

ALESSANDRO BRINATI

**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO INSETICIDA ENDOSULFAN SOBRE O
METABOLISMO DE MORCEGOS FRUGÍVOROS *Artibeus lituratus* E ANÁLISE DO
BIOACÚMULO NO TECIDO ADIPOSEO E HEPÁTICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B858e
2011

Brinati, Alessandro, 1975-

Efeitos toxicológicos do inseticida endosulfan sobre o metabolismo de morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* e análise do bioacúmulo no tecido adiposo e hepático / Alessandro Brinati. – Viçosa, MG, 2011.

x, 44f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Metabolismo energético. 2. Inseticidas. 3. Morcego.
4. Fígado. 5. Tecido adiposo. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 571.1

ALESSANDRO BRINATI

**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO INSETICIDA ENDOSULFAN SOBRE O
METABOLISMO DE MORCEGOS FRUGÍVOROS *Artibeus lituratus* E ANÁLISE DO
BIOACÚMULO NO TECIDO ADIPOSEO E HEPÁTICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de agosto de 2011.

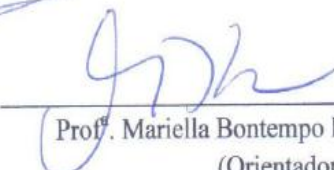
APROVADA: 31 de agosto de 2011.



Prof. Sérgio Luiz Pinto da Matta



Prof.^a Maria Eliana Lopes R. de Queiroz



Prof.^a Mariella Bontempo Duca de Freitas
(Orientadora)

A Deus, meus familiares e aos
meus amigos.....

*“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.”*
Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao Mestre Jesus, por estar presente em todos os momentos de minha vida.

À minha mãe, pelo amor, carinho, incentivo, pelas orações e por compreender a minha dedicação, esforço e ausência.

À minha irmã Graça (*in memoriam*) pelos ensinamentos proporcionados na minha infância.

À minha amada e eterna namorada Viviane, que sempre esteve ao meu lado dando força, incentivo, carinho, não permitindo que eu desanimasse durante essa caminhada, por ter ajudado em todos os processos para a concretização desta etapa da minha vida.

Às minhas cunhadas Luciane e Emiliane, pela força, incentivo e ajuda nas coletas de campo.

Aos demais parentes, obrigado, pelo apoio, torcida, conselhos e orações.

Aos meus amigos e companheiros de campo e laboratório, Túlio, Bruno, Jerusa, Mirlaine e Lucas, obrigado pela ajuda nas coletas e nos experimentos.

Aos meus amigos Paulo e Andreia, pelos conselhos, orientações.

Aos meus alunos e ex-alunos do curso de Ciências Biológicas da Fundação FAVALE que de certa forma participaram desta minha caminhada, apoiando as coletas, e principalmente por ter acreditando e confiando no meu trabalho.

A Universidade Federal de Viçosa e Departamento de Biologia Animal, por ter concedido a oportunidade para a realização deste mestrado.

A professora Dr^a. Mariella Bontempo Duca de Freitas, obrigado, pela orientação, por ter acreditado no meu trabalho e por ter contribuído na minha formação profissional e pessoal.

Ao professor Dr. Renato Feio por ter concedido o Museu de Zoologia para o desenvolvimento de parte do experimento.

A professora Dr^a. Gisele Lessa, pela amizade e por ter confiando no meu trabalho.

A professora Dr^a. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz do Laboratório de Química Analítica e seu aluno Bruno, pela parceria, amizade e orientação nas análises de cromatografia gasosa.

Ao professor Dr. Sérgio Luiz Pinto da Matta, pelos conselhos e ensinamentos nos momentos de dúvidas, e pela amizade.

As professoras Dr^a. Ita de Oliveira e Silva e Dr^a. Mariana Machado Neves pela coorientação e amizade.

A todos que acreditaram no meu trabalho e que de forma direta e indireta contribuíram para a concretização desta etapa da minha vida.

BIOGRAFIA

Alessandro Brinati, filho de Luiz Brinati (*in memoriam*) e Maria da Penha Brinati, nasceu em Espera Feliz, Minas Gerais, no dia 10 de Julho de 1975.

Em 2005 graduou-se em Licenciatura Plena em Ciência Biológicas, pela Universidade Estadual de Minas Gerais/FAVALE, Carangola-MG. Durante a graduação desenvolveu trabalhos de pesquisa nas áreas de monitoramento e caracterização de mamíferos voadores e não voadores em Áreas de Proteção Ambiental, manejo de primatas em cativeiro e educação ambiental.

Iniciou o curso de Pós-graduação (mestrado) em Biologia Animal pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, em agosto de 2009, e defendeu a dissertação em agosto de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT... ..	x
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Efeitos metabólicos de pesticidas em animais experimentais	5
2.2 Efeitos metabólicos de pesticidas em animais silvestres	7
2.3 Bioacúmulo de pesticidas em animais silvestres	8
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
Capítulo 1: Efeitos toxicológicos do inseticida endosulfan sobre o metabolismo de morcegos frugívoros <i>Artibeus lituratus</i> e análise do bioacúmulo no tecido adiposo e hepático.....	15
RESUMO.	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1 Laboratório.....	17
2.2 Inseticida Endosulfan	17
2.3 Espalhante Adesivo	18
2.4 Animais e tratamento	18
2.5 Amostragem	20
2.6 Determinação do consumo alimentar	20
2.7 Determinação da glicemia	21
2.8 Glicogênio hepático e muscular	21
2.9 Determinação da proteína tecidual	22
2.10 Determinação dos lipídios totais	22
2.11 Ácidos graxos totais da carcaça.....	22
2.12 Determinação de resíduos de endosulfan em tecido hepático e adiposo.....	22
2.13 Concentrações plasmáticas de testosterona	23
2.14 Análise estatística	23

3. RESULTADOS	24
3.1 Consumo alimentar	24
3.2 Glicemia	24
3.3 Glicogênio hepático e muscular	25
3.4 Proteína total.....	26
3.5 Lipídios totais teciduais	27
3.6 Lipídios totais do tecido adiposo	28
3.7 Ácidos graxos totais da carcaça.....	29
3.8 Concentrações plasmáticas de testosterona	30
3.9 Análise cromatográfica.....	31
4. DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÃO GERAL	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMO

BRINATI, Alessandro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2011. **Efeitos toxicológicos do inseticida endosulfan sobre o metabolismo de morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* e análise do bioacúmulo no tecido adiposo e hepático.** Orientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas. Coorientadores Mariana Machado Neves e Ita de Oliveira e Silva.

O uso intensivo de várias classes de agrotóxicos na agricultura tem trazido uma série de preocupações associadas com seus efeitos negativos em humanos, animais e o ambiente. Foi provado que a maioria destes componentes pode causar danos agudos e crônicos, tais como alterações no sistema nervoso, efeitos imunossupressores e ações carcinogênicas e/ou mutagênicas, alterando a secreção e ação de hormônios e inibindo enzimas nas vias de glicose e gliconeogênese em animais experimentais. Para investigar os efeitos do inseticida organoclorado endosulfan no metabolismo, na secreção de hormônios e seu possível acúmulo em tecidos, morcegos frugívoros da espécie *Artibeus lituratus* foram expostos a frutos contaminados com esse inseticida por 35 dias. Um total de 28 morcegos foram separados em 4 grupos experimentais: controle, espalhante adesivo 0,015g/L, endosulfan 1,05 g/L e endosulfan 2,1 g/L. A dose usada foi a mesma indicada pelo fabricante, e objetivou simular a intoxicação dos morcegos no campo. A um grupo tratado foi oferecido o dobro da dose do inseticida. Analisou-se as concentrações de glicose e testosterona no plasma, proteínas e lipídios do fígado e músculos, bem como de lipídios do tecido adiposo e ácidos graxos da carcaça. Também se avaliou o bioacúmulo do endosulfan no tecido adiposo e fígado, por cromatografia gasosa (CG). Os grupos tratados mostraram mudanças na concentração de glicose, concentrações de proteínas em alguns músculos e redução de ácidos graxos na carcaça. Observou-se acúmulo de endosulfan depois de 35 dias de tratamentos em ambos os grupos tratados, sugerindo um comprometimento a longo prazo da sobrevivência da população em florestas neotropicais, onde eles representam um papel importante na regeneração das plantas.

ABSTRACT

BRINATI, Alessandro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2011. **Toxicological effects of the insecticide endosulfan on the metabolism of fruit bats *Artibeus lituratus* and analysis of bioaccumulation in adipose tissue and liver.** Adviser: Mariella Bontempo Duca de Freitas. Co-Advisers: Mariana Machado Neves and Ita de Oliveira e Silva.

The intensive use of various classes of pesticides in agriculture has brought a number of concerns associated with its negative effects on humans, animals and environment. It was proved that most of these components can cause acute and chronic damage, such as changes in the nervous system, immunosuppressive effects and carcinogenic actions and/or mutagenic, altering the secretion and action of hormones and inhibiting enzymes in pathways of glucose and gluconeogenesis in experimental animals. To investigate the effects of the organochlorine insecticide endosulfan metabolism, hormone secretion and its possible accumulation in tissues, fruit bats of the species *Artibeus lituratus* were exposed to this pesticide-contaminated fruits for 35 days. A total of 28 bats were separated into 4 groups: control, adhesive spreader 0,015 g/L, endosulfan 1.05 g/L and endosulfan 2.1 g/L. The dose used was the same as indicated by the manufacturer, and aimed to simulate the poisoning of bats in the field. The treated group was given a double dose of the insecticide. We analyzed the concentrations of glucose and testosterone in plasma proteins and lipids of liver and muscle, and adipose tissue lipids and fatty acids from the carcass. We also assessed the bioaccumulation of endosulfan in adipose tissue and liver by gas chromatography (GC). The treated groups showed changes in the concentration of glucose, protein concentrations in some muscles and reduction of fatty acids in the substrate. We observed accumulation of endosulfan after 35 days of treatment in both treated groups, suggesting a commitment to long-term survival of the population in neotropical forests, where they play an important role in the regeneration of plants.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Com o desenvolvimento de modernas práticas agrícolas, que proporcionaram maior produção de alimentos e redução da perda de produtividade, grande número de agrotóxicos tem sido introduzido no meio ambiente, para impedir a ação ou destruir direta ou indiretamente formas de vida vegetal ou animal consideradas indesejáveis nas culturas agrícolas. Entretanto, muitas dessas substâncias químicas possuem ação fisiológica com capacidade de produzir efeitos prejudiciais aos organismos vivos.

Nas últimas décadas, o uso extensivo de agrotóxicos e o intensivo desenvolvimento de novas classes aumentaram significativamente, bem como a variedade e a quantidade de novos produtos (ACKER, 2010). Estima-se que aproximadamente 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos são produzidas e comercializadas por ano no mundo, sendo 39% de herbicidas, 33% de inseticidas, 22% de fungicidas e 6% de outros grupos químicos (RIGOTTO, 2010).

Desde 2008 o Brasil se tornou o maior consumidor de agrotóxico no cenário mundial, respondendo por 86% do consumo de produtos na América Latina, de acordo com a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária- Anvisa (IBGE, 2010). No ano 2008, o consumo de agrotóxico atingiu 725,6 mil toneladas, correspondendo a 3,7 quilos de agrotóxicos por habitante. Em 2009, estimou-se que as vendas tenham atingindo 789.974 toneladas (SINDAG, 2009).

Embora os agrotóxicos produzam resultados positivos no controle de pragas (fungos, insetos, ácaros etc.), seus efeitos danosos em animais que não interferem no processo de produção (espécies não alvo), como por exemplo, os morcegos, não devem ser excluídos.

Após aplicação, os agrotóxicos dispersam no ambiente, contaminam o solo, água e plantações, penetra na cadeia alimentar e são ingeridos por humanos e outros animais (TAYLOR et al., 2003). Declínio de populações de animais silvestres tem sido relatado em consequência da contaminação de seus habitats por agrotóxicos (THIES e THIES, 1996; GELUSO et al. 1976), devido sua longa permanência no ambiente e potencial para ocasionar impactos e mudanças ecológicas (FLORES et al., 2004). Estes efeitos já foram observados em estudos com agrotóxicos organoclorados, considerados, em sua maioria, persistentes no meio ambiente (DORIGATTI, 1987).

Há relatos dos efeitos tóxicos de organoclorados, comumente utilizado em culturas agrícolas, sobre a síntese e secreção de hormônios esteróides (BRETVELD et al., 2006; BISSON et al., 2002), e alterações em órgãos envolvidos no metabolismo energético (GARG et al. 2004; RAHIMI et al., 2007). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos destes agrotóxicos em animais silvestres expostos a estes compostos, como é o caso dos morcegos frugívoros, que consomem frutos contaminados ou usam áreas pulverizadas para forragear ou como abrigo temporário.

Os morcegos (Chiroptera, Mammalia) apresentam a maior diversidade de habitats e distribuição geográfica dentre os mamíferos, podendo ser encontrados em todos os continentes, em regiões tropicais e temperadas. Em ecossistemas tropicais, podem representar, em algumas áreas, 40 a 50% das espécies de mamíferos (PATTERSON e PASCUAL, 1968; TIMM, 1994). No Brasil, compreendem o segundo maior grupo de mamíferos em número de espécies - aproximadamente 167 (REIS et al., 2007), com uma dieta variada, na qual incluem insetos, frutas, folhas, flores, néctar, pólen, peixes, pequenos vertebrados e sangue, sendo a sanguivoria exclusiva dentre dos mamíferos (NOWAK, 1994).

Dentre os frugívoros, destacam-se os pertencentes à família Phyllostomidae, sendo o *Artibeus lituratus* uma das espécies mais conhecida no Brasil, devido à sua alta abundância em quase toda área de distribuição (Figura 1).



Figura 1. Macho adulto de *Artibeus lituratus*, coletado no município de Espera Feliz-MG.

