

JERUSA MARIA DE OLIVEIRA

**EXPOSIÇÃO CRÔNICA A BAIXAS CONCENTRAÇÕES DO INSETICIDA
ENDOSULFAN ALTERA A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE MORCEGOS
FRUGÍVOROS (*Artibeus lituratus*, OLFERS, 1818)**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

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

T

O48e
2013

Oliveira, Jerusa Maria, 1988-

Exposição crônica a baixas concentrações do inseticida
endosulfan altera a capacidade antioxidante de morcegos
frugívoros (*Artibeus lituratus*, Olfers 1818) / Jerusa Maria
Oliveira. – Viçosa, MG, 2013.

x, 80f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Morcego. 2. Stresse oxidativo. 3. Inseticidas.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

II. Título.

CDD 22 ed. 599.4

JERUSA MARIA DE OLIVEIRA

**EXPOSIÇÃO CRÔNICA A BAIXAS CONCENTRAÇÕES DO INSETICIDA
ENDOSULFAN ALTERA A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE MORCEGOS
FRUGÍVOROS (*Artibeus lituratus*, OLFERS, 1818)**

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: 23 de julho de 2013

Eliana de Cássia Pinheiro

Maria do Carmo Gouveia Peluzio

Mariella Bontempo Duca de Freitas
(Orientadora)

A Deus, minha família, amigos e à natureza...

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder fé, saúde persistência, coragem, paciência, tranquilidade e uma família maravilhosa...

À minha família, meus pais Regina e Jurandir e meus irmãos Matheus e Carolina, por acreditarem, investirem e me apoiarem, pelo carinho e amor, e por entender a minha ausência. AMO vocês! Não seria o que sou se não tivesse esse amor...

À família Oliveira, Tios, Tias e Primos pelo incentivo apoio e carinho.

Ao meu Tio Wilmar que tanto me ajudou durante a graduação com os inúmeros financiamentos para fazer o pagamento das mensalidades.

À minha orientadora Prof^a. Mariella B. D. de Freitas por me receber e confiar em mim e na minha capacidade, pela orientação amizade e companheirismo...

A toda a equipe do Laboratório de Ecofisiologia de Morcegos: Ariane Moreno, Diogo Monteiro, Maria Tatiana, Paulo Eder e em especial Ana Carolina, Neriamara Martins e Alessandro Brinati.

À Universidade Federal de Viçosa, juntamente com o programa de Pós-graduação em Biologia Animal pela oportunidade de cursar o mestrado e pela infra-estrutura fornecida para a execução deste trabalho.

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

Ao Laboratório de Bioquímica Nutricional e a Professora Maria do Carmo pela infra-estrutura e reagente concedidos.

Às amigas de república Laís e Iara pelo apoio, amizade, por estar sempre dispostas a ajudar e a ouvir. Por serem verdadeiramente companheiras. Além disso, pelas grandes histórias e aventuras que vivemos juntas durante estes dois anos.

Às amigas que me receberam em Viçosa Natália, Tatiana e Gilda, e principalmente a Graziela Domingues que esteve comigo dès da graduação.

Os amigos Emerson, David, Adriam, Suellem, Lucas e Thales pela amizade e por todos os momentos de descontração...

À Neriamara Martins também pela grande amizade que construímos, pelo companheirismo e carinho.

A todos aos meus amigos que estiveram longe, mas que sempre torceram por mim como a Pricila e a Crislayne.

À Leonora, pela grande amizade e apoio.

A Damiana Rosa e Luciana pelos conselhos na pesquisa, por me ajudar a desvendar os protocolos das análises e pela amizade.

A todos os meus ex-professores no UNILESTEMG, em especial Bianca Cabral e Leonardo Lima.

Ao meu namorado Philipe por todo o amor e carinho, paciência e por me passar tranquilidade e confiança principalmente nos momentos em que estive mais nervosa.

A toda a população de morcegos...

BIOGRAFIA

Jerusa Maria de Oliveira, filha de Jurandir Carmo de Oliveira e Regina Maria de Oliveira, nasceu em Conselheiro Lafaiete em 16 de janeiro de 1988. Em 2009 graduou-se em Ciências Biológicas Licenciatura e em 2010 em Ciências Biológicas Bacharelado no Centro Universitário do Leste de Minas Gerais. Durante toda a graduação participou de várias pesquisas na área de monitoramento de mamíferos e aves, ministrou monitoria de Zoologia de Cordados e Biologia do Desenvolvimento, participou de projeto de extensão, ministrou aula de Ciências em escolas públicas e foi membro do Comitê de Ética em experimentação animal. Em 2011 iniciou o curso de Pós-Graduação em Biologia Animal na Universidade Federal de Viçosa e o concluiu em julho de 2013.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS.....	20
Objetivo Geral.....	20
Objetivos específicos.....	20
REFERÊNCIAS.....	21
CAPÍTULO 1: Repostas antioxidantes do morcego frugívoro <i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818) (Chiroptera: Phyllostomidae) exposto cronicamente a dose comercial do inseticida endosulfan.....	29
Resumo.....	29
1. Introdução.....	31
2. Materiais e Métodos.....	34
2.1 Pesticida.....	34
2.2 Animais e tratamento experimental.....	34
2.3 Análises das enzimas antioxidantes.....	35
2.3.1- Catalase.....	35
2.3.2- Superóxido dismutase.....	35
2.3.3- Proteína total.....	36
2.3.4- Glutathione S-transferase.....	36
2.4 Determinação dos produtos do estresse oxidativo.....	36
2.4.1- Malondialdeído.....	36
2.4.2- Proteínas Carboniladas.....	37

2.5	<i>Determinação da concentração de glutathione</i>	38
2.6	<i>Análise estatística</i>	39
3.	Resultados	40
4.	Discussão	44
5.	Referências	49

CAPÍTULO 2: Alterações nas enzimas Superóxido Dismutase e Catalase em tecidos extra-hepáticos de morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*) expostos a doses comerciais do inseticida endossulfan.....56

	Resumo	56
1.	Introdução	58
2.	Materiais e Métodos	60
2.1	<i>Pesticida</i>	60
2.2	<i>Animais e tratamento experimental</i>	60
2.3	<i>Preparo das amostras</i>	61
2.4	<i>Enzimas antioxidantes</i>	61
2.4.1-	Catalase.....	61
2.4.2-	Superóxido dismutase.....	61
2.4.3-	Glutathione S-transferase.....	62
2.5	<i>Determinação do produto da peroxidação lipídica</i>	62
2.6	<i>Análise Estatística</i>	63
3.	Resultados	64
4.	Discussão	67
5.	Referências	72
	CONCLUSÕES GERAIS	80

RESUMO

OLIVEIRA, Jerusa Maria, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Exposição crônica a baixas concentrações do inseticida endosulfan altera a capacidade antioxidante de morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*, Olfers, 1818).** Orientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas. Coorientadora Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Fatores exógenos como metais pesados, radiação, poluição ambiental e pesticidas induzem o estresse oxidativo em vários tecidos animais. A exposição de morcegos frugívoros a concentrações biologicamente ativas de pesticidas causa bioacúmulo em seus tecidos e pode reduzir suas populações. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações nas enzimas antioxidantes nos tecidos do morcego frugívoro *Artibeus lituratus* exposto cronicamente ao inseticida endosulfan. Morcegos machos (n = 21) foram capturados com redes de neblina em fragmentos de Mata Atlântica em Viçosa- MG e mantidos em gaiolas individuais no morcegário do Museu de Zoologia- UFV. Porções de fruta (mamão) foram imersos em solução de endosulfan (0,00; 1,05 g/L; 2,1 g/L) com espalhante adesivo (0,015g/L) e oferecidos aos animais (n= 7 por grupo). As frutas foram oferecidas durante 35 dias com a casca voltada para cima visando simular a situação enfrentada por morcegos na natureza. Após tratamento foram mensurados os produtos do estresse oxidativo e enzimas antioxidantes em diversos tecidos. No fígado foi avaliada a peroxidação lipídica, proteínas carboniladas e a Glutathione total, e as enzimas antioxidantes: Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD) e Glutathione S-transferase (GST). No tecido nervoso e rim foram avaliados a peroxidação lipídica e as enzimas CAT, SOD e GST, e nos testículos foram avaliadas as enzimas SOD e CAT. Em animais tratados com solução a 2,01 g/L, a atividade hepática das enzimas SOD e CAT diminuiu e a GST aumentou, quando comparados ao grupo controle. A Glutathione não apresentou diferença entre os tratamentos, assim como a peroxidação lipídica e as proteínas carboniladas. Nos rins, a CAT também apresentou declínio em todos os tratamentos, e a SOD sofreu declínio somente nos animais tratados com 1,05 g/L. No tecido nervoso a enzima CAT aumentou e a SOD diminuiu no tratamento End 1,05 g/L quando comparados ao controle. Tanto no tecido nervoso quanto nos rins os animais tratados não apresentaram

alterações na peroxidação lipídica. Nos testículos, SOD e CAT não apresentaram alterações comparadas ao controle. As alterações nas enzimas antioxidantes observadas em morcegos frugívoros *A. lituratus* expostos ao inseticida endosulfan sugerem que estes animais sofreram estresse oxidativo. Os resultados indicam que estes animais são vulneráveis à exposição a doses comerciais do inseticida endosulfan, e que enzimas antioxidantes podem ser utilizadas como biomarcadores de toxicidade ambiental em morcegos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Jerusa Maria, M.Sc., **Universidade Federal de Viçosa, July 2013.**
Chronic exposure to low concentrations of the insecticide endosulfan alters the antioxidant capacity of fruit bats (*Artibeus lituratus*, Olfers, 1818). Adviser: Mariella Bontempo Duca de Freitas. Co-adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Exogenous factors including heavy metals, radiation, environmental pollution, and pesticides can cause oxidative stress. Exposure to toxicants induces tissue bioaccumulation and damage and has been associated with declines in bat populations. The aim of this study was to determine the occurrence of oxidative stress after a chronic exposure to commercial concentrations of the insecticide endosulfan in the tissue of the fruit bat *Artibeus lituratus*. Twenty-one male bats were collected in forest fragments in Viçosa, MG, Brazil, and kept in cages (3 × 3 × 2 m) at the Federal University of Viçosa. Papaya fruits were immersed in endosulfan solution (0.00 g/L, 1.05 g/L, 2.1 g/L) with adhesive spreader (0.015 g/L) and offered to the animals (n = 7 per treatment) for 35 days. After treatment were measured products of oxidative stress and antioxidant enzymes. The activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), as well as total glutathione concentration and the products of oxidative stress - lipid peroxidation and protein carbonyls, were determined in the bats liver. In the brain and kidney were determined the activity of the antioxidant enzymes CAT, SOD, GST, as well as the product of oxidative stress - lipid peroxidation, and in the testes were evaluated SOD and CAT. The liver showed a decrease in SOD, CAT and GST increased in animals that received 2.01 g / L, compared to the control group. Glutathione did not differ between treatments, as well as lipid peroxidation and protein carbonyls. CAT kidney also showed decline in all treatments and SOD has declined only in animals treated with 1.05 g/L. In brain activity, CAT increased and SOD decreased in the treatment End 1.05 g/L. Both in brain as kidney treated animals showed no changes in lipid peroxidation. Activity SOD and CAT testes were similar. The results indicate that the chronic exposure to endosulfan induced oxidative stress in the liver of *A. lituratus*. This result indicates that these animals are vulnerable to exposure to commercial dose of the insecticide Endosulfan, and antioxidant enzymes can be used as biomarkers of toxicity in environmental bats.

INTRODUÇÃO GERAL

Processos metabólicos estimulam a síntese das espécies reativas de oxigênio (EROs) como os radicais livres, as espécies derivadas do oxigênio e as espécies reativas de nitrogênio. As EROs são altamente instáveis e reativas, possuem um ou mais elétrons não emparelhados e a capacidade de combinarem inespecificamente com diversas moléculas causando danos celulares. As EROs incluem, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), a hidroxila ($OH^{\cdot}$), o óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), o dióxido de azoto ($NO_2^{\cdot}$), o peroxil ($ROO^{\cdot}$) e peroxil lipídicos ($LOO^{\cdot}$). As espécies derivadas do oxigênio não apresentam radicais livres e abrangem: o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ozônio (O_3), o oxigênio singlete (1O_2), o ácido hipocloroso ($HOCl$), o ácido nitroso (HNO_2), o peroxinitrito ($ONOO^-$), o trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) e o hidroperóxido lipídico ($LOOH$) (Halliwell, 1992; Hermes-Lima, 2004; Genestra, 2007).

A cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias é a principal fonte de síntese de EROs. O oxigênio advindo da respiração recebe elétrons e é reduzido em água, porém, uma pequena parte deste oxigênio é parcialmente reduzida em radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é altamente tóxico para a célula. Esse radical sofre uma dismutação, mediada pela enzima superóxido dismutase (SOD), produzindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O radical superóxido também reduz o ferro (reação de Haber-Weiss) e facilita a geração de mais EROs (reação de Fenton) como o radical hidroxila, hidroperoxila e o peróxido de hidrogênio (Figura 1). A formação das EROs ocorre em cadeia por diferentes tipos de reação de oxido- redução (Haber-Weiss, Xantina oxidase, oxidação de ácidos graxos em peroxissomos, metabolização de xenobióticos, leucócitos, oxidases, lipoxigenases, etc), que são catalisadas por metais de transição como os íons ferro (Fe^{+2} e Fe^{+3}) e cuprosos (Droge, 2002; Hermes-Lima, 2004).

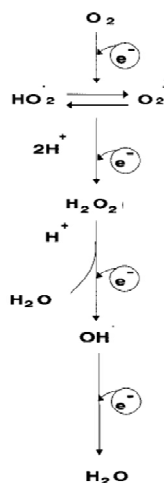


Figura 1- Redução do oxigênio molecular na mitocôndria e formação de várias espécies reativas de oxigênio.

Os organismos vivos possuem mecanismos para manter a homeostase redox através do uso vantajoso dos radicais livres, mesmo estes sendo prejudiciais. Alguns desses mecanismos são: a regulação do tônus vascular, aumento da transdução de sinal de diferentes receptores de membrana, auxílio no controle de relaxamento do músculo liso, inibição da adesão das plaquetas, e aumento da produção do fator de crescimento de células T (Tabela 1) (Droge, 2002).

Mamíferos quando estão em condições patológicas ou de estresse, estimulam a produção das EROs e induzem a formação do estresse oxidativo. O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e o excesso na síntese de EROs alterando a homeostase redox, induzindo a oxidação de lipídios, proteínas e DNA. Estes eventos causam diversas patologias e danos celulares levando até a apoptose celular. Doenças como Alzheimer, Parkinson, diabetes, aterosclerose, anemia, atrasos na

maturidade sexual, artrite reumatóide, envelhecimento entre outras, estão relacionadas com o estresse oxidativo (Droge, 2002, Genestra, 2007; Pham-Huy et al., 2008).

A resposta oxidativa depende da magnitude do estímulo, resultando em adaptação ou lesão celular. Na adaptação, as células podem tolerar o estresse oxidativo, através da auto-regulação da síntese de defesas antioxidantes até restabelecerem o equilíbrio. A lesão é o resultado de estímulos, químicos ou fisiológicos, que alteram transitoriamente ou permanentemente a homeostase celular (Droge, 2002; Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009).

Tabela 1- Importância das funções fisiológicas que envolvem os radicais livres e seus derivados.

Radical	Fonte do radical	Função fisiológica
Oxido Nítrico (NO [•])	Oxido nítrico sintase	Relaxamento do músculo liso (controle do tônus vascular) e de vários outros dependentes das funções da GMPC.
Superóxido (O ₂ ^{•-}) e ROS relacionadas	NAD(P)H oxidase	Controle da ventilação. Controle da produção de eritropoietina. Relaxamento do músculo liso. Sinal de transdução de vários receptores de membrana / aprimoramento de funções imunológicas. Resposta de estresse oxidativo e a manutenção da homeostase redox. Antioxidante (reduz semiquinonas). Sinalizador molecular (oxida grupos - SH)

Fonte: Modificado de Droge, W., 2002. Free Radicals in the Physiological Control of cell function. American Physiological Society 82: 47-95.

A peroxidação lipídica (LPO) é uma das importantes causas de lesão e morte celular desencadeada pelo estresse oxidativo. Ela ocorre através de reações em cadeia, geralmente catalisada por metais de transição. O colapso das membranas plasmáticas, a fluidez, perda da permeabilidade seletiva e até mesmo a sua ruptura são consequências da LPO. Os derivados das reações envolvidas na LPO podem se difundir em outros compartimentos celulares, agredir proteínas e o DNA e causar a inibição de algumas enzimas (Davies, 2000; Hermes-Lima, 2004).

A LPO possui 3 principais fases: iniciação, propagação e terminação. A iniciação ocorre pela abstração de um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) de uma cadeia de ácidos graxos insaturados, formando o radical alquila ($\text{L}\cdot$). O radical $\text{L}\cdot$ se estabiliza por ressonância e origina dieno conjugados. O radical mais importante na fase de iniciação da peroxidação lipídica é o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), mas os radicais peroxinitrito ($\cdot\text{NO}_2$), espécies perferril ($\text{Fe}^{+3}-\text{O}_2^-$) e espécies ferril ($\text{Fe}^{+4}=\text{O}$) também estão envolvidas nas reações. Em seguida, o oxigênio molecular é adicionado ao carbono central do radical $\text{L}\cdot$ e dá origem ao radical peroxila ($\text{LOO}\cdot$). Na propagação o radical $\text{LOO}\cdot$ reage (através da abstração de hidrogênio) com outros ácidos graxos insaturados, resultando em hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Metais de transição como o ferro e o cobre também podem participar do processo catalisando a formação de radicais lipídicos alcóxila, peroxila, e hidroxila. Na fase de terminação, o LOOH irá decompor-se em outras espécies reativas, como o radical alcóxila ($\text{LO}\cdot$), aldeídos (malondialdeído), alcanos e alcoóis (Figura 2) (Davies, 2000; Hermes-Lima, 2004).

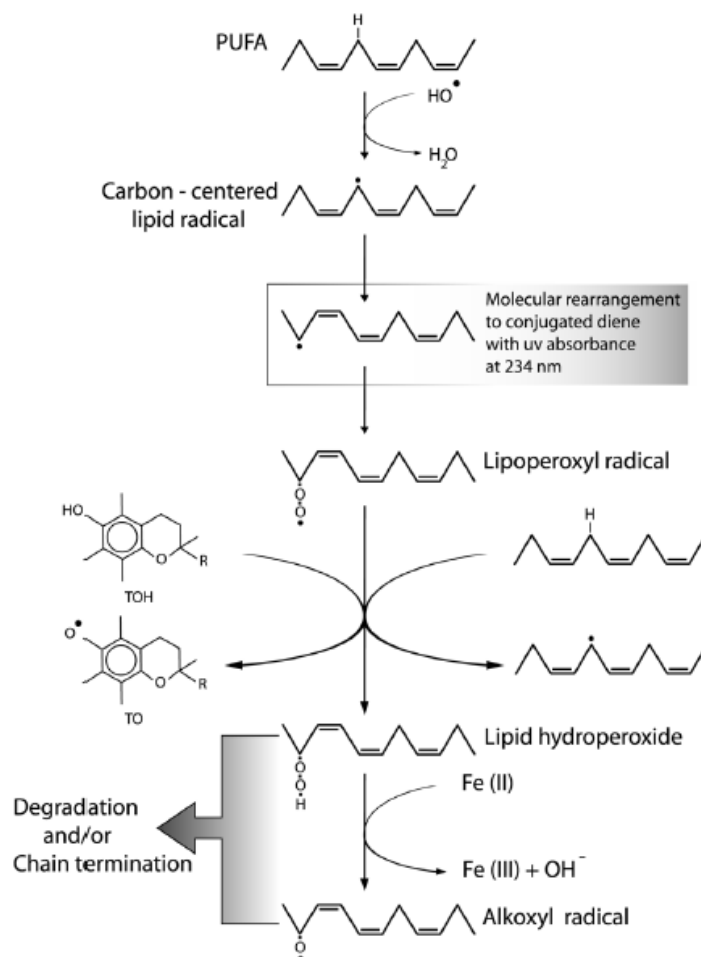


Figura 2- Esquema básico das reações de peroxidação lipídica. Uma molécula de lipídio reage com um agente oxidante ($\bullet\text{OH}$, neste caso), resultando em um radical lipídico com carbono-central. Após a reação com o oxigênio, ele é convertido em um radical lipoperoxyl, que pode reagir (i) com outro ácido graxo poliinsaturado (produzindo uma reação em cadeia, uma vez que um novo lipídio carbono centrado radical é produzido) ou (ii) com α - tocoferol (TOH), que é convertido em tocoferil (TO), em ambos os casos produzindo um hidroperóxido de lipídio. Este último é então convertido a um radical, após reação com o ferro lipídio alcóxido. Hidroperóxidos lipídicos e radicais alcóxil sofrem numerosas rotas de degradação e terminação da cadeia (Fonte: Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen In Biology And Biochemistry: Role Of Free Radicals, in: Functional Metabolism: Regulation and Adaptation).

As proteínas também são alvo de oxidação celular onde sofrem modificação covalente, e possuem poucos mecanismos celulares para repará-las ou protegê-las. Eventos que têm como produtos metabólitos do óxido nítrico, os produtos da peroxidação lipídica, a oxidação de açúcares, a desnaturação, e a glicação não enzimática, acarretam a oxidação de proteínas (Davies, 2000; Hermes-Lima, 2004).

A oxidação de proteínas pode ocorrer por inúmeros mecanismos, e todos os aminoácidos podem ter suas cadeias laterais modificadas pela oxidação. Um destes mecanismos é a inativação das mesmas causadas pelo radical superóxido, que reduz o Fe^{+3} e libera íons ferrosos. Outro mecanismo de oxidação é induzido por radicais hidroxilas advindos da irradiação, e têm a capacidade de oxidar todos os resíduos de aminoácidos de proteínas. Ademais as EROs induzem a clivagem das ligações peptídicas de derivados glutamina, aspartil e resíduos de prolina (Schacter, 2000; Hermes-Lima, 2004). Entre todos os mecanismos de oxidação de proteínas o mais importante é o mediado por íons ferro e cobre, este induz danos nos receptores de membrana, inibição de enzimas e modificações nas proteínas estruturais (Schacter, 2000; Hermes-Lima, 2004).

O ataque das EROs ou a reação entre aldeídos (formados na peroxidação lipídica) e proteínas, são mecanismos indiretos da oxidação de proteínas e produzem derivados carbonil. Este produto da oxidação de proteína é irreversível, sendo considerado o mais importante do ataque de radicais livres em proteínas, e é considerado um biomarcador de estresse oxidativo. O aumento de proteínas carboniladas resulta em várias proteínas disfuncionais e envolve diversas doenças (Schacter, 2000; Hermes-Lima, 2004; Cai e Yan, 2013).

O sistema de defesa antioxidante (enzimático ou não enzimático) é um processo de sinalização redox (Droge, 2002), que vai inibir o estresse oxidativo e limitar o excesso da síntese de EROs. Entre as defesas enzimáticas tem-se a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT), a Glutathione S-transferase (GST), a Glutathione Peroxidase (GPx), a Glutathione reduzida (GSH), Glutathione Redutase (GR) e a Glicose-6- fosfatase deidrogenase (G₆PDH). Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas temos o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E) e a Glutathione total (GSH-eq). A primeira linha de defesa antioxidante ocorre pelo sistema citocromo P450 e inclui as enzimas SOD e CAT. Na segunda fase as enzimas catalisam a conjugação de xenobióticos para um substrato solúvel endógeno, e inclui as enzimas específica GPx, a GST, e a GR (Figura 3) (Sheehan et al., 2001; Hermes-Lima, 2004).

