

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**ANTÔNIO MÁRCIO COSTA FERREIRA**

**ESTUDO HISTOMOFÉTRICO SOBRE TOXICIDADE INDUZIDA PELO  
FUNGICIDA TEBUCONAZOL E O EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE *Ficus  
carica* NO O INTESTINO DELGADO DO MORCEGO FRUGÍVORO *Artibeus  
lituratus* (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE)**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2025**

**ANTÔNIO MÁRCIO COSTA FERREIRA**

**ESTUDO HISTORMOFÉTRICO SOBRE TOXICIDADE INDUZIDA PELO  
FUNGICIDA TEBUCONAZOL E O EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE *Ficus  
carica* NO O INTESTINO DELGADO DO MORCEGO FRUGÍVORO *Artibeus  
lituratus* (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE)**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado  
em Ciências Biológicas da Universidade Federal  
de Viçosa como requisito para obtenção do título  
de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Sirlene Souza Rodrigues Sartori

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2025**

**ANTÔNIO MÁRCIO COSTA FERREIRA**

**ESTUDO HISTORMOFÉTRICO SOBRE TOXICIDADE INDUZIDA PELO  
FUNGICIDA TEBUCONAZOL E O EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE *Ficus  
carica* NO O INTESTINO DELGADO DO MORCEGO FRUGÍVORO *Artibeus  
lituratus* (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE)**

Monografia, apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa como requisito para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Sirlene Souza Rodrigues Sartori

APROVADA: 29 de janeiro de 2025.

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ANTONIO MARCIO COSTA FERREIRA  
Data: 03/02/2025 15:21:12-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** SIRLENE SOUZA RODRIGUES SARTORI  
Data: 03/02/2025 21:57:30-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Sirlene Souza Rodrigues Sartori  
(UFV)

Dra. Ana Luiza Fonseca Destro  
(UFV)

Msc. Alex Filipe Ramos de Souza  
(UFV)

**A Deus, minha mãe, meu pai, minha irmã,  
aos meus amigos e ao meu eu de anos atrás,  
que não sabia aonde iria chegar!**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por minha vida, por me dar capacidade e por colocar pessoas tão boas e especiais em meu caminho. Agradeço a minha mãe por toda educação, carinho e amor dedicado a mim e a toda a família. Agradeço ao meu pai por todo o esforço em me manter estudando longe de casa. Agradeço a minha irmã por toda parceria e por sempre torcer por mim e me admirar. Agradeço aos meus amigos, do curso e da PIB Viçosa, que facilitaram minha caminhada por aqui. Não posso deixar de mencionar a academia VilaFit, que se tornou minha segunda casa nesses anos finais, sendo um ambiente onde pude fazer novos amigos e me divertir todas as manhãs.

Por fim, agradeço a minha orientadora, por ter aceitado me ajudar nessa última etapa e por ter me dado oportunidade de aprender mais sobre a importante área da morfologia e da toxicologia. Um agradecimento especial ao meu amigo Alex, que me indicou para a bolsa de iniciação científica e me ensinou várias das técnicas histológicas que utilizei nesse trabalho. Agradeço também ao curso de Ciências Biológicas e a Universidade Federal de Viçosa por toda a estrutura de qualidade oferecida gratuitamente a nós alunos.

“Em um lugar escuro estamos nós. E mais conhecimento ilumina nosso caminho”.

(Mestre Yoda)

## RESUMO

O uso de pesticidas tem crescido no Brasil, consolidando o país como o que mais utiliza esses compostos no mundo em dados absolutos. O tebuconazol é um pesticida utilizado para controlar fungos, considerados pragas agrícolas, e já é conhecido seu efeito danoso no sistema reprodutivo de ratos e morcegos. O extrato de *Ficus carica* possui componentes bioativos antioxidantes e vem sendo utilizado em estudos para compreender seus efeitos frente à toxicidade de contaminantes. O objetivo desse trabalho foi analisar a morfologia do intestino delgado de espécimes de *Artibeus lituratus* para revelar prováveis alterações provocadas pelo tebuconazol e o possível efeito protetor do extrato de *F. carica*. Machos adultos foram capturados em um fragmento de Mata Atlântica na região de Viçosa, MG e mantidos em cativeiro por 4 dias para adaptação, recebendo dieta variada de frutas. Após isso, foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: 1) CTL (controle): morcegos receberam mamão puro; 2) DMSO: morcegos receberam mamão tratado com calda de dimetil sulfoxido (DMSO); 3) TEB: morcegos receberam mamão tratado com calda de Folicur® (tebuconazol) a 0,1%; e 4) TEBFC: morcegos receberam mamão tratado com calda do fungicida a 0,1% e extrato de *Ficus carica* a 20% em uma solução de 1,25% de DMSO (solubilizante do extrato vegetal). Os animais foram expostos por sete dias e, depois, eutanasiados por decapitação. Fragmentos do intestino delgado foram processados para confecção de lâminas histológicas que foram coradas com azul de toluidina para a morfometria dos constituintes da parede intestinal, e com ácido periódico de Schiff conjugado com Alcian blue (PAS/AB) para a identificação e contagem de mucinas. Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis e ao teste post hoc de comparações múltiplas de Dunn. No duodeno, observou-se que a espessura da camada mucosa e a altura das vilosidades foram menores no grupo tratado TEB em relação aos grupos CTL (controle) e DMSO. A profundidade da cripta foi menor no grupo TEBFC comparado com CTL e DMSO e menor no grupo TEB comparado ao grupo CTL. O grupo TEB apresentou redução na quantidade de mucinas totais quando comparado com os grupos CTL e TEBFC. No jejuno, a camada muscular teve aumento de sua espessura no grupo TEB quando comparado com os grupos CTL, DMSO e TEBFC. A cripta sofreu redução no grupo TEBFC quando comparado com os demais. O grupo TEBFC apresentou aumento das mucinas totais quando comparado com os grupos CTL e DMSO. No íleo, a mucosa, as vilosidades e as criptas sofreram redução no grupo DMSO em relação aos demais. A camada muscular também sofreu aumento em todos os grupos comparados com o controle CTL. O grupo TEBFC apresentou

maiores quantidades de mucinas totais que os grupos CLT e DMSO. Todos esses resultados indicam que o tebuconazol causa efeitos adversos em alguns parâmetros da morfologia do intestino delgado, podendo comprometer tanto o trânsito intestinal quanto a absorção de nutrientes, especialmente quando provoca a redução da camada mucosa e o espessamento da camada muscular. O extrato vegetal de *Ficus carica* não teve o efeito protetor esperado na maioria dos parâmetros avaliados e, em alguns deles, somou-se ao tebuconazol na causa de efeitos adversos.