Esta espécie apresenta listas faciais brancas conspícuas, coloração da pelagem predominantemente amarronzada, podendo variar entre as regiões geográficas. Apresenta grande porte com antebraço podendo ultrapassar 75 cm (VIZOTTO e TADDEI, 1973) e peso acima de 75 g. Formam grupos poligâmicos (poliginia) e o período reprodutivo pode variar de acordo com a distribuição geográfica, sendo que no Brasil pode apresentar um padrão de poliestria bimodal (BREDET et al., 1996). Sua dieta é variada, podendo alimentar de insetos, folhas e néctar. Embora, a frugivoria predomina como hábito principal, consumindo frutos de várias espécies (GARDNER, 1977). Deste hábito provém sua grande importância ecológica como dispersor de sementes, contribuindo para o estabelecimento de muitas espécies de plantas, possibilitando a regeneração e sucessão secundária de florestas tropicais (GALETTI e MORELLATO, 1994; PASSOS et al., 2003). O *A. lituratus*, bem como outras espécies da mesma ordem, podem ser consideradas excelentes ferramentas na identificação dos processos biológicos envolvidos na perda ou transformação do habitat natural, bem como outras espécies de quirópteros (BIANCONI et al, 2004).

Estudos referentes aos aspectos biológicos, biogeográficos, taxonômicos e filogenéticos de morcegos, foram consideráveis nos últimos anos (KUNZ e RACEY, 1998). Porém, uma base de dados referente à fisiologia, reprodução e metabolismo energético é ainda escassa, o que torna difícil estabelecer uma relação dos efeitos provocados pelos agrotóxicos nestes animais.

O metabolismo energético envolve o conjunto de processos químicos de todas as vias utilizadas pelo organismo na conversão de energia a partir de fontes provenientes da alimentação, assim como de fontes endógenas. Esses processos são fundamentais para que o organismo possa manter o fornecimento constante de energia para as células, através da síntese e degradação de substratos energéticos adquiridos na alimentação (carboidratos, lipídios e proteínas) ou das reservas corporais (glicogênio lipídio e proteínas) (GENUTH, 1998; AMARAL, 2009; MELO, 2010).

Dentre os substratos energéticos utilizados para obtenção de energia, a glicose é o principal para a maioria dos mamíferos (ORETEN, 1993; GUYTON, 1997; YEO, 2007). Em função disso, os níveis de glicose na circulação sanguínea são mantidos por alguns órgãos como pâncreas, fígado, cérebro, rins, bem como tecido adiposo e muscular (TIRONE e BRUNICARD, 2001). Outros tecidos como o muscular são menos dependentes da glicose

sanguínea, pois são capazes de obter quantidade de energia química a partir da oxidação de corpos cetônicos e ácidos graxos (GOULART, 2008).

Nos mamíferos, a manutenção da homeostase glicêmica é importante para suprir as necessidades energéticas dos tecidos e envolve processos de síntese e degradação dos substratos energéticos, através das vias metabólicas, tais como síntese de glicogênio no período pós-absortivo e glicogenólise e neoglicogênese no período de jejum (NORDILIE et al., 1999; WEBER, 2001; BEARDSALL et al., 2006; AMARAL, 2009). Alterações nas concentrações de glicose como hipoglicemia, podem causar danos aos neurônios e falência cerebral, ocasionando coma e morte (CORSSMIT et al., 2001; TIRONE e BRUNICARD, 2001; BEARDSALL et al., 2006; MELO, 2010). Da mesma forma, a hiperglicemia também pode resultar em danos ao organismo de mamíferos, ocasionando glicosúria, retinopatia, nefropatia e acidentes vasculares (YEO e SAWDON, 2007; MELO, 2010).

O aumento dos níveis circulantes de glicose, nos animais em período absorptivo, estimula a secreção de insulina que age em diferentes tecidos do organismo. Este hormônio regula a homeostase glicêmica em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via inibição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a sua captação periférica. A insulina estimula também a lipogênese no fígado e nos adipócitos e inibe a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação proteica (CARVALHEIRA et al., 2002).

Em animais experimentais, alterações no metabolismo energético foram relacionadas a efeitos tóxicos de compostos químicos organoclorados e fosforados comumente utilizados em diversas culturas agrícolas (SRIVASTAVA e MISHRA, 1983; KALENDAR et al., 2004; POURNOURMOHAMMADI et al., 2005; REZG et al., 2007; TANGAVEL et al., 2010). As principais alterações encontradas por estes autores referem-se à hiperglicemia, aumento e diminuição de insulina, concentrações de glicogênio no músculo e fígado, além de variações da atividade glicogênio fosforilase.

A exposição a compostos organoclorados presentes no ambiente ou na dieta tem sido apontada também como causadora de alterações reprodutivas em animais experimentais e humanos, ocasionando desequilíbrio na síntese e secreção de hormônios (SINGH et al., 1990; SINHA et al., 1997; BISSON e HONTELA., 2002; SAIYED et al., 2003; BRETVELD et al., 2006).

Além dos diversos efeitos metabólicos, histopatológicos e hormonais encontrados em animais experimentais, os pesticidas têm sido apontados como os principais agentes causadores de declínio em populações de animais silvestres, como morcegos em regiões temperadas. Tal fato pode ser comprovado através de metabólitos encontrados em tecido adiposo, nervoso e fezes destes animais (GELUSO et al., 1976; CLARK et al., 1978; BENNETT et al., 2007).

Assim, o presente trabalho buscou avaliar as ações tóxicas do inseticida organoclorado endossulfan, sobre o metabolismo energético, concentrações plasmáticas testosterona e possível acúmulo no tecido adiposo e fígado de *Artibeus lituratus*, visando contribuir para o conhecimento e avaliação dos impactos causados por este inseticida em morcegos e outros animais que, de forma direta ou indireta, estão expostos a este agente químico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Efeitos metabólicos de agrotóxicos em animais experimentais

A utilização indiscriminada de diversos tipos de agrotóxicos tem despertado o interesse da comunidade científica, especialmente no que se refere aos efeitos destes compostos em humanos e animais. Diversos trabalhos tem reportado que a exposição a substâncias química pertencentes à classe dos organoclorados e organofosforados, pode alterar diversos parâmetros metabólicos e endócrinos em animais experimentais.

Rezg et al. (2006) avaliaram em ratos os efeitos da exposição subcrônica ao inseticida organofosforado malathion, nas concentrações de glicose plasmática e de enzimas da glicogenólise e glicólise, quando administrado via oral 100 mg/kg durante 32 dias. Os autores observaram aumento do glicogênio hepático, diminuição da atividade da glicogênio fosforilase (GP) e aumento da hexoquinase (HK), além de hepatomegalia. Em outro estudo Rezg et al. (2007), utilizando a mesma metodologia, avaliaram a atividade da acetilcolinesterase (AChE), o valor do hematócrito, conteúdo de hemoglobina e glicemia. Em relação aos padrões metabólicos os autores reportaram diminuição significativa das proteínas e lipídios hepáticos, associando este fato a gliconeogênese hepática. Esse resultado foi

acompanhado também por uma diminuição significativa na taxa de glicogênio muscular, o que sugere uma glicogenólise estimulada em favor da liberação de glicose no sangue até alcançar hiperglicemia. Outros estudos citados pelos autores, demonstraram que a hiperglicemia é temporária, e o retorno da glicose a níveis de controle, estão provavelmente relacionado à estimulação da glicogênese, aumentando a deposição de glicogênio hepático. Este fato pode ser observado pelos autores, sugerindo que a exposição ao inseticida malathion altera os padrões metabólicos, como a indução de hiperglicemia.

Aumento das concentrações de glicose e insulina foram encontrados por Pournourmohammadi et al. (2005), em experimento com ratos tratados com alimentos contendo malathion em concentrações de 200 e 400 mg/kg após quatro semanas de administração. Neste mesmo estudo os autores também observaram aumento da fosfofrutoquinase-1 (PFK) nos grupos que receberam doses de 100, 200 e 400 mg/kg e da glicogênio fosforilase (GP) do músculo esquelético na dose de 400 mg/kg. Estes autores sugerem que o malathion possa influenciar a glicogenólise e glicólise muscular, bem como a secreção de insulina pelo pâncreas.

A exposição ao organoclorado endosulfan aumentou os níveis de glicose plasmática em ratos machos, após a administração oral de (40 mg/kg) em única dose (GARG et al. 1980). Aumento da glicose plasmática também foi observado por Kalender et al. (2004) em ratos machos Wistar, tratados com endosulfan 2 mg/kg dia, por seis semanas. O inseticida endosulfan administrado em doses 2,5, 5,0, 7,5, 10 mg/kg via oral em ratos durante 7 dias, causou uma variação na biossíntese de testosterona e sua secreção, sugerindo um desequilíbrio hormonal nas gônadas de ratos machos em uma curta exposição ao inseticida (SINGH et al.,1989). Os mesmos autores, em outro estudo com ratos relataram que uma exposição de 30 dias a doses de 7,5 e 10 mg/kg causou diminuição nos níveis plasmáticos de gonadotrofinas (FSH e LH), juntamente com testosterona plasmática (SINGH et al.,1990).

Em estudos com peixes expostos a concentração subletal de 0,114 mg/kg de uma mistura de aldrin e formathion, Singh et al. (1981) observaram diminuição do glicogênio muscular após 6 e 48 horas de exposição e do glicogênio hepático após 3, 6, 12 e 48 horas. No mesmo estudo, as concentrações plasmáticas de glicose foram menores após 3, 12, 48 e 96 horas. O valor médio do piruvato no sangue foi significativamente diminuído após 3 horas.

Níveis de lactato sanguíneo foram elevados após 3, 6, 12 e 96 horas em peixes tratados com a mistura de pesticidas.

2.2 Efeitos metabólicos de pesticidas em animais silvestres.

Clarck et al. (1977), em experimento com fêmeas adultas de morcego *Tadarida brasiliensis*, alimentadas com larvas de *Tenebrio molitor* contaminados com 107 mg de DDE (1,1-bis (4-clorofenil) 2,2 dicloetileno) , um metabólito do DDT (1,1 –bis (4- clorofenil) 2, 2, 2 tricloroetano), observaram diminuição do peso corporal dos animais tratados, tremores e aumento da concentração de DDE no tecido nervoso quando houve mobilização da gordura.

Avaliando os efeitos metabólicos dos inseticidas organofosforado fentiona e espinosina em morcegos *Artibeus* spp, submetidos à ingestão de alimento contaminado durante 7 dias, Amaral. (2009) observou aumento das concentrações de glicogênio muscular, diminuição dos ácidos graxos da carcaça e lipídios das patas anteriores.

Shore et al. (1996) observaram que morcegos *Pipistrellus pipistrellus* são 30 vezes mais sensíveis à exposição do inseticida organoclorado dieldrin do que ratos de laboratório, baseado na taxa de mortalidade após a intoxicação com as doses usadas para tratamento de madeira. Os autores também relataram que resíduos no cérebro e fígado foram maiores em morcegos.

Em laboratório, Geluso et al. (1976) demonstraram que resíduos de organoclorados, acumulados no tecido adiposo de morcegos *Tadarida brasiliensis* capturados em cavernas em áreas de grande utilização de DDE e DDT no Novo México, atingiram o sistema nervoso causando sintomas de intoxicação após mobilização da gordura em uma simulação de voo migratório. Os autores sugerem que os pesticidas tenham contribuído para diminuição das populações desta espécie nestes locais.

Clark et al. (1978) coletaram em maio e junho de 1974 para análise de resíduos químicos de pesticidas no tecido nervoso, carcaça, leite e conteúdo estomacal, 46 morcegos da espécie *Myotis lucifugus* de uma colônia que tinha sido pulverizada com DDT e Clordane em agosto e setembro de 1973. Dos morcegos coletos, 27 estavam vivos, 17 mortos e 2 em estado de convulsão. As concentrações de resíduos químicos no tecido nervoso de morcegos

coletados vivos foram comparados com os que estavam mortos e convulsivos. Nesta comparação os autores concluíram que o DDT foi responsável pela morte dos indivíduos após a pulverização, e que quando comparados com ratos de laboratório, morcegos adultos de *M. lucifugus* são mais sensíveis ao DDT. Também foi observado neste estudo que morcegos jovens são mais sensíveis que adultos. Concentrações altas de resíduos foram detectadas nas amostras de leite e uma relação estatística significativa entre a diminuição de resíduos na carcaça e fêmeas lactantes, pode ser observada.

Efeitos toxicológicos no fígado de morcegos *Artibeus lituratus*, após sete dias exposição aos fungicidas Mancozeb a 2 g/L e Tebuconazol 1mL/L através da ingestão de alimento contaminado, foram avaliados por Machado (2010). A autora relatou tendências de acumulação lipídica em vacúolos lipídicos de diferentes tamanhos e número e quadro patológico de esteatose, nos animais tratados com Tebuconazol. Também foi observado aumento significativo da vacuolização dos hepatócitos e aumento da proporção volumétrica de capilares sinusóides em animais expostos ao Mancozeb. Em conclusão a autora descreve que a administração dos fungicidas, em concentrações recomendadas para aplicação em campo induziu alterações estruturais no fígado de *A. lituratus*.

Análise histomorfométrica de secções histológicas do intestino delgado e grosso de morcegos *Artibeus lituratus* expostos aos fungicidas Mancozeb 2g/L e Tebuconazol 1mL/L durante sete dias através de ingestão de alimento contaminado, foram avaliados por Andrade (2010). Não foram observadas pela autora alterações morfológicas do intestino dos animais expostos aos fungicidas.

2.3 Bioacúmulo de pesticidas em animais silvestres.

Resíduos de organoclorados e mercúrio foram detectados por Goutner et al. (2011), no fígado de aves (*Phalacrocorax carbo sinensis*) coletadas em regiões da Grécia. Espín et al. (2010), também relataram resíduos de organoclorados na gordura abdominal e subcutânea, fígado e cérebro de aves (*Alca torda*).

Análise do conteúdo estomacal de aves insetívoras da família Caprimulgidae coletadas por Valdez (2007) em fazendas do entorno do Parque Nacional das Emas demonstraram

contaminação destas aves por diversos agrotóxicos. Das 155 amostras coletadas, 117 estavam contaminadas pelo inseticida organoclorado endosulfan.

