

AValiação DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS CRÔNICOS DO HERBICIDA ROUNDUP (GLIFOSATO) SOBRE A DIFERENCIAÇÃO GONADAL DO BAGRE RHAMDIS HILARII (VALENCIENNES, 1840)

Marcelo Grombone de Vasconcellos (PPGERN-UFSscar)
Nelsy Fenerich Verani (PPG-ERN/Depto. de Hidrobiologia-CCBS-UFSscar)
Odila Rigolin de Sá (Faculdades Integradas FAFIBE)

Resumo: Com a necessidade de desenvolver testes eficientes e rápidos que determinem a periculosidade de produtos químicos, para que se possa regulamentar o uso e descarte deles, torna-se imprescindível a prática de teste de toxicidade na avaliação de danos potenciais ao meio ambiente. Este estudo determinou quais as alterações causadas pelo defensivo agrícola Roundup, em doses sub-letais ou crônicas, sobre a morfologia gonadal de larvas do bagre *Rhamdia hilarii*. Cinco concentrações sub-letais foram testadas a partir da CL₅₀ 96 (concentração letal para 50% da população amostral durante 96 horas de exposição) obtida por RIGOLIN-SÁ em 1999, os organismos expostos foram sacrificados e submetidos a preparações histológicas para observação ao microscópio óptico. Como resultado observou-se o atraso no desenvolvimento e diferenciação sexual das gônadas, pronunciadamente nos grupos amostrais submetidos às maiores concentrações sub-letais corroborando com os estudos efetuados por RIGOLIN-SÁ (1999) que observou significativa redução nas taxas de crescimento de larvas de *Rhamdia hilarii*, submetidas às mesmas concentrações testadas neste trabalho, e com outros trabalhos, como o de Wester & Canton (1986) citado por HINTON & LAURÉN (1990), relatam sobre reversões sexuais, retardamento da diferenciação e amadurecimento dos gametas e intersexualidade provocados por defensivos agrícolas.

Palavras-chave: Roundup; diferenciação gonadal; bagre *Rhamdia hilarii*.

1. Introdução

O conceito de biomonitoramento pode ser definido como uso sistemático das respostas biológicas para avaliar as mudanças ambientais de origem antropogênica, com a intenção de usar estas informações em programas de controle de qualidade (MATTHEUS, 1982 In: ROSEMBERG & RESH, 1993).

De acordo com HENDRICKS et al (1989), o biomonitoramento pode ser dividido em duas categorias: bioensaios e bioavaliação. Bioensaios são testes laboratoriais que seguem um rigoroso protocolo experimental, sendo mais comuns os testes de toxicidade, enquanto a bioavaliação engloba a descrição dos organismos presentes na comunidade ou ecossistemas em função das propriedades e processos funcionais, ou seja, são análises realizadas em campo sem um rigoroso controle ambiental (ADAMS 1995).

1.1 Biomarcador de Poluição Ambiental

Segundo HINTON & LAURÉN (1990) o termo biomarcador refere-se a órgãos específicos que sofrem alterações morfológicas e funcionais nas células e ou tecidos em consequência da exposição a um contaminante.

Em ambiente aquático degradado, particularmente onde ocorrem poluentes em concentrações crônicas ou sub-letais, são mais frequentes mudanças na estrutura morfológica e funcional dos órgãos dos peixes do que sua mortalidade em massa. Assim, é necessária a aplicação de um dos métodos de avaliação dos efeitos dos poluentes através do exame das alterações morfológicas dos órgãos.

A exposição de peixes maduros ou em maturação reprodutiva a baixas concentrações de pesticidas pode levar a uma redução de 80% sobre a produção de ovos. Em *Pimephales promelas* (Ciprinidae) as fêmeas de um grupo amostral contaminado com baixas concentrações de zinco e cádmio produziram ovos viáveis em taxas 83% menores que as fêmeas do grupo controle (RAND & PETROCELLI, 1985).

No estudo realizado por Wester & Canton (1986) sobre a diferenciação gonadal de *Oryzas latipes*, com amostras contaminadas em concentrações sub-letais do inseticida lindane, constatou-se a ocorrência de severas alterações morfológicas e taxas significativas de intersexualidade provocada pelo agente contaminante (HINTON & LAURÉN, 1990).

Alterações morfológicas severas ocorridas durante a diferenciação gonadal também foram diagnosticadas em populações amostrais dos ciprinídeos *Pimephales promelas*, *Brachydanio rerio* e do ciprinodontídeo *Poecilia reticulata*, quando contaminadas com concentrações sub-letais de cobre (RAND & PETROCELLI, 1985).

