

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

RENATA MARIA PEREIRA DE FREITAS

**EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE *Ficus carica* CONTRA TOXICIDADE
INDUZIDA PELO FUNGICIDA TEBUCONAZOL NO MORCEGO
FRUGÍVORO NEOTROPICAL *Artibeus lituratus***

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

RENATA MARIA PEREIRA DE FREITAS

**EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE *Ficus carica* CONTRA TOXICIDADE
INDUZIDA PELO FUNGICIDA TEBUCONAZOL NO MORCEGO
FRUGÍVORO NEOTROPICAL *Artibeus lituratus***

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.

Orientadora: Mariella Bontempo Freitas

Coorientadoras: Reggiani Vilela Gonçalves

Sirlene Souza Rodrigues

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F866e
2020
Freitas, Renata Maria Pereira de, 1996-
Efeito protetor do extrato de *Ficus carica* contra toxicidade
induzida pelo fungicida tebuconazol no morcego frugívoro
Neotropical *Artibeus lituratus* / Renata Maria Pereira de Freitas.
– Viçosa, MG, 2020.
61 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Mariella Bontempo Duca de Freitas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Toxicologia ambiental. 2. Pesticidas. 3. Morcegos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.
II. Título.

CDD 22. ed. 571.95

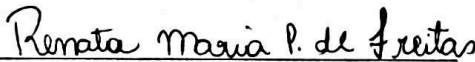
RENATA MARIA PEREIRA DE FREITAS

**EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE *Ficus carica* CONTRA TOXICIDADE
INDUZIDA PELO FUNGICIDA TEBUCONAZOL NO MORCEGO
FRUGÍVORO NEOTROPICAL *Artibeus lituratus***

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: 10 de dezembro de 2020.

Assentimento:


Renata Maria Pereira de Freitas
Autora


Mariella Bontempo Freitas
Orientadora

Dedico esse trabalho a **Deus** por me conceder toda sabedoria, saúde e força durante essa jornada. Aos **meus pais, familiares e amigos** por todo apoio e serem a base da minha vida e à **comunidade científica** por todo conhecimento deixado para um futuro melhor.

AGRADECIMENTOS

Nesses dois anos, muitas pessoas foram importantes para o sucesso desse trabalho e devo a elas toda minha gratidão.

Agradeço à **Universidade Federal de Viçosa (UFV)** e ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal** pela formação profissional e pelo crescimento pessoal. Aos **funcionários do Departamento de Biologia Animal** por toda ajuda e paciência. Ao **Museu de Zoologia João Moojen (MZUFV)**, **Laboratório de Patologia Experimental (DBA- UFV)**, **Laboratório Beagle (DBA-UFV)** pelo acolhimento, apoio e disponibilização de equipamentos durante o experimento.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Mariella Bontempo Duca de Freitas**, por ter me acolhido com todo carinho, por todo conhecimento transferido, pela disponibilidade em ajudar durante todo trabalho realizado, por ser mais que uma professora e estar sempre presente.

Às coorientadoras **Prof^a. Dr^a. Sirlene Souza Rodrigues Sartori** e **Prof^a. Dr^a. Reggiani Vilela Gonçalves** por ajudarem na construção desse trabalho, compartilhando seus conhecimentos e experiências.

À **Dr^a. Mariáurea Matias Sarandy** pela paciência e ajuda com as publicações científicas.

À **Dr^a. Jerusa Maria de Oliveira Amorim** por ser tão presente mesmo longe e se tornar uma grande amiga. Agradeço sua paciência e por ter cedido seu tempo para me transferir grande parte do que sei.

Aos professores **Dr. João Paulo Viana Leite**, **Dr. Leandro Licursi de Oliveira**, **Dr^a. Silvia Almeida Cardoso**, **Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta**, pela disponibilidade em ajudar e agregar conhecimento a este trabalho.

Aos membros da banca **Prof. Dr. Enrico Bernard** e **Dr. João Paulo Viana Leite** pela disponibilidade e valiosas considerações

Aos **amigos do Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros**, por ajudarem em todos os campos e parte experimental, em especial **Bárbara Silva Linhares** por estar sempre do meu lado e ser uma amiga pra vida, **Stella Bicalho Silva** pela disponibilidade em ajudar e por alegrar meus dias no laboratório, **Kemilli Pio Gregório** por toda ajuda nos campos e ao **Jean Zen** por toda ajuda com as análises histológicas.

Aos demais amigos que se fizeram presente em todos os momentos, especialmente **Maria Luiza Assis Rodrigues, Filipe Iglesias de Almeida, Pedro Henrique Costa Neves, Alex Filipe Ramos de Sousa, Juliana Rodrigues Gomes, Karina Ventura Boechat Martins**, por serem minha segunda família e deixarem os dias mais leves.

Às minhas queridas amigas **Gabriela Ferreira Rodrigues, Fernanda Iglesias Rodrigues, LÍlian Maria Moreira e Thaynara Lopes Rosado**, que se fizeram presente desde o colégio, sempre torcendo e se alegrando com minhas conquistas.

Aos meus **familiares**, pelas orações e por serem presentes, em especial meus primos **Luís Otávio Ferreira Freitas e Laura Gomide de Freitas**, por serem meu refúgio.

Ao meu namorado **Leonardo da Silva Miranda**, que esteve do meu lado durante todos os momentos, me apoiando, me incentivando, ajudando nos campos, por toda paciência e por tornar todo esse caminho mais leve.

Aos meus pais, **José Renato Cardoso de Freitas e Maria Elisa Pereira de Freitas** e meus irmãos **Gabriel Vitor Pereira de Freitas e Gustavo Luís Pereira de Freitas**, por serem minha inspiração, minha base e por não medirem esforços para que eu possa realizar meus sonhos.

Obrigada, de coração, a todos que que fizeram parte, essa conquista é nossa!

RESUMO

FREITAS, Renata Maria, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2020. **Efeito protetor do extrato de *Ficus carica* contra toxicidade induzida pelo fungicida tebuconazol no morcego frugívoro Neotropical *Artibeus lituratus*.** Orientadora: Mariella Bontempo Freitas. Coorientadoras: Reggiani Vilela Gonçalves e Sirlene Rodrigues Sartori.

O tebuconazol (TEB) é amplamente utilizado como fungicida e é conhecido por causar desordens metabólicas e endócrinas em mamíferos. Os morcegos são animais silvestres que estão em constante contato com pesticidas o que pode prejudicar seu desenvolvimento e reprodução. O uso de xenobióticos e as consequências desse uso para os morcegos ainda são escassos. A fim de amenizar danos causados por xenobióticos, pesquisas com compostos naturais e antioxidantes estão sendo frequentemente realizadas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos protetores do extrato de *Ficus carica* contra toxicidade induzida por TEB no metabolismo e reprodução de morcegos frugívoros *Artibeus lituratus*. Para isso, vinte e quatro morcegos machos foram aleatoriamente separados em grupos com seis animais cada. 1) CTL receberam mamão puro; 2) DMSO receberam mamão tratado com calda de dimetil sulfoxido (DMSO) 1,25%; 3) TEB receberam mamão tratado com calda de Folicur (nome comercial) 0,1%; e 4) TEBFC receberam mamão tratado com calda do fungicida 0,1% e extrato etanólico de *Ficus carica* 20% em solução de 1,25% de DMSO. Após sete dias de exposição, os morcegos foram eutanasiados. O fígado, o músculo e o testículo foram utilizados para análises de capacidade antioxidante, a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione s-transferase (GST), bem como os níveis de óxido nítrico (NO), proteína carbonilada e peroxidação lipídica (MDA) foram mensuradas. Além disso, parte do fígado e testículo foram utilizados para análises histomorfométricas e histopatológicas e o soro proveniente do sangue colhido foi usado para análise de enzimas transaminases e testosterona total. No fígado, a exposição ao TEB causou estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento de MDA, SOD e CAT, levou a deposição de pigmentos de hemossiderina e aumento de processos inflamatórios e as enzimas AST, ALT e ALP também apresentaram um aumento neste grupo, porém o extrato de *Ficus carica* (no grupo TEBFC) conseguiu amenizar todos esses danos causados pelo TEB. No músculo, o TEB também causou estresse oxidativo, porém no grupo TEBFC não observamos

melhora em relação ao grupo TEB. No testículo, observando aumento de marcadores de estresse oxidativo, MDA, NO e proteína carbonilada, e das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST no grupo TEB, nos animais tratados com F. carica, houve diminuição do estresse oxidativo causado. Um aumento de testosterona foi observado no grupo TEB e TEBFC. Todos os nossos resultados mostraram que o extrato de F. carica possui um potencial antioxidante e que é eficaz na proteção contra a toxicidade causada pelo TEB nos principais órgãos do metabolismo e reprodução. Mais pesquisas são necessárias para compreender melhor como outros antioxidantes naturais irão atuar em conjunto com diferentes pesticidas.

Palavras-chave: Pesticidas. Ecotoxicologia. Chiroptera.

ABSTRACT

FREITAS, Renata Maria, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2020. **Protective effect of *Ficus carica* extract against tebuconazole-induced toxicity in Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*.** Adviser: Mariella Bontempo Freitas. Co-advisers: Reggiani Vilela Gonçalves and Sirlene Rodrigues Sartori.

Tebuconazole (TEB) is widely used as a fungicide and is known to cause metabolic and endocrine disorders in mammals. Bats are wild animals that are in constant contact with pesticides which can hinder their development and reproduction. The use of xenobiotics and the consequences of this use for bats are still scarce. In order to alleviate damage caused by xenobiotics, research on natural compounds and antioxidants is frequently being carried out. The aim of this study was to evaluate the protective effects of *Ficus carica* extract against TEB-induced toxicity on the metabolism and reproduction of *Artibeus lituratus* fruit-eating bats. For this, twenty-four male bats were randomly separated into groups of six animals each. 1) CTL (n=6): bats received pure papaya; 2) DMSO (N=6): bats received papaya treated with 1.25% dimethyl sulfoxide; 3) TEB (n=6): bats received papaya treated with tebuconazole (commercial formulation) 0.1%(v/v); and 4) TEBFC (n=6): bats received papaya treated with tebuconazole 0.1% (v/v) and an ethanolic extract of *Ficus carica* 20% (w/v) solution of dimethyl sulfoxide. After seven days of exposure, the bats were euthanized. The liver, muscle and testis were used for analysis of antioxidant capacity, the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione s-transferase (GST), as well as the levels of nitric oxide (NO), carbonyl protein and lipid peroxidation (MDA) were measured. In addition, part of the liver and testis were used for histomorphometry and histopathological analyzes and the serum from the collected blood was used for analysis of transaminase enzymes and total testosterone. In the liver, exposure to TEB caused oxidative stress, evidenced by the increase in MDA, SOD and CAT, led to the deposition of hemosiderin pigments and increased inflammatory processes and the enzymes AST, ALT and ALP also showed an increase in this group, however the *Ficus carica* extract (in the TEBFC group) managed to alleviate all these damages caused by TEB. In the muscle, TEB also caused oxidative stress, however in the TEBFC group we did not observe any improvement in comparison to the TEB group. In the testis, observing an increase in

oxidative stress markers, MDA, NO and carbonyl protein, and in the antioxidant enzymes SOD, CAT and GST in the TEB group, in animals treated with *F. carica*, there was a decrease in the oxidative stress caused. An increase in testosterone was observed in the TEB and TEBFC group. All of our results showed that *F. carica* extract has an antioxidant potential and that it is effective in protecting against the toxicity caused by TEB in the main organs of metabolism and reproduction. More research is needed to better understand how other natural antioxidants will work in conjunction with different pesticides.

Keywords: Pesticide. Ecotoxicology. Chiroptera.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura	12
I. Pesticidas.....	13
i. Fungicida Tebuconazol.....	13
II. Biomarcadores	15
ii. Estresse oxidativo e lesões teciduais.....	15
iii. Desreguladores endócrinos	18
III. Ordem Chiroptera.....	19
IV. Compostos naturais como atenuantes de toxicidade.....	21
V. Referências	22
CAPÍTULO 2: Efeito protetor do extrato de Ficus carica contra toxicidade induzida pelo fungicida tebuconazol no morcego frugívoro Artibeus lituratus.....	28
1. Introdução	30
2. Material e Métodos	33
2.1 Reagentes Químicos.....	33
2.2 Extrato de Planta	33
2.3 Animais	33
2.4 Design Experimental.....	34
2.5 Índice hepatossomático e gonadossomático.....	35
2.6 Marcadores oxidativos e enzimas antioxidantes	35
Preparação da amostra de tecidos	35
Determinação do Malondialdeído (MDA).....	35
Oxidação de Proteínas	36
Produção de óxido nítrico	36

Superóxido Dismutase (SOD)	36
Catalase (CAT)	36
Glutationa S-transferase (GST)	37
Proteínas totais.....	37
2.7 Análises histológicas do fígado e testículo	37
2.8 Biomarcadores bioquímicos no soro.....	38
2.9 Análise hormonal	38
2.10 Análises Estatísticas	38
3. Resultados.....	39
3.1 Massa corporal e índices dos órgãos	39
3.2 Marcadores oxidativos e enzimas antioxidantes	39
3.3 Análises histológicas	44
3.4 Biomarcadores hepáticos no soro.....	47
3.5 Testosterona Total	47
4. Discussão.....	48
5. Conclusão.....	52
6. Referências	55

CAPÍTULO 1
REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

I. Pesticidas

Pesticidas é um termo que refere a um agente químico ou mistura de agentes químicos, usados como ingredientes ativos de produtos que tem a função de controlar pragas e doenças de plantações, ectoparasitas de animais e pragas da saúde pública (PINTO; JARDIM, 2002).

O uso de pesticidas no Brasil vem sendo maior a cada ano, sendo compatível com crescimento populacional, o crescimento da produção para suprir a demanda de alimentos e o avanço tecnológico da agricultura (REMBISCHEVSKI; CALDAS, 2018). Nas últimas décadas, segundo dados da Organização para Agricultura e Alimentação (FAO), houve um aumento no uso de pesticidas, chegando a cerca de 0,4 milhão de ton/ano em 2015 (FAOSTAT, 2018).

Entretanto, a utilização descontrolada e intensiva de agroquímicos causa impactos adversos ao meio ambiente e animais não-alvo (MANCINI; WOODCOCK; ISAAC, 2019). A permanência dos pesticidas no ambiente, leva a contaminação do solo, da água e dos alimentos e através de vias de contaminação, principalmente por contato ou alimentar, os animais, incluindo seres humanos, estão em constante contato com esses compostos (REBELO; CALDAS, 2014).

Os pesticidas são divididos em diversas classes, como: acaricidas, ronicidas, inseticidas, fungicidas, herbicidas. Os fungicidas, classe alvo deste estudo, são usados em lavouras agrícolas para controlar fungos considerados pragas agrícolas (YANG et al., 2018).

i. Fungicida Tebuconazol

O tebuconazol (TEB), fórmula molecular $C_{16}H_{22}ClN_3O$ (Figura 1), pertence a classe dos fungicidas triazóis, estes apresentam elevada estabilidade química e fotoquímica, baixa biodegradabilidade e fácil transporte no ambiente (KAHLE et al., 2008). TEB é utilizado em diversas culturas, como como arroz, aveia, banana, café, cenoura, cevada, citros, feijão, soja, tomate, trigo, uva entre outras (ANVISA, 2010). Seu modo de ação na planta é sistêmico, ou seja, o fungicida, quando aplicado, percorre todas

as partes da planta (ANVISA, 2010). Sua atividade é baseada na inibição da biossíntese do ergosterol, componente estrutural essencial da membrana plasmática dos fungos, o que inviabiliza sua sobrevivência (MENEGOLA et al., 2006).