Palavras-chave: morfologia; ecotoxicologia; tubo digestivo

## ABSTRACT

The use of pesticides has been growing in Brazil, consolidating the country as the one that uses the most these compounds in the world in absolute data. Tebuconazole is a pesticide used to control fungi, considered agricultural pests, and its harmful effects on the reproductive system of rats and bats are already known. *Ficus carica* extract has antioxidant bioactive components and has been used in studies to understand its effects on the toxicity of contaminants. The objective of this study was to analyze the morphology of the small intestine of specimens of *Artibeus lituratus* to reveal probable changes caused by tebuconazole and the possible protective effect of *F. carica* extract. Adult males were captured in a fragment of Atlantic Forest in the region of Viçosa-MG, and kept in captivity for 4 days for adaptation, receiving a varied diet of fruits. After that, they were randomly divided into four groups: 1) CTL (control): bats received pure papaya; 2) DMSO: bats received papaya treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) syrup; 3) TEB: bats received papaya treated with 0.1% Folicur® (tebuconazole) solution; and 4) TEBFC: bats received papaya treated with 0.1% fungicide solution and 20% *Ficus carica* extract in a 1.25% DMSO solution (solubilizer of the plant extract). The animals were exposed for seven days and, then, euthanized by decapitation. Fragments of the small intestine were processed to prepare histological slides that were stained with toluidine blue for morphometry of the constituents of the intestine wall, and with periodic acid-Schiff conjugated with Alcian blue (PAS/AB) for identification and counting of mucins. The data obtained were subjected to the Kruskal-Wallis statistical test and Dunn's post hoc multiple comparisons test. In the duodenum, it was observed that the thickness of the mucous layer and the height of the villi were lower in the TEB treated group compared to the CTL (control) and DMSO groups. The crypt depth was lower in the TEBFC group compared to the CTL and DMSO and lower in the TEB group compared to the CTL group. The TEB group showed a reduction in the amount of total mucins when compared to the CTL and TEBFC groups. In the jejunum, the muscular layer had an increase in its thickness in the TEB group when compared to the CTL, DMSO and TEBFC groups. The crypt was reduced in the TEBFC group when compared to the others. The TEBFC group showed an increase in total mucins when compared to the CTL and DMSO groups. In the ileum, the mucosa, villi and crypts were reduced in the DMSO group compared to the others. The muscular layer also increased in all groups compared to the CTL control. The TEBFC group presented higher amounts of total mucins than the CTL and DMSO groups. All these results indicate that tebuconazole causes

adverse effects on some parameters of the morphology of the small intestine, which may compromise both intestinal transit and nutrient absorption, especially when it causes a reduction in the mucosal layer and the thickening of the muscular layer. The plant extract of *Ficus carica* did not have the expected protective effect in most of the parameters evaluated and, in some of them, it added to tebuconazole in causing adverse effects.

Key-words: morphology; ecotoxicology; digestive tube.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
1.1 Pesticidas e o fungicida tebuconazol	11
1.2 Biologia e ecologia dos quirópteros	12
1.3 Morfofisiologia do tubo digestivo de quirópteros	13
1.4 Compostos naturais como atenuantes de toxicidade	13
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
3.1 Coleta e preparação de material	14
3.2 Processamento histológico e morfometria	15
3.3 Análises estatísticas	16
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>16</b>
4.1 Duodeno	17
4.2 Jejuno	17
4.3 Íleo	17
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>23</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>23</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>24</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Pesticidas e o fungicida tebuconazol

Pesticidas são agentes químicos que compõem ativamente produtos que tem o objetivo de controlar pragas que afetam a saúde pública e a produtividade agropecuária (PINTO; JARDIM, 2002). A utilização recorrente de pesticidas causa impactos variados ao meio ambiente e a organismos não-alvo (MANCINI, WOODCOCK; ISAAC, 2019). Ainda, a permanência desses defensivos no ambiente contamina o solo, a água e os alimentos, fazendo com que os animais e os seres humanos fiquem em contato constante com esses compostos (REBELO; CALDAS, 2014).

O uso de pesticidas no Brasil tem crescido ano após ano, consolidando o país como o que mais faz uso dessas substâncias no mundo em dados absolutos, atingindo as marcas de 400.000 toneladas em 2015 e 719.507 toneladas em 2021 (FAOSTAT, 2018 e 2024). De acordo com dados da FAO (Food and Agriculture Organization), em 2021 foram usados no Brasil 3,31kg de agrotóxicos por pessoa; enquanto nos Estados Unidos, segundo maior usuário, foram 1,36kg de agrotóxico por pessoa (FAO, 2021). Nesse mesmo ano, o Ministério de Agricultura aprovou o registro de 562 agrotóxicos, batendo um recorde desde o início da série histórica, que começou no ano 2000.

Dentre as classes de pesticidas, o Tebuconazol (TEB), alvo desse estudo, é classificado como fungicida, sendo utilizado para controlar fungos considerados pragas agrícolas (YANG et al., 2018). O TEB (C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>CIN<sub>3</sub>O) pertence à classe dos fungicidas triazóis e possuem estabilidade química e fotoquímica, baixa biodegradabilidade e podem ser facilmente transportados (KAHLE et al., 2008). É utilizado amplamente em diversas culturas no Brasil, como arroz, cevada, banana, café, cenoura e soja. Possui um modo de ação sistêmico, ou seja, percorre todas as partes da planta (ANVISA, 2010). Quando aplicado, atua inibindo o ergosterol, componente estrutural da membrana plasmática dos fungos, inviabilizando a sobrevivência e reprodução dos mesmos (MENEGOLA et al., 2006).

O TEB é classificado como defensivo de periculosidade classe II, sendo altamente tóxico para organismos aquáticos. Em peixes zebra expostos a doses comerciais por 96h, TEB induziu estresse oxidativo no fígado, apoptose de células hepáticas, genotoxicidade e mutações (LI et al. 2020). Já em ratos também expostos às mesmas doses, observou-se atividade antiandrogênica, alteração no desenvolvimento neurológico, comprometimento do sistema imunológico e maior taxa de aborto (MOSER et al., 2001; TAXVIG et al., 2007; YANG et al.,

2018). Em um estudo com morcegos expostos por 30 dias, TEB teve efeitos adversos nas células de Leydig, prejudicando a reprodução da espécie (MACHADO-NEVES et al., 2018). Em outro estudo, morcegos *Artibeus lituratus* expostos por sete dias ao fungicida tebuconazol apresentaram estresse oxidativo no músculo peitoral, fígado e testículo, histopatologias hepáticas e alterações hormonais (aumento na testosterona) (FREITAS et al., 2021).

## 1.2 Biologia e ecologia dos quirópteros

Os morcegos pertencem à ordem Chiroptera, única ordem de mamíferos voadores. Ocupam uma variedade de nichos alimentares, apresentando significativa importância no equilíbrio de ecossistemas, atuando como polinizadores, dispersores de sementes ou controladores de outras espécies de animais (REIS et al., 2011). No Brasil, são encontradas 181 espécies de morcego, distribuídas em 9 famílias (GARBINO et al., 2020).