Concentrações e padrões de bifenil policlorado (PCBs), e éteres difenílicos polibromados (PBDEs) foram estudadas em baleias brancas (*Delphinapterus leucas*) e no cetáceo narval (*Monodon monoceros*) na Noruega (Wolkers et al., 2006). As concentrações de PCBs e pesticidas encontradas por estes autores foram aproximadamente 3000 e 8000 ng/g de lipídio, para as baleias brancas e três vezes maior para narvais. Concentrações de PBDEs 47, foram de aproximadamente 70 ng/g de lipídios para as baleias brancas e 170 ng/g lipídica para narval. Comparando seus resultados com dados de outros mamíferos marinhos da mesma área, os autores concluíram que os níveis de contaminantes observados em baleias brancas e narvais estão entre os mais altos.

Resíduos de DDT, PCBs, dieldrin e DDE foram encontrados em três espécies de morcegos (*Eptesicus fuscus*, *Myotis lucifugus* e *Pipistrellus subflavus*) coletados em Maryland e Virginia Ocidental - EUA (CLARK et al., 1976). Os autores reportaram que quando as concentrações de DDE na gordura da carcaça de todas as espécies estavam acima de 60-90 ppm foi possível mensurá-las no tecido nervoso.

Cabe ressaltar que, embora existam na literatura inúmeros relatos sobre bioacúmulo de pesticidas para animais de clima temperado, até o presente, nenhum estudo foi publicado acerca desta problemática envolvendo morcegos neotropicais, que também estão amplamente expostos a pesticidas, principalmente nas regiões agrícolas da América do Sul.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKER, C. I. **Efeito do tipo antidepressivo do disseleneto de difenila em um modelo de depressão induzida por malation em ratos.** 2010. 47 f. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2010.

ANDRADE, D. V. **Histomorfometria intestinal de *Artibeus lituratus* sob exposição a fungicidas ditiocarbamato e triazol.** 2010. 46 f. Monografia (Estágio Supervisionado em Biologia Geral II) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

AMARAL, T. S. **Alterações metabólicas e histopatológicas induzidas pelos inseticidas fentiona e espinosina em morcegos frugívoros.** 2009. 46 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

BEARDSALL, K. et al. Applied physiology of glucose control. **Current Paediatrics**, v. 16, n. 6, p. 424-438, Nov. 2006.

BIANCONI, G. V.; MIKICHII, S. B.; PEDRO, W. A. Diversidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em remanescentes florestais do município de Fênix, noroeste do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba v. 21, n. 4, Dec. 2004.

BISSON, M.; HONTELA, A. Cytotoxic and endocrine-disrupting potencial of Atrazine, Diazinon, Endosulfan, and Mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.15;180, n.2, p. 110-117, Apr. 2002.

BREDT, A.; ARAUJO, F. A. A.; CAETEANO, J. J. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. Brasília: **Fundação Nacional de Saúde**, Ministério da saúde, 1996.

BRETVELD, R. W. et al. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? **Reproductive Biology and Endocrinology** . p. 4-30, May. 2006.

BENNETT, B. S.; THIS, M. L. Organochlorine pesticide residues in guano of Brazilian free-tailed bats, *Tadarida brasiliensis* Saint-Hilaire, from East Texas. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 78, n. 3-4, p. 191-194, May. 2007.

CARVALHEIRA, J. B.C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, Ago. 2002.

CLARK, D. R. JR; KROLL, J. C. Effects of DDE on experimentally poisoned free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*): lethal brain concentrations. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 3, n.5-6, p. 893-901, Dec.1977.

CLARK, D. R. JR.; PROUTY, R. M. Organochlorine residues in three bat species from four localities in Maryland and West Virginia, 1973. **Pesticides Monitoring Journal**, v. 10, n. 10, p. 44-73, Sep. 1976.

CLARK, D. R.; KUNZ, T. H.; KAISER, T. E. Insecticides applied to a nursery colony of little brown bats (*Myotis lucifucus*): lethal concentrations in brain tissues. **Journal of Mammalogy**, v. 59, n. 1, p. 84-91, Feb. 1978.

CORSSMIT, E. P.; ROMIJN, J. A.; SAUERWEIN, H. P. **Regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms**: A review. *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 50, n. 7, p. 742-755, Jul. 2001.

DORIGATTI, A. **Aplicação de cromatografia gasosa em estudos de dissipação de herbicidas em solos brasileiros**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1987.

FLORES, A. V. et al. **Organoclorados um problema de saúde pública**. *Ambiente e sociedade*, v.7, n.2, p.113-124, Jun. 2004.

GALETTI, M.; MORELLATO, L. P. C. Diet of the large fruiteating bat *Artibeus lituratus* in a forest fragment in Brazil. **Mammalia**, v.58, n.4, p. 661-665, 1994.

GARDENER, A. L. **Feeding habits**. In: BAKER, R. J.; JONES JR, J. K.; CARTER, D, C.(Eds). *Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae*. **Special Publications Museum Texas Tech University**, v. 13, p. 364, Lobbok, 1977.

GARG, A. et al. Endosulfan intoxication: Blood glucose, electrolytes, Ca levels, ascorbic acid and glutathione in rats. **Toxicology Letters**, v. 5, n. 2, p. 119-123, Feb. 1980.

GARG, U. K. et al. Haemato-biochemical and immuno-pathophysiological effects of chronic toxicity with synthetic pyrethroid, organophosphate and chlorinated pesticides in broiler chicks. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 13, p. 1709–1722, Dec. 2004.

GELUSO, K.N.; ALTENBACH, J. S.; WILSON, D. Bat mortality: pesticide poisoning and migratory stress. **Science**, v. 194, n.8, p. 184-186, Oct. 1976.

GENUTH, S. For aggressive preventive management of type 2 diabetes. What is the evidence is it enough? **The Journal of Family Practice**, v. 47, n.5 p. 23-26, Nov. 1998;

GOULART, L. S. **Metabolismo energético em resposta ao jejum do morcego insetívoro *Molossus molossus* Pallas, 1766 (Chiroptera Molossidae)**. 2008. 62 f. Dissertação(Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

GOUTNER, V.; BECKER, P. H.; LIORDOS, V. Organochlorines and mercury in livers of great cormorants (*Phalacrocorax carbo sinensis*) wintering in northeastern Mediterranean wetlands in relation to area, bird age, and gender. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 4, p. 710–718, Jan. 2011

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

IBGE – **Indicadores de desenvolvimento sustentável – Brasil 2010**. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, p.443, 2010.

JONSSON, C. M. **Estudos de toxicidade e acúmulo de endosulfan nos peixes *Brachydanio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus***. 1991.180 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimento) – Faculdade de engenharia de alimentos – universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

KALENDER, S. et al. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. **Toxicology**, v. 202, n. 3, p. 227–35, Out. 2004.

KUNZ, T.; RACEY, P. A. Bat biology and conservation. **Washington, Smithsonian Institution Press**, 1998.

MACHADO, R. A. C. **Alterações morfológicas hepática e renais induzidas pela exposição aos fungicidas tebuconazol e mancozeb em *Artibeus lituratus***. 2010. 31 f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

MELO, B. E.S. **Avaliação das reservas energéticas em *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae) em áreas com diferentes graus de antropização em Minas Gerais**. 2010. 39 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

NORDLIE, R. C.; FOSTER, J. D.; LANGE, A. J. Regulation of glucose production by the liver. **Annual Review of Nutrition**, v. 19, p. 379-406, 1999.

NOWAK, R. M. Walkers bats of the world. Introduction por, KUNTZ, T. H.; PIERSON, E. D. (Eds.). Baltimore: **Johns Hopkins University Press**, p.287, 1994.

ORTEM, J. M.; NEUHAUS, O. W. **Bioquímica humana**. 10ª ed. Buenos Aires, 1 Editora médica Panamericana, 1993.

PASSOS, F.C. et al. Frugivoria em Morcegos (Chiroptera, Phyllostomidae) no Parque Estadual Intervales, sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba**, v.20, n.3. p. 511-517, 2003.

PATTERSON, B.; PASCUAL, R. The fossil mammal fauna of South America. The **Quarterly Review of Biology**, v.43. n.3, p. 247-309, Sep. 1968.

POURNOURMOHAMMADI, S. et al. Effects of malathion subchronic exposure on rat skeletal muscle glucose metabolism. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.19, n. 1, p. 191-196, Jan. 2005.

RAHIMI, R.; MOHAMMAD, A. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n.2, p. 115-121, June. 2007.

REIS, N. R. et al. **Morcegos do Brasil**. Londrina, 2007. 253 p.

REZG, R. et al. Effect of subchronic exposure to malathion on glycogen phosphorylase and hexokinase activities in rat liver using native PAGE. **Toxicology**, v. 223, n. 1-2, p.9-14, Jun. 2006.

REZG, R. et al. Biochemical evaluation of hepatic damage in subchronic exposure to malathion in rats: Effect on superoxide dismutase and catalase activities using native PAGE. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 655-662, 2008.

REZG, R. et al. Effect of subchronic exposure to malathion on metabolic parameters in the rat. **Comptes Rendus Biologies**, v. 330, n. 2, p. 143-147, Feb. 2007.

RIGOTTO, RM et al. **Estudo epidemiológico da população da região do baixo Jaguaribe exposta à contaminação ambiental em área de uso de agrotóxicos** -Documento síntese dos resultados parciais da pesquisa. Fortaleza, agosto de 2010.

SAIYED, H. et al. Effect of Endosulfan on Male Reproductive Development. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n.16, p.1958-1962, Dec. 2003.

SHORE, R. F.; MYHILL, D. G.; WRIGHT, J. A comparison of the toxicity to laboratory mice and pipistrelle bats *Pipistrellus pipistrellus* of exposure to remedially-treated timber. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 15, n. 2-3, p. 125-129, Oct. 1996.

SINGH, N. N.; SRIVASTAVA, A. K. Effect of a paired mixture of aldrin and formothion on carbohydrate metabolism in a fish, *Heteropneustes fossilis*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 15, n. 3, p. 257–261, Jun.1981.

SINGH, S. K.; PANDEY, R. S. Gonadal toxicity of short term chronic endosulfan exposure to male rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 27, n.4, p. 341-346, Apr. 1989.

SINDAG (2008) **Mercado Brasileiro de Fitossanitários. Apresentado no Workshop Avaliação da Exposição de Misturadores, Abastecedores e Aplicadores a Agrotóxicos**. Brasília, 2009.

SINGH, S. K.; PANDEY, R. S. Effect of sub-chronic endosulfan exposures on plasma gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis in rat. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 28. n. 10, p. 953-956, Oct.1990.

SINHA, N. R.; NARAYAN, D.; SAXENA, K. Effect of Endosulfan on the Testis of Growing Rats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p.79–86, 1997.

SRIVASTAVA, A. K.; MISHRA, J. Effects of fenthion on the blood and tissue chemistry of a teleost fish (*Heteropneustes fossilis*). **Journal of Comparative Pathology**, v.93, n. 1. p. 27–31, Jan. 1983.

TAYLOR, M. et al. Pesticide Residues in Coastal Tropical Ecosystems. Distribution, Fate and Effects. London. 541 p. 2003.

THANGAVEL, P. et al. Hormone profile of an edible, freshwater teleost, *Sarotherodon mossambicus* (Peters) under endosulfan toxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 3 p. 229–234, Jul 2010.

THIES, M. L.; THIES, K.; MCBEE, K. Organochlorine pesticide accumulation and genotoxicity in Mexican free-tailed bats from Oklahoma and New Mexico. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 178-187, Feb. 1996.

TIMM, R. M. **The mammal fauna**, In: L.A. MCDADE; K.S. BAWA; H.A. HESPENHEIDE and G.S. HARTSHORN (Eds). *La Selva: Ecology and natural history of a neotropical rain forest*. Chicago, University of Chicago Press p. 229-237, 1994.

TIRONE, T. A.; BRUNICARD, F. C. 2001. Overview of glucose regulation. **World Journal of Surgery**, v.25, n.4. p. 461-467, Apr. 2001.

VALDEZ, S. A. C. **Estudo da contaminação por agrotóxicos em aves da Família Cuprimulgidae no Parque Nacional das Emas (GO)**. 2007. 109 f. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. *Revista da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras São José do Rio Preto*. **Boletim de Ciências**, São José do Rio Preto, SP. n.1, p.1-72, 1973.

WEBER, J-M. Energy Cycle in Vertebrates. *Encyclopédia of life sciences*. London: **Nature Publishing Group**, 2001.

WOLKERS, H. et al. Accumulation, Metabolism, and Food-Chain Transfer of Chlorinated and Brominated Contaminants in Subadult White Whales (*Delphinapterus leucas*) and Narwhals (*Monodon monoceros*) From Svalbard, Norway. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, n. 1, p. 69-78, Jan. 2006.

YEO, R. P.; SAWDON, M. Hormonal regulation of metabolism: regulation of plasma glucose. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v.8. n. 7, p. 295-298, 2007.

CAPÍTULO 1

Efeitos toxicológicos do inseticida endosulfan sobre o metabolismo de morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* e análise do bioacúmulo no tecido adiposo e hepático.

Brinati, A.^{1,2}; Freitas, M. B.¹.

¹Laboratório de Ecofisiologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa. CEP 36571-000, Viçosa, MG, Brasil.