A SOD catalisa o radical superóxido, através da reação de dismutação, em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é mais reativo e pode ser degradado por outras enzimas como a CAT e a GPx. Existem três tipos de enzimas SOD, a SOD-Cobre/Zinco encontrada no citoplasma, lisossomas, peroxissomas, núcleos, e no espaço inter-membranar mitocondrial. A SOD-Manganês é encontrada somente nas mitocôndrias e tem um papel de controle do estresse oxidativo e na regulação da concentração de O₂⁻ nas mitocôndrias. Outro tipo de SOD é a SOD-EC (superóxido dismutase extracelular) que é uma glicoproteína que está presente no espaço extracelular especialmente nas células dos vasos pulmonares e no sangue. Todas as formas da enzima SOD estão presentes em todos os tecidos, porém em pequenas concentrações no tecido nervoso (Hermes-Lima, 2004; Droge, 2002; Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009).

A CAT é uma peroxidase que tem papel de degradar o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Esta enzima é encontrada no citosol em grande concentração nos peroxissomos de todos os tecidos animais, porém é mais eficiente quando as concentrações intracelulares de H_2O_2 são mais elevadas. O cérebro, coração e pulmão não possuem peroxissomos, por isso apresentam baixa concentração de CAT sendo mais sensíveis a danos oxidativos (Hermes-Lima, 2004; Droge, 2002).

Assim como a CAT, a GPx catalisa o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e também hidroperóxidos orgânicos como os ácidos graxos hidroperóxido (LOOH). Porém, diferentemente da CAT, a GPx remove o H_2O_2 através de um acoplamento com GSH em sua forma reduzida. Esta enzima está presente no citoplasma e na matriz mitocondrial. Órgãos com alta taxa metabólica como o fígado, rim e intestino possuem alta atividade da GPx, já o cérebro possui baixos níveis da enzima (Hermes-Lima 2004; Droge, 2002; Limón-Pacheco e Gonshebbatt, 2009).

A superfamília da enzima GST é a principal enzima de desintoxicação de segunda fase da defesa antioxidante. É encontrada principalmente no citoplasma de todos os tecidos. Essa enzima realiza a desintoxicação celular contra substratos exógenos como os medicamentos, produtos intermediários industriais, pesticidas, herbicidas, poluentes ambientais e agentes cancerígenos. Esta desintoxicação ocorre através de conjugados de glutathione com xenobióticos e produtos aldeídos produzidos na peroxidação lipídica (hidroperóxidos) tornando os produtos mais solúveis em água (Hermes-Lima, 2004; Hayes, 2005; Limón-Pacheco e Gonshebbatt, 2009).

A GR impede a formação de radical hidroxila, que é altamente citotóxico e reduz uma molécula de glutathione oxidada (GSSG) em duas moléculas de glutathione reduzida (GSH). Para realizar essa redução a GR utiliza a nicotinamida-

adeninadinucleotídio em sua forma reduzida (NADPH), transformando-a em sua forma oxidada (NADP⁺). A NADPH é obtida através da redução de sua forma oxidada (NADP⁺) pela G6PDH, que converte glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconato (Kidd, 1997; Droge, 2002; Hermes-Lima, 2004; Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009).

A GSH é um tripeptídeo tiol encontrado no citoplasma, núcleo e mitocôndrias das células de todos os tecidos de mamífero, sendo outra linha de defesa antioxidante. Ela ajuda a prevenir a formação de peroxinitrito (espécie reativa de nitrogênio), regenera a vitamina E ao reduzir o radical tocoferil em tocoferol e previne a oxidação de proteínas. Além disso, a GSH é co-substrato da GPx e da GST, participa da redução das ligações dissulfeto de proteínas e no transporte de aminoácidos. O fígado possui a maior concentração de GSH, enquanto o coração, plasma e rins possuem baixas concentrações. A diminuição da GSH dispara os mecanismos celulares de apoptose (Kidd, 1997; Hermes-Lima, 2004; Rahman, 2007; Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009).

A síntese da GSH ocorre através da gama-glutamilcisteína sintetase e da GSH sintetase, sendo a forma reduzida (GSH) a mais encontrada nas células do que a forma oxidada (GSSG). A GSSG é acumulada dentro das células e a razão GSH / GSSG é uma boa medida do estresse, o aumento dessa razão está relacionada com o aumento da produção de hidroperóxidos (Kidd, 1997; Hermes-Lima, 2004; Rahman, 2007; Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009).

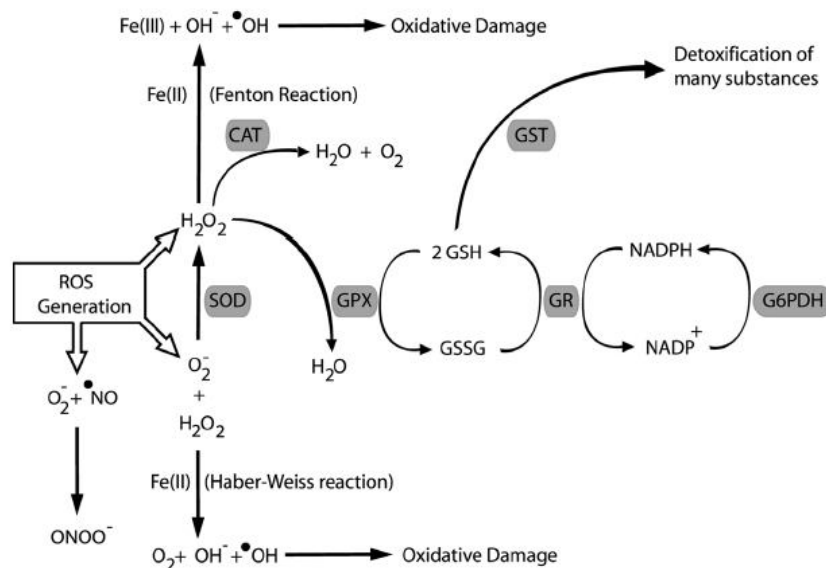


Figura 3- Defesas antioxidantes trabalham em conjunto para proteger as células contra as espécies reativas de oxigênio (Fonte: Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen In Biology And Biochemistry: Role Of Free Radicals, in: Functional Metabolism: Regulation and Adaptation).

As vitaminas E (α -tocoferol), C (ácido ascórbico), e os carotenóides são antioxidantes não-enzimáticos capazes de manter a capacidade antioxidante do corpo sinergicamente (Abdollahi et al., 2004). Todos os oito isômeros da vitamina E, são solúveis em lipídio e evitam a propagação da peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas. O composto α -tocoferol está mais presente nas membranas celulares e no plasma como lipoproteína. A vitamina C é solúvel em água e sintetizada a partir do metabolismo da glicose, porém várias espécies de mamíferos como as cobaias, primatas e morcegos não possuem a capacidade de sintetizar essa vitamina (Cui et al., 2011; Hermes-Lima, 2004). Essas vitaminas têm a capacidade de inibir a peroxidação lipídica, e eliminar alguns radicais livres como o oxigênio singlete e o ozônio (Hermes-Lima, 2004).

O fígado e o tecido adiposo são os principais locais de armazenamento de carotenóides. Os carotenóides são encontrados em vegetais amarelos e verdes, peixes, ovos e carnes e realizam a eliminação de radicais de oxigênio por três vias principais: transferência de elétron, captação de hidrogênio e adição de uma espécie de radical. Alguns carotenóides, como o β -caroteno estão associados a proteínas ou lipoproteínas, e podem funcionar sinergicamente com α -tocoferol e vitamina C formando uma barreira contra a oxidação (Hermes-Lima, 2004).

Os efeitos protetores das vitaminas contra o estresse oxidativo são conhecidos, tendo reduzido a concentração das proteínas carboniladas e da peroxidação lipídica em camundongos tratados com vitamina E após 14 dias de exposição ao inseticida organofosforado diazationon (El-Shenawy et al., 2010). Alguns coelhos expostos ao inseticida endosulfan e suplementados com vitamina C apresentaram menor acúmulo do inseticida e proteção do tecido contra danos histopatológicos (Mor e Ozmen 2010). Na maioria dos mamíferos existe uma relação inversa entre a peroxidação lipídica e os níveis de vitaminas α -tocoferol (vitamina E) e de carotenóides como o β -caroteno (carotenóide presentes em frutos) em seus tecidos, quando altas concentrações dessas vitaminas são encontradas, os níveis de LPO estão reduzidos (Filho et al., 2007).

Fatores endógenos, como a ativação das células imunes, infecção e câncer ou fatores exógenos como exposição a metais pesados, poluição ambiental, radiação e exposição a pesticidas induzem a produção excessiva de EROs e originam o estresse oxidativo (Figura 4) (Abdollahi et al., 2004; Valko et al., 2007; Limón-Pacheco & Gonsebatt 2009). Por isso a capacidade antioxidante tem sido utilizada como biomarcador de toxicidade por contaminantes ambientais em diversos animais (Zhang et

al., 2005; Amin & Hashem 2012; Oruc 2012), mas ainda é muito pouco conhecida em morcegos.

Os pesticidas são a primeira classe de químicos que causam diversos danos nos sistemas biológicos como a indução ao estresse oxidativo em mamíferos, e ainda são utilizados extensivamente e lançados no meio ambiente (Abdollahi et al., 2004), principalmente no Brasil.

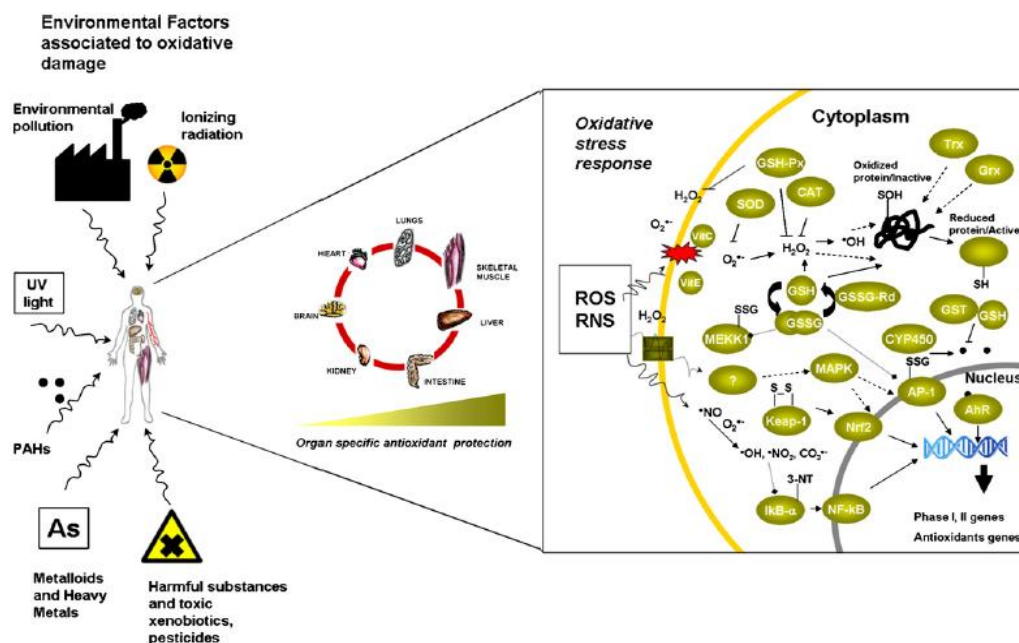


Figura 4- Fatores associados a danos oxidativos. (Fonte: J. Limón-Pacheco, M.E. Gonshebat. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 674: 137-147).

O consumo estimado de pesticidas no Brasil em 2011 foi de US\$ 8,5 bilhões, 16,3% a mais que o ano de 2010 (Sindag, 2012). O país é considerado o maior consumidor de pesticidas no mundo e o oitavo por área cultivada (Rebello et al., 2010). Pesticidas, extensivamente utilizados na agricultura, embora proporcionem incrementos na produção de alimentos, causam prejuízos severos tanto à saúde pública quanto ao

meio ambiente. Ademais, podem alcançar estuários e corpos d'água e são potencialmente tóxicos a animais silvestres, (El-Shenawy, 2010; Androustopoulos et al., 2012) em especial para morcegos.

O acaricida e inseticida organoclorado endosulfan [1,2,3,4,7,7a-hexaclorobiciclo(2,2,1)heptene2,5,6,bis (methylene)sulfide], é tóxico e um poluente orgânico persistente (POPs), e ainda muito utilizado em diversas culturas no Brasil como mamão, laranja e morango (ANVISA, 2010). O endosulfan e outros organoclorados são compostos de carbono, hidrogênio e muitos átomos de cloro por molécula. O mecanismo de ação deste inseticida está ligado ao bloqueio da ação no Neurotransmissor GABA do Sistema Nervoso Central (SNC), impedindo o influxo de cloro e, portanto a repolarização celular, causando hiperexcitabilidade do SNC.