Os morcegos insetívoros e frugívoros estão em contato constante com pesticidas que são utilizados largamente na agricultura, principalmente durante o forrageio (ZALLER; BRÜHL, 2019; DE SOUZA et al., 2020), o que pode afetar esses animais tão sensíveis a essa exposição a doses de campo (STECHELT et al., 2014), podendo ocasionar efeitos adversos nos sistemas digestório e reprodutor (FREITAS et al., 2021). Os poucos estudos envolvendo pesticidas e morcegos demonstram que os pesticidas podem afetar o crescimento e a reprodução desses animais (HSIAO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2020; TORQUETTI; GUIMARÃES; SOTO-BLANCO, 2021).

Dentre as espécies de morcegos, *Artibeus lituratus* é o grande morcego frugívoro; pertencente à família Phyllostomidae e possui listras brancas faciais como característica marcante (PEREIRA et al., 2019). Além disso, essa espécie possui uma cor marrom-escura, com a parte ventral do corpo sempre mais clara que a dorsal. Sua folha nasal apresenta a borda inferior da ferradura fusionada medianamente ao lábio. Sua membrana interfemoral é larga e com presença moderada de pelos, tendo uma pelagem mais densa na parte dorsal (RUI et al., 1999). É nativo das Américas, estando presente desde a América do Norte até a América do Sul (REIS et al., 2011). Essa espécie consegue consumir 14 milhões de sementes com potencial de germinação por hectare por dia, contribuindo, assim, para a recuperação de áreas degradadas da Mata Atlântica (MIKICH et al., 2015). Por serem voadores, os morcegos são ótimos dispersores pois conseguem dispersar as sementes a longas distâncias e a maior parte dessas sementes permanecem preservadas durante a digestão. (MIKICH et al., 2015). Isso traz a esses animais uma importância ecológica que traz à tona a necessidade de se entender como os pesticidas

como o tebuconazol podem afetar esses animais e o que pode ser feito para amenizar esses efeitos.

### **1.3 Morfofisiologia do intestino delgado de quirópteros**

O intestino delgado serve para variadas funções. Além da digestão, promove a absorção, osmorregulação e até mesmo proteção. Já é de notório saber que esses animais possuem adaptações em todo o tubo digestivo, apresentando uma relativa redução deste quando comparado com outras ordens de mamíferos (Makanya et al., 2001; Scillitani et al., 2007; Strobel et al., 2015; Aylward et al., 2019; Silva et al., 2020). Essa diminuição do tamanho do tubo e, conseqüentemente, do tempo de digestão, confere uma vantagem ao voo desses animais, otimizando seu gasto energético (Price et al., 2015). Esse padrão comum não significa que outras adaptações a nível de espécie não puderam ocorrer no tempo evolutivo, intimamente relacionadas a grande variedade de dietas que as diferentes espécies de quirópteros possuem (Tedman & Hall, 1985; Price et al., 2015).

O intestino delgado apresenta inúmeras vilosidades de diferentes tamanhos que se projetam no lúmen que, juntamente com as microvilosidades do epitélio, aumentam a área de superfície do tecido disponível para absorção dos nutrientes (Helander & Fändriks, 2014; Maroux et al., 1988; Shifrin et al., 2012). O epitélio possui uma variedade de células, como células caliciformes, células de Paneth, células enteroendócrinas.

As células caliciformes sintetizam e secretam moléculas bioativas, como mucinas, formando uma camada de muco sobre o epitélio (Kim & Ho, 2010). O muco é importante na eliminação do conteúdo intestinal, no transporte de nutrientes e, além disso, protege o tecido de lesões físicas e químicas causadas pela ingestão de alimentos (Dharmani et al., 2009).

### **1.4 Compostos naturais como atenuantes de toxicidade**

Boa parte dos compostos naturais eficazes contra a toxicidade induzida por contaminantes são constituídos por componentes antioxidantes, como os flavonoides, polifenóis, antocianinas, quercetinas, carotenoides e minerais (DEL RÉ; JORGE, 2012). Constituintes da figueira comum (*Ficus carica*), árvore da família Moreacea, nativa da Ásia, possuem compostos bioativos antioxidantes como 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 seus efeitos frente à toxicidade causada por pesticidas e outros contaminantes (KHAN; SULTANA, 2005; MOHAN et al., 2007). Um

recente estudo demonstrou que o extrato de *Ficus carica* atenuou efeitos adversos causados ao fígado de *A. lituratus* expostos ao tebuconazol (FREITAS, et al., 2021)

## 2 OBJETIVOS

Esse estudo teve como objetivo estudar a estrutura morfométrica do intestino delgado de *Artibeus lituratus* para avaliar as alterações provocadas pelo fungicida tebuconazol, bem como estudar o efeito protetor do extrato de *Ficus carica*.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Coleta e preparação de material

A formulação comercial do fungicida Folicur® 200 EC, contendo tebuconazol como ingrediente ativo (200g/L; 21,3% m/v), foi adquirida no Laboratório de Proteção de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), proveniente da empresa Bayer Crop Science Ltda (Rio Grande do Sul, Brasil). A concentração nominal do fungicida tebuconazol utilizado (0,2 mg/mL de ingrediente ativo (a.i)) corresponde à recomendação do fabricante para culturas de frutas.

O material vegetal foi coletado em uma área de Mata Atlântica em Viçosa – MG, sendo depositada uma exsicata no herbário da Universidade Federal de Viçosa (UFV) com o número VIC 31703. O extrato etanólico dos galhos de *Ficus carica* foi obtido no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica da UFV, seguindo o método descrito por Alves et al., 2020. As amostras foram desidratadas em estufa ventilada por aproximadamente 72 horas a 40°C e submetidas a uma extração exaustiva por percolação com etanol 99%. Posteriormente, o solvente foi removido completamente utilizando um evaporador rotativo sob vácuo a 40°C, resultando no extrato etanólico seco, conforme descrito por Alves et al. (2020).

Morcegos machos adultos da espécie *Artibeus lituratus* (n=24) foram capturados em um fragmento de Mata Atlântica na região de Viçosa, Minas Gerais (20° 45' 17" Sul, 42° 52' 57" Oeste). A determinação da idade dos morcegos foi feita com base no grau de ossificação das epífises dos metacarpos e primeiras falanges das asas. Todas as capturas ocorreram durante a estação chuvosa, no período entre outubro de 2018 e março de 2019, utilizando redes de neblina. Após a captura, os morcegos foram identificados com base em uma chave dicotômica (Díaz et al., 2016) e transferidos para o Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa. Posteriormente, foram alojados em um morcegueiro, composto por oito compartimentos individuais construídos com meias paredes de tela de proteção, localizado em uma área de

imersão da Mata Atlântica. Nesse ambiente, os animais foram mantidos em recintos individuais de 1m<sup>3</sup> cada, com apenas um grupo experimental alojado por vez, sujeitos às variações sazonais, de temperatura e de pressão do ambiente externo. Todos os procedimentos realizados durante o estudo seguiram as diretrizes éticas estabelecidas pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA) (registro nº 03/2019) e foram aprovados pelo governo brasileiro (SISBIO, registro nº 67062-2).