1.2 Transporte e Destino dos Agrotóxicos no Ambiente Aquático.

Os agrotóxicos entram no ambiente aquático através da aplicação intencional, implemento aéreo, escoamento das aplicações ou liberação acidental. A descarga de resíduos provenientes da manufatura de agrotóxicos é a segunda maior fonte de contaminações dos corpos d'água. Os resíduos dos defensivos agrícolas presentes na água podem tornar-se aderidos ao material em suspensão, depositados no sedimento ou absorvidos pelos organismos (Murty, 1988) Peixes e invertebrados podem acumular pesticidas em grande concentração em relação ao meio em que vivem, pois tais compostos podem se ligar à matéria ingerida ou serem passivamente absorvidos durante as trocas respiratórias.

No ambiente aquático, os defensivos agrícolas podem sofrer transformações através de reações fotoquímicas e químicas como oxi-redução e hidrólise, além de transformações biológicas ocorridas nos organismos. A transformação do composto pode ser mais ou menos tóxica que o produto original (RAND & PETROCELLI, 1985).

Quanto mais lipofílico, maior a facilidade com que o pesticida ou químico será absorvido pelos organismos aquáticos. Tamanho, sexo e idade do organismo podem afetar a taxa de absorção, além disso, o mesmo composto pode ser absorvido em concentrações distintas em espécies diferentes. Brânquias e a superfície corporal são os locais primários de absorção e a tomada passiva depende da concentração do composto na água (RAND & PETROCELLI, 1985).

1.3 Caracterização do Agrotóxico Roundup

O Glifosato recebe várias denominações comerciais: Roundup (Monsanto Schering); Sting (Monsanto); Rodeo (Monsanto); Spasor (May e Baker); Muster (ICI); Tumbleweed (Murphy); Sonic (Rigby Taylor); Glifonox (Cristal); Gliol (ExceIL). Quimicamente é caracterizado como N –(Fosfonometil) Glicina, composto por sal de

isopropilamina de N (Fosfometil) glicina (Glifosate) 480 g/l, correspondente a 356 g/l do ácido equivalente, com fórmula bruta $C_3H_8NO_5P$ (MONTEIRO, 1987). O Roundup é um herbicida estável a luz, calor e umidade, pouco estável a ácidos e bases e corrosivo ao ferro e aço galvanizado (BRASIL, 1988). Trata-se de um herbicida do grupo dos organofosforados em pós-emergência das culturas e das plantas daninhas.

No Brasil, o Roundup está enquadrado na classe toxicológica IV, comercialmente vendido com rótulo verde, considerado como composto químico pouco tóxico para humanos.

1.4 Toxicidade de Agrotóxicos nas Primeiras Fases de Vida de Peixes

Testes de toxicidade durante o ciclo de vida de uma espécie é considerado fundamental para maioria dos toxicologistas, para determinação das concentrações ambientais de elementos químicos tóxicos para populações aquáticas.

Estudos têm demonstrado que as fases mais sensíveis do ciclo de vida são os estágios embrionários, larvais ou juvenis de várias espécies de peixes, permitindo a estimativa da Concentração Tóxica Máxima Admissível (PICKERING, CAST, 1972; McKIM et al, 1975, 1978; EATON, 1978; SAUTER et al, 1976).

A maior sensibilidade nos primeiros estágios de vida de peixes é utilizada como ferramenta eficiente para previsão dos efeitos crônicos de poluentes ambientais entre um e dois meses de teste. Assim são empregados testes com ciclo de vida relativamente longo, atingindo maiores tamanhos, pesos, idade ou outros fatores que impossibilitem sua manutenção em laboratório.

Exemplares de uma espécie de peixe nas fases iniciais de sua ontogenia são expostos por 28 a 32 dias, a partir da fertilização, abrangendo o desenvolvimento embrionário, larval e o início do desenvolvimento juvenil (RAND & PETROCELLI, 1985). A rapidez do crescimento e das mudanças morfológicas durante o início do desenvolvimento são ferramentas importantes nos testes de toxicidade, estando padronizados primariamente como sobrevivência e crescimento.

No trabalho realizado por RIGOLIN-SÁ (1998) com grupos amostrais de *Rhamdia hilarii* (Pimelodidae) sob contaminação crônica do defensivo agrícola Roundup (Glifosato), foram observadas diferenças significativas do crescimento em peso e em comprimento com tempos de desenvolvimento inferiores a 21 dias, a partir da fertilização.

SILVA (1996), analisando o desenvolvimento ontogenético da espécie referida sob condições laboratoriais, observou que a diferenciação gonadal ocorre aos aproximados 50 dias e 3,5 cm de comprimento, com a presença de constituintes celulares característicos como oogônias, perinucleolares em diferentes estádios e espermatogônias.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos de toxicidade crônica do herbicida Roundup sobre a morfologia gonadal de exemplares juvenis de *Rhamdia hilarii*. Os testes foram realizados com base no valor da CL_{50-96} horas determinado por RIGOLIN-SÁ (1998) para a mesma espécie.