²E-mail: alexesperafeliz@yahoo.com.br

RESUMO

O uso intensivo de várias classes de agrotóxicos na agricultura tem trazido uma série de preocupações associadas com seus efeitos negativos em humanos, animais e o ambiente. Foi provado que a maioria destes componentes pode causar danos agudos e crônicos, tais como alterações no sistema nervoso, efeitos imunossupressores e ações carcinogênicas e/ou mutagênicas, alterando a secreção e ação de hormônios e inibindo enzimas nas vias de glicose e gliconeogênese em animais experimentais. Para investigar os efeitos do inseticida organoclorado endosulfan no metabolismo, na secreção de hormônios e seu possível acúmulo em tecidos, morcegos frugívoros da espécie *Artibeus lituratus* foram expostos a frutos contaminados com esse inseticida por 35 dias. Um total de 28 morcegos foram separados em 4 grupos experimentais: controle, espalhante adesivo 0,015g/L, endosulfan 1,05 g/L e endosulfan 2,1 g/L. A dose usada foi a mesma indicada pelo fabricante, e objetivou simular a intoxicação dos morcegos no campo. A um grupo tratado foi oferecido o dobro da dose do inseticida. Analisou-se as concentrações de glicose e testosterona no plasma, proteínas e lipídios do fígado e músculos, bem como de lipídios do tecido adiposo e ácidos graxos da carcaça. Também se avaliou o bioacúmulo do endosulfan no tecido adiposo e fígado, por cromatografia gasosa (CG). Os grupos tratados mostraram mudanças na concentração de glicose, concentrações de proteínas em alguns músculos e redução de ácidos graxos na carcaça. Observou-se acúmulo de endosulfan depois de 35 dias de tratamentos em ambos os grupos tratados, sugerindo um comprometimento a longo prazo da sobrevivência da população em florestas neotropicais, onde eles representam um papel importante na regeneração das plantas.

Palavras-chave: metabolismo, resíduos, morcegos, organoclorado, endosulfan, inseticida, testosterona.

1. INTRODUÇÃO

O uso intensivo e indiscriminado de diversas classes de agrotóxicos nas culturas agrícolas tem sido relacionado a diminuições das populações de animais silvestres e aumento da toxicidade para várias espécies de organismos não alvos (GELUSO et al., 1976; GOUTNER et al., 2011).

Diversos trabalhos já demonstraram que a exposição crônica a pequenas quantidades de inseticidas organoclorados e organofosforados podem causar efeitos deletérios em órgãos como pâncreas, fígado, músculo e cérebro envolvidos no metabolismo de carboidratos, gordura e proteínas, por meio de alterações na atividade das vias glicolítica, gliconeogênese e glicogênese (MATSCHINSKY et al., 1971; DEATORE e CHAKRABARTI., 1981; SINGH e SRIVASTAVA., 1981; RAHIMI et al., 2007). Estes inseticidas têm sido apontados também como desreguladores endócrinos, causadores de alterações na síntese e na secreção de diversos hormônios, incluindo os esteróides (BISSON et al., 2002; BRETVELD et al., 2006; ALAHYARY et al., 2008).

Embora exista na literatura dados sobre a toxicidade de agrotóxicos organoclorados em algumas espécies, pouco se sabe sobre seus efeitos no metabolismo energético e na reprodução de animais silvestres expostos a estes compostos. O endosulfan, utilizado para o controle de insetos em diversas culturas de frutas, café, legumes, arroz, milho, algodão e chá é um inseticida organoclorado. O mecanismo de ação desse inseticida tem sido associado à inibição do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA), causando efeito despolarizante e superestimulação do tecido nervoso (COATS, 1990). Em adição aos efeitos neurotóxicos, o endosulfan pode interferir no metabolismo de carboidratos (KALENDER et al., 2004; TANGAVEL et al., 2010), secreção hormonal (SINGH et al., 1990; SAIYED et al., 2003) e ainda acumular em tecido adiposo e nervoso (TAWANDA et al., 2007).

Em morcegos, resíduos de compostos organoclorados foram relatados em espécies de regiões temperadas por diversos autores (CLARK et al., 1976; GELUSO et al., 1976; O'SHEA et al., 2001; ALLINSON et al., 2006; KANNAN et al., 2010;). Tais resultados podem estar relacionados com a contaminação de suas fontes de alimento e habitats, resultando em declínios das populações de morcegos que vivem próximos a campos de cultivos (GELUSO et al., 1976). Apesar destes estudos, investigações acerca de alterações

metabólicas, hormonais e acúmulo endógeno em diversas espécies de mamíferos silvestres neotropicais ainda são pouco conhecidas, especialmente as que ocorrem em fragmentos de Mata Atlântica, rodeados por ambientes com diversos tipos de culturas agrícolas como, por exemplo, o morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae). Essa espécie desempenha um papel fundamental como dispersor de sementes, sendo cruciais nos processo regeneração e sucessão secundária de áreas tropicais (CHARLES- DOMINIQUE 1986; GORCHOV et al. 1993).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição crônica ao inseticida organoclorado endosulfan no metabolismo energético, na concentração plasmática de testosterona e o possível acúmulo endógeno desse inseticida no tecido adiposo e no fígado de morcegos frugívoros *Artibeus lituratus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Laboratórios

O processamento das amostras e análises do material deste estudo foi realizado no Laboratório de Ecofisiologia (Departamento de Biologia Animal – Universidade Federal de Viçosa), Laboratório de Química Analítica (Universidade Federal de Viçosa) e Laboratório Hermes Pardini, Belo Horizonte – MG.

2.2 Inseticida Endosulfan

Foi utilizado o inseticida organoclorado endosulfan (1,4 ,5,6,7,7-hexachloro-8 9,10-trinorborn-5-en-2,3-ylenebismethylene/ sulfite, 350 g/L – 35% m/v) conhecido popularmente como Thiodan^R50WP - Hoechst Schering AgrEvo, GmBh . Seu ingrediente ativo consiste na mistura de dois isômeros: α -endosulfan 70 % e β -endosulfan 30 % (Figura 1). O endosulfan é insolúvel na água e moderadamente solúvel na maioria dos solventes orgânicos: em acetona

33%; benzeno 37%; xileno 45% e metanol 11% (Larini, 1999). A LD₅₀ em ratos varia de 18-335 mg/kg de peso corporal (Kuvarega, 2005).

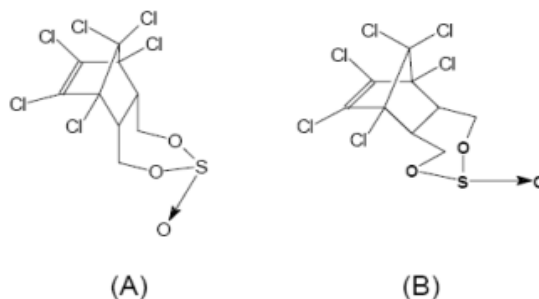


Figura 1: Estrutura química do alfa-endosulfan (a) e beta-endosulfan (b).

De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o endosulfan é classificado como extremamente tóxico. Quanto à classificação ambiental, é enquadrado como produto altamente perigoso para o meio ambiente.

2.3 Espalhante adesivo

O espalhante adesivo utilizado foi Will Fix (ácido dodecilbenzeno sulfônico, 30 g/L – 3% m/v), indicado para aumentar a eficiência das caldas de inseticidas e herbicidas, reduzindo a tensão superficial da solução a ser pulverizada, auxiliando a aderência dos agrotóxicos à folhas e frutos.

2.4 Animais e tratamento

Machos adultos de morcegos da espécie *Artibeus lituratus* (N=28) foram capturados em fragmentos de Mata Atlântica próximos ao Campus da Universidade Federal de Viçosa - MG e Espera Feliz – MG, por meio de redes de neblina (*mist nets*), entre os meses de agosto de 2010 e janeiro de 2011. Os animais capturados, pesando entre 61-90 g, foram mantidos individualmente em sacos de contenção sendo posteriormente transferidos para gaiolas de

arame galvanizado (45x22 cm) onde permaneceram por 35 dias. As gaiolas foram alocadas em dois recintos distintos, em morcegário localizado no Museu de Zoologia João Moojen da UFV, com iluminação natural e temperatura ambiente (Figura 2).



Figura 2. Recinto (morcegário) utilizado para acondicionamento das gaiolas no período de tratamento dos animais, localizado no Museu de Zoologia João Moojen-UFV.

Após um período adaptativo de dois dias em cativeiro, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, sendo alimentados diariamente com mamão papaia maduro, por ser de fácil aceitação em cativeiro. O grupo Controle (Controle; N= 7) foi alimentado com fruto sem tratamento; o grupo Espalhante (Esp; N=7) foi alimentado com fruto tratado somente com espalhante adesivo 0,015 g/L; o grupo Endosulfan 1 (End 1; N= 7) foi alimentado com fruto tratado com inseticida endosulfan na concentração 1,05 g/L = 0, 105% m/v e espalhante adesivo 0,015 g/L; e o grupo Endosulfan 2 (End 2; N= 7) alimentado com fruto tratado com inseticida endosulfan na concentração 2,1 g/L = 0,21% m/v e mesma concentração de espalhante adesivo utilizada no End 1. Os frutos inteiros (~300 g) foram divididos ao meio e oferecidos aos animais do grupo controle. Para os demais grupos, os frutos foram imersos em calda, constituída de espalhante adesivo e o inseticida endosulfan de acordo com a concentração do grupo específico. Após imersão na calda, os mamões foram mantidos suspensos em uma caixa plástica adaptada, de modo que não ocorresse contato com

outras superfícies, para evitar assim retirada do agente químico por contato e também para a secagem dos mesmos.

Posteriormente, os frutos foram partidos ao meio, pesados e oferecidos aos animais, sendo mantida a casca (Figura 3). O alimento foi oferecido diariamente, próximo das 18 horas, sendo a água oferecida *ad libitum*.



Figura 3. *Artibeus lituratus* alimentando-se durante o experimento.

As concentrações utilizadas do inseticida seguem a indicação do fabricante para aplicação em diversas culturas como soja, tomate, café, algodão, cana-de-açúcar e frutas.

2.5 Amostragem

Ao final dos tratamentos os animais foram eutanasiados por decapitação e o sangue foi imediatamente coletado em tubos heparinizados. Os tecidos hepático e adiposo, os músculos peitoral e das patas anteriores e posteriores foram retirados, pesados e divididos em sub-amostras com peso superior a 200 mg para cada dosagem, e congelados a temperatura de -20 °C.

2.6 Determinação do consumo alimentar

Para mensurar a quantidade de mamão ingerida por animal durante o período de tratamento, foi realizado o registro diário do peso do alimento oferecido, bem como das sobras. Os mamões inteiros foram divididos ao meio e colocados em placas de petri, devidamente identificadas de acordo com os recintos de cada animal e o tratamento. Posteriormente as placas com as frutas foram pesadas em uma balança digital western KC – 04 com capacidade para 2.000 g. As sobras foram recolhidas em sacos plásticos (10 x15 cm) e pesadas. Os valores referentes ao alimento oferecido e as sobras foram registrados diariamente em uma planilha, sendo no final do tratamento calculada a média de consumo e sobras de cada animal.

2.7 Determinação da Glicemia

Para a determinação da glicemia, o sangue coletado foi centrifugado (2000 rpm/10 min) para separação do plasma, sendo posteriormente armazenado em microtubo e estocado a -20 °C. A glicemia foi determinada pelo método enzimático da glicose-oxidase - GLUCOX 500 (DOLES).

2.8 Glicogênio hepático e muscular

Para as determinações do glicogênio hepático e do músculo peitoral, uma amostra de 350-800 mg desses tecidos, foi colocada em tubo cônico contendo KOH 30% e hidrolisada em banho-maria fervente por 1 hora, acrescentando 5 gotas de Na₂SO₄ saturado ao retirar do banho. Posteriormente foram adicionados 4,5 mL de álcool absoluto (99,9%) para tornar a solução alcoólica a 70%. Os tubos contendo essa solução foram aquecidos por 15 segundos, e depois centrifugados (2000 rpm/10 min), sendo descartado o sobrenadante. O precipitado (glicogênio) foi levantado com 2 mL de água destilada e levados ao banho-maria por 15 segundos para ser dissolvido. Após foi acrescentado à solução 4,5 mL de álcool absoluto (99,9%). Os tubos contendo a solução foram novamente aquecidos em banho-maria por 15 segundos e em seguida centrifugados, sendo posteriormente descartado o sobrenadante e adicionado ao precipitado 5 mL de água destilada norma. A solução contendo o glicogênio foi

transferida para uma proveta e completada para 10 mL com água destilada, sendo em seguida armazenada em freezer a -20 °C.

A dosagem do glicogênio das amostras foi realizada pelo método colorimétrico segundo Sjörgren et al. (1983).

2.9 Determinação da proteína tecidual

Para determinação da proteína total hepática e muscular (músculo peitoral e das patas anteriores e posteriores), uma porção conhecida do fígado e dos músculos foi homogeneizada com solução fisiológica 0,9%. Posteriormente foi utilizado o método colorimétrico através do Kit *BCA Protein Assay Reagent* (BCA-PIERCE).

2.10 Determinação dos lipídios totais

Para a determinação dos lipídios totais do fígado, tecido adiposo e muscular (músculos das patas e peitoral), uma porção conhecida desses tecidos foi retirada e homogeneizada com um volume conhecido de solução clorofórmio-metanol (2:1) (FOLCH et al.,1957). Após filtração e separação das fases por adição de solução fisiológica 0,9%, uma alíquota da fase clorofórmica (10 mL) foi utilizada para determinação dos lipídios totais pelo método gravimétrico.

2.11 Ácidos graxos totais da carcaça

Após a retirada dos tecidos utilizados nas demais dosagens, foi retirado também o tubo digestório, a partir da porção terminal do esôfago até o ânus, rins e sistema reprodutivo. A carcaça foi então pesada, e acondicionada em um recipiente de vidro contendo 200 mL de KOH 6 N durante 4 a 6 dias, sendo posteriormente filtrada. Foi então adicionado volume igual de álcool absoluto, resultando assim uma solução de KOH-etanol 50% (v/v). Uma amostra desta solução foi lavada por 3 vezes com 40 mL de éter de petróleo, acidificada com 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e submetida à extração por clorofórmio, com 3 vezes o

volume final. Foram utilizados 50 mL desta fase para a determinação dos ácidos graxos totais por método gravimétrico (FOLCH et al.,1957).