Após a captura, os morcegos foram mantidos em cativeiro por um período de 3 a 4 dias para adaptação antes do início do experimento. Durante essa fase de adaptação, os morcegos receberam uma dieta variada de frutas (>200 g por animal), incluindo mamão, banana e figo, e tiveram acesso à água ad libitum. As frutas foram lavadas com água e sabão antes de serem oferecidas para remover impurezas. Após o período de adaptação, os morcegos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: 1) Grupo CTL (controle): morcegos receberam mamão puro; 2) Grupo DMSO: morcegos receberam mamão tratado com calda de dimetil sulfoxido (DMSO) a 1,25%; 3) Grupo TEB: morcegos receberam mamão tratado com calda de Folicur® (nome comercial) a 0,1%; e 4) Grupo TEBFC: morcegos que receberam mamão tratado com calda do fungicida a 0,1% e extrato etanólico de *Ficus carica* a 20% em uma solução de 1,25% de DMSO (usado para solubilizar o extrato vegetal). Todos os animais foram expostos por um período de sete dias. Os mamões foram escolhidos como dieta pois os morcegos aceitam facilmente essa fruta em cativeiro (Amaral et al., 2012). Nos grupos tratados com o fungicida, o Folicur foi diluído em água e pulverizado diariamente sobre toda a casca da fruta de forma homogênea, seguindo a concentração e as instruções de uso recomendadas pelo fabricante, com uma concentração nominal de 0,2 mg/mL (a.i). Os frutos tratados foram suspensos durante a secagem para preservar a camada de pesticida formada na casca. Após a secagem, os frutos foram cortados ao meio, pesados e oferecidos aos animais com a casca voltada para cima, para que o contato dos morcegos fosse direto com o pesticida, simulando as condições encontradas na natureza. Os frutos foram oferecidos todas as noites por volta das 18:00 horas. Água estava disponível ad libitum durante todo o experimento. O consumo alimentar foi monitorado diariamente, oferecendo uma quantidade conhecida de fruta para cada animal (200g), e as sobras foram pesadas no dia seguinte. Após sete dias de exposição, os morcegos foram eutanasiados por decapitação, e em seguida, foram pesados em uma balança de precisão. O trato gastrointestinal foi removido e colocado em solução fixadora de formalina 10%.

### **3.2 Processamento histológico e morfometria**

Fragmentos das regiões cranial (duodeno), média (jejuno) e caudal (íleo) do intestino delgado foram processados para a inclusão em resina glicolmetacrilato. O processamento inclui banhos em série crescente de etanol e posteriormente na resina.

Os fragmentos incluídos em resina foram seccionados em micrótomo rotativo semiautomático para obtenção de cortes semiseriados de 3µm de espessura, com espaçamento de 30µm entre eles. Os cortes foram usados na confecção das lâminas histológicas, sendo 10 cortes em cada lâmina. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina ou azul de toluidina para descrição e morfometria dos constituintes parietais, e com Ácido Periódico de Schiff conjugado com Alcian Blue (PAS/AB) para identificação e quantificação de mucinas neutras (PAS+), ácidas (AB+) e mistas (PAS/AB+).

As lâminas histológicas foram fotografadas usando o microscópio Olympus BX-40 e sistema de captura de imagens, com a objetiva de 4x para as lâminas coradas com hematoxilina e eosina, ou azul de toluidina (5 imagens por lâmina), e objetiva de 40x para as lâminas coradas com PAS/AB (20 imagens por lâmina). As imagens capturadas serão analisadas por meio do software Image Pro-Plus 4.5 ®.

Para a realização da morfometria foram realizadas 12 medições por imagem (n=60 medidas por animal), para os seguintes parâmetros: altura da parede intestinal; altura das camadas mucosa, submucosa e muscular; altura da vilosidade; profundidade de cripta e altura do epitélio.

Para quantificação de mucinas foram utilizadas as imagens (n = 20 por animal) obtidas de cada lâmina de PAS/AB, sendo obtidas as áreas contendo mucinas neutras (coradas em rosa – PAS positivas), ácidas (coradas em azul – AB positivas) e mistas (coradas em roxo – PAS/AB positivas), por meio do método da colorimetria, com os dados expressos em área de mucinas por área de mucosa, em porcentagem.

### **3.3 Análises estatísticas**

Os dados morfométricos foram submetidos primeiramente ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, tendo falhado a esse teste, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05$ ) e ao teste post hoc de análises múltiplas de Dunn. Foi utilizado o software PRISM® para a realização dos testes. Os dados foram representados como média e desvio padrão.

## **4 RESULTADOS**

#### **4.1 Duodeno**

Os resultados histológicos estão ilustrados nas figuras 1 e 2 e os dados morfométricos estão representados nos gráficos 1 e 2.

A espessura da parede e da camada mucosa e o tamanho das vilosidades foram menores no grupo tratado TEB em relação aos grupos CTL (controle) e DMSO. A profundidade da cripta foi menor no grupo TEBFC comparado com CTL e DMSO e no grupo TEB comparado com CTL. Já nas análises histoquímicas das mucinas, os grupos DMSO e TEB apresentaram mais mucinas ácidas que os grupos CTL e TEBFC e o grupo TEB apresentou significativamente menos mucinas ácidas que o grupo DMSO. As mucinas neutras estão em menor quantidade no grupo TEB em relação a todos os outros, e o grupo DMSO apresentou menos mucinas neutras que o grupo CTL. Por fim, as mucinas mistas também foram menores no grupo TEB em relação aos grupos CTL e TEBFC e, da mesma forma, o grupo DMSO apresentou quantidade menor de mucinas mistas que o controle CTL. Quando se avalia as mucinas totais, ou seja, a soma dos diferentes tipos (ácidas, neutras e mistas), tem-se que o grupo TEB apresenta significativamente menos mucinas que os grupos CTL e TEBFC.

#### **4.2 Jejuno**

Os resultados histológicos estão ilustrados nas figuras 1 e 2 e os dados morfométricos estão representados nos gráficos 1 e 2.