O inseticida endosulfan é rapidamente absorvido pelo intestino, entrando facilmente na circulação. Ele é metabolizado em animais por oxidação e hidrólise, gerando sulfato, diol, hidroxí-éter, lactona, éter, ácido carboxílico hidroxí-endosulfan. Em seguida, os compostos são distribuídos pelo corpo acumulando-se em vários tecidos como placenta, leite, cordão umbilical, sangue, músculos, fígado e tecido adiposo (Mrema et al., 2013).

No fígado, o inseticida é biotransformado pelo sistema enzimático da Citocromo P450, produzindo radicais livres altamente reativos e reduzindo a capacidade antioxidante dos tecidos. Seus derivados alteram a homeostase celular e causam a apoptose celular, gerada pela diminuição da capacidade antioxidante e pelo acúmulo de EROs como o $O^{\cdot -}$, $HO^{\cdot}$, $NO^{\cdot}$ (El-Shenawy, 2010; Karami-Mohajeri e Abdollahi, 2011; Mrema et al., 2013).

Este inseticida está presente em águas de superfície e na biota marinha de diferentes regiões do Ártico, bioacumulado no zooplâncton, peixes e mamíferos marinhos e terrestres (Singh et al., 2008; Weber et al., 2010). As consequências do bioacúmulo desse inseticida nos tecidos animais são inúmeras, uma delas é a indução da formação de câncer, desequilíbrio nas funções endócrinas, citotoxicidade e neurotoxicidade. Além disso, leva atrasos na maturidade sexual de machos, redução das células testiculares, anormalidades no conteúdo espermático e distúrbios metabólicos (Saiyed et al., 2003; Cerrilo et al., 2005; Caride et al., 2010; Mrema et al., 2013).

Morcegos (Ordem Chiroptera) são vulneráveis a alterações de habitat como mudanças climáticas (Sherwin et al., 2012), perturbações em seu local de descanso (Lewis, 1995) e exposição a pesticidas (Stahlschmidt e Bruhl 2012). O bioacúmulo de inseticidas em seus tecidos tem sido associado ao declínio de populações, como observado para as espécies insetívoras *Pipistrellus pipistrellus* (Gerell e Lundberg, 1993) e *Tadarida brasiliensis* (Clark Jr., 2001). O bioacúmulo de pesticidas organoclorados também já foi registrado em diversos morcegos insetívoros como as espécies *Miniopterus schreibersi*, *Pipistrellus pipistrellus* e *Rhinolophus ferrumequinum* (Fernandez et al., 1993), *Myotis leibii*, *Myotis lucifugus* (Kannan et al., 2010), *Myotis septentrionalis* e *Pipistrellus subflavus* (Clark et al., 1983).

Quando exposto a pesticidas, morcegos apresentam diversas alterações fisiológicas como à diminuição da taxa metabólica basal observada no insetívoro *Pipistrellus pipistrellus* após exposição a doses subletais de lindano, um pesticida organoclorado (Swanepoel et al., 1999). Morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* quando expostos cronicamente a doses comerciais do inseticida endosulfan, apresentaram bioacúmulo nos tecidos adiposo e hepático (Brinati, 2011). Neste mesmo

estudo, animais expostos apresentaram diminuição das reservas de proteínas nos membros anteriores, aumento das reservas lipídicas totais no tecido hepático e diminuição dos ácidos graxos totais da carcaça (Brinati, 2011). Além destes efeitos nas reservas energéticas, estudos de outros autores do mesmo grupo de pesquisa também reportaram alterações histopatológicas no tecido hepático do morcego frugívoro *Artibeus* após tratamento com o bioinseticida espinosina (Amaral et al., 2012a) e alterações nas reservas energéticas após exposição ao inseticida fention (Amaral et al., 2012b).

A ordem Chiroptera é considerada como a segunda maior ordem em número de espécie dentre a classe Mammalia, representando 25% das espécies de mamíferos existentes (Altringham, 1996). O nome Chiroptera origina-se do grego onde *cheir* significa mão e *pteron* asa (Nowak, 1994; Altringham, 1996). No mundo são registradas 18 famílias, 202 gêneros e aproximadamente 1120 espécies, divididas em duas subordens Microchiroptera (encontrado no mundo todo) e Megachiroptera (exclusiva do velho mundo) (Simmons, 2005). Esse grupo possui características adaptativas únicas, voo verdadeiro e a ecolocalização, que permite a comunicação entre os indivíduos e auxilia na orientação durante o forrageio (Reis et al., 2007).

Os Microchiroptera (17 famílias, 157 gêneros 928 espécies) são altamente diversos e apresentam grande variedade de hábitos alimentares. Nesta subordem encontram-se os hematófagos, frugívoros, insetívoros, piscívoros, polinívoros e onívoros. O grupo pode ser encontrado em vários abrigos, como cascas de árvores, grutas, cavernas, casas abandonadas, galhos de árvores e minas (Reis et al., 2007). No Brasil são encontradas, aproximadamente, 167 espécies distribuídas em 9 famílias. A família Phyllostomidae é endêmica do continente americano e uma das mais abundantes

do Brasil (Reis et al., 2007). Essa família é dividida em subfamílias, sendo a mais abundante a Sternodermatinae com 67 espécies descritas (Simmons, 2005), tais como os morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* objeto do presente estudo, *Carollia perpicillata*, *Sturnira lilium* e *Tonatia bidens*.

A ordem Chiroptera apresenta grande relevância para o equilíbrio dos ecossistemas, principalmente por realizarem a dispersão de sementes e a polinização de plantas, contribuindo para o reflorestamento e conservação das florestas tropicais (Mikich et al., 2003; Mikich e Bianconi, 2005; Sato et al., 2008). Estima-se que 44 famílias de plantas brasileiras têm suas sementes dispersas por morcegos (Fabian et al. 2008). Além disso, podem controlar insetos, incluindo vetores de doenças como dengue, leishmaniose e malária (Fabian et al. 2008; Sato et al. 2008) e também controlam as populações de espécies pragas para a agricultura (Boyles et al., 2011). Essas características mostram a importância dos morcegos para o equilíbrio dos ecossistemas, onde também podem ser considerados como bioindicadores de áreas degradadas (Jones et al., 2009).

Nas florestas tropicais, 25% das espécies de árvores possuem sua dispersão realizada por morcegos frugívoros (chiropterocoria) (Humphrey et al., 1983). Diante disso, a frugivoria contribui diretamente para a dinâmica populacional de vegetais e regeneração de fragmentos florestais (Trevelin et al., 2013). Isso é possível, pois, a passagem da semente no trato digestivo do morcego é rápida e promove mobilidade (Sato et al., 2008). Além disso, existe co-evolução animal-planta entre morcegos frugívoros e algumas árvores, como as do gênero *Cecropia* (Charles-Dominique, 1986, 1993; Lobova et al., 2003). Essas são árvores pioneiras, importantes para estágio inicial

de sucessão ecológica após distúrbio em fragmentos de mata. As árvores são de grande porte, com crescimento rápido e resistência a grande incidência de luz pode estabilizar o solo, sombrear o chão e acrescentar nutrientes, facilitando o crescimento de plantas de estágio tardio (Townsend et al., 2006).

Morcegos frugívoros podem, inclusive, ser utilizados como estratégias de regeneração natural em ambientes degradados ou em comunidades rurais que apresentam déficit de cobertura florestal. Mickich e Bianconi (2005) propuseram a utilização de óleos essenciais em matrizes, como áreas cultivadas que cerca remanescentes florestais como estratégia para aumentar a atividade de algumas espécies de morcegos frugívoros em pontos particulares e incrementar a chuva de sementes.

A espécie *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) é encontrada com abundância em todo o continente americano, sendo uma das mais conhecidas do Brasil (Reis et al., 2007), e seu estado de conservação é pouco preocupante de acordo com IUCN, 2013. Essa espécie pode ser encontrada em copas das árvores e em ambientes conservados e urbanos (Bianconi et al., 2004). A frugivoria é seu hábito alimentar predominante, podendo ingerir mamão, manga, banana e figos (Nowak, 1994, Passos e Graciolli, 2004). Ao se alimentarem dos frutos, a espécie retira a polpa, flores e frutos inteiros e parece possuir preferência pelos gêneros *Ficus*, *Cecropia*, *Solomonum*, *Piperaceae*, *Syagrus* e *Terminalia* (Passos e Graciolli, 2004). Esse gênero possui o hábito de levar os frutos para o seu local de descanso o que os torna, tornando-os excelentes dispersores de sementes (Medellin e Gaona, 1999; Trevelin et al., 2013), principalmente porque podem percorrer, no mínimo 500 metros, de distância por noite (Menezes et al., 2008).

Os indivíduos dessa espécie são reconhecidos por apresentarem coloração marrom-chocolate acinzentado ou enegrecido, com alguns pêlos prateados, que são

curtos e macios e de textura aveludada. São animais de grande porte com aproximadamente 75 cm de antebraço e pesando entre 44 e 87 gramas. A espécie possui duas listas claras faciais conspícuas, folha nasal mediana em forma de lança na extremidade do focinho, não possui cauda, e sua membrana interfemural é profundamente recortada até a altura de mais da metade da tíbia (Nowak, 1994; Reis et al., 2007). Assim como todas as espécies da família Phyllostomidae, *A. lituratus* (Figura 5) se orienta através do olfato (Frahm 1981) e visão, além da ecolocalização (Reis et al., 2007).



Foto: Alessandro Brinati

Figura 5- Macho adulto de *Artibeus lituratus*, coletado no município de Viçosa-MG e mantido em gaiola individual no morcegário do Museu de Zoologia da Universidade Federal de Viçosa.

Ao forragear, morcegos podem facilmente encontrar alimentos contaminados com pesticidas em diversas áreas de cultivo (Stahlschmidt et al., 2012), como o de frutos. Esses animais, em comparação com outros mamíferos, são considerados

potencialmente mais sensíveis à exposição aos pesticidas devido a suas características ecológicas (Stahlschmidt e Bruhl 2012). O bioacúmulo de pesticidas e suas consequências para a fisiologia de morcegos têm sido estudados nas últimas décadas, principalmente em morcegos que ocorrem na América do Norte, Europa e Ásia. No entanto, os efeitos da exposição a organoclorados na capacidade antioxidante do morcego frugívoro neotropical *A. lituratus* não são conhecidos (Gelbke et al., 2004).

A capacidade antioxidante será avaliada através da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) e dos produtos da oxidação de proteínas (proteínas carboniladas) e lipídios (malondialdeído).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a capacidade antioxidante do fígado (capítulo 1), tecidos nervoso, renal e testículos (capítulo 2) dos morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* após exposição crônica a doses comerciais do inseticida organoclorado endosulfan.

Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione S-transferase, e mensurar os produtos da peroxidação lipídica nos tecidos nervoso, renal e hepático.
- ✓ Avaliar a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase dos testículos.
- ✓ Mensurar a concentração de proteínas carboniladas e a concentração de glutathione total (GSH-eq), glutathione reduzida (GSH) e razão GSSG/GSH-eq no fígado.

REFERÊNCIAS

Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: A review. *Medical Science Monitor* 10: 141-147.

Altringham, J.D., 1996. *Bats, Biology and Behaviour*. Oxford, Oxford University Press. 262 pp.

Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Silva, M.C., Goulart, L.S., Barros, M.S., Picanço, M.C., Neves, C. A., Freitas, M. B., 2012 (a). Metabolic and histopathological alterations in the fruit-eating bat *Artibeus lituratus* induced by the organophosphorous pesticide fenthion. *Acta Chiropterologica* 14 (1): 225–232.

Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Barros, M.S., Picanço, M.C., Neves, C.A., Freitas, M.B., 2012 (b). Short-term effects of spinosyn's family insecticide on energy metabolism and liver morphology in frugivorous bats *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). *Brazilian Journal of Biology* 72 (2): 299-304.