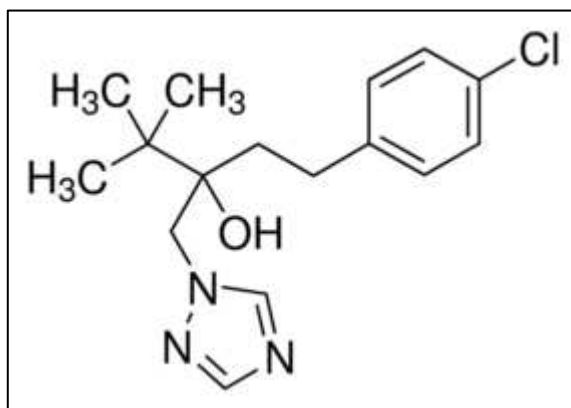


Figura 1: Estrutura química do fungicida Tebuconazol

De acordo com seu potencial de periculosidade ambiental TEB é classificado como perigoso ao meio ambiente (classe II) e altamente tóxico para organismos aquáticos. No Brasil é o segundo fungicida mais utilizado e sua toxicidade em animais não-alvo é bem conhecida e estudada, devida sua permanência e fácil transporte no ambiente. Em peixes zebra expostos a doses comerciais por 96h TEB induz estresse oxidativo, apoptose de células do fígado, genotoxicidade e mutações (LI et al., 2020). Em ratos também expostos a doses comerciais, o fungicida leva a atividade antiandrogênica, alteração no desenvolvimento neurológico e comprometimento do sistema imunológico, maior taxa de aborto e estresse oxidativo (MOSER et al., 2001; TAXVIG et al., 2007; YANG et al., 2018). Em morcegos expostos por 30 dias TEB causou alterações nas células de Leydig, indicando efeito negativo para reprodução da espécie (MACHADO-NEVES et al., 2018). Em humanos, foram encontradas, em amostras de urina e cabelo de trabalhadores agrícolas, concentrações máximas de 19,2µg/L e 2,22ng/Kg, respectivamente (SCHUMMER et al., 2012; FUSTINONI et al., 2014).

Apesar disso, estudos sobre o impacto do tebuconazol em animais silvestre não-alvo ainda são escassos, sendo necessárias mais investigações sobre seus efeitos tóxicos e as consequências de seu uso, principalmente para esses animais.

II. Biomarcadores

ii. Estresse oxidativo e lesões teciduais

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses (ARRIGONI; DE TULLIO, 2002). Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROS) (Tabela 1) são moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio e são necessárias em diversas sinalizações celulares (VALKO et al., 2007). Porém, quando em excesso essas moléculas são potencialmente tóxicas e podem causar danos as proteínas, lipídeos e ao DNA (VALKO et al., 2007).

RADICAIS LIVRES	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
Superóxido (O_2^-)	Peróxido de Hidrogenio (H_2O_2)
Hidroxila (OH)	Ácido hipocloroso (HOCl)
Peroxila (LO_2)	Ozônio (O_3)
Óxido Nítrico (NO)	Oxigênio singlet
Hidroxi-peroxila (HO_2)	Peróxidos lipídicos

Tabela 1: Exemplos de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs)

Diversos são os fatores que contribuem para geração excessiva de EROS e radicais livres, como: má alimentação, tabaco, toxinas, radiação UV e IV e poluentes ambientais (dentre estes, os pesticidas) (BARBOSA et al., 2010). Os xenobióticos através do citocromo P-450 ou ciclo redox promovem a produção excessiva das EROS (BARBOSA et al., 2010), tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). (Figura 2).

Dentre todos os componentes celulares, a membrana lipídica é a mais afetada pela ação dos radicais livres e EROS (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O radical hidroxila (OH) é frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação, que acarreta na alteração de estruturas e permeabilidade das membranas

(NIGAM; SCHEWE, 2000). Os produtos finais do processo de peroxidação lipídica são os hidroperóxidos lipídicos e aldeídos como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxinonal e isopropanos (LIMA; SAES; ABDALLA, 2001). Esses produtos podem ser encontrados em amostras biológicas e usados como marcadores do estresse oxidativo (LIMA; SAES; ABDALLA, 2001).

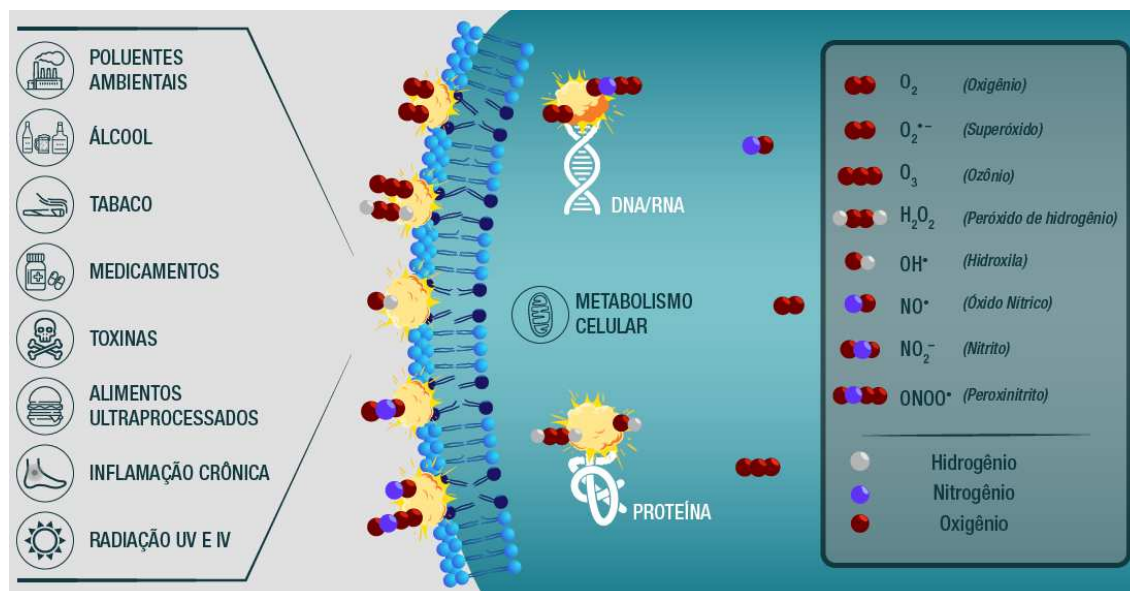


Figura 2: Principais fontes de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) e potenciais alvos celulares para danos por estresse oxidativo. Fonte: activepharmaceutica.com.br. Acessado em: 27/01/2020.

As proteínas também sofrem oxidação e esse dano pode ocorrer diretamente sobre sua estrutura via ação dos radicais e EROS, mas também indiretamente, via moléculas já originadas pelo processo de oxidação, como o MDA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Esses ataques às proteínas podem acarretar em má formação da estrutura proteica e conseqüentemente disfunção das proteínas, comprometendo a atividade celular (CECARINI et al., 2007). O dano oxidativo às proteínas pode ser detectado pela presença de grupos carbonil (Proteína carbonilada) em amostras biológicas (CECARINI et al., 2007).

O excesso de radicais livres, como o óxido nítrico (NO) entre outros, e EROS também representa uma ameaça à integridade do DNA, e é responsável pelas alterações químicas nas bases nitrogenadas, na ribose do DNA e quebra nas suas ligações. Essas

alterações levam ao envelhecimento, desenvolvimento de câncer, mutações e morte celular (BARREIROS; DAVID, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Além disso, o dano tecidual que pode desencadeado pelo estabelecimento do processo de estresse oxidativo, promove uma sequência de sinalizações que desencadeia a resposta inflamatória (FILIPPIN et al., 2008). Ocorre a migração de células, como células fagocitárias e neutrófilos para o sítio de inflamação para eliminação do agente causador (RAMOS; RAMOS; DOMINGUEZ, 2000). A atividade dessas células depende, porém, de liberação de EROS que são produzidas durante um processo denominado explosão oxidativa (FILIPPIN et al., 2008). Com isso, tem-se um ciclo vicioso de estresse oxidativo e resposta inflamatória.

A fim de atenuar a produção excessiva de radicais livres e EROS e combater o estresse oxidativo e suas implicações, as células contam com um poderoso sistema antioxidante (BARBOSA et al., 2010). O sistema antioxidante pode ser dividido em defesas enzimáticas através da atuação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx). E defesa não enzimática, que engloba as vitaminas C e E, carotenóides, flavonóides, pigmentos biliares, urato e o tripeptídeo glutathione (GSH) (BARREIROS; DAVID, 2006). Em condições normais esse sistema também atua, permitindo o equilíbrio de oxidantes e antioxidantes (BARBOSA et al., 2010).

A SOD é uma enzima que promove a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em eucariotos são encontradas duas principais isoformas, no citosol a forma SOD-CuZn, enquanto que na mitocôndria a forma SOD-Mn. A CAT catalisa a degradação do H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2), e está localizada em maior abundância nos peroxissomos, já a GPx está relacionada à função antioxidante da GSH com atividade peroxidásica contra peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). GST é responsável pela conjugação de xenobióticos eletrofílicos a GSH, reduzindo sua toxicidade, e tornando-os mais hidrofílicos, facilitando sua eliminação para o meio extracelular. A GST, por ser uma enzima sensível a compostos exógenos, tem sido largamente usada como biomarcador (TEW; RONAI, 1999).

O aumento de nível em vários indicadores biológicos relacionados com o dano oxidativo celular, tais como danos as membranas por lipoperoxidação, ao DNA e as

proteínas, assim como mudança na atividade das enzimas antioxidantes, tem sido demonstrado em exposição a pesticidas, tornando-se um bom bioindicador nessas situações.

O fungicida tebuconazol é conhecido por induzir estresse oxidativo em fígado de peixes expostos durante 28 dias a 0.18, 0.92 e 1.84 mg/L de TEB (LI et al., 2020). Em ratos também expostos por 28 dias a 0.9, 9 e 27 mg/kg, TEB causou danos as membranas lipídicas e proteínas dos rins, além de induzir apoptose e dano ao DNA (OTHMÈNE et al., 2020).

iii. Desreguladores endócrinos

Desreguladores endócrinos são substâncias capazes de simular ou alterar o sistema hormonal de seres humanos e animais, comprometendo o funcionamento dos demais sistemas e órgãos (GHISELLI; JARDIM, 2007). De acordo com a Environmental Protection Agency (EPA), um desregulador endócrino é definido como um "agente exógeno que interfere com síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos" (SCHUG et al., 2011).

Os desreguladores endócrinos podem ser utilizados como biomarcadores em estudos que buscam conhecer os efeitos dos xenobióticos, uma vez que interagem direta ou indiretamente com essas substâncias (SCHIAVINI; CARDOSO; RODRIGUES, 2011).

Os pesticidas possuem essa capacidade de afetar o sistema endócrino, portanto são considerados desreguladores endócrinos (BILA; DEZOTTI, 2007). Além disso, seus resíduos são encontrados em alimentos, água potável e corpos hídricos, vias de fácil contaminação (BILA; DEZOTTI, 2007). Os efeitos ao sistema endócrino causados por pesticidas são comprovados em diferentes estágios de vida e diferentes organismos (FUDVOYE; BOURGUIGNON; PARENT, 2014; BURGGREN; MUELLER, 2015). Em seres humanos, há uma correlação direta entre a contaminação por pesticidas e efeitos hormonais ligados a infertilidade, câncer de testículo e próstata, câncer de mama e ovário (KOIFMAN; KOIFMAN; MEYER, 2002). Outros efeitos encontrados na literatura são diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas; feminização de peixes

machos; problemas no sistema reprodutivo em peixes, répteis, pássaros e mamíferos e, alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos (BILA; DEZOTTI, 2007).

O fungicida tebuconazol também é considerado como desregulador endócrino, por ser capaz de inibir a ação aromatase em ratos, enzima responsável por converter estrógeno em testosterona (YANG et al., 2018). Além disso, TEB também é conhecido por induzir toxicidade endócrina da tireoide em embriões de zebrafish, comprometendo o desenvolvimento desses animais (YU et al., 2013), quando os pais (zebrafish) são expostos a esse fungicida a geração F0 e F1 também apresenta desregulação dos hormônios da tireoide (LI et al., 2019). Em pássaros, a ingestão de sementes contaminadas com tebuconazol retarda a reprodução, através de alterações nos níveis de colesterol, precursor dos hormônios esteroides sexuais (LOPEZ-ANTIA et al., 2021).

III. Ordem Chiroptera

Os morcegos, representantes da ordem Chiroptera, são os únicos mamíferos capazes de voar e ocupam os mais variados nichos alimentares sendo considerados animais reconhecidamente importantes na regulação de ecossistemas, como polinizadores, dispersores de sementes ou controladores de insetos (REIS et al., 2011).

De acordo com a última lista de espécies publicada pela Sociedade Brasileira de Quirópteros (SBEQ), no Brasil são encontradas 9 famílias, 68 gêneros e 181 espécies de morcegos (GARBINO et al., 2020).

Durante o forrageio, os morcegos estão em constante contato com pesticidas, sendo morcegos frugívoros e insetívoros os mais afetados (ZALLER; BRÜHL, 2019; DE SOUZA et al., 2020). Poucos são os estudos que envolvem pesticidas e morcegos, porém estes demonstram que os pesticidas podem afetar crescimento, desenvolvimento e reprodução desses animais (HSIAO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2020; TORQUETTI; GUIMARÃES; SOTO-BLANCO, 2021). A intensificação da agricultura junto com o aumento do uso de produtos químicos, como os pesticidas é uma das causas de declínio de populações, podendo levar a extinção de espécies (STECHELT et al., 2014).

Em morcegos, inseticidas como deltametrina e endosulfan causam toxicidade hepática e muscular, mudanças no metabolismo e bioacumulação no fígado e tecido adiposo (Brinati et al., 2016; Oliveira et al., 2018). Já o fungicida tebuconazol induz

alterações morfológicas testiculares em morcegos frugívoros machos (MACHADO-NEVES et al., 2018).

Já se sabe que os morcegos são animais particularmente sensíveis a exposição a pesticidas (STECHELT et al., 2014) e essa exposição pode prejudicar o importante papel ecológico que eles exercem. Os morcegos prestam uma variedade de serviços ecossistêmicos que podem trazer benefícios para o meio ambiente, para agricultura e bem estar humano (KUNZ et al., 2011). Podemos destacar o controle de populações de insetos (muitos destes insetos considerados pragas agrícolas ou vetores de doença), dispersores de sementes ajudando na regeneração de florestas, importantes polinizadores, mantenedores do ecossistema de cavernas e modelos para criações tecnológicas, como radares e aparelhos de ultra-som (KUNZ et al., 2011).

Dentre as várias espécies de morcego, o *Artibeus lituratus* é conhecido por ser o grande morcego frugívoro, pertence à família Phyllostomidae, é caracterizado por listras brancas faciais e considerado de grande porte (PEREIRA et al., 2019) (Figura 3). Está distribuído na região central do México até o sul do Brasil (REIS et al., 2011). *A. lituratus* tem grande importância na recuperação de áreas degradadas da Mata Atlântica (MIKICH et al., 2015). Essa espécie é capaz de consumir 14 milhões de sementes com potencial de germinação por hectare por dia (MIKICH et al., 2015). Além disso, os morcegos frugívoros em geral são considerados ótimos dispersores, porque conseguem dispersar semente longe da planta mãe, sendo que essas sementes não sofrem injúrias durante a digestão (o que aumenta o potencial de germinação) (MIKICH et al., 2015). Além disso eles consomem plantas consideradas pioneiras, como as do gênero *Piper* e *Ficus* e interagem bem com paisagens degradadas, auxiliando no reflorestamento (MIKICH et al., 2015).

Considerando esses fatores, é de grande importância entendermos como os pesticidas afetam os morcegos e quais as principais medidas a serem tomadas para conservação desses animais de grande relevância ecológica.