2.12 Determinação de resíduos de endosulfan em tecido hepático e adiposo.

Para a análise de possíveis resíduos acumulados do pesticida endosulfan nos animais tratados, foram utilizadas amostras de tecido adiposo e fígado. A técnica consistiu em extrair 1,000 mg da amostra dos tecidos previamente homogeneizados. Posteriormente foi adicionado às amostras o solvente extrator (3 mL de água, 8 mL de acetonitrila). As amostras e a mistura extratora foram submetidas à agitação em Vortex por 2 minutos e em seguida congeladas em freezer à -20 °C por 4 horas. Após separação das fases pelo congelamento da fase aquosa e da amostra, o sobrenadante constituído de fase orgânica líquida foi filtrado em papel filtro contendo 1,0 g de sulfato de sódio anidro, sendo o papel filtro previamente lavado com acetonitrila resfriada. O volume do extrato obtido foi concentrado e ajustado em balão volumétrico para 5,0 mL com acetonitrila. Em cada balão volumétrico foram adicionados 0,1 mL do padrão interno utilizado (parationa metílica na concentração de 10 mg/L). Após este procedimento, a mistura foi transferida para um frasco de vidro e armazenada em freezer até o momento da análise. Para a análise cromatográfica, foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17A equipado com um detector por captura de elétrons (DCE).

2.13 Concentrações plasmática de testosterona

A análise das concentrações plasmáticas de testosterona foi realizada através do método de quimioluminescência, pelo Laboratório Hermes Pardini, Belo Horizonte – MG .

2.14 Análise estatística

Os dados estão apresentados na forma de Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). Para comparação dos resultados foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para dados não repetidos, quando foi comprovada a distribuição normal e

homogeneidade dos dados. Para dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis. O critério de significância foi acertado em 5% ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Consumo alimentar

Foi observada diferença em relação à quantidade (g) de mamão oferecido entre os grupos, controle e End2, porém não houve diferença entre as sobras quando comparados os grupos experimentais ao controle (Tabela 1).

Tabela 1: Determinação do consumo alimentar entre o grupo Controle, Esp, End1 e End2.

Grupos	(g)	Média	Erro padrão
Controle	Oferecido	153	0,98
	Sobra	40	4,86
Esp	Oferecido	149	1,19
	Sobra	39	4,72
End 1	Oferecido	153	1,10
	Sobra	33	5,23
End 2	Oferecido	148	1,22
	Sobra	39	4,41

3.2 Glicemia

As concentrações de glicose plasmática dos animais do grupo End1 apresentaram redução ($18,25 \pm 2,35$ mmol/L) em relação aos do grupo Controle ($25,99 \pm 1,52$) ($F_{(1)} = 2,78$; $P = 0,05$), (Figura 4).

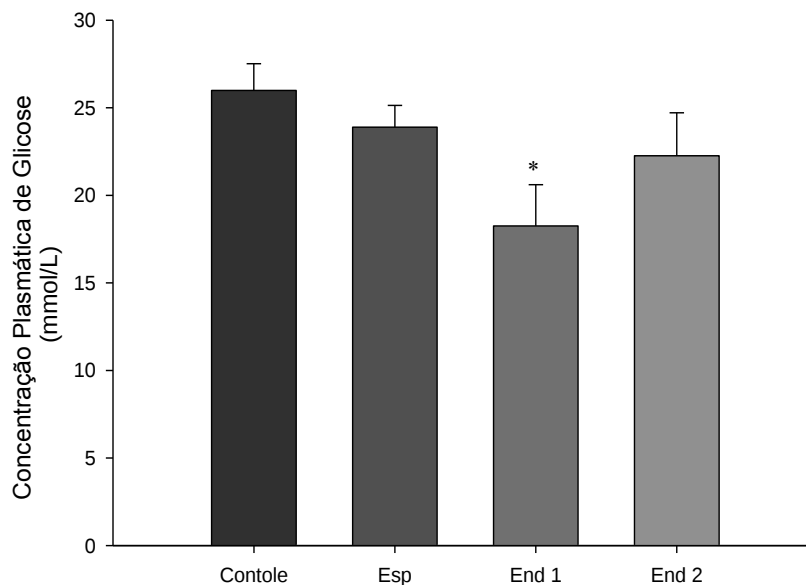


Figura 4. Concentrações plasmática de glicose (mmol/L) em animais Controle; Esp= espalhante adesivo 0,015 g/L; End1= endosulfan 1,05 g/L; End2= endosulfan 2,1 g/L. Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

3.3 Glicogênio hepático e muscular

Não foi observada diferença significativa nas concentrações de glicogênio do músculo peitoral nos animais tratados com Esp ($0,84 \pm 0,28$ μmol glicosil-unidades/g) e End1 e End2 ($0,45 \pm 0,15$ e $0,46 \pm 0,12$ μmol glicosil-unidades/g, respectivamente) quando comparados com o grupo Controle ($0,56 \pm 0,19$ μmol glicosil-unidades/g) ($F_{(1)} = 0,47$; $P = 0,70$). As concentrações de glicogênio hepático também não diferiram significativamente entre os grupos tratados com Esp ($4,53 \pm 0,69$ μmol glicosil-unidades/g), End 1 e End2 ($2,74 \pm 0,93$; $3,46 \pm 0,66$ μmol glicosil-unidades/g, respectivamente) em relação ao grupo Controle ($2,17 \pm 0,62$ μmol glicosil-unidades/g) ($F_{(1)} = 1,88$; $P = 0,15$).

Os resultados das análises de glicogênio muscular e hepático estão mostrados na figura 5. Não houve diferença entre os grupos tratados e o controle, bem como entre os tratamentos.

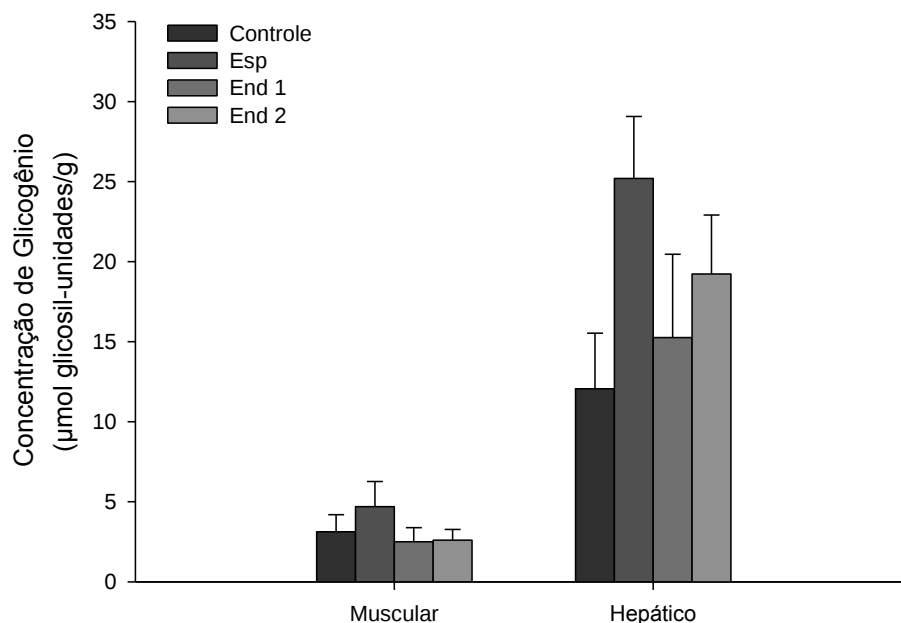


Figura 5. Concentrações de glicogênio muscular e hepático em animais Controle; Esp= espalhante adesivo 0,015 g/L; End1= endosulfan 1,05 g/L; End2= endosulfan 2,1 g/L. Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM.

3.4 Proteína total

A concentração total de proteína da musculatura das patas anteriores apresentou diminuição significativa nos animais tratados com espalhante adesivo quando comparados com o grupo controle ($42,19 \pm 3,85$ e $63,06 \pm 5,47$ g/100g, respectivamente) ($F_{(1)} = 3,11$; $P = 0,04$). Redução significativa na concentração total de proteína das patas posteriores também foi observada entre os animais do grupo End1 e Esp ($37,09 \pm 2,83$ e $41,34 \pm 4,00$ g/100g, respectivamente) ($F_{(1)} = 5,57$; $P = 0,005$). Não foram encontradas alterações nas concentrações totais de proteínas do fígado ($F_{(1)} = 0,72$; $P = 0,54$) e músculo peitoral ($F_{(1)} = 0,42$; $P = 0,73$) nos animais tratados em relação ao controle (Figura 6).

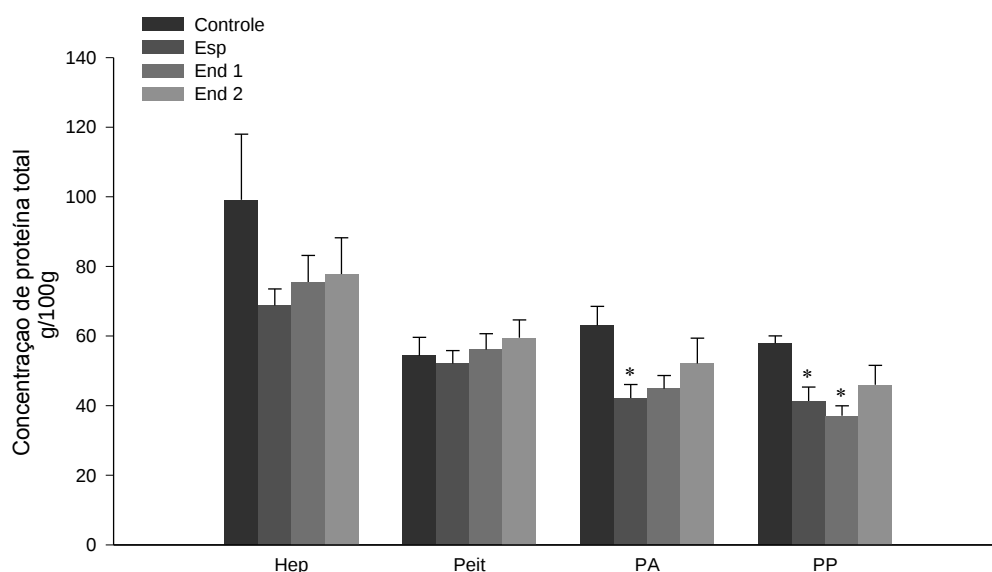


Figura 6. Concentrações totais de proteína (g/100g) no fígado (Hep), no músculo peitoral (Peit), músculo das patas anteriores (PA) e posteriores (PP), em morcegos *Artibeus lituratus*, do grupo Controle; Esp = espalhante adesivo 0,015 g/L; End1= endosulfan 1,05 g/L; End2= endosulfan 2,1 g/L. Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle no mesmo tecido.

3.5 Lipídios totais teciduais

As concentrações de lipídios totais no fígado apresentaram aumento significativo nos animais do grupo Esp quando comparados com o grupo Controle ($9,87 \pm 0,77$ e $6,90 \pm 0,70$ g/100g) ($F_{(1)} = 3,32$; $P = 0,03$). Nos lipídios totais das patas anteriores também se observou um aumento significativo nos animais End1 em relação ao Controle ($5,27 \pm 0,25$ e $3,52 \pm 0,31$ g/100g, respectivamente) ($F_{(1)} = 3,36$; $P = 0,03$). Não houve diferença significativa nas concentrações de lipídios totais do músculo peitoral ($F_{(1)} = 1,23$; $P = 0,32$) e patas posteriores dos grupos analisados ($F_{(1)} = 0,27$; $P = 0,84$) (Figura 7).

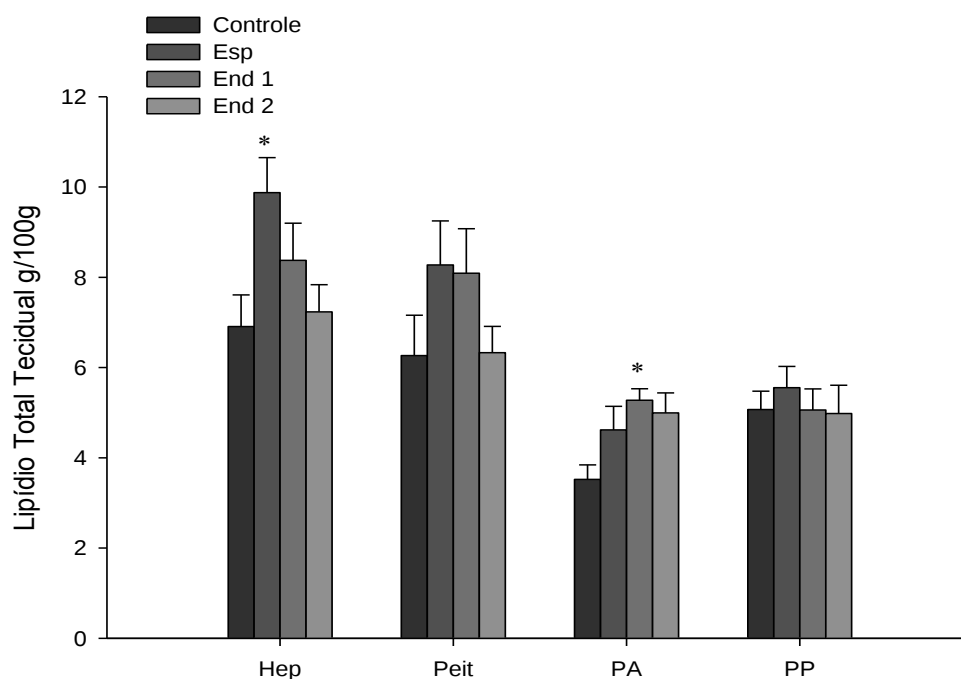


Figura 7. Concentrações médias de lipídios (g/100g) no fígado (Hep), no músculo peitoral (Peit), músculos das patas anteriores (PA) e posteriores (PP), em morcegos *Artibeus lituratus*, do grupo Controle; Esp= espalhante adesivo 0,015 g/L; End1= endosulfan 1,05 g/L; End2= endosulfan 2,1 g/L. Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ para Hep e PA em relação ao grupo controle.