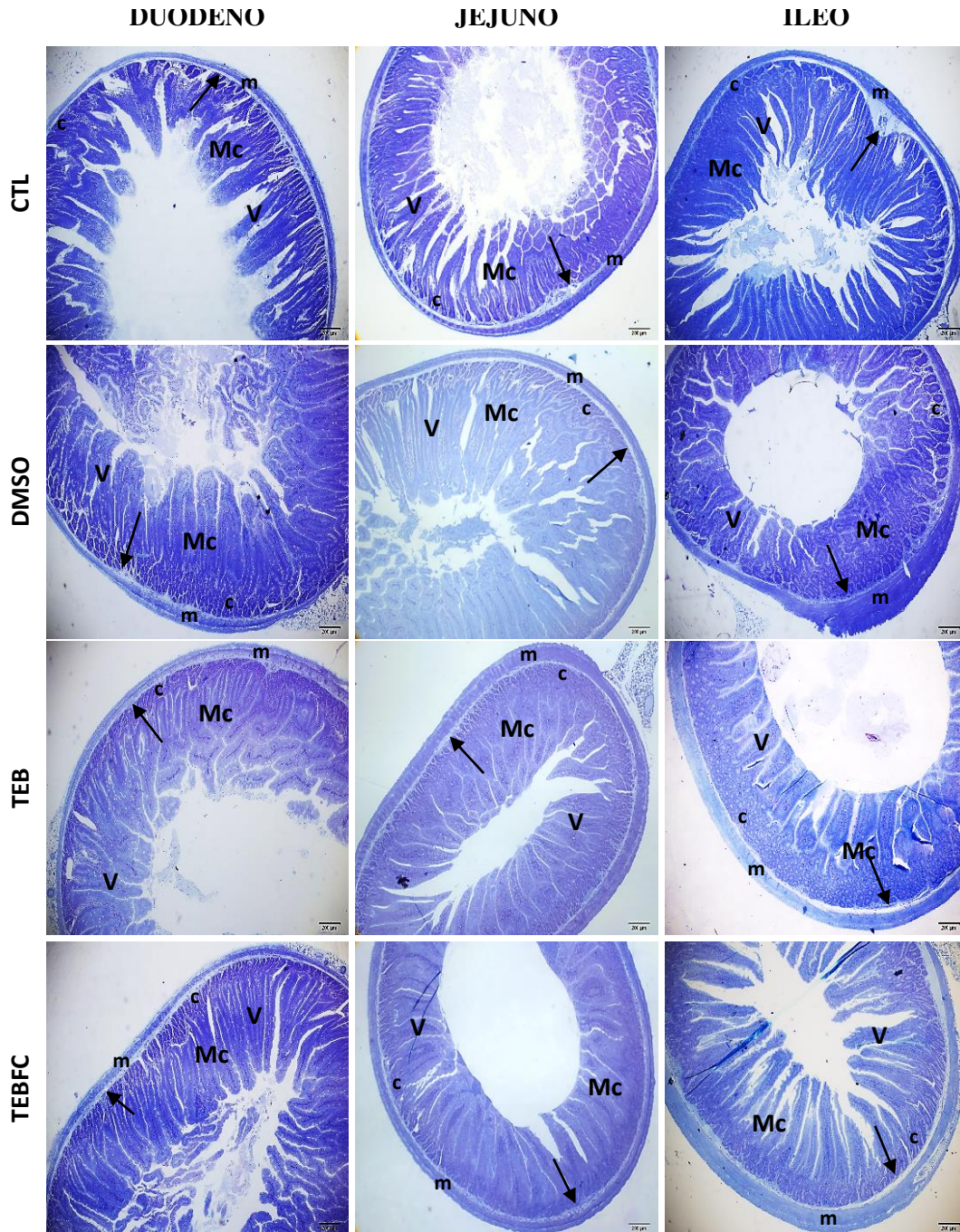
No jejuno, ocorreu a redução da camada mucosa no grupo TEBFC em relação ao grupo TEB e o aumento da camada muscular no grupo TEB em relação aos demais. A camada submucosa foi maior nos grupos TEB e DMSO em relação aos grupos CTL e TEBFC. As criptas ficaram reduzidas no grupo TEBFC em relação aos demais. Já o epitélio foi maior no grupo TEB em relação aos demais. As análises das mucinas apenas mostraram resultados significativos entre as mucinas mistas e na contabilização total. As mucinas mistas foram aumentadas nos grupos TEBFC e TEB em comparação com o grupo DMSO. Na contabilização total, porém, o grupo TEBFC apresentou um número maior de mucinas que os grupos CTL e DMSO.

#### **4.3 Íleo**

Os resultados histológicos estão ilustrados nas figuras 1 e 2 e os dados morfométricos estão representados nos gráficos 1 e 2.

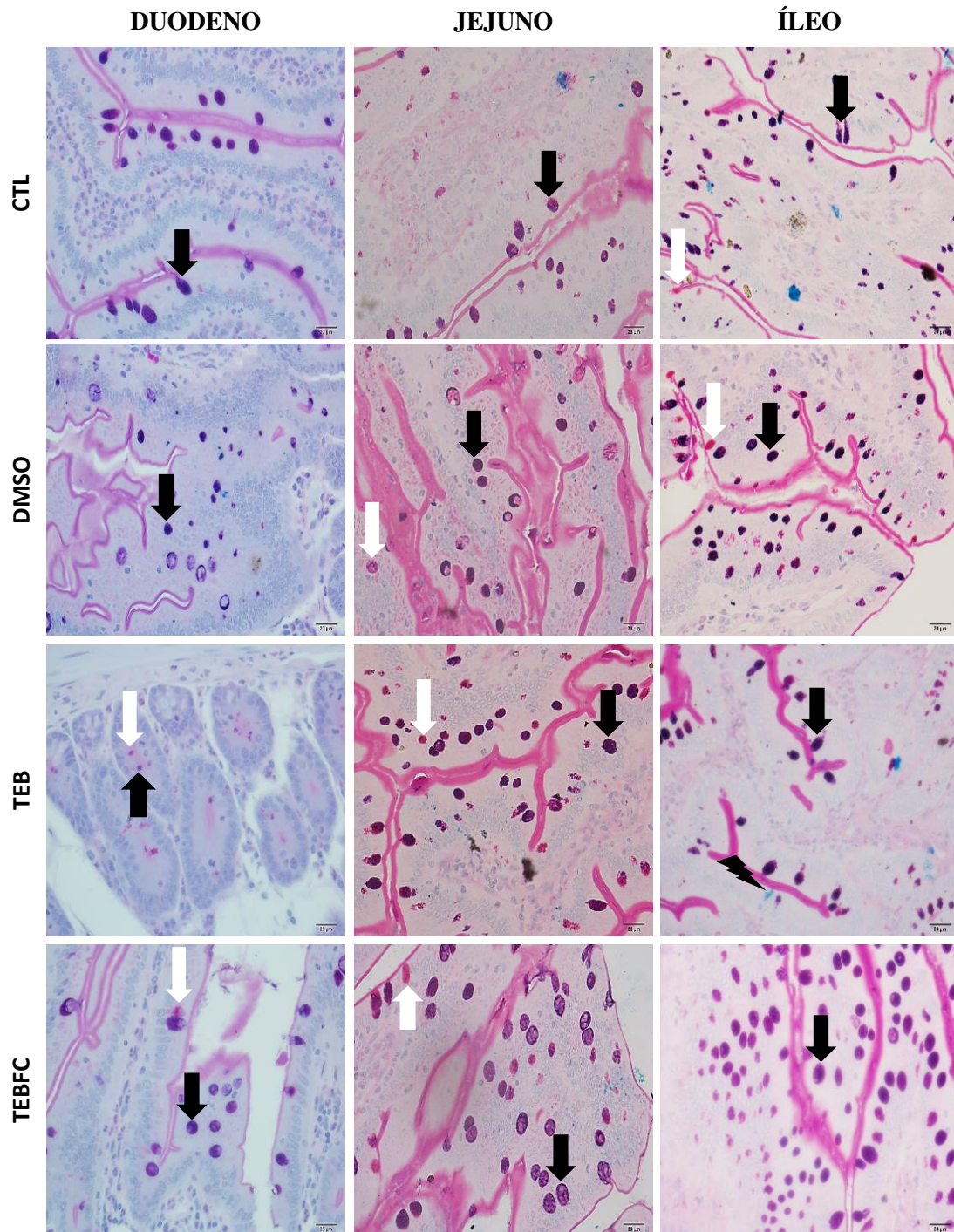
Nesse último segmento do intestino delgado, a camada mucosa diminuiu no grupo DMSO comparados com todos os demais. Em contrapartida, houve um aumento da camada submucosa no grupo DMSO quando comparado com o grupo TEB. A camada muscular segue aumentada e, nessa parte do órgão, o aumento foi observado em todos os grupos em relação ao grupo CTL. As vilosidades ficaram menores no grupo DMSO quando comparadas com os demais grupos. Já a profundidade de cripta foi menor no grupo DMSO quando comparada com os grupos CTL e TEB. O epitélio ficou reduzido nos grupos TEBFC e TEB quando comparados com os grupos CTL e DMSO. Ainda, os grupos DMSO e TEBFC apresentaram menos mucinas ácidas e mais mucinas neutras e mistas que o grupo CTL. Na contabilização total de mucinas, os grupos DMSO e TEBFC apresentaram uma quantidade maior que o grupo CTL. E o grupo TEBFC ainda apresentou mais mucinas que o grupo TEB.