Figura 3: Morcego macho da espécie *Artibeus lituratus*. Fonte: <http://morcegosdobrasil.blogspot.com>. Acessado em 28/01/2021.

IV. Compostos naturais como atenuantes de toxicidade

Recentemente, pesquisas utilizando compostos naturais, como extrato de plantas, óleos essenciais e outros, estão sendo realizadas a fim de verificar a eficácia desses compostos contra a toxicidade induzida por contaminantes, incluindo os pesticidas (SAOUDI et al., 2017; MOSBAH; DJERROU; MANTOVANI, 2017; TREA; TICHATI; OUALI, 2020; SHALABY; EMAM; SOLIMAN, 2020).

A grande maioria desses compostos são constituídos por componentes com propriedades antioxidantes, como os flavonoides, polifenóis, antocianinas, quercetinas, carotenoides, minerais entre outros (DEL RÉ; JORGE, 2012). Esses componentes são responsáveis por fortalecer o sistema antioxidante do organismo, auxiliando na neutralização de radicais livres e assim, combatendo os possíveis danos dessas moléculas às células saudáveis (LOBO et al., 2010; DEL RÉ; JORGE, 2012).

As folhas, galhos e frutos da figueira comum (*Ficus carica* L.), árvore da família Moreacea e nativa do Oriente Médio e da Ásia, são reconhecidos por possuírem componentes bioativos antioxidantes com minerais, flavonoides e polifenóis (SOLOMON et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009). Portanto, o extrato dos seus constituintes vem sendo utilizado em estudos para compreender essa ação antioxidante e antiinflamatória frente a toxicidade de contaminantes (KHAN; SULTANA, 2005; MOHAN et al., 2007).

V. Referências

ANVISA, A. N. D. V. S. Resolução 160 de 19 de janeiro de 2010. Agrotóxicos e toxicologia, monografia dos agrotóxicos. Tebuconazol.

ARRIGONI, O.; DE TULLIO, M. C. Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1569, n. 1–3, p. 1–9, 2002.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutricao*, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. ESTRESSE OXIDATIVO: RELAÇÃO ENTRE GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS E DEFESA DO ORGANISMO. *Quimica Nova*, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BURGGREN, W. W.; MUELLER, C. A. Developmental critical windows and sensitive periods as three-dimensional constructs in time and space. *Physiological and Biochemical Zoology*, v. 88, n. 2, p. 91–102, 2015.

CECARINI, V. et al. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1773, n. 2, p. 93–104, 2007.

DE SOUZA, M. B. et al. Current status of ecotoxicological studies of bats in Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, n. 0123456789, 2020.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: Aplicações em alimentos e implicação na saúde. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 14, n. 2, p. 389–399, 2012.

FAOSTAT. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*, 1997.

FILIPPIN, L. I. et al. Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide Redox Influence on the Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis. p. 17–24, 2008.

FUDVOYE, J.; BOURGUIGNON, J. P.; PARENT, A. S. Endocrine-disrupting chemicals and human growth and maturation. A focus on early critical windows of exposure. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2014. v. 94. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00001-8>>.

FUSTINONI, S. et al. Biological monitoring of exposure to tebuconazole in winegrowers. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, v. 24, n. 6, p. 643–649, 2014.

GARBINO, G. S. T. et al. Updated checklist of Brazilian bats: versão 2020. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. Disponível em: <<https://www.sbeq.net/lista-de-especies>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Quimica Nova*, v. 30, n. 3, p. 695–706, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 4. ed. [S.l.]: Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you do it and what do the results mean ? p. 231–255, 2004.

HSIAO, C. J. et al. Imidacloprid toxicity impairs spatial memory of echolocation bats through neural apoptosis in hippocampal CA1 and medial entorhinal cortex areas. *NeuroReport*, v. 27, n. 6, p. 462–468, 2016.

KAHLE, M. et al. Azole fungicides: Occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environmental Science and Technology*, v. 42, n. 19, p. 7193–7200, 2008.

KHAN, N.; SULTANA, S. Chemomodulatory effect of *Ficus racemosa* extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats. *Life Sciences*, v. 77, n. 11, p. 1194–1210, 2005.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Distúrbios do sistema reprodutivo humano e exposição a pesticidas no Brasil*. *Cad. Saúde Pública*, v. 18, n. 2, p. 435–445, 2002.

KUNZ, T. H. et al. Ecosystem services provided by bats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1223, n. 1, p. 1–38, 2011.

LI, S. et al. Parental exposure to tebuconazole causes thyroid endocrine disruption in zebrafish and developmental toxicity in offspring. *Aquatic Toxicology*, v. 211, n. January, p. 116–123, 2019.

LI, S. et al. Tebuconazole induced oxidative stress related hepatotoxicity in adult and larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, v. 241, 2020.

LIMA, É. S.; SAES, D.; ABDALLA, P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, n. 2, 2001.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010.

LOPEZ-ANTIA, A. et al. Birds feeding on tebuconazole treated seeds have reduced breeding output. *Environmental Pollution*, v. 271, p. 116292, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116292>>.

MACHADO-NEVES, M. et al. Dietary exposure to tebuconazole affects testicular and epididymal histomorphometry in frugivorous bats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 101, n. 2, p. 197–204, 2018.

MANCINI, F.; WOODCOCK, B. A.; ISAAC, N. J. B. Agrochemicals in the wild : Identifying links between pesticide use and declines of nontarget organisms. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, v. 11, p. 53–58, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.07.003>>.

MENEGOLA, E. et al. Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects. *Reproductive Toxicology*, v. 22, n. 2, p. 186–195, 2006.

MIKICH, S. B. et al. Serviços ambientais prestados por morcegos frugívoros na recuperação de áreas degradadas. **SERVIÇOS AMBIENTAIS EM SISTEMAS**

AGRÍCOLAS E FLORESTAIS DO BIOMA MATA ATLÂNTICA. Brasília, DF: Embrapa, 2015. p. 248–256.

MOHAN, G. et al. Hepatoprotective activity of *Ficus carica* Linn. leaf extract against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Daru*, v. 15, n. 3, p. 162–166, 2007.

MOSBAH, R.; DJERROU, Z.; MANTOVANI, A. Protective effect of *Nigella sativa* oil against acetamiprid induced reproductive toxicity in male rats. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 41, n. 2, p. 206–212, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01480545.2017.1337127>>.

MOSER, V. C. et al. The effects of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological and reproductive function in rats. *Toxicological Sciences*, v. 62, p. 339–352, 2001.

NIGAM, S.; SCHEWE, T. Phospholipase A2s and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1488, n. 1–2, p. 167–181, 2000.

OLIVEIRA, A. P. et al. *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 11, p. 2841–2846, 2009.

OLIVEIRA, J. M. et al. How do pesticides affect bats? – A brief review of recent publications. *Brazilian Journal of Biology*, v. 6984, p. 1–9, 2020.

OTHMÈNE, Y. BEN et al. Tebuconazole induced oxidative stress and histopathological alterations in adult rat heart. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 170, n. August, p. 104671, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104671>>.

PEREIRA, A. D. et al. Dieta de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Mammalia, Chiroptera) em um fragmento florestal urbano da cidade de Londrina, Paraná, Brasil. *Biotemas*, v. 32, n. 2, p. 79–86, 2019.

PINTO, G. M. F.; JARDIM, I. C. S. F. Use of solid phase extraction and HPLC for determination of herbicide multiresidue recoveries in water. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 25, n. 7, p. 1093–1101, 2002.

RAMOS, V. A.; RAMOS, P. A.; DOMINGUEZ, M. C. Papel do estresse oxidativo na manutenção da inflamação em pacientes com artrite reumatóide huvenil. *J. pediatr. (Rio J.)*, v. 76, p. 125–32, 2000.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. *Quimica Nova*, v. 37, n. 7, p. 1199–1208, 2014.

REIS, N. R. et al. Sobre os mamíferos do Brasil. In: REIS, N. R. (Org.). *Mamíferos do Brasil*. 2ed. ed. Londrina: [s.n.], 2011. p. 23–29.

REMBISCHEVSKI, P.; CALDAS, E. D. Agroquímicos para controle de pragas no Brasil: análise crítica do uso do termo agrotóxico como ferramenta de comunicação de risco. *Vigilância Sanitária em Debate*, v. 6, n. 4, p. 2, 2018.

SAOUDI, M. et al. Deltamethrin induced oxidative stress in kidney and brain of rats: Protective effect of *Artemisia campestris* essential oil. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 94, p. 955–963, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.030>>.

SCHIAVINI, J. D. A.; CARDOSO, C. E.; RODRIGUES, W. C. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente e o Uso de Potenciais Bioindicadores. *Revista Eletrônica TECCEN*, v. 4, n. 3, p. 33, 2011.

SCHUG, T. T. et al. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 127, n. 3–5, p. 204–215, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.08.007>>.

SCHUMMER, C. et al. Determination of farm workers' exposure to pesticides by hair analysis. *Toxicology Letters*, v. 210, n. 2, p. 203–210, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.019>>.

SHALABY, M. A.; EMAM, S. R.; SOLIMAN, A. M. Protective Effect of Vitamin E against Herbicide Paraquat-induced Enzymatic Leakage and Oxidative Damage in the Liver of Rats. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, v. 8, n. 6, p. 639–646, 2020.

SOLOMON, A. et al. Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 20, p. 7717–7723, 2006.

STECHERT, C. et al. Insecticide residues in bats along a land use-gradient dominated by cotton cultivation in northern Benin , West Africa. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, p. 8812–8821, 2014.

TAXVIG, C. et al. Endocrine-disrupting activities In Vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicological Sciences*, v. 100, n. 2, p. 464–473, 2007.

TEW, K. D.; RONAI, Z. GST function in drug and stress response. *Drug Resistance Updates*, v. 2, n. 3, p. 143–147, 1999.

TORQUETTI, C. G.; GUIMARÃES, A. T. B.; SOTO-BLANCO, B. Exposure to pesticides in bats. *Science of the Total Environment*, v. 755, p. 142509, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142509>>.

TREA, F.; TICHATI, L.; OUALI, K. Protective effect of *Thymus munbyanus* aqueous extract against 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced nephrotoxicity in Wistar rats. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1809669>>.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

YANG, J. DI et al. Effects of tebuconazole on cytochrome P450 enzymes, oxidative stress, and endocrine disruption in male rats. *Environmental Toxicology*, v. 33, n. 8, p. 899–907, 2018.

YU, L. et al. Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae following exposure to hexaconazole and tebuconazole. *Aquatic Toxicology*, v. 138–139, p. 35–42, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.04.001>>.

ZALLER, J. G.; BRÜHL, C. A. Editorial: Non-target effects of pesticides on organisms inhabiting agroecosystems. *Frontiers in Environmental Science*, v. 7, n. May, p. 1–3, 2019.

CAPÍTULO 2

**EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE *Ficus carica* CONTRA TOXICIDADE
INDUZIDA PELO FUNGICIDA TEBUCONAZOL NO MORCEGO FRUGÍVORO
NEOTROPICAL *Artibeus lituratus***

Efeito protetor do extrato de *Ficus carica* contra toxicidade induzida pelo fungicida tebuconazol no morcego frugívoro Neotropical *Artibeus lituratus*

Renata Maria Pereira de Freitas¹, Bárbara Silva Linhares¹, Jerusa Maria de Oliveira², João Paulo V. Leite³, Sérgio Luis P. da Matta⁴, Reggiani G. Vilela¹, Mariella B. Freitas^{1*}

¹ Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Campus UFV, Viçosa, Brasil, 36570-900

² Universidade Federal de Alagoas

³ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Campus UFV, Viçosa, Brasil, 36570-900

⁴ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Campus UFV, Viçosa, Brasil, 36570-900

*Autor correspondente (M. Freitas)

E-mail: mfreitas@ufv.br

Phone #: +55 (31) 3612-5271

Palavras-chave: Pesticida; Ecotoxicologia; Chiroptera.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população e o desenvolvimento acelerado da agricultura para abastecer o mercado contribuíram para aumentar em grande escala o uso dos pesticidas no Brasil (PIGNATI et al., 2017). No ano de 2017, foram consumidas 377.176 toneladas de pesticidas e em 2016 o consumo de fungicidas foi de 59.124 toneladas. Nos EUA e União Europeia esse número também foi alto em 2017, totalizando 407.779 e 362.421 toneladas de pesticidas, respectivamente (FAO, 2018).

A utilização extensiva desses pesticidas pode gerar resíduos que permanecem nos alimentos, água e solo (CEREJEIRA et al., 2003; GREWAL et al., 2017), representando uma grande ameaça para os ecossistemas e para a biodiversidade, já que podem influenciar negativamente o crescimento, a reprodução e desenvolvimento dos seres vivos (DÉVIER et al., 2011; KEIKOTLHAILE; SPANOGHE; STEURBAUT, 2010; SÁNCHEZ-BAYO, 2011).

Os pesticidas usados em lavouras agrícolas são divididos em três classes principais: herbicidas, inseticidas e fungicidas (LEROUX, 2003). O tebuconazol (TEB), é um fungicida triazol usado para controlar fungos principalmete em culturas de frutas, vegetais e sementes (YANG et al., 2018). A atividade antifúngica do TEB baseia-se na inibição da biossíntese do ergosterol, componente estrutural essencial na membrana plasmática dos fungos, o que inviabiliza sua sobrevivência (GEORGOPAPADAKOU, 1998; SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Estudos toxicológicos mostram que a exposição crônica a concentrações ambientalmente relevantes (as mesmas usadas pelos agriculturas nas plantações) do fungicida tebuconazol induz estresse oxidativo hepático, atividade anti-androgênica em ratos machos (YANG et al., 2018) e causa neurotoxicidade em ratos (MOSER et al., 2001). Também foi observado que o TEB provocou a perda de fetos, morte pós-natal, ou perda de peso da prole após exposição perinatal em ratas grávidas (TAXVIG et al., 2007). Em peixes-zebra, baixas dose do fungicida induziu estresse oxidativo e apoptoses no fígado (LI et al., 2020) e também, atividade genotóxica e mutagênica, quando expostos a dose sub-letal do TEB por 96h. (CASTRO et al., 2018).

A exposição a pesticidas é capaz de ocasionar um aumento do nível de estresse oxidativo e desregulação endócrina e pode elevar a suscetibilidade a doenças

(JABŁOŃSKA-TRYPUC' et al., 2017). Estudos sobre o uso de xenobióticos e as consequências desse uso para a fauna silvestre ainda são escassos.

Sabemos que o contato dos morcegos com pesticidas se dá principalmente no momento do forrageio, no qual morcegos frugívoros e insetívoros são os mais afetados (DE SOUZA, M. B. et al., 2020; ZALLER; BRÜHL, 2019). Este contato pode causar toxicidade hepática, muscular e testicular, alterações no metabolismo, na morfologia hepática e testicular e bioacúmulo no tecido hepático e adiposo (BRINATI et al., 2016; MACHADO-NEVES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018). Tal fato, poderia causar prejuízos fisiológicos em indivíduos e, conseqüentemente, declínio das populações de morcegos que vivem perto de culturas tratadas com pesticidas (STECHELT et al., 2014; WICKRAMASINGHE et al., 2003).