3.6 Lipídios totais do Tecido Adiposo

As concentrações de lipídios do tecido adiposo (g/100 g) não apresentaram diferenças significativa entre animais tratados com Esp ($59,06 \pm 3,55$ g/100 g) e End1 e End2 ($53,70 \pm 3,58$ e $61,75 \pm 4,63$ g/100 g, respectivamente) quando comparados com o Controle ($51,56 \pm 2,65$ g/100 g) ($F_{(1)} = 1,60$; $P = 0,21$) (Figura 8).

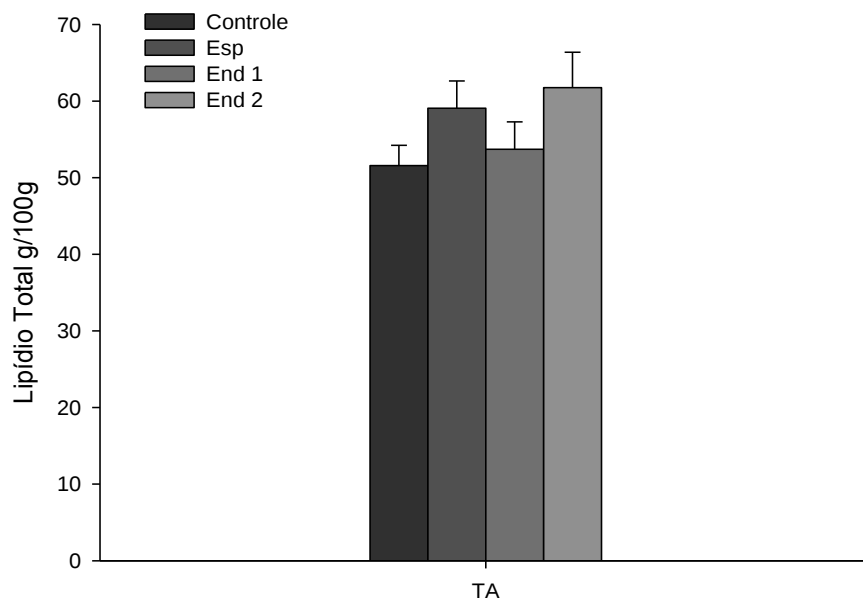


Figura 8. Concentrações médias de lipídios no Tecido Adiposo (TA) (g/100g) em morcegos *Artibeus lituratus*, do grupo Controle; Esp= espalhante adesivo 0,015 g/L; End1= endosulfan 1,05 g/L; End2= endosulfan 2,1 g/L. Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM.

3.7 Ácidos graxos totais da carcaça

As concentrações de ácidos graxos totais da carcaça apresentaram diminuição significativa nos animais dos grupos End1 e End2 ($6,17 \pm 0,72$ e $5,22 \pm 0,43$, respectivamente), quando comparados com o grupo Controle ($9,66 \pm 0,77$) ($F_{(1)} = 5,58$; $P = 0,005$) (Figura 9).

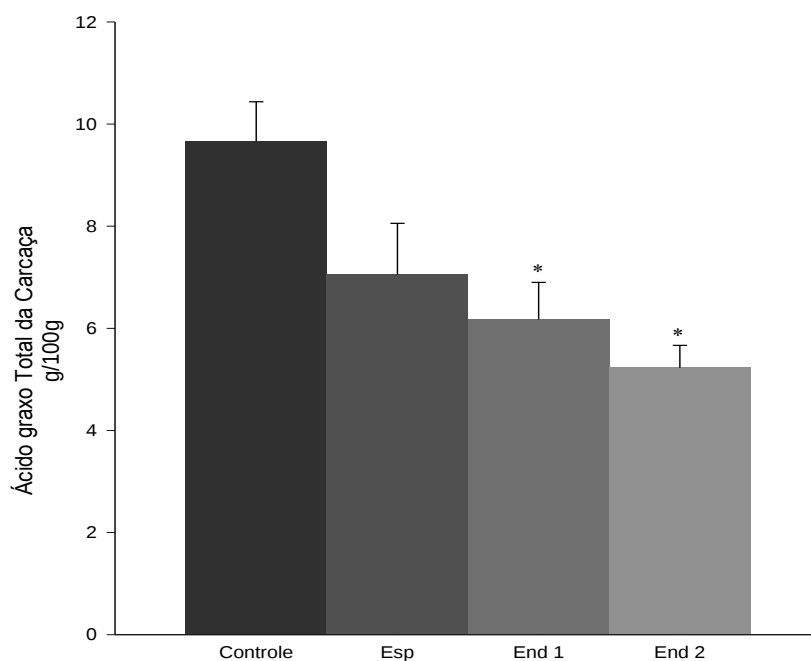


Figura 9. Concentrações médias de ácidos graxos totais da carcaça (g/100g) em animais do grupo Controle; Esp= espalhante adesivo 0,015 g/L; End1= endosulfan 1,05 g/L; End2= endosulfan 2,1 g/L. Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

3.8 Concentrações plasmáticas de testosterona

As concentrações de testosterona não apresentaram diferença significativa entre os animais Esp ($37,57 \pm 9,88$ ng/dL), End1 e End2 ($82,86 \pm 21,83$ e $460,00 \pm 394,11$ ng/dL, respectivamente) (P quando comparados com o grupo controle ($674,29 \pm 390,46$ ng/dL) (Figura 10).

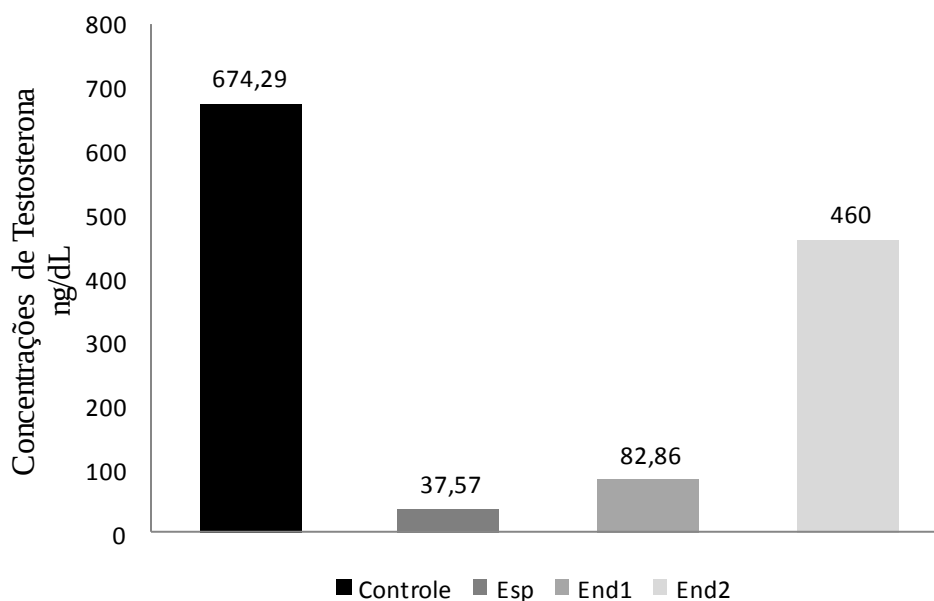


Figura 10. Concentrações totais de testosterona (ng/dL) em morcegos *Artibeus lituratus*, do grupo Controle; Esp= espalhante adesivo 0,015 g/L; End1= endosulfan 1,05 g/L; End2= endosulfan 2,1 g/L.

3.9 Análise Cromatográfica

Por meio da técnica cromatográfica de alta sensibilidade aos compostos halogenados, foi possível separar, identificar e quantificar os resíduos do inseticida endosulfan nos extratos de tecido adiposo e fígado de morcegos (*Artibeus lituratus*). O organoclorado endosulfan foi identificado pela comparação do tempo de retenção do composto com os dos padrões desta substância. Os picos com tempo de retenção t_R iguais a 7,629 e 8,878 correspondem ao inseticida α -endosulfan, β -endosulfan e o pico 6,456 ao padrão interno parationa. Dessa forma, considerou-se como o valor de área para endosulfan, a soma das áreas dos picos dos seus isômeros (Figuras 11 a 14). Foi encontrada a concentração de $9,180 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{g/g}$ de endosulfan no fígado de animais do grupo End1 e $6,408 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g/g}$ no grupo End2. No tecido adiposo foi encontrada a concentração de $3,087 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g/g}$ no grupo End1 e $1,368 \cdot 10^{-2}$ no End2.

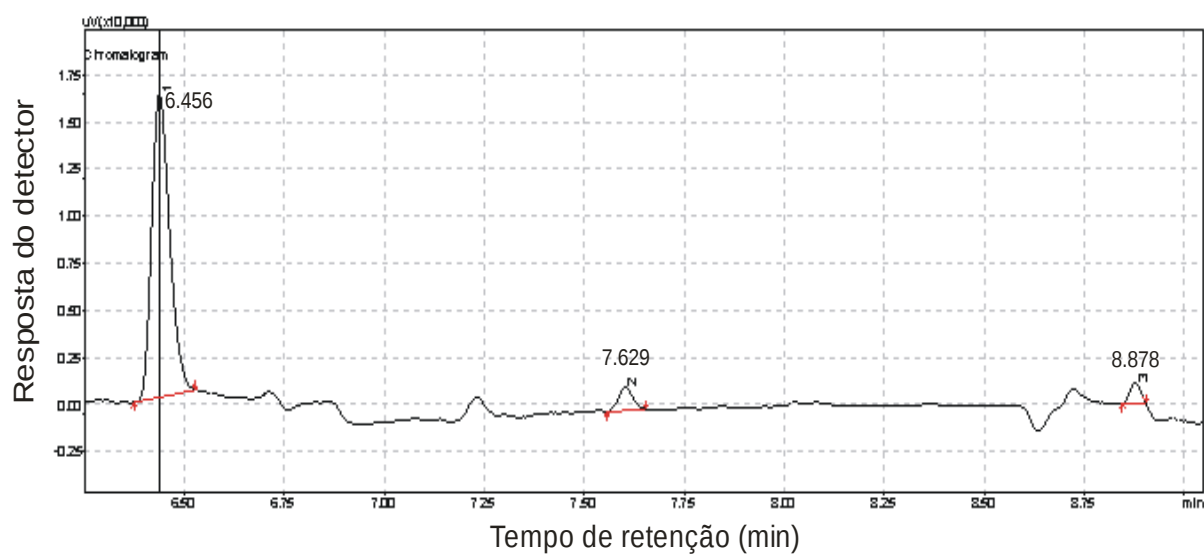


Figura 11. Cromatograma de amostras de tecido adiposo dos morcegos tratados com endosulfan 1,05 g/L, onde $t_R = 6.456$: parationa, $t_R = 7.629$: α -endosulfan e $t_R = 8.878$: β -endosulfan.

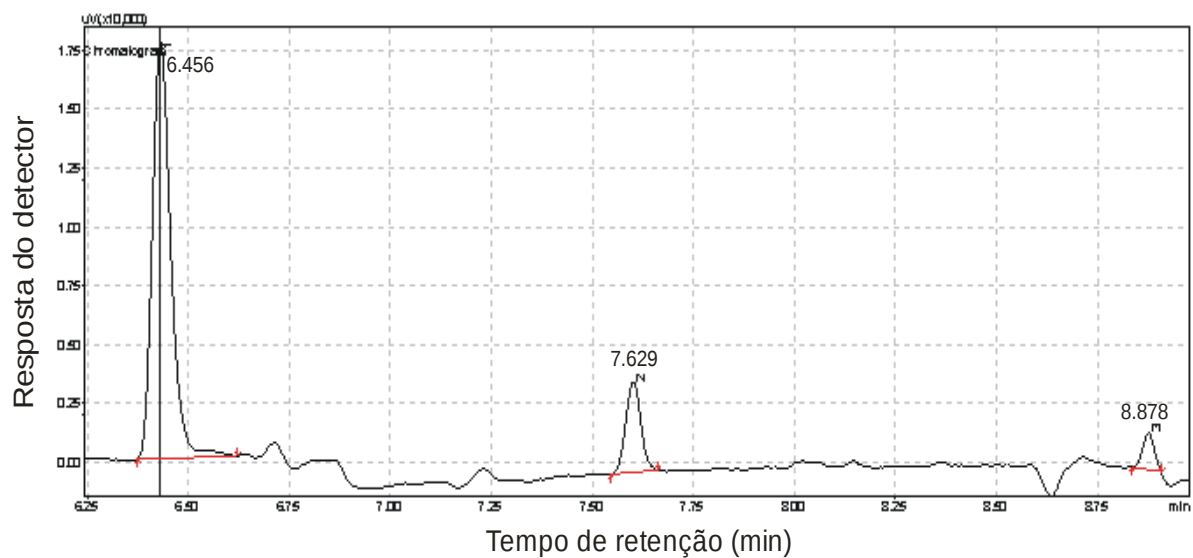


Figura 12. Cromatograma de amostras de tecido adiposo dos morcegos tratados com endosulfan 2,1 g/L, onde $t_R = 6.456$: parationa, $t_R = 7.629$: α -endosulfan e $t_R = 8.878$: β -endosulfan.

