus* exposta ao endossulfan, por 96 horas, nas concentrações de 0,25, 1, 2, 3, 4 e 16 $\mu\text{g L}^{-1}$, os peixes exibiram comportamento indicativo de neurotoxicidade, mas não foram encontradas diferenças na atividade da AChE. A ventilação branquial acelerada e a não procura por alimentos nas primeiras 24 horas observadas, nos diferentes experimentos, sugere que a entrada de água pela via branquial foi a causa direta da absorção e difusão do tóxico no organismo. No entanto, a via epidérmica também poder ser considerada via de entrada do tóxico para os tecidos (MCKIM et al., 1996). Estes estudos fornecem evidências adicionais de efeitos deletérios da exposição ao endossulfan sobre o sistema nervoso, o que contribui para as observações do presente estudo.

Em peixes teleósteos, o tipo de desenvolvimento folicular pode ser assíncrono, com a presença de folículos em diferentes estádios de desenvolvimento (GRIER, 2007), assim como na espécie deste estudo. Os ovários das fêmeas de *A. bimaculatus* submetidas ao efeito do Thiodan® apresentaram folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento folicular, conforme observado em outras espécies mantidas em ambientes livre de

tóxico (GRIER et al., 2007) e com a presença de endossulfan (HERNAN DA CUÑA et al., 2011). Ao contrário do que foi observado no presente estudo, DUTTA & DALAL (2008), ao submeterem as fêmeas da espécie *Lepomis macrochirus* a três diferentes concentrações (0,25; 0,75 e 1 $\mu\text{g L}^{-1}$) de endossulfan, observaram comprometimento do desenvolvimento folicular com retração nuclear, folículos com aspecto vazio ou sem conteúdo citoplasmático, e alterações no núcleo, que é relatado como necrose nuclear, assim como foi observado também no trabalho conduzido por CHATTERJEE et al. (1997). De acordo com BALLESTEROS et al. (2007), peixes fêmeas da espécie *Jenynsia multidentata* são menos susceptíveis à intoxicação pelo endossulfan do que os machos, devido à maior afinidade pelos lipídios, sendo um fator importante para esclarecer a ausência de alterações morfológicas nas fêmeas de *A. bimaculatus*, em período reprodutivo, nas diferentes concentrações de Thiodan® testadas.

O diâmetro dos folículos vitelogênicos é espécie-específico; porém, o Thiodan® alterou o diâmetro folicular no experimento com aclimatação/com alimentação. Esta alteração do diâmetro que leva os folículos vitelogênicos a atingirem a maturação pode ser causada pelas diferenças nas concentrações de vitelogenina, estradiol e aromatase (JENSEN et al., 2004; CHAKRABARTY et al., 2012) ou sendo ligada aos receptores específicos nos folículos (BUGEL et al., 2010). Contudo, é necessário estudar as vias que conduzem a esta alteração. Estes resultados mostram que diferentes vias podem afetar a reprodução dos peixes e que o Thiodan® pode agir como desregulador endócrino nos folículos secundários avançados de *A. bimaculatus*.

CONCLUSÃO

As fêmeas de *A. bimaculatus* podem estar em processo inicial de intoxicação por meio de como foi conduzido os experimentos por 96 horas nas diferentes concentrações testadas com o inseticida Thiodan®. No entanto, a causa do aumento do diâmetro folicular pode ser sugerida como alteração hormonal e enzimática que estão relacionadas na produção da vitelogenina, ou o Thiodan® pode estar agindo como desregulador endócrino nos receptores específicos de vitelogenina nos folículos secundários. Entretanto, são necessários estudos fisiológicos para se confirmar a via correta desta suposta alteração nas fêmeas de *A. bimaculatus*.

COMITE DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, protocolo n. 24/2009.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), como parte do projeto APQ-02176-2009. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo para Lucas Marcon e Diego Senra Lopes.

REFERÊNCIAS

ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). **NBR 15088 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. 2.ed: versão corrigida 31/03/2006. Brasília, 2007. p.19.

BALLESTEROS, M. L. et al. Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata Anablepidae*, Cyprinodontiformes). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v.42, n.4, p.351-357, 2007. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03601230701309577#.UubICM9TviU>. Acesso em: 20 janeiro, 2014. Doi: 10.1080/03601230701309577.

BARBIERI, G. et al. Época de reprodução e relação peso corporal/comprimento padrão de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, *Characidae*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, p.1057-1065, 1982.

BAYER. Acesso em: 23 abr. 2014. Online. Disponível na internet: <http://www.bayercropscience.com.br/site/nossosprodutos/protecao-de-cultivo-e-biotecnologia/DetailDoProduto.fss?Produto=52>.