Figura 1 – Imagens histológicas do intestino delgado do morcego *Artibeus lituratus*



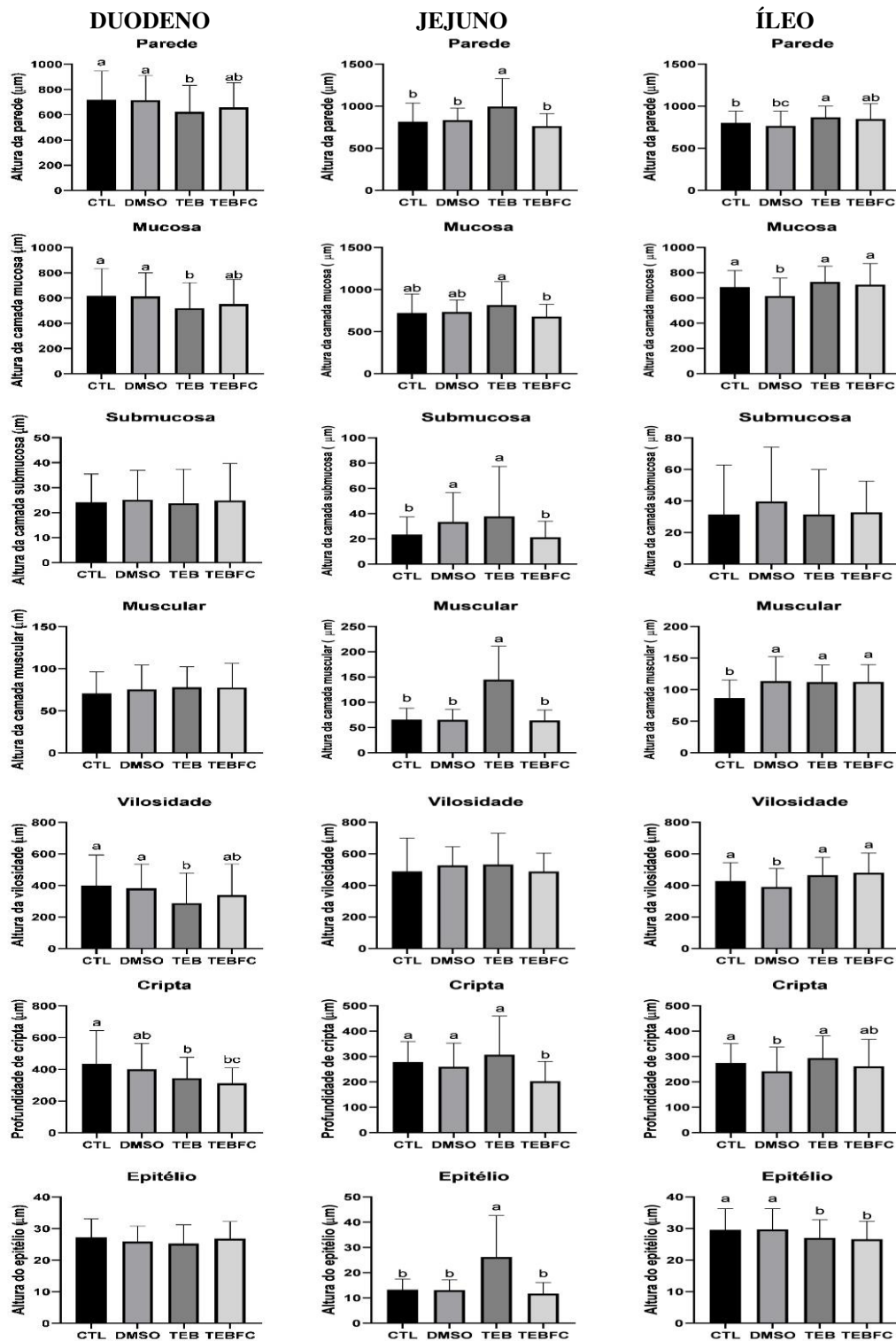
Coloração: azul de toluidina. Mc: camada mucosa; V: vilosidade; m: camada muscular; c: cripta; seta: camada submucosa. Objetiva de 4x; escala: 200µm.

Figura 2 – Imagens histológicas do intestino delgado do morcego *Artibeus lituratus*