2.2. Objetivos Específicos

Analisar os efeitos de concentrações crônicas do agrotóxico Roundup sobre a morfologia gonadal de exemplares juvenis do bagre *Rhamdia hilarii*, especificamente a diferenciação gonadal. Frente a estes resultados, avaliar se as gônadas podem ser utilizadas como biomarcadores dos efeitos de contaminação pelo referido agrotóxico até 45 dias de desenvolvimento.

3. Metodologia

3.1. Obtenção dos Organismos Testes

Utilizaram-se exemplares juvenis de *Rhamdia hilarii*, com aproximadamente 45 dias de vida, obtidos no laboratório do DHB através de reprodução artificial. Foram divididos em 5 grupos experimentais e 1 controle, cada grupo constituído por 5 indivíduos.

3.1.1. *Rhamdia hilarii* (VALENCIENNES, 1840).

Rhamdia hilarii pertence à classe Osteichthyes, ordem Siluriformes e família Pimelodidae, apresentando ampla distribuição (FOWLER, 1951). Na literatura existem informações sobre o desenvolvimento larval e embrionário desta espécie e comportamento biológico em ambiente natural (GODINHO et al., 1978; NARAHARA, 1983; NARAHARA et al., 1985; NARAHARA et al., 1989). Entre outras informações, tem-se que a primeira maturação gonadal ocorre aos 13.0-14.0 cm de comprimento total; o período reprodutivo é prolongado, estendendo-se de setembro a fevereiro; o tipo de desova é parcelado. Sob condições laboratoriais, com temperatura da água a 24° C, observa-se a eclosão dos ovos após 40 h a partir da fertilização; abertura do intestino após 48h e abertura da boca e alimentação exógena após 70-72h; perda do saco vitalício após 120h; forma semelhante ao adulto aos 20 dias; diferenciação gonadal direta em aproximadamente 50 dias com tamanho aproximado de 3,5 cm de comprimento e 1ª maturação gonadal aos 9 meses (SILVA, 1996; RIGOLIN-SÁ, 1998).

3.2. Teste de Toxicidade Crônica

Com base nos resultados dos testes agudos para o herbicida Roundup efetuados por RIGOLIN-SÁ (1998), ou seja, no valor CL₅₀ - 96 h (0.0106g/l) determinado, foram selecionadas cinco concentrações sub-letais, além do grupo controle.

Para este cálculo efetuou-se uma divisão por dois. Os experimentos foram realizados com réplicas para cada concentração, mais um grupo controle.

3.3. Estudos Morfológicos

Os testes crônicos foram realizados com 0.0055; 0.00275; 0.001375; 0.0006875 e 0.0003437 g/l de Roundup em água mole, numa proporção de 1 g de peixe por litro d'água. Após 45 dias, os exemplares foram sacrificados e preparados para análise em microscopia de luz.

3.4. Microscopia de Luz

Devido à pequena dimensão das gônadas e à impossibilidade de isolá-las através de dissecação nos juvenis, esses foram seccionados, preservando-se a porção abdominal.

A porção abdominal dos exemplares foi lavada com solução salina 0,9%, fixada em McDowell ou Glutaraldeído 2% (24 horas), lavada em álcool 70% (+ ou - 2 horas) e desidratados em banhos sucessivos de álcool 95% e 100%. Após a desidratação as peças foram incluídas em historesina LKB, na proporção de 1:1 de resina-álcool 95% por 4 horas em temperatura ambiente, resina pura “overnight” a 4^oC e resina pura + endurecedor. Incluíram-se as amostras em moldes apropriados colocados em estufa a 50 ^oC durante dois dias. Após a polimerização da resina, a peça foi colada com araldite aos blocos de madeira efetuando-se a trimagem do material para a obtenção dos cortes em micrótopo (Microm, HM 340E) que foram corados com Azul de Toluidina (LUFT, 1961; LOCKWOOD, 1964; ANDERSON, 1967; FRANCO, 1994; RIGOLIN-SÁ, 1998).

4. Resultados

Analisando-se os cortes histológicos das gônadas dos exemplares dos grupos experimentais (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5), constata-se que as gônadas mostraram-se indiferenciadas, consistindo basicamente de células somáticas e de células volumosas, as germinativas primordiais.

Nas gônadas dos grupos expostos às menores concentrações (Figuras 4 e 5), nota-se um maior número de células germinativas primordiais em relação às células somáticas. Essa característica é mais pronunciada em relação ao grupo controle (Figura 6), em que a relação entre células germinativas primordiais e células somáticas é maior.