BUGEL, S.M. et al. Impaired reproductive health of killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting Newark Bay, NJ, a chronically contaminated estuary. **Aquatic Toxicology**, v.3, p.182-93, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X09003579>. Acesso em: 20 jan. 2014. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.10.016.

CARVALHO, P.A. et al. Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in southeastern Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v.25, n.3, p.306-313, 2009. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0426.2009.01238.x/abstract>. Acesso em: 20 jan. 2014. doi: 10.1111/j.1439-0426.2009.01238.x.

CAPKIN, E. et al. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. **Chemosphere**, v.64, p.1793-1800, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16466770>. Acesso em: 20 jan, 2014. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.12.050.

CHAKRABARTY, S. et al. Endosulfan and flutamide, alone and in combination, target ovarian growth in juvenile catfish, *Clarias batrachus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.155, n.3, p.491-497, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227439>. Acesso em: 20 jan. 2014. doi: 10.1016/j.cbpc.2011.12.007.

CHATTERJEE, S. et al. Impact of carbofuran in the oocyte maturation of catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.32, p.426-430, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227439>. Acesso em: 20 jan. 2014. doi: 10.1016/j.cbpc.2011.12.007.

DUTTA, H.M.; DALAL, R. The effect of endosulfan on the ovary of bluegill sunfish: a histopathological study (*Lepomis macrochirus*). **International Journal of Environmental Research**, v.2, n.3, p.215-224, 2008. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00244-005-1061-0>. Acesso em: 20 jan. 2014. doi:10.1007/s00244-005-1061-0.

EATON, A.D. et al. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21.ed. Maryland: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2005. 1082p.

GLOVER C.N. et al. Assessing the sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan exposure using tissue biochemistry and histology. **Aquatic Toxicology**, v.84, n.3, p.346-355, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X07002512>. Acesso em: 20 jan. 2014. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.06.013.

GRIER, H.J. et al. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). **Journal of Morphology**, v.268, p.293-310, 2007. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmor.10518/abstract>. Acesso em: 20 jan. 2014. doi: 10.1002/jmor.10518.

HENRY, L.; KISHIMBA, M.A. Pesticide residues in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Nile Perch (*Lates niloticus*) from Southern Lake Victoria, Tanzania. **Environmental Pollution**, v.140, p.348-354, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749105003878>. Acesso em: 20 jan. 2014. doi: 10.1016/j.envpol.2005.06.029.

HERNANDEZ CUÑA, H. et al. Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.1065-1073, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749105003878>. Acesso em: 20 jan. 2014. doi: 10.1016/j.envpol.2005.06.029.

- JENSEN, M.K. et al. Characterization of responses to the antiandrogen flutamide in a short-term reproduction assay with the fathead minnow. **Aquatic Toxicology**, v.70, n.2, p.99-110, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X04002243>>. Acesso em: 20 jan. 2014. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.06.012.
- MAXWELL, L.B.; DUTTA, H.M. Diazinon induced endocrine disruption in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, p.21-27, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651303002410>>. Acesso em: 20 jan. 2014. doi: 10.1016/j.ecoenv.2003.12.015.
- MCKIM, J.M. et al. Dermal absorption of three waterborne chloroethanes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Fundamental and Applied Toxicology**, v.31, n.2, p.218-228, 1996. Disponível em: <<http://toxsci.oxfordjournals.org/content/31/2/218.full.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2014.
- MOLINA, D. Anvisa baixa resolução proibindo agrotóxico Endosulfan a partir de 2013. **Jornal da Associação de Defesa do Meio Ambiente Araucária**, 17 ago. 2010. Online. Disponível na internet: <<http://amarnatureza.org.br/site/anvisa-baixa-resolucao-proibindo-ogrotoxico-endossulfan-a-partir-de-2013,67995/>>. Acesso em: 20 ago. 2010.
- MUSANHI, R.G. Influence of two organochloridepesticides, Thiodan and Lindane on survival of fingerlings of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. United nations development program food and agriculture organization of the United Nations (FAO). **Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research**. Fev. 1987. Online. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/field/003/ac162e/ac162e00.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2014.
- PEREIRA, V.M. et al. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology**, v.33, n.3, p.469-75, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X1200068X>>. Acesso em: 20 jan. 2014. doi: 10.1016/j.neuro.2012.03.005.
- UNEP (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME). Consideration of the draft risk management evaluation on endosulfan. In: **Stockholm convention on persistent organic pollutants**. Genebra, 2010. 138p. (POPS/POPRC.6/INF/12).