Os morcegos, pertencentes a ordem Chiroptera, compõem a segunda ordem mais diversa entre os mamíferos. No Brasil são 181 espécies de morcegos, sendo 71% presente no bioma Mata Atlântica, onde são fundamentais para dinâmica florestal (GARBITO et al., 2020; REIS et al., 2011). Devido à grande variedade de dieta, os morcegos prestam os mais diversos serviços ecológicos e ecossistêmicos (JONES et al., 2009), sendo um grande aliado da agricultura, das florestas e do bem estar humano. Estima-se que a maior colônia de morcegos (*Tadarida brasiliensis*) do mundo (caverna de Bracken, Texas) poderia consumir até 8,4 toneladas de insetos em uma única noite (KUNZ et al., 2011), dentre esses insetos a maioria são pragas agrícolas e vetores de doenças. Nos EUA estima-se que a atuação dos morcegos insetívoros no controle biológico em lavouras de milho retorne US\$ 22,9 bilhões/ano, incluindo os custos reduzidos com o uso de pesticidas (BOYLES et al., 2011). Além disso, os morcegos fornecem energia via guano para o ecossistema das cavernas (KUNZ et al., 2011). Os que se alimentam de fruta e néctar promovem regeneração de florestas e produção de madeira, são essenciais para muitos produtos alimentares, dispersando sementes e polinizando flores de muitas espécies de plantas tropicais e neotropicais (KASSO; BALAKRISHNAN, 2013; KUNZ et al., 2011). Algumas dessas espécies dependem exclusivamente dos morcegos para dispersão e polinização (BREDET; UIEDA; PEDRO, 2012).

Dentro da família Phyllostomidae, a espécie *Artibeus lituratus* é uma espécie abundante, com alta plasticidade adaptativa que, devido ao desmatamento e a destruição de habitats, está presente em áreas de agricultura e áreas urbanas (BREDET; UIEDA;

PEDRO, 2012). Assim como outros morcegos frugívoros, *A. lituratus* desempenha papel fundamental na dispersão de sementes e restauração de áreas degradadas (BREDT; UIEDA; PEDRO, 2012). Estudos comprovam que essa espécie tem preferências alimentares por frutos de plantas pioneiras, como *Cecropia*, *Ficus* e *Piper* (MARTINS; TORRES; DOS ANJOS, 2014).

Afim de minimizar as alterações provocadas pelos pesticidas, pesquisas com compostos naturais, como extratos de plantas, estão sendo realizadas, (DATTA et al., 2010; GIRISH; REDDY, 2018; SUNTRES, 2018). Os antioxidantes naturais advindos destes compostos tem capacidade de atenuar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), combatendo o estresse oxidativo e o desbalanço homeostático causado por essa produção excessiva de EROs (LOBO et al., 2010).

A figueira comum (*Ficus carica*), pertencente à família Moreacea, é uma árvore nativa do Oriente Médio e Ásia Ocidental. Suas folhas, galhos e frutos possuem propriedades medicinais tem sido utilizadas na medicina popular como anti-inflamatórios, hiperglicêmico, hipolipidêmico e anticâncer (OLIVEIRA, A. P. et al., 2009; SOLOMON et al., 2006). Além disso, a figueira, deste suas folhas aos seus frutos, é rica em minerais, vitaminas A, B1 e B2 e antioxidantes (OLIVEIRA, A. P. et al., 2009; SOLOMON et al., 2006), especialmente através de compostos bioativos como flavonoides, polifenóis e antocianinas (OLIVEIRA, A. P. et al., 2009; RAWAT; TIWARI; SRIVASTAVA, 2012; VIUDA-MARTOS et al., 2015). Estudos envolvendo extrato do fruto de *Ficus carica* comprovam o potencial desta espécie na proteção contra ruptura da membrana basal de túbulos seminíferos lesados por acetato de chumbo em ratos adultos (ASAD; HAMID; QAMA, 2018) e contra toxicidade hepática e renal induzida por radiação em ratos (FOUAD et al., 2019). Além disso, demais espécies de *Ficus* também foram estudadas quanto a capacidade protetiva contra danos causados por diferentes xenobióticos, (KHAN; SULTANA, 2005; MOHAN et al., 2007).

Portanto, neste estudo objetivamos avaliar o potencial efeito protetor do extrato etanólico do galho de *Ficus carica* contra possíveis efeitos tóxicos causados pelo fungicida tebuconazol em morcegos frugívoros machos (*Artibeus lituratus*), a fim de propor que novas formulações de pesticidas possuam compostos que amenizem sua toxicidade e assim, atenuem os possíveis efeitos tóxicos para a abundante quiropterofauna que desempenha um importante papel ecológico na manutenção de ecossistemas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes Químicos

A formulação comercial do fungicida Folicur® 200 EC, que tem como ingrediente ativo o tebuconazol (200g/L; 21,3% m/v) (formulação: [(RS) -1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) pentan-3-ol]), fabricado pela empresa Bayer Crop Science Ltda (Rio Grande do Sul, Brasil) foi obtido no Laboratório de Proteção de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Todos os outros reagentes foram comprados da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, US), Merck (Darmstadt, Alemanha) e Leica (Alemanha).

A concentração nominal do fungicida tebuconazol usado (0,2 mg / mL ingrediente ativo (a.i)) foi a mesma recomenda pelo fabricante para cultura de frutas.

2.2 Extrato de Planta

O material vegetal foi coletado em área de Mata Atlântica localizada em Viçosa – MG. Uma exsiccata foi depositada no herbário de Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob o número VIC 31703. O extrato etanólico dos galhos de *Ficus carica* foi obtido de acordo com ALVES et al., 2020, Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A concentração usada foi estabelecida de acordo com estudos realizados com ratos.

2.3 Animais

Morcegos machos adultos (determinado pelo grau de ossificação das epífises dos metacarpos e primeiras falanges das asas) (Peso Corporal: $65,60 \pm 1,31$ g) da espécie *Artibeus lituratus* (n=24) foram capturados em fragmento de Mata Atlântica na região de Viçosa, Minas Gerais (20° 45' 17" Sul, 42° 52' 57" Oeste). Todas as capturas foram realizadas na estação chuvosa (Outubro de 2018 a Março de 2019) com auxílio de redes de neblina. Os animais foram identificados por chave dicotômica (DÍAZ et al., 2016), acondicionados em gaiolas e transportados para o Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa. Em seguida, foram alocados em um morcegário (um espaço com 8 compartimentos individuais construídos de meias paredes de tela de proteção), situado em uma área de imersão da Mata Atlântica. Neste ambiente, os animais ficaram em recintos individuais de 1m³ cada (um grupo experimental de cada vez), sob

efeito da sazonalidade, temperatura e pressão do ambiente externo. Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com a declaração ética do Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA) (registro nº 03/2019) e do Governo brasileiro (SISBIO, registro nº 67062-2).

2.4 Design Experimental

Após captura os animais foram mantidos de 3 a 4 dias em cativeiro para adaptação antes de iniciar o experimento. Nessa fase de adaptação os animais receberam frutas variadas (>200 g por animal) como mamão, banana e figo e água ad libitum, oferecidas às 18:00 h e removidas no dia seguinte. As frutas eram lavadas, antes de serem ofertadas, com água e sabão para retirar as impurezas. Após o período de adaptação os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: 1) CTL receberam mamão puro; 2) DMSO receberam mamão tratado com calda de dimetil sulfoxido (DMSO) 1,25%; 3) TEB receberam mamão tratado com calda de Folicur (nome comercial) 0,1%; e 4) TEBFC receberam mamão tratado com calda do fungicida 0,1% e extrato etanólico de *Ficus carica* 20% em solução de 1,25% de DMSO (usado para solubilizar o extrato vegetal). Todos os animais foram expostos por um período de sete dias. Mamões foram usados porque os morcegos aceitam facilmente esta dieta em cativeiro (AMARAL et al., 2012).

Nos grupos tratados com o fungicida, o Folicur foi diluído em água e a solução foi pulverizada diariamente de forma homogênea em toda casca da fruta, conforme a concentração e as instruções de uso recomendadas pelo fabricante, a concentração nominal foi de 0,2 mg/mL (i.a). Os frutos tratados foram mantidos suspensos durante a secagem para que não perdessem a camada de pesticida formada na casca.

Após a secagem, as frutas foram cortadas ao meio, pesadas, e oferecidas aos animais com a casca voltada para cima, para que o contato do animal fosse direto com o pesticida, simulando a situação encontrada pelos animais na natureza. O fruto foi oferecido a cada noite por volta de 18:00 horas, e água foi disponível ad libitum durante todo experimento. O consumo alimentar foi monitorado diariamente, oferecendo uma quantidade conhecida da fruta para cada animal (200g), sendo que as sobras foram pesadas no dia seguinte.

Após sete dias de exposição, os morcegos foram eutanasiados por decapitação e, em seguida, pesados em balança de precisão. O sangue foi coletado e centrifugado a 3000

rpm, durante 15 min a 4 °C e o soro foi separado em alíquotas e estocado a -80° C para as análises séricas. Fragmentos do fígado, do músculo peitoral e o testículo direito foram removidos, pesados e colocados imediatamente em nitrogênio líquido e depois estocados a -80° C para posteriores análises de enzimas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo. Um fragmento do fígado e o testículo esquerdo foram removidos, pesados e colocados em solução fixadora para análises histológicas.

2.5 Índice hepatossomático e gonadossomático

O fígado e testículos de cada morcego foram dissecados e pesados em balança de precisão. Os índices dos órgãos foram calculados como uma porcentagem de peso do órgão em relação ao peso corporal total de cada indivíduo (peso do órgão/peso corporal total x 100).

2.6 Marcadores oxidativos e enzimas antioxidantes

Preparação da amostra de tecidos

Amostras de tecidos congelados de fígado (100 mg), músculo peitoral (100 mg) e testículo (100 mg) de *A. lituratus* foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,2 mol/L, 1 mmol/L de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), pH 7,4 usando um homogeneizador (OMNI). Os homogenatos foram centrifugados a 12000 rpm por 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram usados para ensaios de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), óxido nítrico (NO), malondialdeído (MDA) e proteínas totais. Os pellets resultantes foram utilizados para análises de oxidação de proteínas. As análises foram determinadas usando leitor de microplacas ELISA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) ou espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu, Japão).

Determinação do Malondialdeído (MDA)

As substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico são, em sua maioria, produtos da peroxidação lipídica, sendo o Malondialdeído (MDA) um importante marcador para monitorar a taxa de lipoperoxidação (BUEGE; AUST, 1978). Para a determinação da peroxidação lipídica foi adicionado à uma alíquota da amostra (200 µL) ácido tricloroacético TCA 15%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,375% e ácido clorídrico (HCl) 0,25N, mantidos em banho-maria por 40 minutos a 90°C, resfriados por 5 minutos no

gelo, centrifugados a 3000 rpm, 10 min, 15°C e mensurados a 540 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína.

Oxidação de Proteínas

Grupos carbonil nas proteínas foram mensuradas utilizando os pellets resultantes dos homogeneizados dos tecidos preparados para as enzimas. Os danos às proteínas foram determinados baseado nos grupos carbonil da reação com DNPH e mensurado em leitor de microplacas ($\lambda = 370\text{nm}$). O total de proteínas carboniladas (CP) foi calculado baseado no coeficiente de extinção molar de $\epsilon_{370} = 22,000 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expresso em nmol/mL (LEVINE et al., 1990).

Produção de óxido nítrico

A produção de NO foi quantificada pela reação padrão de Griess. Em resumo, 50 μL de sobrenadantes descritos acima foram incubados com um volume igual de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de N- (1-naftil) etilenodiamina e 2,5% de H_3PO_4) à temperatura ambiente, durante 10 minutos (TSIKAS, 2007). A absorbância foi medida a 540 nm. A conversão da absorbância em concentrações micromolares de NO foi deduzida de uma curva padrão usando uma concentração conhecida de NaNO_2 . Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol}/\text{L}$.

Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método baseado na redução do superóxido (O^{-2}) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), diminuindo a auto-oxidação do pirogalol, de acordo com (DIETERICH et al., 2000). A mistura de reação contém 99 μL de tampão fosfato de potássio (5 mmol/L , pH 8) e 30 μL de amostra. A reação foi iniciada adicionando 15 μL de pirogalol (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$). A leitura foi feita a 570 nm. A atividade da SOD foi calculada como U SOD por miligrama de proteína.

Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi medida de acordo com HADWAN; ABED (2016) com modificações. Uma alíquota de amostra (5 μL) foi adicionada a 100 μL de substrato (65 mmol/mL de H_2O_2 em 60 mmol/L de tampão de fosfato de potássio e sódio, pH 7,4) ou em 100 μL de tampão (branco) e incubada a 37 °C. Depois de três minutos, a reação foi parada com a adição de 150 μL de molibdato e a leitura da absorbância foi realizada a 374 nm. Alterações na absorbância, em relação ao branco, foram registradas. A conversão

da absorvância em concentrações micromolares de H₂O₂ foi calculada a partir de uma curva padrão usando uma concentração conhecida de H₂O₂. A atividade da catalase foi expressa em U CAT/ mg de proteína.

Glutathione S-transferase (GST)

A atividade de GST foi medida usando o método de HABIG et al. (1974), de acordo com a formação de glutathione conjugada à 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB). Resumidamente, foi adicionado 1 mmol/L de CDBN ao tampão contendo 1 mmol/L de GSH e a alíquota (10 µL) da amostra a ser testada. Após a adição de CDBN, a alteração foi monitorada com absorvância a 340 nm por 90 segundos. O coeficiente de extinção molar usado para CDBN foi de $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mmol/L} \times \text{cm}$. Os resultados foram expressos em µmole/min/g.

Proteínas totais

A quantificação de proteínas totais nos tecidos estudados foi determinada pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. Os dados resultantes foram utilizados para padronizar os resultados das enzimas antioxidantes (SOD, CAT) e dos marcadores de estresse oxidativo (MDA).

2.7 Análises histológicas do fígado e testículo

Fragmentos dos órgãos (fígado e testículo) foram fixados em solução fixadora Karnovsky e incluídos em glicol metacrilato (Historesin®, Leica, Alemanha). Foram realizados cortes semisseriados de 3µm de espessura, com intervalo de 30 µm entre eles. Os cortes foram obtidos com auxílio de micrótomo rotativo (Leica, Alemanha). As secções de fígado foram coradas com hematoxilina e eosina, e as secções de testículo com azul de toluidina. Imagens digitais (10imagens/animal) foram obtidas em fotomicroscópio colorido (Olympus BX53) para as análises histopatológicas e histomorfométricas que foram realizadas usando o software de análise de imagem Image Pro-Plus 4.5 (media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

No fígado, a proporção dos componentes: esteatose, infiltrado inflamatório e pigmentos de hemossiderina, foi determinada por meio de uma grade quadriculada de 266 pontos (2660 pontos por animal). Para o cálculo foi utilizada a seguinte fórmula $V_v = (PP/PT) \times 100$, onde V_v é densidade volumétrica, PP são os pontos sobre estrutura e PT são os pontos totais (ROSA et al., 2018).

No testículo, o diâmetro tubular (DT), a altura do epitélio (AE) e o diâmetro luminal (DL) foram obtidos através da medição de secções transversais dos túbulos seminíferos mais circular possível (MOURO et al., 2020). A área do túbulo seminífero (STAr) foi determinada pela fórmula $STAr = \pi R^2$ (onde, R = raio do túbulo), a área do lúmen (LAr) foi obtida por $LAr = RL^2$ (onde, RL = raio luminal) e a área do epitélio (EAr) foi calculada por $EAr = STAr - LAr$ (MOURO et al., 2020). Os resultados foram expressos em milímetros quadrados (mm^2) (MOURO et al., 2020). A densidade volumétrica dos componentes dos compartimentos tubular e intertubular foi obtida utilizando uma grade de 266 pontos sobre as imagens digitais (2660 pontos por animal). Foram contados pontos sobre epitélio, túnica própria e lúmen (compartimento tubular) e espaço linfático, vasos sanguíneos, citoplasma de leydig e núcleo de leydig (compartimento intertubular). A porcentagem de cada componente foi determinada pela fórmula: razão de volume (%) = (número de pontos sobre o componente / 2660 pontos no total) \times 100 (MOURO et al., 2020).

2.8 Biomarcadores bioquímicos no soro

O soro foi usado para a determinação de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP). Esses biomarcadores foram mensurados de acordo com Kit Bioclin, seguindo as instruções do fabricante.