5. Discussão

O desenvolvimento do aparelho reprodutivo é um processo contínuo durante a ontogenia, conseqüentemente está sujeito ao efeito de estressores ambientais em todas as fases do ciclo de vida (HOAR & RANDALL)

O controle do desenvolvimento gonadal nos teleósteos é realizado pelas gonadotrofinas (GtHs) originárias da glândula pituitária (DONALDSON & HUNTER, 1983 In: ADAMS, 1990). Recentes pesquisas evidenciam a presença de duas gonadotrofinas em teleósteos: GtH1, produzida durante o desenvolvimento gonadal e GtH2 produzida em grandes quantidades durante os estádios finais de maturação (KAWAUCHI et al. 1987; SUZUKI et al. 1988 In: ADAMS, 1990)

Substâncias tóxicas parecem atuar indiretamente sobre o equilíbrio entre os hormônios gonadotróficos, vitelogênicos, dopamina e estrogênio, o que se refletirá na diferenciação, maturação, morfologia e fisiologia gonadal (ADAMS, 1990); podendo, entretanto influir diretamente nas divisões celulares do tecido germinativo, como é o caso dos organo-fosforados (BADRE & KUMAR, 1987).

A exposição a toxicantes em diferentes fases do ciclo de vida tem como características gerais relacionadas ao aparelho reprodutivo o retardamento de fases de desenvolvimento e maturação gonadal, redução no número e viabilidade de gametas,

histopatologias, redução do número e viabilidade de descendentes (RAND & PETROCELLI, 1985; ADAMS, 1990).

A significativa alteração esperada, resultante da contaminação dos organismos-teste, seria a indiferenciação gonadal histologicamente constatada, citado por DONALDSON & SCHERER (1983) como crítica para avaliar o efeito de poluentes químicos em juvenis de salmonídeos. Como consequência do retardamento do desenvolvimento gonadal provocado pela ação do contaminante na diferenciação, Wester & Canton, 1986 In: HINTON & LAURÉN (1990), relatam reversões sexuais e intersexualidade provocados por inseticidas em *Oryzas latipes*.

Os organismos observados neste trabalho apresentaram como constituintes básicos de sua morfologia gonadal células germinativas primordiais e células somáticas, sendo portanto consideradas indiferenciadas (ROBLIN & BRUSLÉ, 1983; ALVES & GODINHO, 1987).

Em condições normais de laboratório, *Rhamdia hilarii* com 45 dias de vida apresenta gônadas indiferenciadas (SILVA, 1996), podendo alguns indivíduos apresentar gônadas diferenciadas diretamente em machos ou fêmeas ao redor de 50 dias de vida.

No presente trabalho, as principais alterações evidenciadas nas gônadas expostas às maiores concentrações de Roundup, ou seja, o pequeno número de células germinativas quando comparados com o grupo controle, devem acarretar um atraso ou comprometimento na diferenciação gonadal nessa espécie.

Alterações graves na morfologia gonadal como atresias foliculares, proliferações somáticas e outras histopatologias são mais comuns em gônadas já diferenciadas e em maturação, provavelmente relacionadas a alterações em órgãos participantes do processo como o fígado que tem importância fundamental no processo de vitelogenese (ADAMS 1990)

RIGOLIN-SÁ (1998) efetuou experimentos de crescimento de *Rhamdia hilarii*, sob as mesmas concentrações de Roundup utilizadas neste presente trabalho e obteve como resultado crescimento significativamente menor em peso e em comprimento quando comparados os organismos amostrais de cada concentração aos peixes do grupo controle. Tais resultados forneceram embasamento para se suspeitar de uma provável assincronia da diferenciação gonadal entre controle e contaminados.

6. Considerações Finais

Frente aos resultados obtidos no presente trabalho para *Rhamdia hilarii*, denota-se a necessidade executar experimentos de contaminação crônica com o referido defensivo agrícola por um período mais prolongado, aproximadamente 60 dias, tempo necessário para a diferenciação gonadal, permitindo, com análises estereológicas, que se confirme a hipótese levantada neste trabalho.