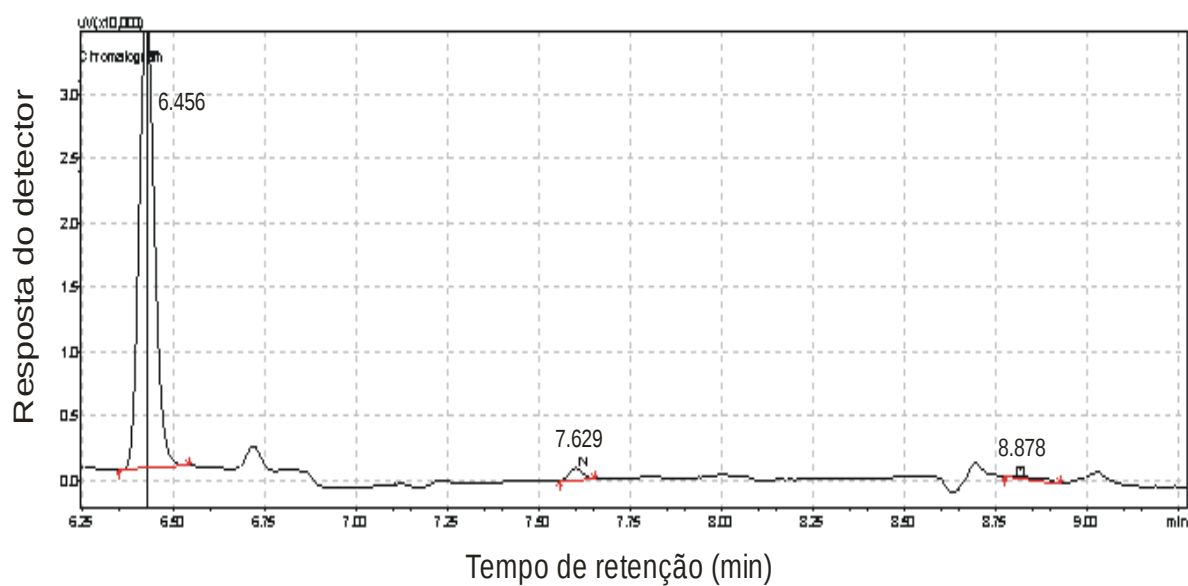


Figura 13. Cromatograma de amostras de fígado dos morcegos tratados com endosulfan 1,05 g/L, onde $t_R = 6.456$: parationa, $t_R = 7.629$: α -endosulfan e $t_R = 8.878$: β -endosulfan.

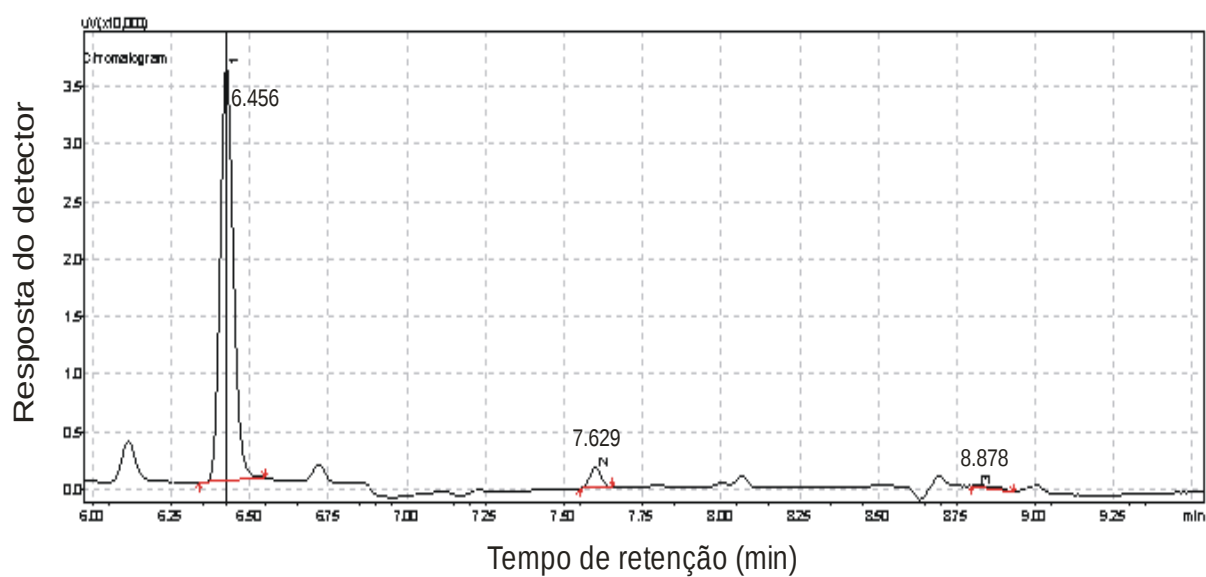


Figura 14. Cromatograma de estratos de fígado dos morcegos tratados com endosulfan 2,1 g/L, onde $t_R = 6.456$: parationa, $t_R = 7.629$: α -endosulfan e $t_R = 8.878$: β -endosulfan.

4. DISCUSSÃO

Até o presente, este é o primeiro estudo que investiga a ação do inseticida organoclorado endosulfan sobre o metabolismo energético e concentrações plasmáticas hormonais de uma espécie de morcego frugívoro neotropical, inclusive com a avaliação do possível acúmulo endógeno desse inseticida no tecido adiposo e no fígado em função de contaminação oral.

Em relação aos diferentes efeitos deletérios causados por inseticidas organoclorados, Singh et al. (1981) demonstraram que a exposição subletal ao inseticida Aldrin causou diminuição da glicose plasmática, aumento do lactato, diminuição do glicogênio muscular e hepático e diminuição de piruvato no plasma de peixe. Estudos com o inseticida endosulfan, também em doses subletais em peixes, demonstraram hiperglicemia, aumento das concentrações de insulina e dos hormônios tireoidianos no plasma (TANGAVEL et al., 2010). O aumento da glicose circulante também foi observado por Kalendar et al. (2004) em ratos.

Em geral, os resultados demonstraram poucas alterações significativas dos padrões metabólicos nos dois grupos de animais tratados com o inseticida endosulfan. Dentre os 13 parâmetros avaliados, somente as concentrações de glicose, proteínas das patas posteriores, lipídios das patas anteriores e ácidos graxos da carcaça apresentaram alterações significativas.

A diminuição observada nas concentrações plasmáticas de glicose em morcegos expostos à menor dosagem de endosulfan já foi reportada na literatura para outras espécies de vertebrados. Kalendar et al. (2004), em estudos com ratos machos Wistar, encontraram concentrações de glicose no sangue aumentadas ao final da 3ª e 4ª semana e na 5ª e 6ª semana, após a administração oral subcrônica de 2,0 mg/kg por dia de endosulfan durante seis semanas. Outros estudos com ratos também reportaram um quadro de hiperglicemia em animais tratados com o mesmo pesticida (GARG et al., 1980; KIRAN et al., 1988). Somente estudos com o organoclorado Aldrin, e em peixes, relatam redução da glicemia após tratamento subletal.

A ausência de hiperglicemia, após o período de exposição em morcegos tratados deste estudo, pode ser atribuída às baixas concentrações de endosulfan utilizadas, se comparadas com concentrações empregadas em outros estudos, no qual foram relatados hiperglicemia. Cabe ressaltar que a metodologia empregada neste experimento segue as concentrações

indicadas pelo fabricante, para aplicação em diversas culturas, e teve como objetivo a simulação das condições a que estão expostas as espécies de morcegos frugívoros em campo, uma vez que os animais têm acesso a pomares comerciais de frutas cultivadas com uso de inseticidas.

Em relação às reservas de glicogênio no fígado e no tecido muscular, não foi observado alterações em animais expostos ao inseticida, apesar da diminuição nestas concentrações já terem sido reportadas em ratos tratados com endosulfan e também com os organofosforados malation e acephate, indicadas pelo aumento característico da enzima glicogênio fosforilase (GP) (KIRAN e VARMA, 1988; POURNOURMOHAMMADI et al., 2005; JOSHI et al., 2009). Em estudos realizados com morcegos frugívoros, tratados com o organofosforado fentiona, Amaral et al. (2009) observaram aumento no glicogênio muscular. Os autores sugerem que por um determinado período, pode ter ocorrido um quadro de hiperglicemia nos indivíduos devido à exposição ao inseticida.

Em relação às reservas de proteínas nos tecidos analisados, as concentrações do inseticida endosulfan utilizadas não influenciaram nos níveis proteicos, já que não foi observada mobilização dessa fonte energética, com exceção da diminuição observada nas concentrações de proteínas das patas posteriores em animais que receberam alimento com menor concentração do inseticida. Amaral (2009), não observaram alterações nas concentrações totais de proteínas em morcegos expostos ao inseticida fentiona e espinosade durante 7 e 30 dias.

Nas reservas lipídicas, as concentrações de lipídios na maior parte dos tecidos analisados (músculo das patas posteriores, peitoral, do fígado e do tecido adiposo) não sofreram influência do inseticida endosulfan, com ressalva do aumento observado nos músculos das patas anteriores, que tiveram estas concentrações aumentadas em animais submetidos à menor concentração do inseticida. Amaral (2009), em estudos com morcegos expostos ao inseticida fentiona não observaram alterações nas concentrações totais de proteínas. O mesmo autor em outro estudo reportou diminuição dos lipídios totais do músculo das patas posteriores em morcegos expostos ao inseticida espinosade durante 7 dias.

Os morcegos submetidos à alimentação contaminada com endosulfan apresentaram redução significativa dos ácidos graxos da carcaça, quando comparados com o grupo controle. Uma mobilização dos ácidos graxos da carcaça, similar à observada neste estudo, foi relatada em experimento com morcegos frugívoros (*Artibeus* sp) submetidos ao tratamento com o

inseticida organofosforado fentiona por 7 dias (AMARAL, 2009). O autor sugere que tenha ocorrido a mobilização dos ácidos graxos da carcaça para uma possível formação de glicose, a partir da ativação da via neoglicogênese, já que estudos com pesticidas organoclorados e fosforados demonstraram alterações em enzimas-chave de diversas vias metabólicas relacionadas ao metabolismo de glicose. Efeitos como inibição da glicólise e aumento da atividade da neoglicogênese e glicogenólise hepáticas já foram demonstradas em estudos com organofosforados (POURNOURMOHAMMADI et al., 2007; RAHIMI et al., 2007; REZG et al., 2008).

Uma diminuição semelhante dos ácidos graxos da carcaça também foi relatada em estudos com morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), submetidos ao jejum (Freitas et al., 2006) e em *Artibeus lituratus* e *A. jamaicensis* (PINHEIRO., 1995), sugerindo que esta reserva funciona como importante fonte de fornecimento de substrato energético para via da neoglicogênese, fornecendo glicose para a circulação sanguínea alocada na carcaça. É importante destacar que a diminuição desta reserva observada em nossos experimentos pode implicar em um prejuízo para a capacidade reprodutiva destes animais, dada a reportada importância dos lipídios para a reprodução em mamíferos (MOORE et al., 1984).

Os resultados indicam que a mobilização dos ácidos graxos da carcaça provocada pelo endosulfan, pode ser atribuída à ativação da via da neoglicogênese para produção de glicose a partir de glicerol, já que vários trabalhos com organoclorado e organofosforado demonstraram que esses agentes químicos comprometem a homeostase lipídica (REZG., 2008; LASRAM., 2008).

Em relação aos animais tratados com o espalhante adesivo, foi encontrado alterações nos seguintes parâmetros: redução nas concentrações de proteína das patas anteriores, patas posteriores e aumento nas reservas lipídicas do fígado.

Quanto ao acúmulo do inseticida endosulfan, os resultados apontam uma deposição nos tecidos adiposo e hepático de animais submetidos aos dois tratamentos com endosulfan, sendo esse acúmulo maior no tecido adiposo. Um dos fatores que pode explicar esse maior acúmulo no tecido adiposo é o fato de o agrotóxico em questão ser altamente lipofílico. Estudos sobre efeitos tóxicos causados pelo acúmulo de organoclorado em lipídios corporais têm demonstrado uma correlação significativa entre concentrações de resíduos acumulados em lipídios da carcaça e seu aumento no cérebro quando há mobilização dessa reserva (DALE et al., 1962; CLARK., 1981). Tal relação pode ser observada em experimentos com a espécie

de morcego *Tadarida brasiliensis*, quando resíduos de organoclorados (DDE, DDT e Dieldrin) no tecido adiposo atingiram o sistema nervoso, após a mobilização dessa reserva pelos animais exercitados em uma a simulação de voo migratório (GELUSO et al., 1976; CLARCK et al., 1978; CLARCK.,1981; STEBBINGS et al., 1986; MITCHELL-JONES et al., 1989; RANSOME., 1889; SWANEPOEL et al., 1999). Os dados obtidos pelos autores apoiam a hipótese de que os pesticidas acumulados em lipídios corporais tenham contribuído para declínio da população de *T. brasiliensis* das cavernas de Carlsbad, no Novo México, quando esses resíduos alcançaram níveis elevados no sistema nervoso. Cabe ressaltar que nos animais não exercitados, os autores não observaram acúmulo do pesticida no sistema nervoso. A não movimentação dos animais deste estudo, acondicionados em gaiolas, pode ter mantido o pesticida acumulado no tecido adiposo, causando um efeito latente, prevenindo sua circulação no sangue e consequentemente seus efeitos sistêmicos.

Com relação à análise dos resíduos no fígado dos animais tratados, foi possível detectar uma deposição do inseticida neste órgão, menor do que a encontrada no tecido adiposo. Estudos com coelhos submetidos à exposição subletal de endosulfan 1mg/kg durante 6 semanas, mostraram hemorragias hepáticas, necrose e degenerações (MOR et al., 2010). Em outro estudo com peixes, a esteatose foi a alteração que caracterizou os efeitos tóxicos após 14 e 21 dias de exposição ao endosulfan (JOSSON., 1991). O fígado desempenha um papel importante nos processos de manutenção da glicemia, armazenamento de glicogênio, síntese de proteínas plasmáticas, produção de hormônios e metabolização de xenobióticos. Portanto alteração histoquímica no fígado causado por inseticidas organoclorados e fosforados podem afetar metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (MOHAJERI et al., 2010).

Avaliando as concentrações totais de testosterona nos morcegos tratados com o inseticida endosulfan, observa-se que não houve alterações significativas desse hormônio. No entanto, o endosulfan tem sido apontado como um desregulador endócrino, estando a exposição a ele associada a diversas alterações, súbitas ou permanentes, nas vias de sinalização endócrina, atividade reprodutiva, síntese e secreção de diversos hormônios (SINGH et al. 1989; SINGH et al. 1990; VOS et al., 2000; DE FALCO et al., 2007; EUSTACHE et al., 2009). Dentre as alterações provocadas pela exposição ao endosulfan, estudos comprovam efeitos como inibição da biossíntese de andrógenos testiculares em ratos adultos, quando administradas doses de 7,5 e 10 mg/kg, consecutivamente para 15 e 30 dias

(SINGH et al. 1990). Esses autores relataram que uma exposição mais prolongada (30 dias) de ambas as doses causou redução nos níveis plasmáticos de gonadotrofinas (FSH e LH), bem como de testosterona plasmática. Tais alterações foram revertidas quando o tratamento foi retirado. Os mesmos autores, em outro estudo, observaram uma variação na biossíntese de testosterona e sua secreção, sugerindo, no entanto, um desequilíbrio hormonal nas gônadas de ratos machos em uma exposição crônica ao inseticida endosulfan (SINGH et al. 1989).