2.9 Análise hormonal

Uma alíquota de soro (10 μ L) foi usada para mesurar a quantidade de testosterona total de acordo com o Kit Testosterone Test System – EIA (USA Diagnostica), seguindo as instruções do fabricante.

2.10 Análises Estatísticas

A distribuição dos dados foi determinada pelo teste Shapiro-Wilk, usando o software GraphPad Prism (versão 6.0, Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Todos os dados apresentaram distribuição normal e foram submetidos a análise de variância (one-way ANOVA), seguida de teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Os dados foram expressos como média e erro padrão da média. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Massa corporal e índices dos órgãos

A massa corporal dos animais não diferiu entre os grupos, assim como os índices hepatossomático e gonadossomático (Tabela 1). O consumo de mamão durante os dias de tratamento também foi semelhante entre os grupos (Tabela 1).

3.2 Marcadores oxidativos e enzimas antioxidantes

No fígado, a concentração de MDA aumentou no grupo TEB em relação ao controle ($F_{(3,21)} = 7,49$; $P = 0,0024$). No grupo TEBFC a concentração deste marcador ficou semelhante ao controle ($F_{(3,21)} = 7,49$; $P = 0,9062$) (Fig. 1-A). A atividade das enzimas SOD e CAT foi maior no grupo TEB (SOD: $F_{(3,21)} = 5,91$; $P = 0,0409$; CAT: $F_{(3,17)} = 4,73$; $P = 0,0250$) e igual no TEBFC (SOD: $P = 0,9831$; CAT: $P = 0,9826$) quando comparado ao grupo CTL (Fig. 1-D e E). Os níveis de proteína carbonilada e óxido nítrico não diferiram entre os grupos (Fig. 1-B e C), bem como a atividade da enzima GST (Fig. 1-F).

No músculo peitoral, a concentração de MDA foi maior ($F_{(3,20)} = 24,65$) nos grupos TEB ($P < 0,0001$) e TEBFC ($P < 0,0001$) em relação ao controle (Fig. 2-A). A atividade de SOD e CAT também foi maior nos grupos TEB e TEBFC em relação ao CTL (SOD: $F_{(3,20)} = 49,31$; $P < 0,0001$, para ambos; CAT: $F_{(3,19)} = 7,37$; $P = 0,0291$ e $P = 0,0111$, respectivamente) (Fig. 2-D e E). Os níveis de proteína carbonilada e óxido nítrico (Fig. 2-B e C) e a atividade da enzima GST (Fig. 2-F) não diferiram entre os grupos.

No testículo, a concentração de MDA foi maior no grupo TEB quando comparado ao controle ($F_{(3,20)} = 10,61$; $P = 0,0003$) e igual no grupo TEBFC e CTL ($F_{(3,20)} = 10,61$; $P = 0,8868$) (Fig. 3-A). O nível de proteína carbonilada foi maior no grupo TEB em relação ao CTL ($F_{(3,20)} = 7,44$; $P = 0,0011$) já o nível de óxido nítrico foi maior nos grupos TEB ($F_{(3,20)} = 10,29$; $P = 0,0005$) e TEBFC ($F_{(3,20)} = 10,29$; $P = 0,0057$) em relação ao controle (Fig. 3-B e C). A atividade de SOD e CAT foi maior no grupo TEB quando comparado ao CTL (SOD: $F_{(3,21)} = 5,22$; $P = 0,0107$, CAT: $F_{(3,20)} = 20,33$; $P < 0,0001$) (Fig. 3-D e E), entretanto a atividade de CAT diminuiu no TEBFC comparado ao TEB ($F_{(3,20)} = 20,33$; $P = 0,0323$). Por fim, a atividade de GST foi maior no grupo TEB ($F_{(3,21)} =$

Tabela 1: Massa corporal, índices dos órgãos e consumo de *A. lituratus* expostos a TEB e TEB coadministrado com *Ficus carica*.

	Tratamentos			
	CTL (n = 6)	DMSO (n = 6)	TEB (n = 6)	TEBFC (n = 6)
Peso corporal (g)	59,84 ± 3,26 ^a	66,98 ± 2,24 ^a	67,84 ± 2,08 ^a	66,64 ± 2,44 ^a
Índice hepatossomático	4,52 ± 0,40 ^a	4,44 ± 0,12 ^a	3,76 ± 0,22 ^a	3,68 ± 0,27 ^a
Índice gonadossomático	0,11 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,03 ^a	0,11 ± 0,02 ^a	0,21 ± 0,03 ^a
Consumo de mamão (g/massa corporal/dia)	1,92 ± 0,10 ^a	2,21 ± 0,16 ^a	1,74 ± 0,12 ^a	1,91 ± 0,14 ^a

CTL: grupo controle, DMSO: grupo dimetilsulfóxido, TEB: grupo tebuconazol, TEBFC: grupo Tebuconazol/*Ficus carica*. ^{a, b} Letras diferentes significam diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos. Dados expressos em Média ± EPM.

11,59; $P = 0,0056$) e igual no TEBFC ($F_{(3,21)} = 11,59$; $P = 0,9525$) quando comparado ao controle (Fig. 3-F).

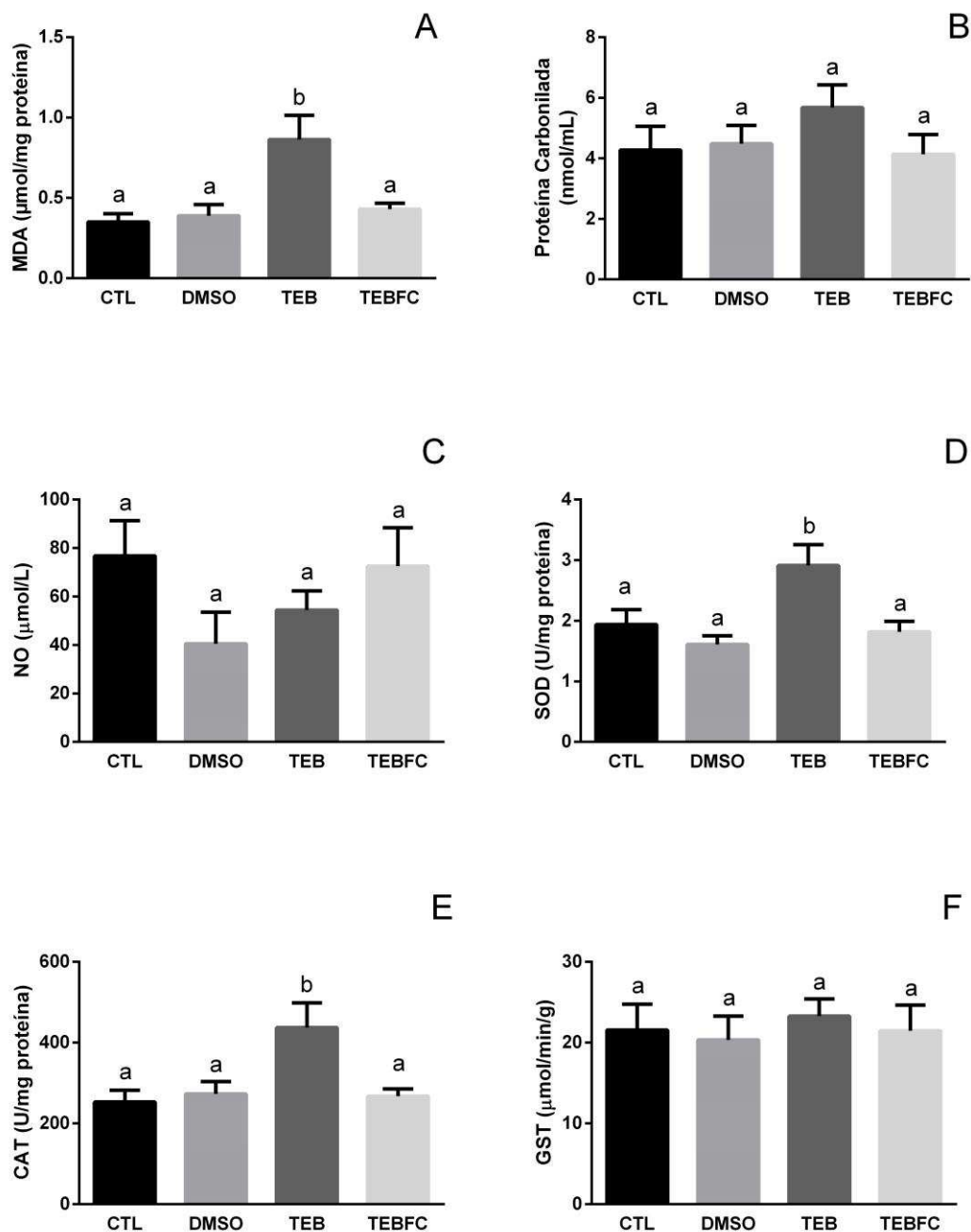


Figura 1: Efeito do fungicida tebuconazol e extrato de *Ficus carica* sobre os marcadores de estresse oxidativo e capacidade antioxidante hepática de *A. lituratus* após exposição oral de 7 dias. (A) malondialdeído - MDA, (B) proteína carbonilada, (C) óxido nítrico - NO, (D) atividade da superóxido dismutase - SOD, (E) atividade da catalase - CAT, (F) atividade da glutatona S-transferase - GST. CTL: grupo controle, DMSO: grupo dimetilsulfóxido, TEB: grupo tebuconazol, TEBFC: grupo Tebuconazol/*Ficus carica*. ^{a, b} Letras diferentes significam diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos. Dados expressos em Média \pm EPM.

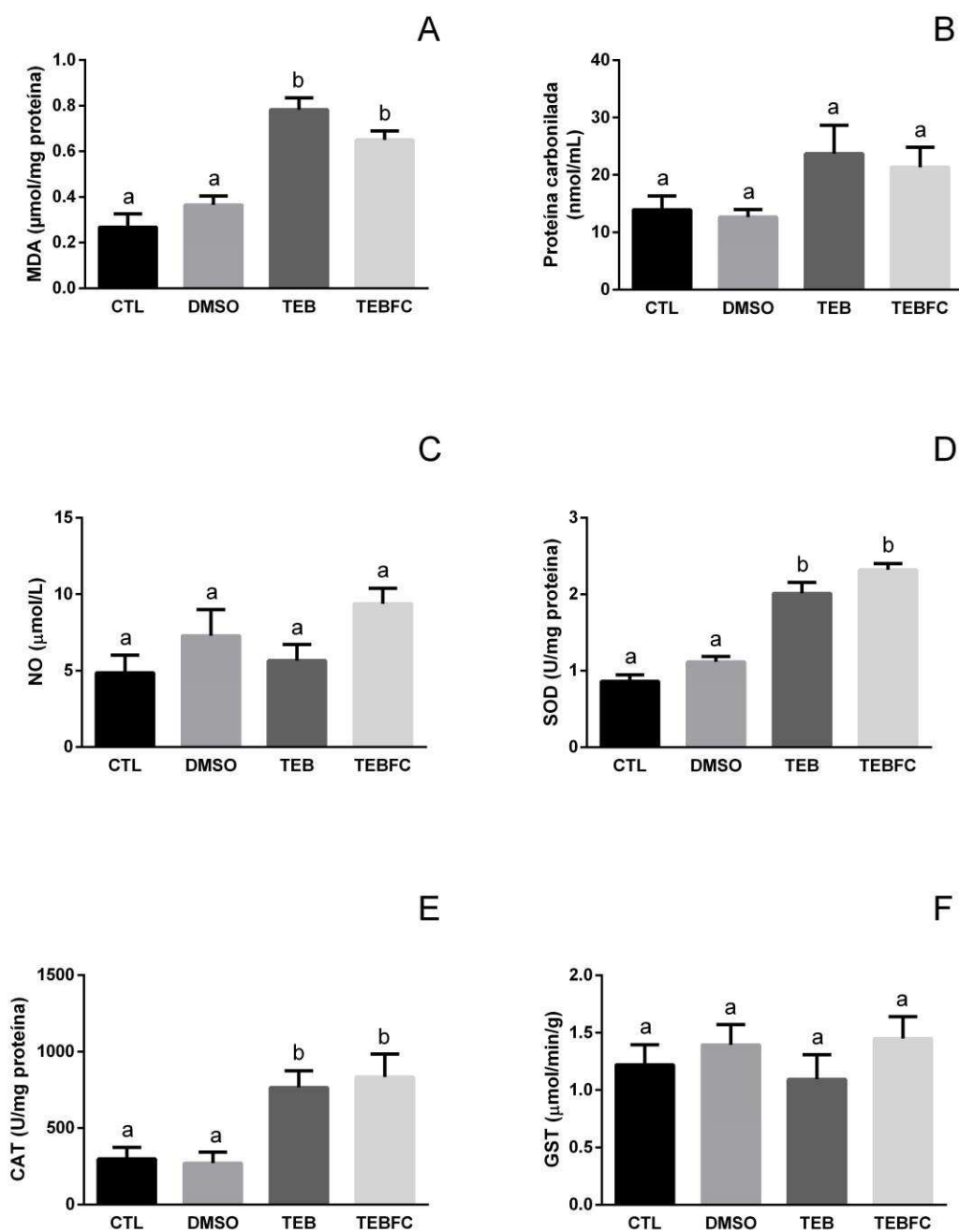


Figura 2: Efeito do fungicida tebuconazol e extrato de *Ficus carica* sobre os marcadores de estresse oxidativo e capacidade antioxidante do músculo peitoral de *A. lituratus* após exposição oral de 7 dias. (A) malondialdeído - MDA, (B) proteína carbonilada, (C) óxido nítrico – NO, (D) atividade da superóxido dismutase – SOD, (E) atividade da catalase – CAT, (F) atividade da glutathiona S-transferase – GST. CTL: grupo controle, DMSO: grupo dimetilsulfóxido, TEB: grupo tebuconazol, TEBFC: grupo Tebuconazol/*Ficus carica*. ^{a, b} Letras diferentes significam diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos. Dados expressos em Média \pm EPM.