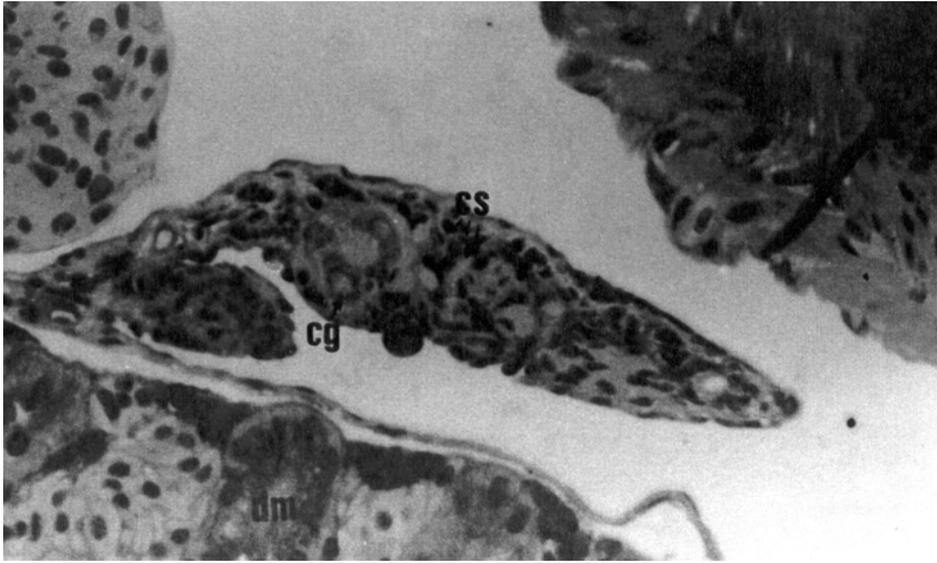


FIGURA 1. Gônada de *Rhamdia hilarii*, exposto a 0,0055g/l de Roundup mostrando células germinativas primordiais (cg) e células somáticas (cs). (Azul de toluidina, barra de escala = 10 μ m).

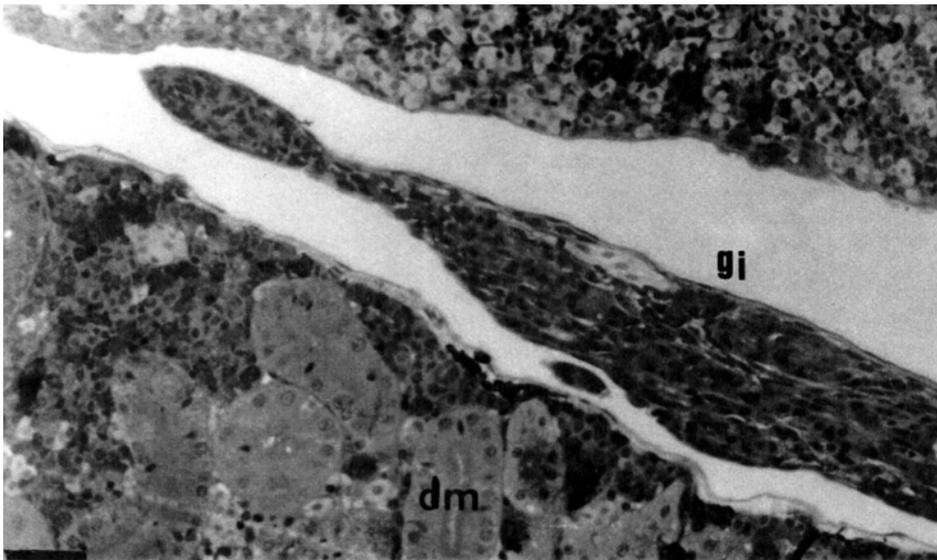


FIGURA 2. Gônada indiferenciada de *Rhamdia hilarii* (gi), exposto a 0,00275g/l de Roundup próxima a dutos mesonéfricos (dm) (Azul de toluidina, barra de escala = 10 μ m).

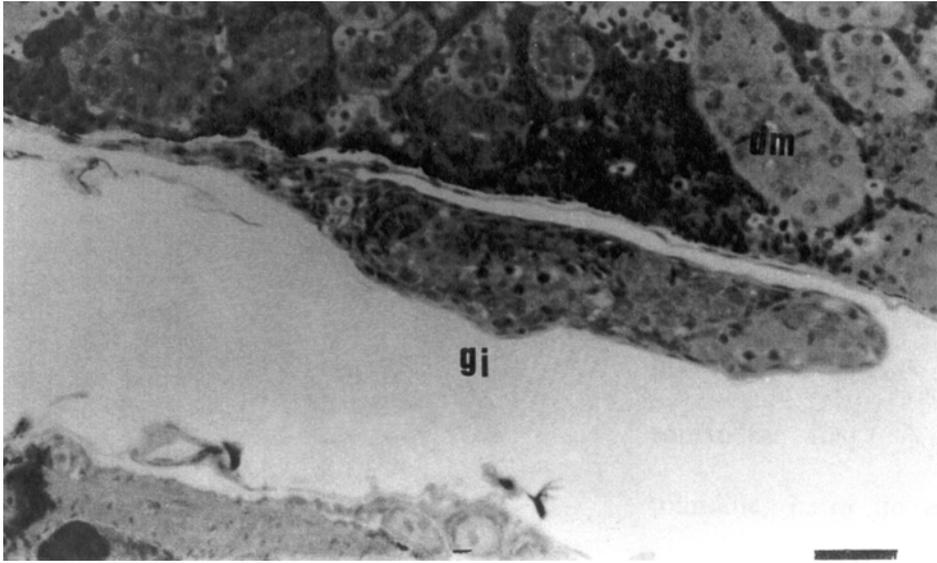


FIGURA 3. Gônada indiferenciada de *Rhamdia hylarii* (gi), exposto a 0,001357g/l de Roundup próxima a dutos mesonéfricos (dm) (Azul de toluidina, barra de escala = 10 μ m).