Amin, K.A., Hashem, K.S., 2012. Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *Veterinary Research* 8: 45.

Androustopoulos, V. P., Hernandez, A.F., Liesivuori, J., Tsatsakis, A. M., 2012. A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. *Toxicology* (article in press).

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Ministério da Saúde, Nota Técnica Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo endossulfam. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d3f25b80474586588f6fdf3fbc4c6735/Nota+ta+t%C3%A9cnica.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 01 de maio de 2013

Barquez, R., Perez, S., Miller, B. & Diaz, M. 2008. *Artibeus lituratus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 11 Julho 2013.

Bianconi, G. V., Mikich, S. B.; Pedro, W. A., 2004. Diversidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em remanescentes florestais do município de Fênix, noroeste do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21 (4): 943-954.

Brinati, A., 2011. Efeitos toxicológicos do inseticida endossulfan sobre o metabolismo energético de morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* e análise do bioacúmulo no tecido adiposo e hepático. Dissertação (Mestrando em Biologia Animal), Universidade Federal de Viçosa (MG).

Boyles, J.G., Cryan, P.M., McCracken, G.F., Kunz, T.H., 2011. Economic importance of bats in agriculture. *Science*, 332 (1): 41-42.

Cai, Z., Yan, L.J., 2013. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research* 1 (1): 15-26.

Caride, A., Lafuente, A., Cabaleiro, T., 2010. Endosulfan effects on pituitary hormone and both nitrosative and oxidative stress in puberal male rats. *Toxicology Letters* 197:106-112.

Cerrillo, I., Granada, A., Lopez-Espinosa, M. J., Olmos, B., Jimenez, M., Cano, A.; Olea, N., Olea-Serrano, M. F., 2005. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. *Environmental Research* 98: 233-239.

Charles-Dominique, P., 1993. Speciation and coevolution: an interpretation of frugivory phenomena. *Advances in vegetation science* 15: 75-84.

Charles-Dominique, P., 1986. Inter-relations between frugivorous vertebrates and pioneer plants: *Cecropia*, birds and bats in French Guyana. *Tasks for vegetation science* 15: 119-135.

Clark Jr., D.R., 2001. DDT and the decline of free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) at Carlsbad Cavern, New Mexico. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40: 537-543.

Clark, D. R., Jr, Krynitsky, A.J., 1983. DDE in Brown and White Fat of Hibernating Bats *Environmental Pollution (Series A)* 31: 287-299.

Cui J, Yuan X, Wang L, Jones G, Zhang S. 2011. Recent Loss of Vitamin C Biosynthesis Ability in Bats. *PLoS one* 6(11): e271214.

Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82: 47-95.

El- Shenawy, N.S., 2010. Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro* 24: 1148-1157.

El- Shenawy, N.S., El-Salmy, F., Al-Eisa, R.A., El-Ahmary, B., 2010. Amelioratory effect of vitamin E on organophosphorus insecticide diazinon-induced oxidative stress in mice liver. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96: 101-107.

Fabián, M. E.; Rui, M. A.; Waechter, J. L., 2008. Plantas utilizadas como alimento por morcegos (Chiroptera, Phyllostomidae) no Brasil. In: *Ecologia de Morcegos*. Paraná: Technical Books, cap. 5: 51-70.

Fernández, M.A., Hernández, L.M., Ibáñez, C., González, M.J., Guillón, A., Pérez, J.L., 1993. Congeners of PCBs in three bat species from Spain. *Chemosphere* 6: 1085-1097.

Filho, D.W., Althoff, S.L., Dafré, A.L., Boveris, A. 2007. Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146: 214-220.

Frahm, H.D., 1981. Volumetric comparison of the accessory olfactory bulb in bats. *Acta Anatomica (Basel)* 109 (2): 173-83.

Gelbke, H.P., Kayser, M., Poole, A., 2004. OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology* 205: 17-25.

Genestra, M., 2007. Oxy radicals, redox-sensitive signaling cascades and antioxidants: Review *Cellular Signaling* 19: 1807-1819.

Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S- Transferases: The First Enzymatic Step In Mercapturic Acid Formation. *The Journal of Biological Chemistry* 249 (22): 7130-7139.

Halliwell, B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 59: 1609-23.

Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Kenneth B. Storey (Ed). *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Wiley-Liss, NY: John Wiley & Sons, Inc. 319- 368 pp.

Humphrey, S.R., Bonaccorso, F.J., Zinn, T.L., 1983. Guild structure of surface-gleaning bats in Panama. *Ecology* 64: 284-294.

Jones, G., Jacobs, D.S., Kunz, T. H., Willig, M. R., Racey, P.A., 2009. *Carpe noctem*: the importance of bats as bioindicators. *Endangered Species Research* 8: 93–115.

Kannan, K., Se Hun Yun, Rudd, R. J., Behr, M., 2010. High concentrations of persistent organic pollutants including PCBs, DDT, PBDEs and PFOS in little brown bats with white-nose syndrome in New York, USA. *Chemosphere* 80: 613-618.

Karami-Mohajeri S, Abdollahi M., 2011. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Human & Experimental Toxicology* 30 (9):1119-40.

Kidd, M., 1997. Gluthatione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage. *Alternative Medicine Review* 2 (3): 155-176.

Lewis, S. E., 1995. Roost Fidelity of bats: A review. *Journal of Mammalogy* 76 (2): 481-496.

Limón-Pacheco, J. & Gonsébat, M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research* 674: 137-147.

Lobova, T. A., Mori, S. A., Blanchard, F., Peckham, H., Charles-Dominique, P., 2003. *Cecropia* As A Food Resource For Bats In French Guiana And The Significance Of Fruit Structure In Seed Dispersal And Longevity. *American Journal of Botany* 90 (3): 388-403.

Medellin, R.A., Goana, O., 1999. Seed Dispersal by Bats and Birds in Forest and Disturbed Habitats of Chiapas, Mexico[†]. *Biotropica* 31,(3): 478-485.

Menezes-JR., L.F; Duarte, A.C., Novaes, R.L. M.; Façanha, A.C.; Paracchi, A.L.; Costa, L.M.; Prata, A . F.D., Esbérard, C.E.L., 2008. Deslocamento de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Mammalia, Chiroptera) entre ilhas e continente no Estado do rio de janeiro, Brasil. *Biota Neotropical* 8 (2): 243-245.

Mikich, S. B.; Bianconi, G. V. 2008. Potencializando o papel dos morcegos frugívoros na recuperação de áreas degradadas. *Boletim de Pesquisa Florestal* 51: 155-164.

Mrema, E.J., Rubino, F.M., Brambilla, G., Moretto, A., Tsatsakis, A.M., Colosio, C., 2013. Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology* 10 (307): 74-88.

Mor, F., Ozmen, O., 2009. Effect of citamin C in reducing the toxicity of endosulfan in liver in rabbits. *Experimental and Toxicologic Pathology* 62: 75-80.

Nowak, R.M. 1994. Chiroptera: Phyllostomidae; Genus *Artibeus*. In: Nowak, R.M. (Ed.), *Walker's Bats of the World*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London. 161- 163 pp.

Oruc, E., 2012. Oxidative Stress Responses and Recovery Patterns in the Liver of *Oreochromis niloticus* exposed to Chlorpyrifos-Ethyl. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 88: 678–684.

Paiva, S.A.R., Russell, R.M. 1999. B-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition* 18 (5): 426-433.

Passos, F.C., Graciolli, G. 2004. Observação da dieta de *Artibeus lituratus* (Olfers) (Chiroptera, Phyllostomidae) em duas áreas do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21(3): 487-489.

Phan-Huy, L.A, He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* 4 (2): 89-96.

Khalid Rahman *Clin Interv Aging*. 2007 June; 2 (2): 219–236. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors.

Rahman, K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Journal of Clinical Interventions in Aging* 2 (2): 219–236.

Rebelo, R.M., Vasconcelos, R.A., Buys, B.D.M.C., Rezende, J.A., Moraes, K.O.C., Oliveira, R.P., 2010. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. IBAMA, Brasília.

Reis, N.R.; Peracchi, A . L.; Pedro, W. A .; Lima, I. P., 2007. Morcegos do Brasil. Londrina: Nelio R. dos Reis. 253 pp.

Saiyed, H., Dewan, A., Bhatnagar, V., Shenoy, U., Shenoy, R., Rajmohan, H., Patel, K., Kashyap, R., Kulkarni, P., Rajan, B., Lakkad, B., 2003. Endosulfan and male reproductive development. *Children's Health* 16 (111): 1958-1962.

Sato, T.M.; Passos, F. C.; Nogueira, A. C. 2008. frugivoria de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em *Cecropia pachystachya* (Urticaceae) e seus efeitos na germinação das semenstes. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 48 (3): 19-26.

Sindag- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola- Disponível em http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2256, acesso em 22/05/2013.

Singh, P.B., Singh, V., Nayak, P.K., 2008. Pesticide residues and reproductive dysfunction in different vertebrates from north India. *Food and chemical toxicology* 46 (7): 2533-9.

Schacter, E., 2000. Quantification and Significance Of Protein Oxidation In Biological Samples. *Drug Metabolism Reviews* 32 (3-4): 307-326.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M. & Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* 360:1-16.

Sherwin, H. A., Montgomery, W. I., Lundy, M. G., 2013. The impact and implications of climate change for bats. *Mammal Review* 43: 171-182.

Stahlschmidt, P., Brühl, C.A., 2012. Bats at risk? Bat activity and insecticide residue analysis of food items in an apple orchard. *Environmental toxicology and chemistry* 31 (7): 1556-63.

Swanepoela, R.E., Raceya, P.A., Shore, R.F. b, Speakmana, J.R., 1999. Energetic effects of sublethal exposure to lindane on pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus*) *Environmental Pollution* 104: 169-177.

Trevelina, L. C., Silveira, M., Port-Carvalhoc, M., Homema, D.H., Cruz-Neto, A. P. 2013. Use of space by frugivorous bats (Chiroptera: Phyllostomidae) in a restored Atlantic forest fragment in Brazil. *Forest Ecology and Management* 291: 136–143.

Townsend, C. R., Begon, M., Harper, J.L., 2006. Capítulo 10: Padrões na Riqueza em espécies. *In: Fundamentos em ecologia*. 2 ed., Porto Alegre: Artmed. 371-406 pp.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1): 44-84.

Zhang, J.F., Liu, H., Sunb, Y.Y., Wangb, X.R., Wu, J.C., Xue, Y.Q., 2005. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19: 185–19.

Weber, J., Halsall, C.J., Muir, D., Teixeira, C., Small, J., Solomon, K.; Hermanson, M., Hung, H., Bidleman, T., 2010. Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Science of the Total Environment* 15 (408): 2966-2984.

Capítulo 1

Repostas antioxidantes do morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Chiroptera: Phyllostomidae) exposto cronicamente à dose comercial do inseticida endosulfan

Antioxidant responses to a chronic exposition to commercial doses of the insecticide endosulfan in the fruit bat *Artibeus lituratus*

Oliveira, Jerusa Maria; Neves, Ana Carolina; Brinati, Alessandro; Peluzio, Maria do Carmo G.; Welker, Alexis. F.; Zanoncio, José Cola; Freitas, Mariella B.

- Artigo submetido à revista *Chemosphere* em 25 de junho de 2013.

Resumo

Fatores exógenos, como metais pesados, radiação, poluição ambiental e pesticidas, podem causar estresse oxidativo. A exposição de morcegos frugívoros a concentrações biologicamente ativas de pesticidas podem bioacumular-se em seus tecidos e levar ao declínio de suas populações. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações nas enzimas antioxidantes no tecido hepático do morcego frugívoro *Artibeus lituratus* exposto cronicamente a doses comerciais do inseticida endossulfam. Morcegos machos (n = 21) foram capturados com redes de neblina em fragmentos de Mata Atlântica em Viçosa-MG, Brasil, e mantidos em gaiolas no morcegueiro da Universidade Federal de Viçosa. Frutos de mamão foram imersos em solução de endosulfan (0,00 g/L; 1,05 g/L; 2,1 g/L) com espalhante adesivo (0,015 g/L), foram diariamente oferecidos aos animais (n= 7 por tratamento) durante 35 dias. A atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), a glutathione total, e a oxidação de lipídios e proteínas e proteínas carboniladas foram avaliadas no tecido hepático desse morcego. Houve declínio da atividade das enzimas CAT e SOD do tecido hepático dos animais tratados em relação ao controle. A atividade da enzima GST aumentou nos animais tratados com endosulfan 2,01 g/L. A oxidação de lipídios e proteínas, e a glutathione total não foram alteradas. As alterações nas concentrações de

enzimas antioxidantes no tecido hepático do morcego *A. lituratus* exposto ao inseticida endosulfan podem indicar que estes animais estejam sofrendo estresse oxidativo e que sejam vulneráveis ao inseticida organoclorado.