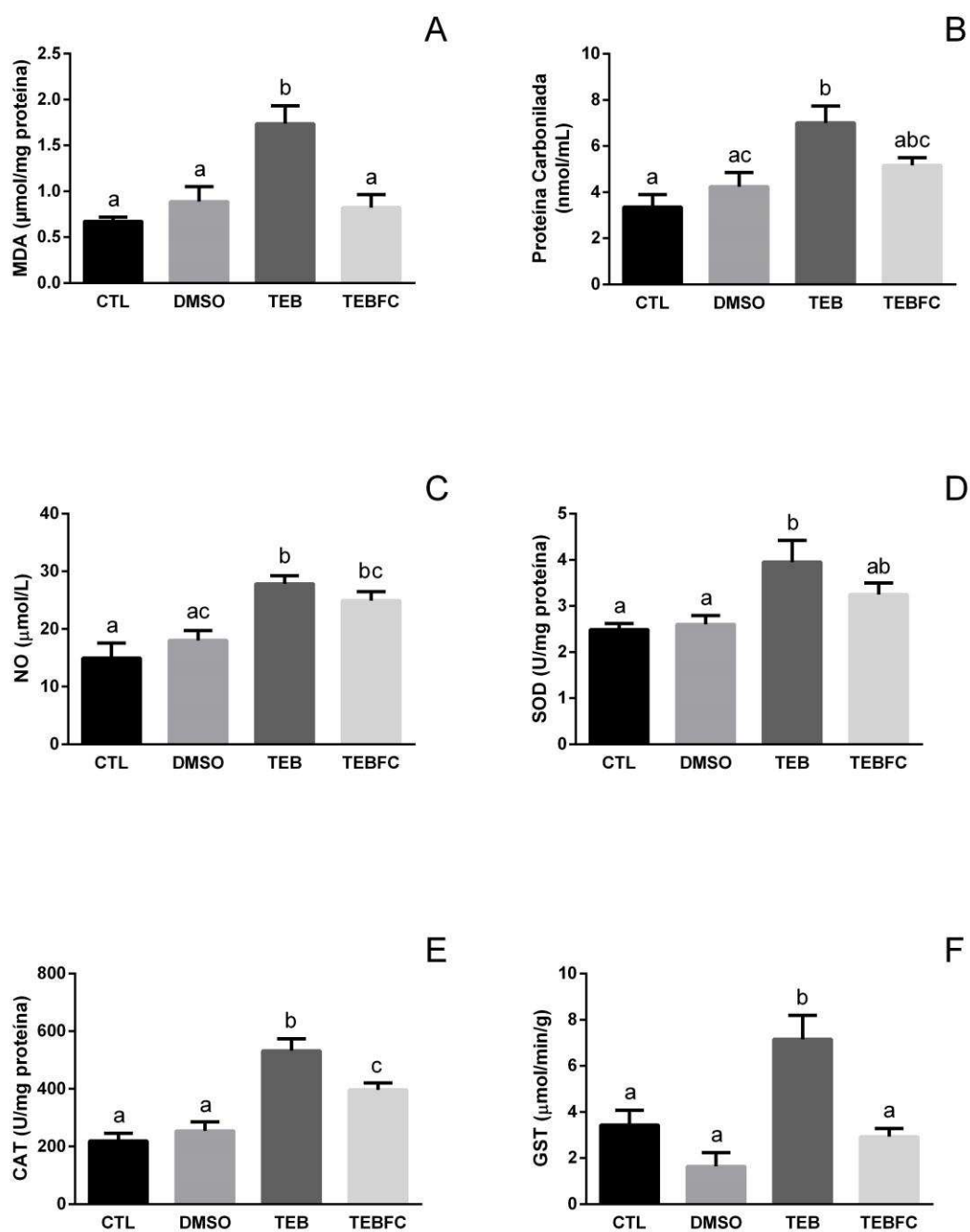


Figura 3: Efeito do fungicida tebuconazol e extrato de *Ficus carica* sobre os marcadores de estresse oxidativo e capacidade antioxidante testicular de *A. lituratus* após exposição oral de 7 dias. (A) malondialdeído - MDA, (B) proteína carbonilada, (C) óxido nítrico - NO, (D) atividade da superóxido dismutase - SOD, (E) atividade da catalase - CAT, (F) atividade da glutatona S-transferase - GST. CTL: grupo controle, DMSO: grupo dimetilsulfóxido, TEB: grupo tebuconazol, TEBFC: grupo Tebuconazol/*Ficus carica*. ^{a, b} Letras diferentes significam diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos. Dados expressos em Média \pm EPM.

3.3 Análises histológicas

No fígado foi observado maior frequência de infiltrado inflamatórios no grupo tratado com o fungicida TEB em relação ao grupo controle ($F_{(3,20)} = 24,01$; $P < 0,0001$). Quando comparado ao CTL o grupo TEBFC teve resultados semelhantes ($F_{(3,21)} = 24,01$; $P = 0,9996$). O mesmo foi observado com os pigmentos de hemossiderina que ocorreu em maior quantidade nos animais do grupo TEB quando comparado com o CTL ($F_{(3,21)} = 9,20$; $P = 0,0007$) e o TEBFC foi semelhante ao CTL ($F_{(3,21)} = 9,20$; $P = 0,8534$). Não houve diferença significativa entre os grupos em relação a esteatose hepática (Fig. 4).

No testículo, o diâmetro tubular ($F_{(3,11)} = 3,66$; $P = 0,0446$), a área tubular ($F_{(3,11)} = 3,93$; $P = 0,0372$) e área luminal ($F_{(3,11)} = 5,28$; $P = 0,0167$) foi maior no grupo TEBFC em relação ao grupo CTL. Já o diâmetro luminal foi maior ($F_{(3,11)} = 6,05$) tanto no grupo TEB ($P = 0,0332$) quanto no TEBFC ($P = 0,0110$) em relação ao controle. A altura do epitélio e área epitelial não apresentaram diferença entre os grupos estudados (Tabela 2). Em relação as proporções volumétricas, foi observado uma maior proporção do lúmen nos animais do grupo TEBFC em relação aos outros ($F_{(3,11)} = 35,85$; $P < 0,0001$). Nos demais parâmetros não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 3).

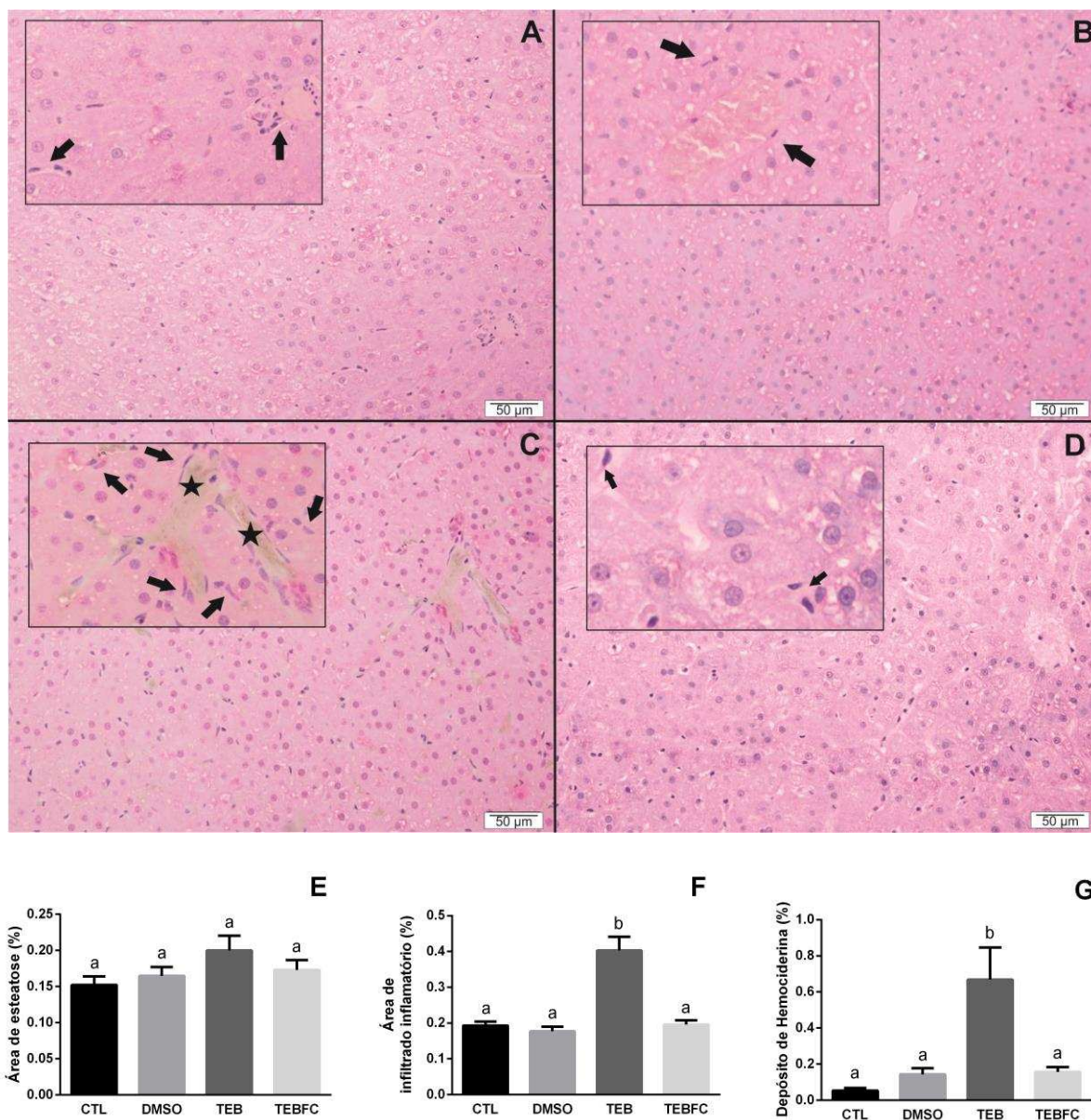


Figura 4: Efeitos histopatológicos do fungicida tebuconazol e do extrato de *Ficus carica* em fígado de *A. lituratus* exposto oralmente por 7 dias. Fotomicrografias de seções do fígado (A) CTL: grupo controle, (B) DMSO: grupo dimetilsulfóxido, (C) TEB: grupo tebuconazol, e (D) TEBFC: grupo Tebuconazol/*Ficus carica*. Setas: regiões de infiltrado inflamatório; estrela: deposição de hemossiderina (coloração HE, lente objetiva de 20x); (E) Área de esteatose, (F) Infiltrado inflamatório, (G) Deposição de hemossiderina. ^{a, b} Letras diferentes significam diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos. Dados expressos em Média \pm EPM.

Tabela 2: Morfometria tubular do testículo de *A. lituratus* expostos oralmente a TEB e TEB coadministrado com *Ficus carica*

	Tratamentos			
	CTL	DMSO	TEB	TEBFC
Diâmetro tubular (μm)	334,50 \pm 14,06 ^a	344,20 \pm 17,37 ^{ab}	360,40 \pm 19,58 ^{ab}	396,8 \pm 7,74 ^b
Diâmetro luminal (μm)	90,16 \pm 8,85 ^a	114,60 \pm 86,60 ^{ab}	132,50 \pm 9,33 ^b	137,30 \pm 111,30 ^b
Altura do epitélio (μm)	122,20 \pm 3,72 ^a	114,80 \pm 5,57 ^a	114,00 \pm 5,73 ^a	129,70 \pm 1,98 ^a
Área tubular (μm^2)	88288 \pm 7082 ^a	93694 \pm 9381 ^{ab}	102557 \pm 11370 ^{ab}	123724 \pm 4877 ^b
Área luminal (μm^2)	6566 \pm 1225 ^a	10487 \pm 1670 ^{ab}	13914 \pm 1983 ^{ab}	14960 \pm 1834 ^b
Área do epitélio (μm^2)	81722 \pm 6081 ^a	83208 \pm 8076 ^a	88643 \pm 9530 ^a	108763 \pm 3344 ^a

CTL: grupo controle, DMSO: grupo dimetilsulfóxido, TEB: grupo tebuconazol, TEBFC: grupo Tebuconazol/*Ficus carica*. ^{a, b} Letras diferentes significam diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos. Dados expressos em Média \pm EPM.

Tabela 3: Densidade volumétrica de componentes dos compartimentos tubular e intertubular do testículo de *A. lituratus* expostos oralmente a TEB e TEB coadministrado com *Ficus carica*.

	Tratamentos			
	CTL	DMSO	TEB	TEBFC
Epitélio	5,32 \pm 0,21 ^a	5,32 \pm 0,34 ^a	5,04 \pm 0,22 ^a	5,05 \pm 0,10 ^a
Túnica própria	1,14 \pm 0,09 ^a	0,90 \pm 0,12 ^a	0,88 \pm 0,04 ^a	1,01 \pm 0,06 ^a
Lúmen	0,18 \pm 0,04 ^a	0,68 \pm 0,06 ^b	0,56 \pm 0,08 ^b	1,17 \pm 0,08 ^c
Espaço linfático	0,033 \pm 0,004 ^a	0,033 \pm 0,002 ^a	0,038 \pm 0,006 ^a	0,036 \pm 0,003 ^a
Vaso sanguíneo	0,046 \pm 0,005 ^a	0,051 \pm 0,009 ^a	0,051 \pm 0,011 ^a	0,044 \pm 0,004 ^a
Citoplasma de Leydig	0,67 \pm 0,12 ^a	0,40 \pm 0,09 ^a	0,48 \pm 0,06 ^a	0,41 \pm 0,08 ^a
Núcleo de Leydig	0,17 \pm 0,04 ^a	0,15 \pm 0,02 ^a	0,22 \pm 0,01 ^a	0,19 \pm 0,03 ^a

CTL: grupo controle, DMSO: grupo dimetilsulfóxido, TEB: grupo tebuconazol, TEBFC: grupo Tebuconazol/*Ficus carica*. ^{a, b} Letras diferentes significam diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos. Dados expressos em Média \pm EPM.

3.4 Biomarcadores hepáticos no soro

Morcegos expostos ao fungicida tebuconazol (grupo TEB) apresentaram níveis séricos mais altos de AST, ALT e ALP quando comparados com o controle (AST: $F_{(3,20)} = 13,08$; $P = 0,0003$; ALT: $F_{(3,20)} = 10,65$; $P = 0,0003$; ALP: $F_{(3,16)} = 8,85$; $P = 0,0055$) (Fig. 5). Já o grupo que recebeu o extrato de planta (TEBFC) apresentou níveis altos de AST, quando comparado ao controle ($F_{(3,20)} = 13,08$); $P = 0,0039$) (Fig. 5 – A). Porém os níveis de ALT e ALP do grupo TEBFC ficaram estatisticamente iguais ao controle (ALT: $F_{(3,20)} = 10,65$; $P = 0,4368$; ALP: $F_{(3,16)} = 8,85$; $P = 0,9483$) (Fig. 5 – B e C).

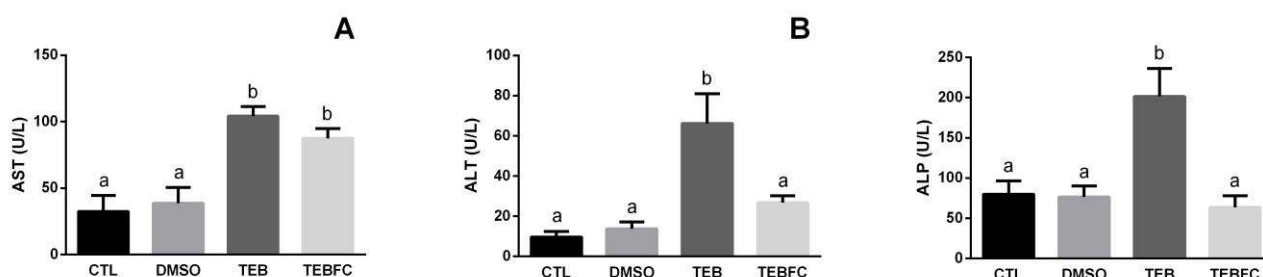


Figura 5: Níveis séricos de enzimas hepáticas em morcegos *A. lituratus* expostos oralmente ao fungicida tebuconazol e ao extrato de *Ficus carica* por 7 dias. (A) Aspartato aminotransferase – AST, (B) Alanina aminotransferase – ALT, (C) Fosfatase Alcalina – ALP. CTL: grupo controle, DMSO: grupo dimetilsulfóxido, TEB: grupo tebuconazol, TEBFC: grupo Tebuconazol/*Ficus carica*. ^{a, b} Letras diferentes significam diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos. Dados expressos em Média \pm EPM.

3.5 Testosterona Total

A concentração sérica de testosterona total foi maior nos grupos tratados com fungicida tebuconazol (TEB) e com tebuconazol mais o extrato de *Ficus carica* (TEBFC) em comparação com o controle ($F_{(3,15)} = 9,52$; $P = 0,0094$ e $P = 0,0096$, respectivamente) (Fig. 6).

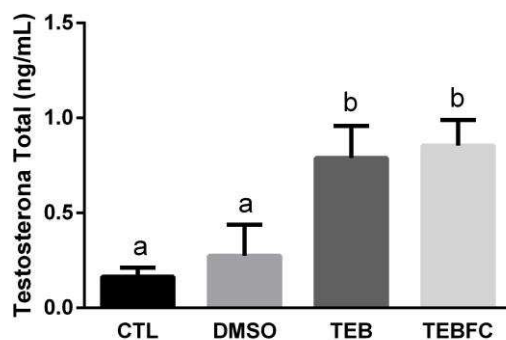


Figura 6: Níveis séricos de testosterona total em morcegos *A. lituratus* expostos oralmente ao fungicida tebuconazol e ao extrato de *Ficus carica* por 7 dias. CTL: grupo controle, DMSO: grupo dimetilsulfóxido, TEB: grupo tebuconazol, TEBFC: grupo Tebuconazol/*Ficus carica*. ^{a, b} Letras diferentes significam diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos. Dados expressos em Média \pm EPM.

4. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que investiga o efeito benéfico da administração do extrato do galho de *F. carica* contra um possível efeito tóxico do fungicida tebuconazol sobre alterações no metabolismo e reprodução de morcegos frugívoros Neotropicais *Artibeus lituratus*. Nosso estudo mostrou que morcegos expostos ao fungicida tebuconazol apresentaram estresse oxidativo no músculo peitoral, fígado e testículo, histopatologias hepáticas e alterações hormonais e de enzimas transaminases hepáticas. Entretanto a coadministração do fungicida com o extrato da planta *F. carica* foi benéfica aos animais, evidenciando o efeito protetor do extrato, atenuando especialmente os danos do fungicida relacionados ao estresse oxidativo no fígado e nos testículos, e transaminases hepáticas.

O estresse oxidativo é causado quando há um desbalanço entre a atuação das enzimas antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo a produção de EROs maior que a atenuação destas (BETTERIDGE, 2000). A ação das EROs e radicais livres levam a destruição das membranas celulares (peroxidação lipídica), a oxidação e má formação de proteínas e danos ao DNA (DRÖGE, 2002). As enzimas antioxidantes atuam catalisando reações para atenuar esses efeitos e manter a homeostase celular, antioxidantes naturais como carotenoides, flavonoides e vitaminas

também exercem esse papel (PIZZINO et al., 2017). O extrato do galho de *F. carica* possui em sua composição antioxidantes naturais (flavonoides e polifenóis) que ajudam na defesa contra o estresse oxidativo (OLIVEIRA et al., 2009; RAWAT; TIWARI; SRIVASTAVA, 2012; VIUDA-MARTOS et al., 2015; AYOUB et al., 2019).

O efeito hepatoprotetor do extrato foi evidenciado neste estudo, no qual a concentração de MDA diminuiu quando coadministramos o extrato com o fungicida. Além disso é possível observar que a atividade das enzimas SOD e CAT também foi menor no grupo que recebeu o TEB em associação com o extrato de *F. carica*, mostrando o potencial antioxidante da planta. Os animais tratados somente com o fungicida apresentaram altos níveis de MDA e alta atividade de SOD e CAT, o que sugere uma atenuação da peroxidação lipídica neste tecido. Por ser o órgão central do metabolismo, o fígado é o primeiro a metabolizar compostos exógenos, e pode ser, por isso, que a ação antioxidante hepática da *F. carica* foi tão pronunciada. Estudos com antioxidantes naturais como própolis e óleo essencial mostraram a eficácia destes compostos contra a hepatotoxicidade causada por fungicidas, tais como tebuconazol, mancozeb e carbendazim (FERREIRA et al., 2013; HASHEM; MOHAMED; ATTIA, 2018). Além disso, o extrato de folhas e frutos de *F. carica* reduziu os níveis de malondialdeído em ratos tratados tetracloreto de carbono (SINGAB et al., 2010). Nestes estudos, assim como no nosso, a peroxidação lipídica foi atenuada quando foi feita a coadministração do antioxidante natural com o xenobiótico.

O aumento da concentração de EROs pode desencadear uma resposta inflamatória e culminar em estresse oxidativo, morte celular e destruição tecidual (ZHANG et al., 2011; ZHOU; SHEN; CLARET, 2013). Notavelmente, o estresse oxidativo no fígado dos animais tratados com TEB pode ter sido agravado por processos inflamatórios no tecido hepático (GOMES; SILVA; OLIVEIRA, 2012), o que pode ser observado através dos dados histológicos, que indicam maior número de infiltrado inflamatório nos animais tratados com o fungicida. Entretanto, o mesmo padrão de recuperação foi observado, sendo que a coadministração com o extrato de *Ficus* foi benéfica para o tecido hepático, reduzindo os processos inflamatórios. Demais estudos com ratos expostos ao tebuconazol e outros pesticidas também mostram o aumento na quantidade de infiltrado inflamatório ou mediadores de inflamação no fígado após o período de exposição (DHOUIB et al., 2015; SAAD et al., 2017).

Os pigmentos de hemossiderina são depósitos de ferro decorrentes da hemocatarese dos glóbulos vermelhos, e podem estar relacionados com estresse oxidativo, alterações vasculares e lesão celular (PANDEY; RIZVI, 2011; SOUZA et al., 2018; WEIR; GIBSON; PETERS, 1984). A maior deposição desse pigmento foi encontrada no grupo tratado com o fungicida tebuconazol. O TEB é conhecido por causar destruição de glóbulos vermelhos e hemoglobina, porém quando coadministrado com óleo *Allium sativum* esses efeitos foram minimizados (BERROUAGUE et al., 2019). Em nosso estudo o extrato do galho de *Ficus carica* contribuiu para diminuição da deposição de hemossiderina em animais expostos ao TEB.

Em nossas análises histológicas não observamos resultados significativos em relação à esteatose no fígado. Como a exposição é considerada aguda, isso pode ter sido limitante para a evidência deste dano. Esteatose hepática causada por fungicidas do grupo triazol foram observadas, através de expressão gênica, em cultura de células humanas expostas por 6 dias e em ratos expostos de 4 a 12 semanas (HEISE et al., 2015; KNEBEL et al., 2019; MARIAM et al., 2020).

Nossos achados referentes aos níveis séricos das transaminases (AST, ALT e ALP), corroboram com a ocorrência de estresse oxidativo e infiltrado inflamatório e evidenciam a hepatotoxicidade causada pelo TEB. Essas enzimas são marcadores que refletem o dano e a função hepática (ZHANG et al., 2018). A ALT é uma importante enzima indicadora de lesão hepatocelular (SOLTER; LIU; GUZMAN, 2000) e neste estudo encontramos baixos níveis de ALT e ALP no grupo TEBFC, indicando o potencial antioxidante do extrato de *F. carica*, que foi capaz de amenizar o dano causado pelo fungicida. Antioxidantes exógenos se mostraram eficazes na proteção do fígado, diminuindo níveis de enzimas transaminases, de ratos expostos a fungicidas (SABER; ABO-ELMAATY; ABDEL-GHANY, 2019; SEFI et al., 2019).

Diferentemente do fígado, o extrato de *F. carica* não se mostrou tão eficaz no músculo peitoral dos morcegos. Neste tecido observamos um aumento de MDA nos grupos TEB e TEBFC e também alta atividade de SOD e CAT nos mesmos grupos, sem observar melhora no grupo TEBFC. De acordo com um estudo *in vitro*, feito em cultura de células de fibroblasto, o fruto da figueira (*Ficus carica*) foi capaz de eliminar EROs, oferecendo proteção para essas células (SOLOMON et al., 2010). Em morcegos a taxa metabólica basal é alta (MUNSHI-SOUTH; WILKINSON, 2010), e a demanda de

oxigênio pelo músculo peitoral durante o voo é alta (BARTHOLOMEW; CASEY, 1978; THOMAS, 1975; YACOE et al., 1982), o que pode causar um aumento na produção de EROs. Apesar disso, a alta atividade das enzimas antioxidantes, retratadas neste estudo, parece acontecer na tentativa de atenuar os danos causados pelo fungicida, principalmente a peroxidação lipídica, evidenciada pelo aumento de MDA.

Além de causar prejuízos para o metabolismo, de acordo com nossos achados o fungicida tebuconazol também é prejudicial para reprodução em morcegos machos. Entretanto, o extrato de *F. carica* também age protegendo a estrutura e função dos testículos. Níveis elevados de MDA, NO e proteína carbonilada indicam o dano oxidativo causado pelo fungicida no grupo TEB, no mesmo grupo observamos alta atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST que agem atenuando o estresse oxidativo. Quando os animais foram expostos ao tebuconazol juntamente com extrato de planta, podemos perceber uma redução do estresse oxidativo, principalmente nos níveis de MDA, e para comprovar o potencial antioxidante do extrato de *F. carica* observamos também a diminuição da atividade das enzimas, o que nos leva a concluir que o extrato tem esse papel de minimizar o dano oxidativo testicular. Por exemplo, nos testículos, a atividade da enzima GST no grupo TEBFC é reduzida a nível de controle, evidenciando a ação do extrato. GST são um grupo de isoenzimas que participam do processo de biotransformação e detoxificação de xenobióticos (CNUBBEN et al., 2001).

Outros estudos com diferentes inseticidas e fungicidas mostraram que estes induziram estresse oxidativo, evidenciado principalmente pelo aumento da peroxidação lipídica, além disso, diferente do nosso trabalho, encontraram uma redução na atividade das enzimas antioxidantes nos grupos expostos ao pesticida, porém, foram experimentos de exposição a longo prazo, entre 4 e 16 semanas (ABDALLAH et al., 2011; GIRISH; REDDY, 2018; MOHAMMADI-SARDOO et al., 2018; NANTIA et al., 2018; SAKR; SHALABY, 2014; YOUSEF, 2010). Em nosso estudo o tempo curto de exposição ainda revela a tentativa das enzimas de atuarem contra a produção de radicais livres e danos às proteínas e lipídeos induzidos pelo fungicida. Apesar disso, estes e os nossos achados reiteram que antioxidantes naturais como vitamina E, quercetina, extratos fitoterápicos e o extrato de *F. carica* diminuem o estresse oxidativo e conseqüentemente, os danos causados pelos pesticidas (ABDALLAH et al., 2011; GIRISH; REDDY, 2018; MOHAMMADI-SARDOO et al., 2018; SAKR; SHALABY, 2014; YOUSEF, 2010).

Quanto aos níveis séricos de testosterona, também testados aqui, os valores encontrados foram maiores nos grupos TEB e TEBFC. Segundo CHEN et al (2019), em ratos jovens, o tebuconazol inibe a enzima aromatase, codificada pelo gene CYP19A1, que é responsável por converter andrógeno em estrógenos, isso faz com que os níveis de testosterona aumentem e os de estradiol diminuam. Diferentemente, outros estudos observaram diminuição dos níveis séricos ou plasmáticos de testosterona em ratos expostos a outros pesticidas como, cialotrina e malation, relacionando com a redução do peso testicular e menor consumo de alimento (YOUSEF, 2010), efeitos deletérios as células de Leydig (SELMI et al., 2018) ou depuração metabólica (YANG et al., 2018). Em alguns destes, a coadministração com antioxidantes naturais como vitamina E, quercetina e L-carnitina ajudou no aumento dos níveis de testosterona (AZIZ et al., 2018; SELMI et al., 2018; YOUSEF, 2010). Nossos achados mostraram que a presença do extrato de *Ficus carica* não foi suficiente para reduzir os níveis de testosterona de modo a torna-los semelhantes aos do grupo controle.

A manutenção do epitélio seminífero depende dos níveis de testosterona (RUSSELL et al., 1990). A hipótese de que a exposição ao TEB inibe a aromatase, causando um desbalanço hormonal, poderia explicar as mudanças morfométricas encontradas nos grupos TEB e TEBFC, no nosso estudo. Apesar dos níveis elevados de testosterona e diâmetro tubular estarem diretamente ligados à maior atividade espermatogênica (FRANÇA; RUSSELL, 1998), a inibição da aromatase e não conversão de testosterona em estrógeno (CHEN et al., 2019) podem causar distúrbios metabólicos que comprometem a reprodução e o desenvolvimento do animal (CARANI et al., 1997; CHEBOUB et al., 2019). Neste ponto, a coadministração com o extrato de *F. carica* não foi suficiente para atenuar os efeitos do fungicida, sendo necessários mais estudos para entender a relação da exposição ao TEB com a atividade da aromatase em morcegos.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, a exposição a concentrações ambientalmente relevantes do fungicida tebuconazol induziu estresse oxidativo, lesões teciduais, desordens metabólicas e hormonais em morcegos dispersores de frutas em florestas Neotropicais, o que pode comprometer seu importante papel ecológico na regeneração de ecossistemas florestais. A coadministração do fungicida com o extrato de *Ficus carica* atenuou o dano causado

por radicais livres, mantendo a homeostase do sistema antioxidante no fígado e nos testículos, e atenuou lesões hepáticas e distúrbios metabólicos, mas na concentração testada, o extrato não foi suficiente para reverter o desequilíbrio hormonal causado pela exposição ao fungicida. Estudos que avaliam o potencial de antioxidantes naturais em animais silvestres expostos naturalmente a xenobióticos são necessários para produzir formulações de pesticidas menos prejudiciais a estes animais.

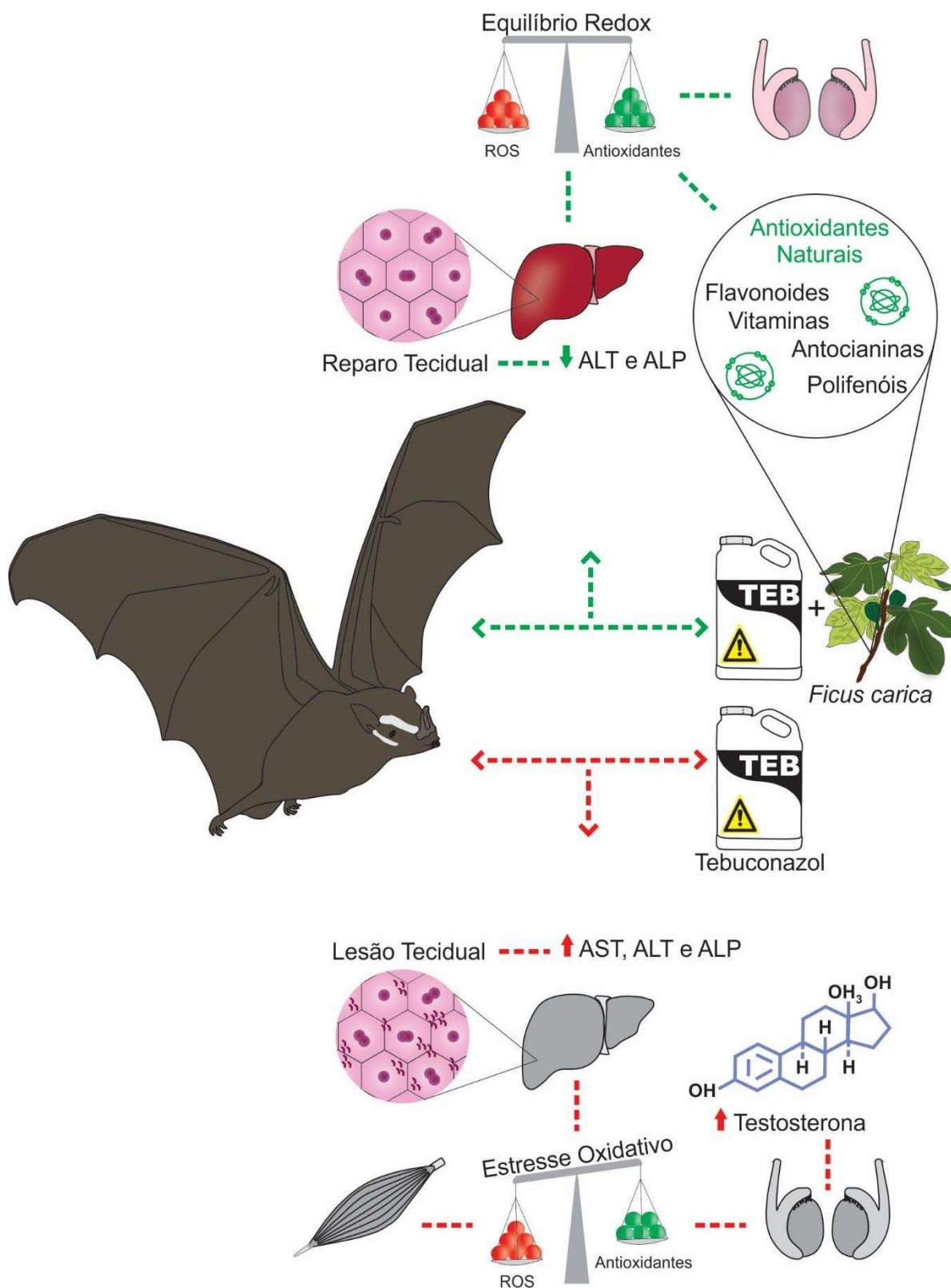


Figura 7

6. REFERÊNCIAS

ABDALLAH, F. et al. Quercetin attenuates lambda cyhalothrin-induced reproductive toxicity in male rats. *Environmental Toxicology*, 2011.