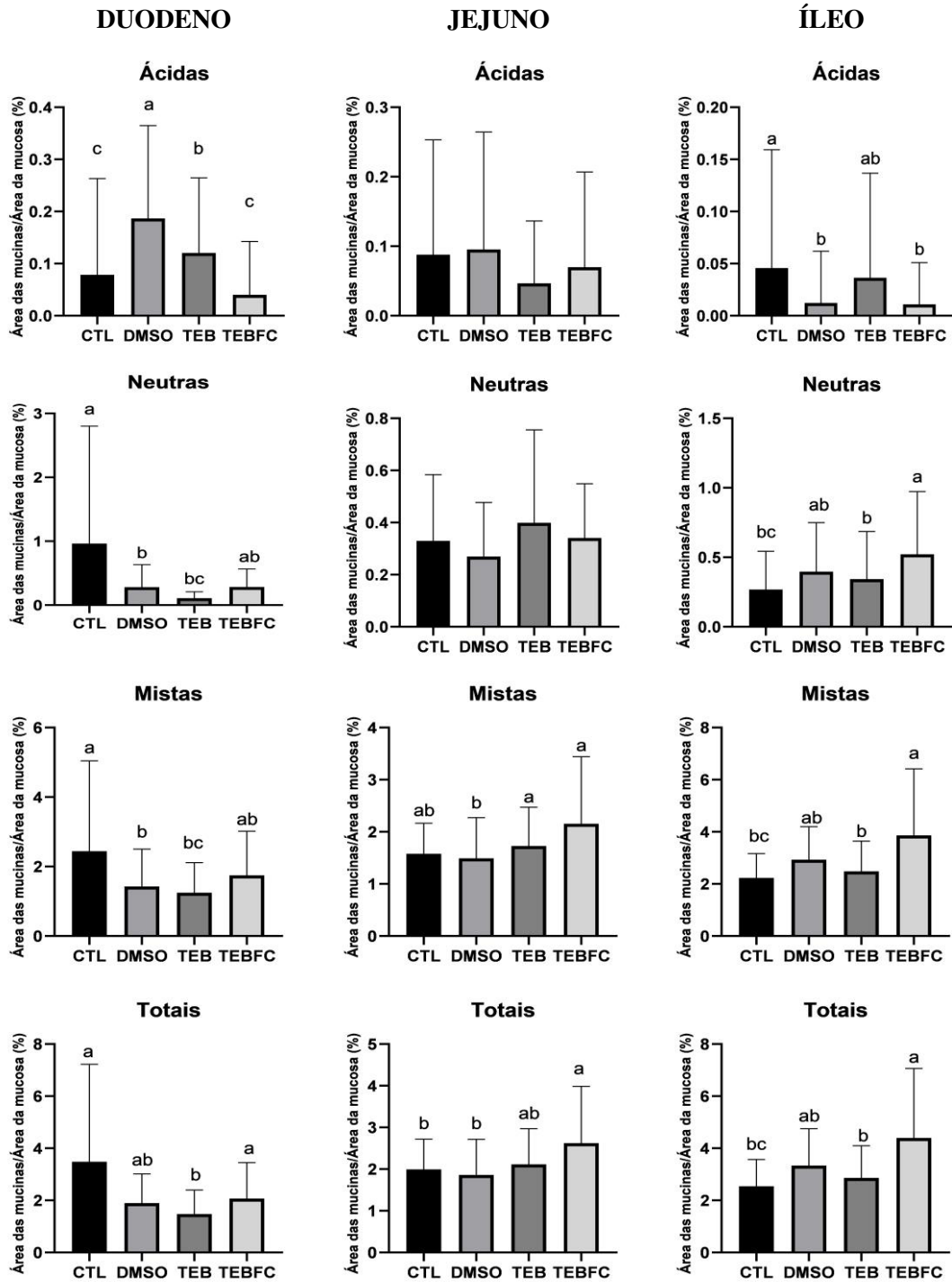
Coloração: Ácido Periódico de Schiff conjugado com Alcian Blue (PAS/AB). Seta preta: mucina mista; seta branca: mucina neutra; raio: mucina ácida. Objetiva de 40x; escala: 20µm.

Gráfico 1 – Parâmetros morfométricos do intestino delgado do morcego *Artibeus lituratus*



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Dunn ( $\alpha=0,05$ ). Dados expressos em média e desvio padrão.

Gráfico 2 – Parâmetros morfométricos do intestino delgado do morcego *Artibeus lituratus*



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Dunn ( $\alpha=0,05$ ). Dados expressos em média e desvio padrão.

## 5 DISCUSSÃO

A redução da camada mucosa e das vilosidades no duodeno observada no grupo tratado com o fungicida e no jejuno observada no grupo tratado com DMSO pode comprometer a absorção de nutrientes nesses segmentos do intestino delgado, além de reduzir a proteção física contra eventuais patógenos (TURNER, 2009). A redução das criptas observada nos grupos TEB e TEBFC no duodeno, no grupo TEBFC no jejuno e no grupo DMSO no íleo podem comprometer a renovação epitelial do intestino e, conseqüentemente, a manutenção de sua capacidade absorptiva (CLEVERS, 2013). Além disso, disfunções provocadas nas células das criptas podem causar neoplasias nesse tecido (BARKER et al., 2009). Um outro resultado que se destacou foi o espessamento da camada muscular observado no grupo tratado com o fungicida no jejuno e no íleo. De acordo com Junqueira e Carneiro (2013), as células do tecido muscular liso têm relevante capacidade mitótica em comparação com as dos tecidos musculares estriados e podem utilizar essa capacidade quando estimuladas. Um estudo com ratos submetidos a processos inflamatórios intestinais por apenas seis dias mostrou que a camada muscular desses animais reagiu apresentando tanto hiperplasia quanto hipertrofia (BLENNERHASSETT et al., 1992). Um trabalho de revisão também evidenciou que a camada muscular não é simplesmente passiva aos processos inflamatórios, podendo, assim, responder ativamente quando estimulada (SHEA-DONOHUE et al., 2012). Dessa forma, o espessamento observado nesse estudo pode estar relacionado a um processo de reação à exposição ao tebuconazol. E esse espessamento acelera o trânsito intestinal, diminuindo o tempo que a camada mucosa fica em contato com os nutrientes a serem absorvidos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

As mucinas totais, menores no grupo tratado com tebuconazol no duodeno, são importantes na produção de muco e sua diminuição pode comprometer a manutenção da homeostase intestinal (OKUMURA, 2018). No jejuno e no íleo observou-se um aumento da quantidade de mucinas no grupo tratado com extrato vegetal. Nesse mesmo grupo e nesses mesmos segmentos, como destacado anteriormente, houve redução das criptas. Pode-se, então, correlacionar esses dois resultados como um sendo efeito compensatório do outro. Visto que, enquanto as criptas são responsáveis pela renovação epitelial do intestino, as mucinas são importantes para a proteção desse mesmo epitélio (CLEVERS, 2013; OKUMURA, 2018).

## 6 CONCLUSÃO

Ao analisar os dados obtidos com esse trabalho pode-se concluir que o fungicida tebuconazol apresenta efeitos adversos na morfologia de todo o intestino delgado, em especial nas camadas mucosa (redução no duodeno) e muscular (aumento no jejuno e no íleo), podendo prejudicar a digestão e absorção de nutrientes. O veículo DMSO, por sua vez, também provocou alterações em alguns parâmetros e se assemelhou ao controle em outros, não se apresentando, então, como um solvente ideal para o extrato vegetal nesses casos. O extrato de *Ficus carica* obteve efeito protetor mais expressivo apenas no jejuno, onde o grupo submetido a esse tratamento teve suas camadas mucosa e muscular semelhantes às do grupo controle. Por outro lado, no duodeno e no jejuno, o extrato provocou uma diminuição das criptas, importantes estruturas no processo digestivo ao mesmo tempo que provocou um aumento nas mucinas. A variação nas mucinas aparentemente ocorreu como reação de efeito compensatório para proteção. Com isso, o efeito protetor do extrato vegetal contra os eventuais danos provocados pelo fungicida se mostrou limitado nesse estudo. Novos estudos são necessários para compreender se os seus benefícios suplantam seus efeitos adversos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AYALA-BERDON, J., & Schondube, J. E. A physiological perspective on nectar-feeding adaptation in phyllostomid bats. *Physiological and Biochemical Zoology*, v. 84, n. 5, p. 458–466, 2011

AYLWARD, M. et al. A comparative morphological and histological study of the gastrointestinal tract of four insectivorous bat species: *Asellia tridens*, *Chaerephon pumilus*, *Nycteris thebaica*, *Rhinopoma hardwickii*. *Journal of Morphology*, v. 280, n. 8, p. 1106–1117, 2019.