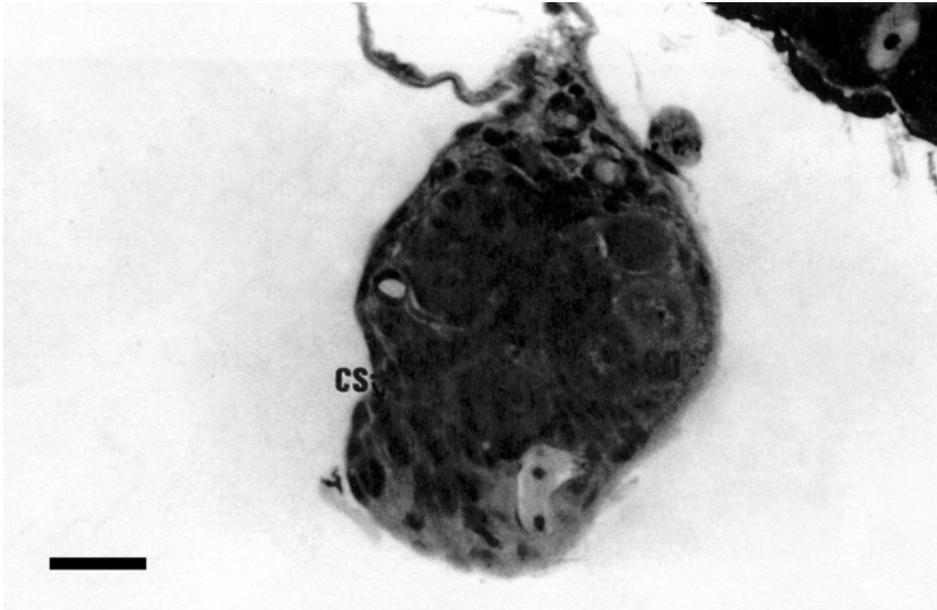


FIGURA 4. Gônada indiferenciada de *Rhamdia hylarii* (gi), exposto a 0,0006875g/l de Roundup mostrando células germinativas primordiais (cg) e células somáticas (cs) (Azul de toluidina, barra de escala = 20 μ m).

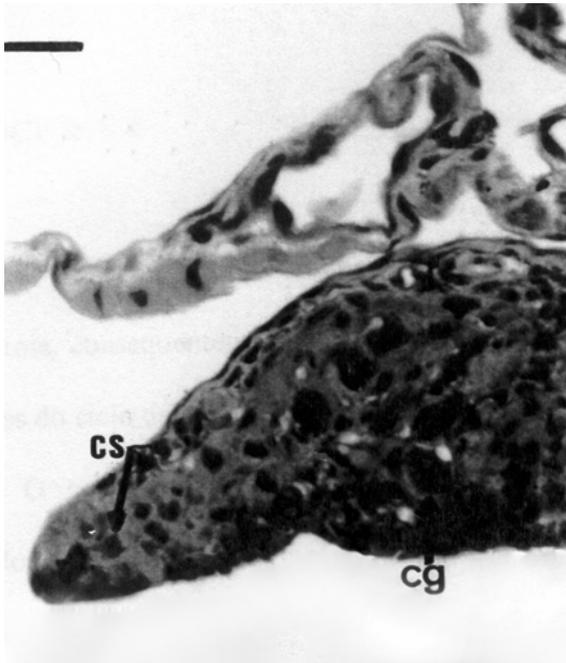


FIGURA 5. Gônada indiferenciada de *Rhamdia hilarii* (gi), exposto a 0,0003437g/l de Roundup mostrando células germinativas primordiais (cg) e células somáticas (cs) (Azul de toluidina, barra de escala = 20 μ m).