Palavras chaves: defesas antioxidantes, peroxidação lipídica, organoclorado, estresse oxidativo, proteínas carboniladas.

1. Introdução

Respostas metabólicas produzem espécies reativas de oxigênio (EROS), como os radicais livres (superóxido, hidroxila e peroxil lipídicos) e as derivadas do oxigênio (peróxido de hidrogênio, ozônio, oxigênio singlete, ácido hipocloroso, ácido nitroso e peroxinitrito). Porém, a produção das EROS pode aumentar e causar estresse oxidativo, induzindo a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Droge, 2002, Genestra, 2007; Pham-Huy et al., 2008). A exposição a fatores exógenos como a metais pesados, radiação, poluição ambiental e exposição a pesticidas, podem originar estresse oxidativo (Abdollahi et al., 2004; Valko et al., 2007; Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009).

O sistema de defesa antioxidante, enzimático ou não enzimático, limita o excesso da produção de ROS e inibe a oxidação celular. Defesas enzimáticas incluem a enzima superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione S-transferase (GST), que faz parte da segunda fase na desintoxicação do organismo eliminando conjugados com a glutathione (Fujioka e Casida, 2007). Defesas não enzimáticas incluem as vitaminas E (α -tocoferol) e C (ácido ascórbico), os carotenóides e a glutathione (Hermes-Lima, 2004; Rodrigo et al., 2007). O fígado tem um alto sistema de defesa antioxidante, e exibe um grau significativo de intoxicação, principalmente por ser o principal órgão no metabolismo de produtos metabólicos residuais e xenobióticos (Astiz et al., 2009).

Pesticidas, extensivamente utilizados na agricultura, podem alcançar estuários e corpos d'água e são potencialmente tóxicos a animais silvestres (El-Shenawy, 2010). O acaricida e inseticida organoclorado endossulfan [1,2,3,4,7,7 α -hexaclorobiciclo (2,2,1) heptene2,5,6,bis (methylene)sulfide], classificado como altamente tóxico (ANVISA, 2010), e também é um poluente orgânico persistente, está presente em águas de

superfície e na biota marinha de diferentes regiões do Ártico, bioacumulando no zooplâncton, peixes e mamíferos marinhos (Weber et al., 2010). Este organoclorado também pode bioacumular na placenta, leite e cordão umbilical de humanos (Cerrilo et al., 2005), induzir o estresse oxidativo, desequilibrar as funções da hipófise (Caride et al., 2010), causar citotoxicidade, peroxidação lipídica em células hepáticas (El-Shenawy, 2010) e atrasar a maturidade sexual de crianças (Saiyed et al., 2003).

A exposição de morcegos a concentrações biologicamente ativas de pesticidas causa bioacúmulo no tecido adiposo e marrom, como relatado para as espécies insetívoras *Myotis leibii*, *Myotis lucifugus* (Kannan et al., 2010), *Myotis septentrionalis*, e *P. subflavus* (Clark et al., 1983). O declínio de populações de morcegos associado à exposição de pesticidas foi observada nos insetívoros *Miniopterus Schreibersi*, *Pipistrellus pipistrellus* (Gerell e Lundeberg, 1993), *Rhinolophus ferrumequinum* (Fermindez et al., 1993) e *Tadarida brasiliensis* (Clark Jr., 2001). A exposição subletal de morcegos *Pipistrellus pipistrellus* ao inseticida lindano provocou aumento de sua taxa metabólica basal (Swanepoel et al., 1999). O morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Chiroptera: Phyllostomidae) apresentou alterações histopatológicas no tecido hepático após exposição ao bioinseticida espinosina (Amaral et al., 2012a) e ao inseticida fention (Amaral et al., 2012b).

Morcegos dispersam sementes e polinizam plantas, contribuindo para o reflorestamento e conservação das florestas tropicais (Mickich e Bianconi, 2005; Sato et al., 2008). Estima-se que 44 famílias de plantas brasileiras têm suas sementes dispersas por morcegos (Fabián et al., 2008). Essas características mostram a importância dos morcegos para o equilíbrio dos ecossistemas e como bioindicadores de áreas degradadas (Jones et al., 2009).

O bioacúmulo de pesticidas e suas consequências na biologia de morcegos têm sido estudados, mas o efeito de organoclorados na capacidade antioxidante do morcego frugívoro *A. lituratus* não é conhecido (Gelbke et al., 2004). Este estudo objetivou avaliar o comportamento das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase, glutathione S-transferase, a glutathione total e os produtos do estresse oxidativo peroxidação lipídica e proteínas carboniladas no tecido hepático do morcego frugívoro *A. lituratus* exposto, durante 35 dias, ao inseticida organoclorado endosulfan.

2- Materiais e Métodos

2.1-Pesticida

O inseticida organoclorado endosulfan [1,2,3,4,7,7 α -hexaclorobiciclo (2,2,1) heptene-2,5,6-bis (methylene)sulfide] foi obtido do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais, Brasil). O espalhante adesivo Will Fix (ácido dodecilbenzeno sulfônico , 30 g/L- 3% m/v) é utilizado por agricultores por aumentar a eficiência de caldas inseticidas e herbicidas, e portanto foi adicionado à calda nos tratamentos.

2.2- Animais e tratamento experimental

Morcegos machos adultos (n= 21) da espécie *A. lituratus* foram coletados com redes de neblina na Mata do Paraíso do Campus da UFV (MG) e na fazenda do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro em Araponga (MG), sudeste do Brasil. Esses animais foram identificados com a Chave de Identificação de Morcegos Brasileiros (Vizzotto e Taddei 1973), separados em gaiolas, pesados e mantidos em morcegário. Após dois dias de adaptação ao cativeiro, os animais foram divididos em três grupos: grupo controle (n= sete), alimentados com frutos sem tratamento; grupo End 1 (n= sete), alimentados com frutos tratados com endosulfan a 1,05 g/L adicionados de espalhante adesivo (0,015 g/L); grupo End 2 (n= sete), alimentados com frutos com endosulfan 2,01 g/L adicionados de espalhante adesivo (0,015 g/L). O mamão foi o fruto escolhido e oferecido sempre aos animais devido ao fato desse morcego aceitar facilmente esta dieta em cativeiro. Para adição do inseticida as frutas foram mergulhadas na calda de

endosulfan, nas doses desejadas, e em seguida foram armazenadas em recipiente adaptado para se evitar a perda da camada externa do inseticida. Após a secagem do inseticida, as frutas foram partidas (aproximadamente 200 g cada porção) e oferecidas aos animais durante 35 dias com a casca voltada para cima, visando simular a situação encontrada por morcegos na natureza. Os animais foram alimentados por volta das 18:00 h quando também receberam água *ad libitum*. Após 35 dias de tratamento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical seguido de decapitação, e o fígado foi retirado, pesado e congelado a -80°C.

2.3- Análises das enzimas antioxidantes

2.3.1- Catalase

O tecido hepático (100 mg) de *A. lituratus* foi homogeneizado em tampão fosfato (pH 7,0) com tampão triton X-100 e a suspensão centrifugada (12000 rpm à 4°C por 10 minutos) para se determinar a atividade da catalase. A atividade enzimática dessa enzima foi mensurada no sobrenadante e determinada pela taxa de queda do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (10 mmol L⁻¹) em espectrofotômetro a 240nm durante 60s (Aebi et al., 1984).

2.3.2- Superóxido dismutase

O tecido hepático (100 mg) foi homogeneizado em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, centrifugado (12000 rpm à 4°C por 10 minutos) e a atividade enzimática medida no sobrenadante. A atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada em leitor de Elisa em 570 nm (Dieterich et al., 2000 modificado) baseado na capacidade desta

enzima em catalisar a reação do superóxido O_2^- e o peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol.

2.3.3- Proteína total

A proteína total dos homogenatos de SOD e CAT foi mensurada (Lowry et al. 1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão e os resultados expressos em Unidades de CAT/ mg proteína e Unidades de SOD/ mg proteína.

2.3.4- Glutathione S-transferase

A enzima glutathione S-transferase (GST) foi mensurada no tecido hepático (50 mg) homogeneizado em tampão fosfato (7,4 pH) (500 μ L), centrifugado a 12000 rpm à 4°C por 10 minutos e a atividade enzimática medida no sobrenadante. A GST foi mensurada através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno e estimada pela variação da absorbância em 340 nm por 60s. A formação do conjugado ocorre espontaneamente no substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em reação não enzimática, sendo acelerada pela atividade das enzimas GST. Uma unidade (U) de GST equivale à quantidade de enzima que forma 1mol do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno por minuto. O coeficiente de extinção molar do CDBN 340 = 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹ foi utilizado para os cálculos (Habig et al., 1976). A atividade da GST foi expressa em μ mol min⁻¹ g⁻¹.

2.4- Determinação produtos do estresse oxidativo

2.4.1- Malondialdeído

As substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico são, em sua maioria, produtos da peroxidação lipídica, sendo o malondialdeído (MDA) importante marcador para monitorar a taxa de lipoperoxidação. A dosagem MDA foi realizada no tecido hepático (50 mg), homogeneizado em tampão fosfato (pH 7,0), o sobrenadante centrifugado (10000 g por 10 min), adicionada solução TBARS (ácido tricloroacético 15% e 0,375% de ácido tiobarbitúrico, e HCL 0,25 N) em banho maria por 15 minutos, resfriados, centrifugados a 2500 rpm e o sobrenadante mensurado em espectrofotometria a 535 nm (Buege e Aust, 1978). O coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^{-5} \text{ M cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos. A dosagem de proteína nos homogenatos foi realizada (Lowry et al., 1951) e os resultados expressos em nmol MDA/ mg proteína.

2.4.2- Proteínas Carboniladas

As proteínas carboniladas indicam o dano celular pelas ROS levando a disfunção das proteínas. A concentração de proteínas carboniladas foi determinada utilizando-se os pellets dos homogenatos empregados no método de mensuração de glutathione. Os pellets foram precipitados em ácido tricloroacético 10% e centrifugados (5000 g por 10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado e aos pellets adicionados a 0,5 mL de solução de dinitrophenylhydrazine (DNPH) 10 mM. Um total de 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl) 2M foi adicionado aos tubos que representavam o branco de cada amostra, misturados em vortex e mantidos em temperatura ambiente no escuro agitando-se no vortex a cada 15 minutos durante meia hora. A seguir, 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% gelado foi adicionado por tubo, agitado com vortex, centrifugado por 5000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O

precipitado foi lavado três vezes com 1 mL de acetato de etila (1:1), agitado em vortex, centrifugado e o sobrenadante descartado. Ao final, 1 mL de SDS 6% foi adicionado nos tubos, agitados em vortex para dissolver o pellet e centrifugados para precipitar os resíduos. Os danos às proteínas foram determinados no sobrenadante final, baseado nos grupos carbonil da reação com DNPH e mensurado em espectrofotometria a 370 nm (Levine et al., 1990). O total de proteínas carboniladas foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar de 22000 M cm^{-1} e expresso em nmol/mL.

2.5- Determinação da concentração de glutathiona

Os níveis de glutathiona total (expressos em equivalente de glutathiona (eq-GSH)) foram mensurados no fígado (50mg) dos animais homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 10% 0,5 M e centrifugado a 12000 rpm por seis minutos a 4°C. O eq-GSH ($\text{GSH-eq} = \text{GSH} + 2 \text{ GSSG}$) e o GSSG foram determinados no sobrenadante. Os GSSG e GSH foram indisponibilizados na amostras por reação com 2-vinilpiridina (2-VP) (Griffith, 1980) de acordo com protocolo de Akerboom e Sies (1981) modificado.