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

BARKER et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal câncer. *Nature*, v. 457, p. 608–612, 2009.

BLENNERHASSETT, M. G. et al. Inflammation causes hyperplasia and hypertrophy in smooth muscle of rat small intestine. *Gastrointestinal and liver physiology*, v. 262, n. 6, 1992.

CAVIEDES-Vidal, E., McWhorter, T. J., Lavin, S. R., Chediack, J. G., Tracy, C. R., & Karasov, W. H. The digestive adaptation of flying vertebrates: High intestinal paracellular absorption compensates for smaller guts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 48, p. 19132–19137, 2007

CLEVERS, H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, v. 154, p. 274-284, 2013.

CRAWLEY, S. W., Mooseker, M. S., & Tyska, M. J. Shaping the intestinal brush border. *Journal of Cell Biology*, v. 207, n. 4, p. 441–451, 2014

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.

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

DHARMANI, P., Srivastava, V., Kisson-Singh, V., & Chadee, K. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *Journal of Innate Immunity*, v. 1, n. 2, p. 123–135, 2009.

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

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

FORMAN, G. L. Studies of gastric morphology in North American Chiroptera (Emballonuridae, Noctilionidae, and Phyllostomatidae). *Journal of Mammalogy*, v. 54, n. 4, p. 909-923, 1973.

GADELHA-ALVES, R., Rozensztranch, A. M. D. S., & Barbosa, O. R. (2008). Comparative Intestinal Histomorphology of Five Species of Phyllostomid Bats (Phyllostomidae, Microchiroptera): Ecomorphological Relations with Alimentary Habits / Histomorfometria Comparativa de Intestino de Cinco Especies de Murciélagos Phyllostomideos. *International Journal of Morphology*, v. 26, n. 3, p. 591–602, 2008.

GARBINO, G. S. T. et al. Updated checklist of Brazilian bats: versão 2020. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil - CLMB.

HELANDER, H. F.; Fändriks, L. Surface area of the digestive tract - revisited. *Scandinavian journal of gastroenterology*, v. 49, n. 6, p. 681–689, 2014.

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.

ISHIKAWA, K., Matoba, M., Tanaka, H., & Ono, K. Anatomical study of the intestine of the insect-feeder bat, *Myotis frater kaguae*. *Journal of Anatomy*, v. 142, p. 141-150, 1985.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, ed. 12, 2013.

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.

KIM, Y. S.; Ho, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*, v. 12, n. 5, p. 319–330, 2010.

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

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.

MAKANYA, A. N. et al. Gut morphology and morphometry in the epauletted wahlberg's fruit bat (*Epomophorus wahlbergi*, Sundevall, 1846). *Acta Biologica Hungarica*, v. 52, n. 1, p. 75-89, 2001.

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.

MAROUX, S., Coudrier, E., Feracci, H., Gorvel, J. P., & Louvard, D. Molecular organization of the intestinal brush border. *Biochimie*, v. 70, n. 9, p. 1297–1306, 1988.

MENEGOLA, E. et al. Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphic 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.

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.

OGUNBIYI, O. A. & Okon, E. E. Studies on the digestive enzymes of the african fruit bat *Eidolon helvum* (Kerr). *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, v. 55, n. 4, p. 359–361, 1976.

OKON, E. E. Functional Anatomy of the Alimentary Canal in the Fruit Bat, *Eidolon helvum*, and the Insect Bat, *Tadarida nigeriae*. *Acta Zoologica*, v. 58, n. 2, p. 83–93, 1977.

OKUMURA, R.; TAKEDA, K. Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers. *Inflamm Regen*, v. 38, n. 5, 2018.

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.

OUELLETTE, A. J. Paneth Cells and Innate Immunity in the Crypt. *Gastroenterology*, v. 113, p. 1779–1784, 1997.

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.

PORTER, E. M., Bevins, C. L., Ghosh, D., & Ganz, T. The multifaceted Paneth cell. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 59, n. 1, p. 156–170, 2002.

PRICE, E. R., Brun, A., Caviedes-Vidal, E., & Karasov, W. H. Digestive adaptations of aerial lifestyles. *Physiology*, v. 30, n. 1, p. 69–78, 2015.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. *Química 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.

RODRIGUES, S. S., Fonseca, C. C., & Neves, M. T. D. Células Endócrinas Do Sistema Gastroenteropancreático: Conceitos, distribuição, secreções, ação e controle. *Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR*, v. 8, n. 2, p. 171–180, 2005.

ROUK, C. S.; Glass, B. P. Comparative gastric histology of five north and central American bats. *Journal of Mammalogy*, v. 51, n. 3, p. 455–472, 1970.

RUI, A. M.; FABIÁN, M. E.; MENEGHETI, J. O., Distribuição geográfica e análise morfológica de *Artibeus lituratus* Olfers e de *Artibeus fimbriatus* Gray (Chiroptera, Phyllostomidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.16, n. 2, p. 447-460, 1999.

SCILLITANI, G. et al. Lectin histochemistry of gastrointestinal glycoconjugates in the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber, 1774). *Acta Histochemica*, v. 109, n. 5, p.347-357, 2007.

SHEA-DONOHUE, T. et al. Mechanisms of smooth muscle responses to inflammation. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 24, n. 9, p. 802-811, 2012.

SHIFRIN, D. A., McConnell, R. E., Nambiar, R., Higginbotham, J. N., Coffey, R. J. & Tyska, M. J. Enterocyte microvillus-derived vesicles detoxify bacterial products and regulate epithelial- microbial interactions. *Current Biology*, v. 22, n. 7, p. 627–631, 2012.

SILVA, C. H. S. et al. Comparative study on the small and large intestines of the bats *Artibeus planirostris* and *Diphylla ecaudata*: influence of food habits on morphological parameters. *Acta Chiropterologica*, v. 22, n. 2, p. 435-448, 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.

STROBEL, S. et al. Histological and histochemical analysis of the gastrointestinal tract of the common pipistrelle bat (*Pipistrellus pipistrellus*). *European Journal of Histochemistry: EJH*, v. 59, n. 2, p. 2477, 2015.

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.

TEDMAN, R. A.; Hall, L. S. The morphology of the gastrointestinal tract and food transit time in the fruit bats *Pteropus alecto* and *P. poliocephalus* (Megachiroptera). *Australian Journal of Zoology*, v.33, p. 625-640, 1985.

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.

TURNER, J. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Ver Immunol* v. 9, p. 799-809, 2009.

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.

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.