Em relação às concentrações plasmáticas de testosterona, os resultados não foram conclusivos, possivelmente em razão da grande variação das concentrações individuais dos animais dentro dos grupos experimentais. Três indivíduos do grupo controle e um indivíduo do grupo End2 apresentaram, em média, concentrações 31,73 vezes maiores que a média dos demais indivíduos. Uma possível explicação para as altas concentrações de testosterona observadas nestes quatro indivíduos, pertencentes a grupos experimentais distintos, seria a posição social destes animais como machos que defendiam harém anteriormente à coleta. Aumentos significativo nas concentrações de testosterona em machos alfa já foram relatados por Stefan et al. (2009) em estudos com morcegos *Pteropus poliocephalus*, e poderiam explicar a alta variação destas concentrações neste experimento, impossibilitando a análise estatística dos efeitos dos tratamentos.

5. CONCLUSÃO GERAL

Pode-se concluir que o inseticida endosulfan na concentração recomendada pelo fabricante, provocou alterações metabólicas nas concentrações plasmáticas de glicose, proteínas das patas posteriores, lipídios das patas anteriores e lipídios da carcaça. Alterações como diminuição de lipídios da carcaça podem causar complicações para *Artibeus lituratus*, uma vez que as reservas lipídicas são fundamentais para o fornecimento de glicose, em processos em que ocorra alta demanda metabólica para a produção de energia como, reprodução, migração e períodos de escassez alimentar. Dessa forma, baixas reservas lipídicas na carcaça nos animais tratados com endosulfan durante 35 dias poderiam comprometer esses eventos. Além disso, pode-se concluir que as doses ambientais do inseticida estudado são suficientes para provocarem acúmulo no tecido adiposo e no fígado, após a exposição contínua de 35 dias.

De modo geral, os resultados deste trabalho demonstram que, as alterações observadas em relação à deposição de endosulfan no tecido adiposo e no fígado podem comprometer, a longo prazo, a sobrevivência das populações de *Artibeus lituratus*, animais de grande importância ecológica que desempenham papel fundamental na dispersão de sementes, contribuindo para o reflorestamento e conservação das florestas tropicais, especialmente nos remanescentes de Mata Atlântica onde ocorrem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, T. S. **Alterações metabólicas e histopatológicas induzidas pelos inseticidas fentiona e espinosina em morcegos frugívoros**. 2009. 46 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

ALAHYARY , P. P. MI.; AZARBAIJANI. F.F.; NEJATI, V. The potential toxicity of diazinon on physiological factors factors in male rat. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.11, p. 127–130, 2008.

ALLINSON, G. et al. Organochlorine and trace metal residues in adult southern bent-wing bat (*Miniopterus schreibersii bassanii*) in southeastern Australia. **Chemosphere**, v.64, n. 9, p.1464-1471, 2006 .

BEARDSALL K. et al. Applied physiology of glucose control. **Current Paediatrics**, v. 16, n. 6, p. 424-438, Nov. 2006.

BERDANIER, C.D.; DE DENNIS, S. K. Effect of exercise on the responses of rats to DDT. **Journal Toxicology and Environmental Health**, v. 2, n. 3, p. 651– 656, Jan. 1977.

BISSON, M.; HONTELA, A. Cytotoxic and endocrine-disrupting potencial of Atrazine, Diazinon, Endosulfan, and Mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, p. 110-117, Apr. 2002.

BRETVELD, R. W. et al. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4:30. May. 2006.

CHITRA, K.C.; LATCHOUMYCANDANE, C.; MATHUR, P. P. Chronic effect of endosulfan on the testicular functions of rat. **Asian Journal Andrology**, v. 1, n. 4, p. 203-206, Dec. 1999.

CLARK, D. R. Death in Bats from DDE, DDT or Dieldrin: Diagnosis via Residues in Carcass Fat. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 26, n. 1, p. 367-374, 1981.

CHARLES-DOMINIQUE, P. 1986. Inter-relations between frugivorous vertebrates and pioneer plants: *Cecropia*, birds and bats in French Guyana, p. 119-135. In: A. ESTRADA & T.H. FLEMING (Eds). **Frugivores and seed dispersal**. Dordrecht, Dr. W. Junk Publ., 392p.

CLARK, D. R.; KUNZ, T. H.; KAISER, T. E. Insecticides applied to a nursery colony of little brown bats (*Myotis lucifugus*): lethal concentrations in brain tissues. **Journal of Mammalogy**, v. 59, n. 1, p. 84-91, Feb. 1978.

CLARK, D. R.; STAFFORD, C. J. Effects of DDE and PCB (Aroclor 1260) on experimentally poisoned female little brown bats (*Myotis lucifugus*): lethal brain concentrations. **Jornal of Toxicology and Environmental Health**, v. 7, n. 6, p. 925-934, Jun. 1981.

CLARK, D. R. JR.; PROUTY, R. M. Organochlorine residues in three bat species from four localities in Maryland and West Virginia, 1973. **Pesticides Monitoring Journal**, v. 10, n. 10, p. 44-73, Sep. 1976.

COATS, J. R. Mechanisms of toxic action and structure– activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v.87, p. 255–262, 1990.

DALE, W. E.; GAINES, T. B .; HAYES, W. J. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v.4, p. 89, 1962.

DE FALCO, M. et al. The Effects of the Fungicide Methyl Thiophanate on Adrenal Gland Morphophysiology of the Lizard, *Podarcis sicula*. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, n. 2, p. 241-248, Jan. 2007.

DEOTARE, S.T.; CHAKRABARTI, C. H. Effect of acephate (orthene) on tissue levels of thiamine, pyruvic acid, lactic acid, glycogen and blood sugar. **Indian J Physiol Pharmacol**, v. 25, n. 3, p. 259–264, Set. 1981.

EUSTACHE, F. et al. Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Mixture of Genistein and Vinclozolin Modifies the Reproductive Axis, Testis Transcriptome, and Fertility. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n.8, p. 1272–1279, Aug. 2009.

FREITAS, M.B.; WELKER, A. F.; PINHEIRO, E. C. Seasonal variation and food deprivation in common vampire bats (Chiroptera: Phyllostomidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n.4, p. 1051-1055, Nov. 2006.

FOLCH, J.; LESS, M.; SLORNE STANLEY, G. H. A. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*, p. 226-497, 1957.

GARG, A. et al. Endosulfan intoxication: Blood glucose, electrolytes, Ca levels, ascorbic acid and glutathione in rats. **Toxicology Letters**, v. 5, n. 2, p. 119-123, Feb. 1980.

GARG, U. K. et al. Haemato-biochemical and immuno-pathophysiological effects of chronic toxicity with synthetic pyrethroid, organophosphate and chlorinated pesticides in broiler chicks. **International Immunopharmacology**, v. 4, n.3, p. 1709–1722, Aug. 2004.

GELUSO, K.N.; ALTENBACH, J. S.; WILSON, D. Bat mortality: pesticide poisoning and migratory stress. **Science**, v. 194, n. 4261, p. 184-186, Oct. 1976.

GOUTNER, V.; BECKER, P. H.; LIORDOS, V. Organochlorines and mercury in livers of great cormorants (*Phalacrocorax carbo sinensis*) wintering in northeastern Mediterranean wetlands in relation to area, bird age, and gender. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 4, p. 710–718, Jan. 2011.

GORCHOV, D. L. et al. 1993. The role of seed dispersal in the natural regeneration of rain forest after strip-cutting in the Peruvian Amazon, p. 339-349. In: T.H. FLEMING & A. ESTRADA (Eds). **Frugivory and seed dispersal: ecological and evolutionary aspects**. Dordrecht, W. Kluwer Academic Publishers, 416p.

JONSSON, C. M. **Estudos de toxicidade e acúmulo de endossulfanos peixes *Brachydanio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus***. 1991. 180 f. Dissertação (mestrado em Ciências de alimento) – Faculdade de engenharia de alimentos – universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

JOSHI, A. K.; RAJINI, P.S. Reversible hyperglycemia in rats following acute exposure to acephate, an organophosphorus insecticide: role of gluconeogenesis. **Toxicology**, v. 257, p.40–45, 2009.

KALENDER, S. et al. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. **Toxicology**, v. 202, n. 3, p. 227–35, Oct. 2004.

KARAMI-MOHAJERI, S.; ABDOLLAHI, M. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A systematic review. **Human and Experimental Toxicology**, Nov. 2010.

KANNAN, K. et al. High concentrations of persistent organic pollutants including PCBs, DDT, PBDEs and PFOS in little brown bats with white-nose syndrome in New York, USA. **Chemosphere**, v.80, n.6, p. 613-618, 2010.

KIRAN, R.; VARMA, M. N. Biochemical studies on endosulfan toxicity in different age groups of rats. **Toxicology Letters**, v. 44, n. 3, p. 247- 252, Dec. 1988.

KLOSE, S. M.; WELBERGEN, J. A.; KALKO, E. K. V. Testosterone is associated with harem maintenance ability in free ranging grey-headed flying-foxes, *Pteropus poliocephalus*. **Biology Letters**, v. 5, p. 758-761, Aug. 2009.

KUVAREGA, A. T.; TARU, P. Accumulation of Endosulfan in Wild Rat, *Rattus norvegicus* as a Result of Application to Soya Bean in Mazoe (Zimbabwe). **Environ Monit Assess**, v. 124, p. 333-345, 2007.

LASRAM, M. M. et al. Metabolic disorders of acute exposure to malathion in adult Wistar rats. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, n. 2-3, p. 1052-1055, Apr. 2009.

LASRAM, M. M. et al. Effect of short-time malathion administration on glucose homeostasis in Wistar rat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.92, n. 3, p. 114-119, Nov. 2008.

MITCHELL-JONES, A. J. et al. Bats and remedial timber treatment chemicals – a review. **Mammal Review**, v. 19, n.3, p. 93-110. 1989.

MOORE, B. J. et al. The effects of high fat feeding during one cycle of reproduction consisting of pregnancy, lactation and recovery on body composition and fat pad cellularity in the rat. **Journal of Nutrition**, v. 114, n.9, p. 1566-1573, Sep.1984.

MOR, F.; OZMEN, O. Effect of vitamin C in reducing the toxicity of endosulfan in liver in rabbits. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, n. 1, p. 75-80 Jan 2010,

MATSCHINSKY, F.M. et al. Quantitative histochemistry of glucose metabolism in the islets of Langerhans. *Current Problems Clinical Biochemistry*, v. 3, p. 143–182, 1971;

O'SHEA, T. J.; EVERETTE, A. L.; ELLISON, L. E. Cyclodiene insecticide, DDE, DDT, arsenic, and mercury contamination of big brown bats (*Eptesicus fuscus*) foraging at a Colorado Superfund site. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, n.1, 112-120, Jan. 2001.

PINEIRO, E. C. **Metabolismo intermediário de morcegos frugívoros**. 1995. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

POURNOURMOHAMMADI, S. et al. Induction of insulin resistance by malathion: Evidence for disrupted islets cells metabolism and mitochondrial dysfunction. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, n. 3, p. 346–35, Jul. 2007.

POURNOURMOHAMMADI, S. et al. Effects of malathion subchronic exposure on rat skeletal muscle glucose metabolism. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.19, n. 1, p. 191-196, Jan. 2005.

RAHIMI, R.; MOHAMMAD, A. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 2, p. 115-121, Jun. 2007.

RANSOME, R. D. Population changes of greater horseshoe bats studied near Bristol over the past twenty-six years. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 38, n. 1, p. 71-82, Set. 1989.

REZG, R. et al. Biochemical evaluation of hepatic damage in subchronic exposure to malathion in rats: Effect on superoxide dismutase and catalase activities using native PAGE. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331,n.9, p. 655-662, Jul. 2008.

SAIYED, H. et al. Effect of Endosulfan on Male Reproductive Development. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n.16, p.1958-1962, Dec. 2003.

SINGH, S.K.; PANDEY, R.S. Effect of sub-chronic endosulfan exposures on plasma gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis in rat. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 28. n. 10. p. 953-956, Oct. 1990.

SILVA, E. P. **Validação de método de extração e análise multirresíduo de agrotóxicos em carne bovina por cromatografia gasosa**. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

SINGH, N. N.; SRIVASTAVA, A. K. Effect of a paired mixture of aldrin and formothion on carbohydrate metabolism in a fish, *Heteropneustes fossilis*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 15, n. 3, p. 257–261, Jun.1981.

SINGH, S. K.; PANDEY, R. S. Gonadal toxicity of short term chronic endosulfan exposure to male rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 27, n. 4, p. 341-346, Apr. 1989.

SJÖRGREN, B.; NOERDENSJÖLD, T.; HOLMGEEN, H. MOLLERSTROM, J. Beitrag zur Kenntnis der Leberhythmik (glycogen, Phosphor und Calcium in der Kaninchenleber). **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 240, n.4, p. 427-448, 1938.

STEBBINGS, R. E.; GRIFFITHS, F. Distribution and status of bats in Europe. **Institute of Terrestrial Ecology**, UK. STUDIER, E. H.1981.Energetic advantages. Francesca, 1986. Of slings drops in body temperature in little brown bats, *Myotis lucifugus*. **Comparative Biochemistry and physiology** 70A, 537-540, 1986.

SWANEPOEL, R. E. et al. Energetic effects of sublethal exposure to lindane on pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus*). **Environmental Pollution**, v. 104, p. 169-177, 1999.

THANGAVEL, P. et al. Hormone profile of an edible, freshwater teleost, *Sarotherodon mossambicus* (Peters) under endosulfan toxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 3 p. 229–234, Jul 2010.

VOS, J. et al. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30 n.1, p. 71-133, Jan. 2000.