A concentração de eq-GSH e GSSG foi determinada pela formação de TNB, através da variação da absorbância em 412 nm. A glutathiona reduzida (GSH) da amostra reage com DTNB e produz TNB e GSSG. O GSSG produzido e/ou existente é reduzido a GSH pelas GR e GSH e volta a reagir com DTNB. Níveis de GSH foram calculados como: $\text{GSH-eq} = 2 \times \text{GSSG}$. A porcentagem de GSH foi calculada como: $100 \times (2 \times \text{GSSG} / \text{eq-GSH})$.

2.6- Análises estatística

Os dados foram submetidos a análise de homogeneidade de variância com o teste Shapiro-Wilk e submetidos a análise de variância (ANOVA). As médias entre grupos foram comparadas com o teste Newman-Keuls para os dados paramétricos e de Kruskal-Wallis (ANOVA) para os não-paramétricos com nível de significância de $p < 0,05$.

3. Resultados

A atividade da enzima CAT foi menor no fígado de *A. lituratus* (Figura 1) nos grupos com End. 1 ($0,50 \pm 0,03$ U CAT/ mg proteína) ($p < 0,001$, $df = 16$) e End 2 ($0,4 \pm 0,05$ U CAT) ($p < 0,0002$, $df = 16$) em relação ao controle ($0,66 \pm 0,02$ U CAT). A atividade da enzima antioxidante SOD também foi menor nos grupos End 1 ($1,91 \pm 0,08$ U SOD/ mg proteína) ($p < 0,03$, $df = 12$) e End 2 ($1,81 \pm 0,15$ U SOD/ mg proteína) ($p < 0,03$, $df = 12$) em relação ao grupo controle ($2,48 \pm 0,02$ U SOD/ mg proteína) (Figura 1).

A atividade da glutathione S-transferase foi superior nos animais do grupo End 2 ($24,04 \pm 1,96 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) ($p < 0,005$, $df = 10$) comparado ao grupo controle ($15,94 \pm 1,54 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) e ao grupo End 1 ($13,84 \pm 0,62 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) ($p < 0,003$, $df = 10$) quando comparados ao grupo controle (Figura 1).

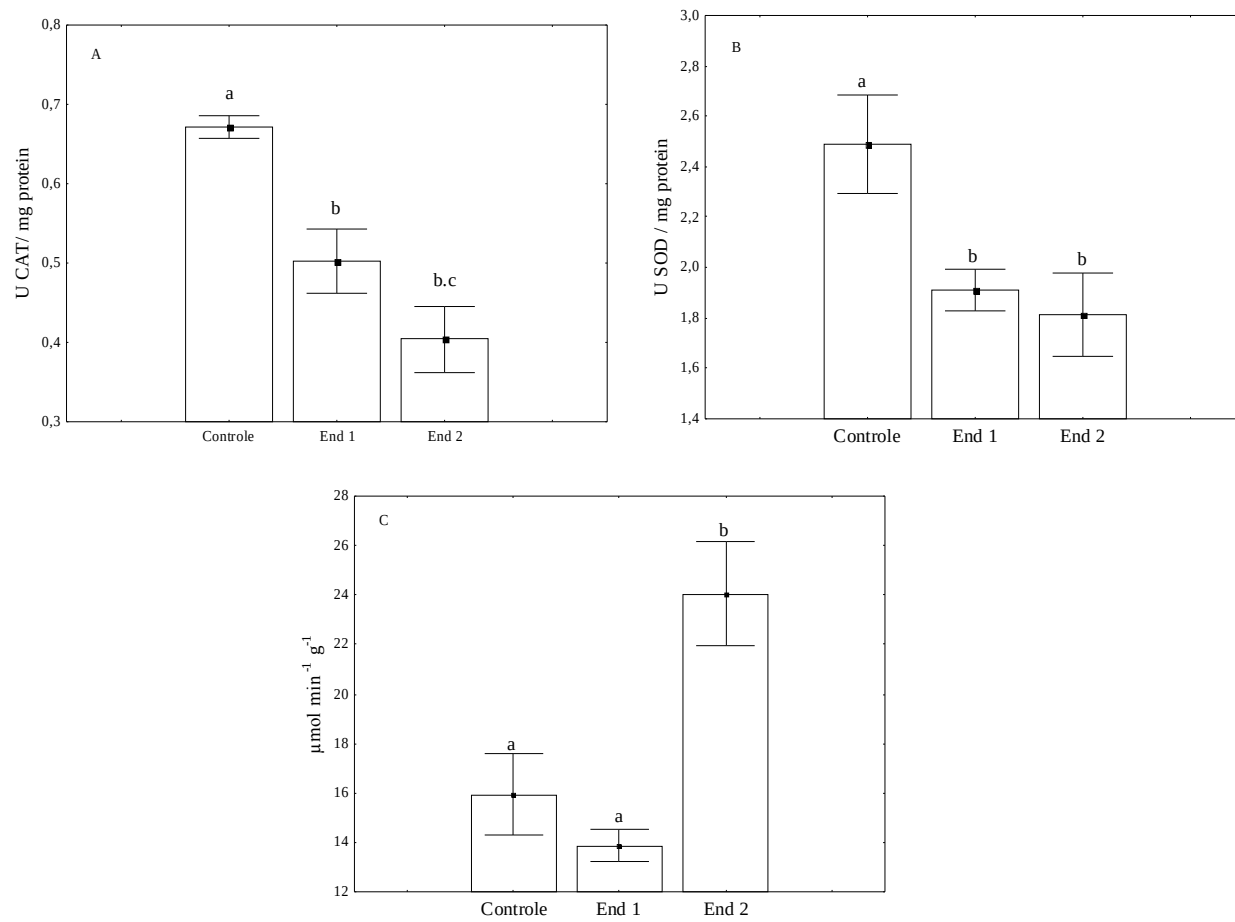


Figure 1 – Atividade das enzimas catalase (a), superóxido dismutase (b) e glutathione S-transferase (c) (mean ± EP) no fígado de morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* alimentados durante 35 dias com mamão tratado com o inseticida organoclorado endosulfan. Controle; endosulfan End 1= 1,05 g/L; End 2 endosulfan = 2,1g/L. Letras diferentes indicam diferença significativas (p<0,05).

Os produtos da peroxidação lipídica nos grupos End 1 ($0,070 \pm 0,022$ nmol/ mg proteína) ($p < 0,89$, $df=11$) e End 2 ($0,088 \pm 0,0168$ nmol/ mg proteína) ($p < 0,72$, $df=11$) não diferiam do grupo controle ($0,075 \pm 0,031$ nmol/ mg proteína) (Tabela 2). As proteínas carboniladas apresentaram concentrações semelhantes nos tratamentos End 1 ($17,53 \pm 2,1$ nmol/mL) ($p < 0,89$, $df=11$) e End 2 ($12,07 \pm 2,9$ nmol/mL) ($p < 0,79$, $df=11$) comparadas ao controle (Tabela 2).

Tabela 1 – Proteína Carbonilada e peroxidação lipídica mensurada pela concentração de malondialdeído (MDA) (mean $\pm$ EP) no fígado de morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* alimentado durante 35 dias com mamão tratado com o inseticida organoclorado endosulfan.

Tratamentos		Proteína carbonilada nmol/ mL	MDA nmol/ mg proteína
Fígado	Controle	$16,20 \pm 2,82^a$	$0,032 \pm 0,006^a$
	End 1,05 g/L	$15,84 \pm 2,11^a$	$0,040 \pm 0,010^a$
	End 2,01 g/L	$12,08 \pm 2,90^a$	$0,034 \pm 0,003^a$

Controle; endosulfan End 1= 1,05 g/L; End 2 endosulfan = 2,1g/L. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

As concentrações de eq- GSH (Chi-Square= 1,56, df= 2, p<0,46) , GSH (Chi-Square = 0,66, df= 2, p<0,72) e GSSG/ eq-GSH (Chi-Square= 0,66, df= 2, p<0,72) no tecido hepático de *A. lituratus* não variou entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Glutationa (mean $\pm$ EP) do fígado de morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* alimentado durante 35 dias com mamão tratado com o inseticida organoclorado endossulfam.

		eq-GSH	GSH (nmol/g)	GSSG/eq-GSH
Fígado	Controle	590,62 $\pm$ 186,90 ^a	487,29 $\pm$ 184,05 ^a	0,208 $\pm$ 0,057 ^a
	End 1,05 g/L	906,25 $\pm$ 298,24 ^a	963, 35 $\pm$ 33,26 ^a	0,307 $\pm$ 0,113 ^a
	End 2,01 g/L	805,00 $\pm$ 57,00 ^a	668, 41 $\pm$ 59,43 ^a	0,176 $\pm$ 0,127 ^a

Controle; endossulfam End 1= 1,05 g/L; End 2 endossulfam = 2,1g/L. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p< 0,05). eq – GSH: níveis totais de glutathione reduzida, GSH: glutathione reduzida, GSSG: glutathione oxidada, GSSG/ eq-GSH: razão entre a glutathione reduzida e glutathione total.

4. Discussão

O efeito da exposição a pesticidas sobre a atividade das enzimas antioxidantes é conhecido e está associado à produção de radicais livres, o que causa alterações nas enzimas antioxidantes e ao estresse oxidativo (Abdollahi et al., 2004). Por esse motivo, a capacidade antioxidante está sendo utilizada como biomarcador de toxicidade por contaminantes (Amin e Hashem, 2012). A maior parte dos trabalhos nesta área tem sido realizada utilizando-se doses altas de pesticidas e tendo como animais experimentais roedores e peixes. Porém, o conhecimento dos efeitos tóxicos das doses recomendadas pelos fabricantes em organismos não alvos como morcegos frugívoros ainda não é conhecido.

Neste trabalho os morcegos frugívoros apresentaram diminuição da atividade da CAT no fígado, resultados semelhantes foram relatados para peixes expostos ao mesmo inseticida em doses comerciais por 15 e 28 dias (Salvo et al., 2012). Em tratamento crônico, o inseticidas organofosforado clorpirifós (Oruc, 2012) e fipronil (Clasen et al., 2012) também causaram a redução dessa enzima em peixes. Por outro lado, um aumento da atividade de CAT no fígado foi observado em ratos tratados sub-cronicamente com o inseticida organofosforado malation (Possamai et al., 2007) e em peixes expostos por 75 dias ao herbicida organofosforado yerbimat (Ortiz-Ordoñez, 2011). O decréscimo da atividade desta enzima no fígado dos morcegos tratados com endosulfan observado neste trabalho poderia indicar um aumento de radicais superóxidos, os quais inibem a ação da catalase e levam ao estresse oxidativo (Brainy et al., 1996; Ortiz-Ordoñez, 2011, Oruc, 2012).

A diminuição da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) observado neste estudo, também foi relatado em ratos (Bebe e Panemangalore, 2002) e

no peixe zebra (Shao et al., 2012) expostos cronicamente ao mesmo inseticida. O tratamento agudo também foi capaz de reduzir a atividade da SOD, como foi observado em cultura de hepatócitos expostos ao endosulfan e inseticidas organofosforados fenitrothion e abamectin, (El-Shenaway et al., 2010), e em peixes expostos ao inseticida e fungicida organofosforado tebuconazol (Toni et al., 2011). Em contrapartida, ratos expostos sub-cronicamente ao inseticida organofosforado malation apresentaram aumento da atividade da SOD (Possamai et al., 2007). A redução da atividade da enzima SOD observada nos morcegos tratados com endosulfan poderia ser explicada pela ação deste inseticida estimulando a síntese de radicais livres, os quais inibem a ação da SOD e outras enzimas antioxidantes (Shao et al., 2012).