ALVES, J. R. et al. Phytochemical potential of *Ficus* species for the control of the phytonematode *Meloidogyne javanica*. *Journal of Plant Protection Research*, v. 60, n. 2, p. 193–206, 2020.

AMARAL, T. et al. Short-term effects of a spinosyn's family insecticide on energy metabolism and liver morphology in frugivorous bats *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). *Brazilian Journal of Biology*, v. 72, n. 2, p. 299–304, 2012.

ASAD, A.; HAMID, S.; QAMA, K. Effect of lead acetate on basement membrane of seminiferous tubules of adult rat testis and protective effects of *Ficus carica*: A histological study. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP*, v. 28, n. 10, p. 731–734, 2018.

AZIZ, R. L. A. et al. Dose- dependent ameliorative effects of quercetin and L-Carnitine against atrazine- induced reproductive toxicity in adult male Albino rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 102, n. March, p. 855–864, 2018.

BARTHOLOMEW, B. Y. G. A.; CASEY, T. M. Oxygen consumption of moths during rest, pre-flight warm-up, and flight in relation to body size and wing morphology. *Journal of Experimental Biology*, v. 76, n. 1, p. 11–25, 1978.

BERROUAGUE, S. et al. Efficacy of *Allium sativa* oil to alleviate tebuconazole-induced oxidative stress in the liver of adult rats. *Cellular and Molecular Biology*, 2019.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 49, n. 2 SUPPL. 1, p. 3–8, 2000.

BOYLES, J. G. et al. Economic importance of bats in agriculture. *Science*, v. 332, n. 6025, p. 41–42, 2011.

BREDT, A.; UIEDA, W.; PEDRO, W. A. Plantas e morcegos: na recuperação de áreas degradadas e na paisagem urbanas. Brasília: Reede de Sementes do Cerrado, 2012.

BRINATI, A. et al. Low, chronic exposure to endosulfan induces bioaccumulation and decreased carcass total fatty acids in Neotropical fruit bats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 97, n. 5, p. 626–631, 2016.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 52, p. 302–310, 1978.

CARANI, C. et al. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *The New England Journal of Medicine*, v. 337, n. 2, p. 91–95, 1997.

CASTRO, T. F. D. et al. Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to tebuconazole-based commercial product. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 62, n. June, p. 140–146, 2018.

CEREJEIRA, M. J. et al. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Research*, v. 37, n. 5, p. 1055–1063, 2003.

CHEBOUB, A. et al. Short-term aromatase inhibition induces prostatic alterations

in adult wistar rat: A biochemical, histopathological and immunohistochemical study. *Acta Histochemica*, v. 121, n. 8, p. 151441, 2019.

CHEN, X. et al. Pubertal exposure to tebuconazole increases testosterone production via inhibiting testicular aromatase activity in rats. *Chemosphere*, v. 230, p. 519–526, 2019.

CNUBBEN, N. H. P. et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 10, p. 141–152, 2001.

DATTA, S. et al. Influence of polyphenolic extracts from *Enydra fluctuans* on oxidative stress induced by acephate in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n. 10, p. 2766–2771, 2010.

DE SOUZA, M. B. et al. Current status of ecotoxicological studies of bats in Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, n. 0123456789, 2020.

DÉVIER, M. H. et al. New challenges in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures. *Comptes Rendus Chimie*, v. 14, n. 7–8, p. 766–779, 2011.

DHOUIB, I. E.-B. et al. A comparative study on toxicity induced by carbosulfan and malathion in Wistar rat liver and spleen. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 124, p. 21–28, 2015.

DÍAZ, M. M. et al. *Chave De Identificação Dos Morcegos*. [S.l: s.n.], 2016.

DIETERICH, S. et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, v. 101, n. 1, p. 33–39, 2000.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

FAOSTAT. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

FERREIRA, D. et al. Bee products prevent agrichemical-induced oxidative damage in fish. *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, 2013.

FOUAD, D. et al. Hepatotoxicity and renal toxicity induced by gamma-radiation and the modulatory protective effect of *Ficus carica* in male albino rats. *Research in Veterinary Science*, v. 125, n. April, p. 24–35, 2019.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Churchill Livingstone, Madri: [s.n.], 1998.

GARBINO, G. S. T. et al. Updated checklist of Brazilian bats: versão 2020. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. Disponível em: <<https://www.sbeq.net/lista-de-especies>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Antifungals: Mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Current Opinion in Microbiology*, v. 1, n. 5, p. 547–557, 1998.

GIRISH, B. P.; REDDY, P. S. Forskolin ameliorates mancozeb-induced testicular and epididymal toxicity in Wistar rats by reducing oxidative toxicity and by stimulating

steroidogenesis. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 32, n. 2, 2018.

GOMES, E. C.; SILVA, A. N.; OLIVEIRA, M. R. DE. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2012, 2012.

GREWAL, A. S. et al. Pesticide residues in food grains, vegetables and fruits: A hazard to human health. *Journal of Medicinal Chemistry and Toxicology*, v. 2, n. 1, p. 40–46, 2017.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; WILLIAM B. JAKOBY. Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 25, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HADWAN, M. H.; ABED, H. N. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in Brief*, v. 6, p. 194–199, 2016.

HASHEM, M. A.; MOHAMED, W. A. M.; ATTIA, E. S. M. Assessment of protective potential of *Nigella sativa* oil against carbendazim- and/or mancozeb-induced hematotoxicity, hepatotoxicity, and genotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 2, p. 1270–1282, 2018.

HEISE, T. et al. Hepatotoxic effects of (tri)azole fungicides in a broad dose range. *Archives of Toxicology*, v. 89, n. 11, p. 2105–2117, 2015.

JABŁOŃSKA-TRYPUĆ, A. et al. The impact of pesticides on oxidative stress level in human organism and their activity as an endocrine disruptor. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 52, n. 7, p. 483–494, 2017.

JONES, G. et al. Carpe noctem: The importance of bats as bioindicators. *Endangered Species Research*, v. 8, n. 1–2, p. 93–115, 2009.

KASSO, M.; BALAKRISHNAN, M. Ecological and economic importance of bats (Order Chiroptera). *ISRN Biodiversity*, v. 2013, p. 1–9, 2013.

KEIKOTLHAILE, B. M.; SPANOGHE, P.; STEURBAUT, W. Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: A meta-analysis approach. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n. 1, p. 1–6, 2010.

KHAN, N.; SULTANA, S. Chemomodulatory effect of *Ficus racemosa* extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats. *Life Sciences*, v. 77, n. 11, p. 1194–1210, 2005.

KNEBEL, C. et al. Pregnane X receptor mediates steatotic effects of propiconazole and tebuconazole in human liver cell lines. *Archives of Toxicology*, v. 93, n. 5, p. 1311–1322, 2019.

KUNZ, T. H. et al. Ecosystem services provided by bats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1223, n. 1, p. 1–38, 2011.

LEROUX, P. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *Comptes Rendus - Biologies*, v. 326, n. 1, p. 9–21, 2003.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 464–478, 1990.

LI, S. et al. Tebuconazole induced oxidative stress related hepatotoxicity in adult and larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, v. 241, 2020.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265–275, 1951.

MACHADO-NEVES, M. et al. Dietary exposure to tebuconazole affects testicular and epididymal histomorphometry in frugivorous bats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 101, n. 2, p. 197–204, 2018.

MARIAM, J. et al. Triazole fungicides induce hepatic lesions and metabolic disorders in rats. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, v. 10, n. 2, p. 040–047, 2020.

MARTINS, M. P. V.; TORRES, J. M.; DOS ANJOS, E. A. C. Dieta de morcegos filostomídeos (Mammalia, Chiroptera, (Phyllostomidae) em fragmento urbano do Instituto São Vicente, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Papeis Avulsos de Zoologia*, v. 54, n. 20, p. 665–670, 2014.

MOHAMMADI-SARDOO, M. et al. Mancozeb induces testicular dysfunction through oxidative stress and apoptosis: Protective role of N-acetylcysteine antioxidant. *Toxicology and Industrial Health*, v. 34, n. 11, p. 798–811, 2018.

MOHAN, G. et al. Hepatoprotective activity of *Ficus carica* Linn. leaf extract against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Daru*, v. 15, n. 3, p. 162–166, 2007.

MOSER, V. C. et al. The effects of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological and reproductive function in rats. *Toxicological Sciences*, v. 62, p. 339–352, 2001.

MOURO, V. G. S. et al. Euterpe oleracea (Martius) oil reverses testicular alterations caused after cadmium administration. *Biological Trace Element Research*, 2020.

MUNSHI-SOUTH, J.; WILKINSON, G. S. Bats and birds: Exceptional longevity despite high metabolic rates. *Ageing Research Reviews*, v. 9, n. 1, p. 12–19, 2010.

NANTIA, E. A. et al. Parastar insecticide induced changes in reproductive parameters and testicular oxidative stress biomarkers in Wistar male rats. *Toxicology and Industrial Health*, v. 34, n. 7, p. 499–506, 2018.

NCIBI, S. et al. *Opuntia ficus indica* extract protects against chlorpyrifos-induced damage on mice liver. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 797–802, 2008.

OLIVEIRA, A. P. et al. *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 11, p. 2841–2846, 2009.

OLIVEIRA, M. J. et al. Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 148, p. 684–692, 2018.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomedical Papers*, v. 155, n. 2, p. 131–136, 2011.

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, 2017.

PIZZINO, G. et al. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2017, 2017.

RAWAT, A. K. S.; TIWARI, S. S.; SRIVASTAVA, A. Comparative botanical and phytochemical evaluation of medicinally important stem bark of *Ficus* species. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 2, n. SUPPL.1, 2012.

REIS, N. R. et al. Sobre os mamíferos do Brasil. In: REIS, N. R. (Org.). *Mamíferos do Brasil*. 2ed. ed. Londrina: [s.n.], 2011. p. 23–29.

ROSA, D. F. et al. High-fat diet and alcohol intake promotes inflammation and impairs skin wound healing in Wistar rats. *Mediators of Inflammation*, v. 2018, 2018.

RUSSELL, L. D. et al. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Revista Internacional de Andrología*, v. 16, n. 1, 1990.

SAAD, H. BEN et al. Effects of selenium on tebuconazole - induced hepatotoxicity in adult rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 6, n. 6, p. 105–109, 2017.

SABER, T. M.; ABO-ELMAATY, A. M. A.; ABDEL-GHANY, H. M. Curcumin mitigates mancozeb-induced hepatotoxicity and genotoxicity in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 183, n. July, p. 109467, 2019.

SAKR, S. A.; SHALABY, S. Y. Carbendazim-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats: Ameliorative effect of licorice aqueous extract. *Toxicology and Industrial Health*, v. 30, n. 3, p. 259–267, 2014.

SÁNCHEZ-BAYO, F. Impacts of agricultural pesticides on terrestrial ecosystems. *Ecological impacts of toxic chemicals*. USA: Bentham Science Publishers Ltd, 2011. p. 63–87.

SEFI, M. et al. Beneficial role of vanillin, a polyphenolic flavoring agent, on maneb-induced oxidative stress, DNA damage, and liver histological changes in Swiss albino mice. *Human and Experimental Toxicology*, v. 38, n. 6, p. 619–631, 2019.

SELMİ, S. et al. *Lavandula stoechas* essential oils protect against Malathion-induced reproductive disruptions in male mice. *Lipids in Health and Disease*, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2018.

SINGAB, A. N. B. et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of Egyptian moraceous plants against carbon tetrachloride-induced oxidative stress and liver damage in rats. *Pharmaceutical Biology*, v. 48, n. 11, p. 1255–1264, 2010.

SOLOMON, A. et al. Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 20, p. 7717–7723, 2006.

SOLOMON, A. et al. Protection of fibroblasts (NIH-3T3) against oxidative damage by cyanidin-3-rhamnoglucoside Isolated from fig fruits (*Ficus carica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 11, p. 6660–6665, 2010.

SOLTER, P.; LIU, Z.; GUZMAN, R. Decreased hepatic ALT synthesis is an outcome of subchronic microcystin- LR toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 164, n. 2, p. 216–220, 2000.

SOUZA, A. C. F. et al. Arsenic aggravates oxidative stress causing hepatic alterations and inflammation in diabetic rats. *Life Sciences*, v. 209, n. May, p. 472–480,

2018.

STECHELT, C. et al. Insecticide residues in bats along a land use-gradient dominated by cotton cultivation in northern Benin, West Africa. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, p. 8812–8821, 2014.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. CYP51: Is it a good idea? *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 2, p. 539–575, 2015.

SUNTRES, Z. E. Exploring the potential benefit of natural product extracts in paraquat toxicity. *Fitoterapia*, v. 131, n. September, p. 160–167, 2018.

TAXVIG, C. et al. Endocrine-disrupting activities In Vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicological Sciences*, v. 100, n. 2, p. 464–473, 2007.

THOMAS, S. P. Metabolism during flight in two species of bats, *Phyllostomus hastatus* and *Pteropus gouldii*. *Journal of Experimental Biology*, v. 63, n. 1, p. 273–293, 1975.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 851, p. 51–70, 2007.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Assessment of chemical, physico-chemical, techno-functional and antioxidant properties of fig (*Ficus carica* L.) powder co-products. *Industrial Crops and Products*, v. 69, p. 472–479, 2015.

WEIR, M. P.; GIBSON, J. F.; PETERS, T. J. Haemosiderin and tissue damage. *Cell Biochemistry and Function*, v. 2, n. 4, p. 186–194, 1984.

WICKRAMASINGHE, L. P. et al. Bat activity and species richness on organic and conventional farms: Impact of agricultural intensification. *Journal of Applied Ecology*, v. 40, n. 6, p. 984–993, 2003.

YACOE, M. E. et al. Muscle enzyme profile, diet, and flight in South American bats. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 11, n. 2, p. 0–5, 1982.

YANG, J. DI et al. Effects of tebuconazole on cytochrome P450 enzymes, oxidative stress, and endocrine disruption in male rats. *Environmental Toxicology*, v. 33, n. 8, p. 899–907, 2018.

YOUSEF, M. I. Vitamin E modulates reproductive toxicity of pyrethroid lambda-cyhalothrin in male rabbits. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n. 5, p. 1152–1159, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.02.002>>.

ZALLER, J. G.; BRÜHL, C. A. Editorial: Non-target effects of pesticides on organisms inhabiting agroecosystems. *Frontiers in Environmental Science*, v. 7, n. May, p. 1–3, 2019.

ZHANG, C. et al. Molecular mechanisms involved in oxidative stress-associated liver injury induced by chinese herbal medicine: An experimental evidence-based literature review and network pharmacology study. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 9, 2018.

ZHANG, Y. et al. Redox control of the survival of healthy and diseased cells. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 15, n. 11, p. 2867–2902, 2011.

ZHOU, F.; SHEN, Q.; CLARET, F. X. Novel roles of reactive oxygen species in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 94, n. 3, p. 423–429, 2013.