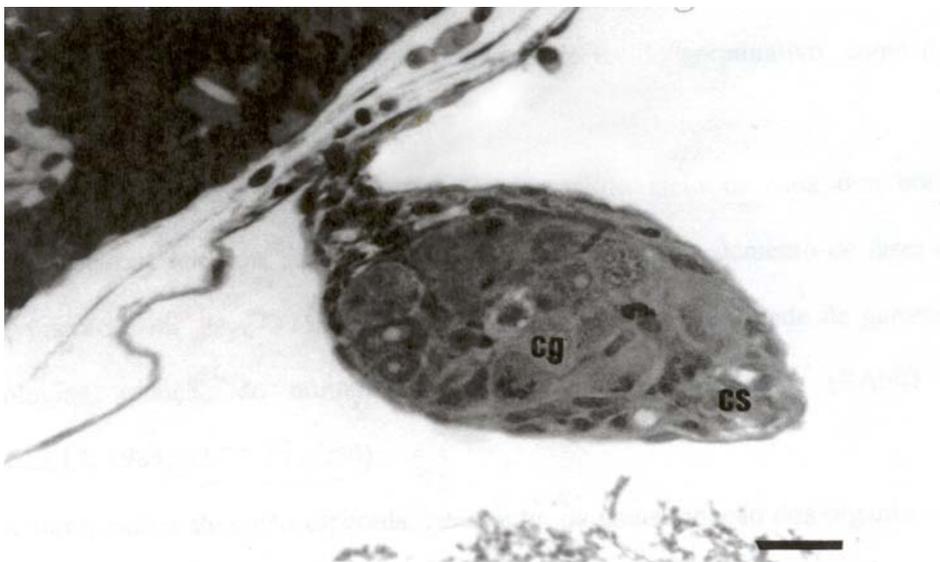


FIGURA 6. Gônada indiferenciada de *Rhamdia hilarii* (gi) do grupo controle mostrando células germinativas (cg) e células somáticas (cs) (Azul de toluidina, barra de escala = 20 μ m).

7. Referências Bibliográficas.

- ADAMS, S. M. Aquatic toxicology testing methods. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON JR, G. A. CAIRNS JR, J. **Handbook of toxicology**. Boca Raton: Lewis, 1994. 755p
- ADAMS, S. M., **Biological indicators of stress in fish**. American Fisheries Society Symposium 8, 1990, 190p.
- ALVES, M. D. & GODINHO, H. P. Gonadal Differentiation of *Shizodon Knerii* (STEINDACHNER, (1987) (Pisces, Anostomidae) **Rev. Brasil. Biol.**, v. 47, p 237-241.
- ANDERSON, P. J. Purification and quantation of glutaraldehyde and its effect on several enzyme activities in Skeletal muscle. **J. Histochem Cytochem.**, v. 15: 652, 1967.
- BADRE, A. A. & KUMAR, K. Malathion Toxicity: Effect on the Ovary of Zebra Fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae) **Int. Revue ges. Hydrobiol.**, v. 72-4, p. 517-528, 1987.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Pesticidas: método de análise e informações técnicas**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1988 a . v.1.
- BRUSLÉ, S., & BRUSLÉ, J. La gonadogenese des Poissons. Laboratoire de Biologie marine, Université de perpignan, **France. Repro. Nutr. Develop.** 1983, v. 23, p. 453-491.
- BUIKEMA, A.L. JR., CAIRNS, J. JR. (eds): **Aquatic invertebrate bioassays**, Philadelphia American Society for Testing and Materials, 1980. 209p (*ASTM STP, 715*).
- CONNEL, D. W. & MILLER, G. J. **Chemistry and ecotoxicology of pollution**, John Wilwy & Sons, 1984, 444p.
- EATON, J.G. Chronic malation toxicity to the blue-gill (*Lepomis macrochirus* Rafinesque). **Water Res** 4:673-684,1970.
- ESTEVES, F. A. **fundamentos de limnologia** -2^a ed.- Rio de Janeiro: Interciência, 1988, 602p
- FRANCO, C. R. C. Estudos Ultraestrutural do Estômago de dois Teleósteos *Hypostomus commersonii* (Reis et al, 1990) e *Rhamdia branneri* (Hasemann, 1911),. UFPR-Curitiba (Dissertação de Mestrado), 94p., 1994.
- FOWLER, H. M. Os peixes de água doce de Brasil. **Arch. Zool. Est. S. Paulo**, v. 6, p. 405-628, 1951.
- GLAUERT, A . M. & GLAUERT, R. H. Araldite as na embedding medium for electron microscopy. **J. Biochem. Cytol.**, v. 4: 191,1958.
- GODINHO, H. M.; FENERICH-VERANI, N.; NARAHARA, M. Y. Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). **Rev. Brasil. Biol.**, 38(1): 151-156, 2, 1978 Rio de Janeiro-RJ.
- HANSEN, D. J.; PARRIS, P. R. Suitability of sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) for life-cycle toxicity tests. IN: MAYER, F. L., HAMELINK, J. L. (Eds) **Aquatic toxicology and hazard evaluation**. Philadelphia: ASTM, 1977. P. 117-126.
- HANSEN, D. J.; NIMMO, D. R.; SCHIMMEL, S. C.; WALSH, G. E.; WILSON JR, A. J. Effects of Kepone on estuarine organisms. In: USEPA. **Recent advances in fish ecotoxicology** (Symposium). Washington: USEPA, 1977. P. 20-30. (Ecological Research Series, Epa-600-3-77-085).
- HENDRICKS, E. E.; SHAEFFER, D. J.; PERRY, J. A. (1989) In: LEVIN, S. A.; HARWELL, M. A.; KELLY, J. R.; KIMBALL, K. D. (Eds). **Ecotoxicology: Problems and Approaches**, Springer-Verlag, New York, cap. 13, 1989, p. 351-364.

- HINTON D. E., LAURÉN DJ. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: ADAMS, S. M. (Ed) **Biological indicators of stress in fish**. Bethesda: American Fisheries Society Symposium 8, 1990. P. 51-66.
- HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. **Fish Physiology**, Academic Press, New York, 1969, 485p.
- LOCKWOOD, W. R. A reliable and easily sectioned epoxy resin embedding medium. **Anat. Rao**. n.150: p. 129, 1964.
- LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin in bedding methods. **J. biophys biochem Cytol** . v. 9: p. 409, 1961.
- MCKIM. J. M.; BENOIT. D. A. Effects of long-term exposures to copper on the survival, growth, and reproduction of brook trout. **J.Fish Res Bd Can** v.28, p.655-662,1971.
- MCKIM. J. M., ARTHUR, J. W., THORSLUND T. W. Toxicity of linear alkylate sulfonate detergent to larvae of four species of freshwater fish. **Bull Environ Contam Toxicol** v.14, p.1-7, 1975.
- MONTEIRO, L. F. **Compêndio de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. São Paulo: Ed., 1987. 432p.
- MURTY, A. S. **Toxity of pesticides to fiish**. 3e. Boca Raton: CRC Press, 1988. V. 1, 178p.
- NARAHARA, M. Y., **Etrutura da população e reprodução de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1984) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae)**. São Paulo, 1983. 226p. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- NARAHARA, M. Y., GODINHO, H. M., FENERICH-VERANI, N., ROMAGOSA, E. Relação peso/comprimento e fator de condição de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). **Bol. Inst. Pesca**, v. 12, n. 4, p. 13-22, 1985.
- NARAHARA, M. Y., GODINHO, H. M., ROMAGOSA, E. Tipo de desova e fecundidade do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Pimelodidae) **Bol. Inst. Pesca**, v. 16, n. 1, p. 37-45, 1989.
- NIMMO, D. R. Pesticides. In: RAND, G. M., PETROCELLI, S. R. (Eds) **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington; Hemisphere Pub., 1985. P. 335-373.
- PICKERING, Q. H.; GAST. M. H. Acute and chronic toxicity of cadmium to the fathead minnow *Pimephales promelas*. **J.Fish Res Bd Can.**, v. 29, p.1099-1106, 1972.
- RAND e PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications**. Washington USA, Hemisphere Publishing, 1985, 666p
- RIGOLIN DE SÁ, O. Toxicidade do herbicida Roundup (Glifosato) e do acaricida Omite (Propargito) nas fases iniciais da ontogenia do Bagre, *Rhamdia hilarii* (VALENCIENNES, 1840) (Pimelodidae, Siluriformes). São Carlos. SP, 1998. 309p tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) Universidade Federal de São Carlos.
- ROBLIN, C.; BRUSLÉ, J. (1983). Ontogenese gonadique et differantiation sexuelle du loup dicentrarchus labrax, en conditions d'elevage. **Repro. Nutr. Develop.**, 23: 115-127.
- ROSEMBER, D. M. RESH, V. H. Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates, New York, London, Chapman & Hall, 1993, 488p.
- SAUTER, S., BUXTON, K. S., MACEK, K. J.; PETROCELLI, S. R. **Effects of exposure to heavy metals on selected freshwater fish**. Washington: U. S. EPA, 1976. (U. S. EPA, 600/3-76-105).

SILVA, B. C. Desenvolvimento Ontogenético Inicial do Bagre, *Rhamdia hilarii* (PIMELODIDAE, SILURIFORMES)-DIFERENCIAÇÃO GONADAL, Monografia (Universidade Federal de São Carlos, Depto. Hidrobiol.) 24p.

SMITH, W. E. A cyprinodontid fish, *Jordanella floridae*, as a laboratory animal for rapid chronic bioassays. **J. Fish. Res. Board Can.**, v. 30, p. 329, 1973.