Os altos níveis da atividade da enzima GST em *A. lituratus* tratados com endosulfan na concentração 2,01 g/L foram similares ao encontrado em peixe (*C. carpio*) (Salvo et al., 2012) e em sapos (*B. regularis*) expostos ao mesmo inseticida (Ezemoney e Tango, 2010). Carpas (*C. auratus*) em tratamento de 10 dias com o inseticida organoclorado diclorofenol, também apresentaram elevação da GST (Zhang et al., 2005). Por outro lado, foi observada a redução dessa enzima no peixe *O. niloticus* exposto ao inseticida organofosforado clorpirifós (Oruc, 2012). Sugere-se que o aumento da GST indicaria uma resposta celular contra o estresse oxidativo induzido pelo inseticida endosulfan. Assim, essa enzima iria catalisar a conjugação de hidrocarbonetos clorados para a excreção e proteger o tecido de maiores danos causados pela EROS (Ezemoney e Tango, 2010).

Os morcegos tratados nas duas concentrações estudadas não apresentaram aumento oxidação de proteínas, da mesma forma que o relatado para ratos tratados com o inseticida malation (Possamai et al., 2007) e peixes expostos ao inseticida tebuconazol

(Toni et al., 2011). Porém, o aumento das proteínas carboniladas foi encontrado em peixes exposto agudamente ao endossulfam (Parvez e Raisuddin, 2005) e cronicamente ao inseticida fipronil (Clasen et al., 2012). Neste estudo, a ausência de alteração no grau de oxidação de proteínas em resposta aos dois tratamentos pode ser justificada pelo maior período de exposição e a pelas baixas dosagens do endossulfam. Além disso, já foi demonstrado que morcegos são capazes de manter baixos níveis de dano oxidativo a proteínas em resposta ao estresse oxidativo (Salmon et al., 2009).

Os produtos da peroxidação lipídica no fígado de morcegos tratados com as diferentes doses do inseticida estudadas não diferiram do grupo controle, o que corrobora os resultados encontrados para ratos tratados, de forma aguda, com o inseticida organofosforado malation (Possamai et al., 2007). Diferentemente, o aumento dos produtos da peroxidação lipídica foi observada em peixes expostos cronicamente ao inseticida organofosforado fipronil (Clasen et al., 2012) e clorpirifós (Oruc, 2012). O aumento dos níveis de peroxidação lipídica pode ter sido causado pela oxidação da membrana plasmática mediada por toxicidade das EROS induzida pelo pesticida (Oruc, 2012; Clasen et al., 2012).

Em morcegos os produtos da peroxidação lipídica têm relação inversa entre a lipoperoxidação e a quantidade de β -caroteno (carotenóide presentes em frutos) e vitaminas α -tocoferol (vitamina E) em seus tecidos. Quando altas concentrações desses compostos são encontradas no tecido, os níveis de peroxidação lipídica estão reduzidos (Filho et al., 2007). Considerando-se que a dieta de *A. lituratus* é baseada principalmente em frutas (Nowak, 1994; Passos e Graciolli, 2004) ricas em vitaminas antioxidantes (Paiva e Russell, 1999), uma das possíveis explicações para os resultados obtidos neste trabalho é que o teor de vitamina na dieta de morcegos frugívoros poderia

ter um efeito protetor contra os efeitos do inseticida na oxidação celular. É sabido que estas vitaminas podem reduzir os níveis de proteínas carboniladas e de peroxidação lipídica em camundongos tratados com a vitamina E, após 14 dias de exposição ao inseticida orfanofosforado diazinon (El-Shenawy et al., 2010). Dessa forma, a dieta de morcegos, rica em vitaminas antioxidantes, poderiam proporcionar proteção celular contra o estresse oxidativo e minimizar os efeitos sobre lipídios e a oxidação de proteínas.

As concentrações semelhantes de glutathione total (eq- GSH) no tecido hepático de *A. lituratus* tratados com endossulfam corroboram com os resultados obtidos para peixes *C. auratus* expostos ao inseticida organoclorado diclorofenol por 40 dias (Zhang et al., 2005). No entanto, os níveis de eq-GSH observado no peixe *O. niloticus* aumentaram após exposição por 24 h ao inseticida fention (Sevgiler e Uner, 2010). A razão GSSG/eq-GSH nos dois grupos tratados com inseticida não mostrou alterações, mas peixes em tratamento crônico com o herbicida organoclorado diclorofenol mostraram valores decrescentes para esta razão GSSG/eq-GSH (Zhang et al., 2005). Os níveis de glutathione reduzida (GSH) também não sofreram alterações nos dois grupos tratados com inseticida, corroborando com os resultados obtidos em tratamento crônico de peixes *C. auratus* com o inseticida diclorofenol (Zhang et al., 2005).

Portanto, os nossos resultados mostram que a exposição crônica a doses comerciais do inseticida endossulfam induziu o estresse oxidativo em *A. lituratus* evidenciada pela diminuição da atividade das enzimas CAT e SOD e pelo aumentando da atividade da enzima GST no fígado desses animais. Além disso, é possível que a dieta deste animal, rica em vitaminas e carotenóides, poderia aumentar as defesas antioxidantes não-enzimáticas das células, o que poderia ajudar a prevenir danos maiores como a

peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas. No entanto, essa espécie de morcego parece apresentar vulnerabilidade ao estresse oxidativo, mesmo com a exposição a baixas concentrações do inseticida organoclorado.

Morcegos forrageiam em plantas frutíferas, que podem ter recebido aplicação de pesticidas. Este contato pode induzir bioacumulação de pesticidas nos tecidos morcegos. Esta exposição crônica tem sido associada a doenças e estresse oxidativo, o que contribuiria para o declínio da sua população e poderia ser uma ameaça a conservação desta espécie.

5. Referências

Abdollahi, M., A. Ranjbar, S. Shadnia, S. Nikfar and A. Rezaie, 2004. Pesticides and oxidative stress: A review. *Med. Sci. Monit.*, 10, RA141-RA147.

Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology* 105, 121-126.

Akerboom, T.P., Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Meth. Enzymol.* 77, 373-382.

Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Silva, M.C., Goulart, L.S., Barros, M.S., Picanço, M.C., Neves, C. A., Freitas, M. B., 2012 (a). Metabolic and histopathological alterations in the fruit-eating bat *Artibeus lituratus* induced by the organophosphorous pesticide fenthion. *Acta Chiropt.* 14 (1), 225–232.

Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Barros, M.S., Picanço, M.C., Neves, C.A., Freitas, M.B., 2012 (b). Short-term effects of spinosyn's family insecticide on energy metabolism and liver morphology in frugivorous bats *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). *Braz J Biol* 72 (2), 299-304.

Amin, K.A., Hashem, K.S., 2012. Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *BMC Vet. Res.* 8, 45.

Astiz, M. Alaniz, M. J. T., Marra, C.A. 2009. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (7), 2025-2032.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Ministério da Saúde, Nota Técnica Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo endossulfam. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d3f25b80474586588f6fdf3fbc4c6735/Nota+tecnica.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 01 de maio de 2013

Bebe, F.N., Panemangalore, M., 2003. Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissues of rats. J Environ Sci. Health. B. 38 (3), 349-363.

Brainy, C.D.A., Saito, E., Carvalho, S.M.P., Junqueira B.C.V. 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. Aquat. Toxicol. 34, 151-162.

Buege, J.A. Aust, S.D. (1978): Microsomal lipid peroxidation methods. Enzymol. 52, 302 - 310.

Caride, A., Lafuente, A., Cabaleiro, T., 2010. Endosulfan effects on pituitary hormone and both nitrosative and oxidative stress in puberal male rats. Toxicol. Lett. 197, 106-112.

Cerrillo, I., Granada, A., Lopez-Espinosa, M. J., Olmos, B., Jimenez, M., Cano, A.; Olea, N., Olea-Serrano, M. F., 2005. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. Environ Res J 98, 233239.

Clark, D.R., Jr., Krynitsky, A.J., 1983. DDE in brown and white fat of hibernating bats. Environ. Pollut. 31, 287-299.

Clark Jr., D.R., 2001. DDT and the decline of free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) at Carlsbad Cavern, New Mexico. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40, 537-543.

Clasen, B., Loro, V. L., Cattaneo, R., Moraes, B., Lópes, T., Avila, L.A., Zanella, R., Reimche, G.B., Baldisserotto, B. 2012. Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: Implications for Rice-fish cultivation. Ecotoxicol. Environ. Saf. 77, 45-51.

Dieterich, S., Bielgk, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., Prestle, J., 2000. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 101, 33-9.

Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82,47-95.

El- Shenawy, N.S. 2010. Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes. *Toxicology In Vitro* 24, 1148-1157.

El- Shenawy, N.S., El-Salmy, F., Al-Eisa, R.A., El-Ahmary, B. 2010. Amelioratory effect of vitamin E on organophosphorus insecticide diazinon-induced oxidative stress in mice liver. *Pestic Biochem Physiol.* 96, 101-107.

Ezemonye L, I Tongo. 2010. Efeitos subletais de endosulfan e pesticidas Diazinon na glutationa-S-transferase (GST) em vários tecidos de adulto anfíbios (*Bufo regularis*). *Chemosphere.* 81 (2), 214-217.

Fermindez, M.A., Hernfindez , L.M., Ibifíez, C., Gonzfilez, M.J., Guillon, A., Porez, J.L., 1993. Congeners of PCBS in three bat species from Spain. *Chemosphere* 6, 1085-1097.

Filho, D.W., Althoff, S.L., Dafré, A.L., Boveris, A. 2007. Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats. *Comp. Biochem. Physiol. C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 146, 214-220.

Fujioka, K. , Casida, J.E. 2007. Glutathione-S-transferase de conjugação de rendimentos pesticidas organofosforados S-fosfo-, S-arilo e S-alkylglutathione derivados. *Chem. Res. Toxicol.* 20 (8), 1211-7.

Gelbke, H.P., Kayser, M., Poole, A., 2004. OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology* 205, 17-25.

Genertra, M., 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signaling cascades and antioxidants: *Cell. Signal.* 19, 1807-1819.

Gerell, R. & Lundeberg, K.G., 1993. Decline of a bat *Pipistrellus pipistrellus* population in an industrialized area in south Sweden. *Biol. Conserv.* 65,153-157.

Griffth, O.W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207- 212.

Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S- Transferases: The First Enzymatic Step In Mercapturic Acid Formation. *J. Biol. Chem.* 249 (22), 7130-7139.

Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Kenneth B. Storey (Ed). *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Wiley-Liss, NY: John Wiley & Sons, Inc. p. 319- 368.

Jones, G., Jacobs, D.S., Kunz, T. H., Willig, M. R., Racey, P.A., 2009. *Carpe noctem*: the importance of bats as bioindicators. *Endanger. Species. Res.* 8, 93–115.

Kannan, K., Se Hun Yun, Rudd, R. J., Behr, M., 2010. High concentrations of persistent organic pollutants including PCBs, DDT, PBDEs and PFOS in little brown bats with white-nose syndrome in New York, USA. *Chemosphere* 80, 613-618.

Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., Shacter, E. 1990. Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins. *Meth. Enzymol.* 233, 346-357.

Limón-Pacheco, J. & Gonsébat, M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat. Res.* 674, 137-147.

Lowroy, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-75.

Mikich, S. B.; Bianconi, G. V. 2005. Potencializando o papel dos morcegos frugívoros na recuperação de áreas degradadas. Pesqui Florest Bras 51, 155- 164.

Nowak, R.M. 1994. Chiroptera: Phyllostomidae; Genus *Artibeus*. In: Nowak, R.M. (Ed.), Walker's Bats of the World. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, pp. 161- 163.

Oruc, E., 2012. Oxidative stress responses and recovery patterns in the liver of *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos-ethyl. Bull Environ Contam Toxicol 88, 678-684.

Ortiz-Ordoñez, E., Uría-Galicia, E., Ruiz-Picos, R.A., Duran, A.G.S., Trejo, Y.H., Sedeño-Díaz, J.E., López-López, E. 2011. Effect of Yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 61, 443-452.

Paiva, S.A.R., Russell, R.M. 1999. B-carotene and other carotenoids as antioxidants. J Am Coll Nutr 18 (5), 426-433.

Parvez, S., Raisuddin, S. 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). Environ. Toxicol. and Pharmacol. 20, 112-117.

Passos, F.C., Graciolli, G. 2004. Observação da dieta de *Artibeus lituratus* (Olfers) (Chiroptera, Phyllostomidae) em duas áreas do sul do Brasil. Rev. Bras. Zool. 21(3), 487-489.

Possamai, F.P., Fortunato, J.J. , Feier, G., Agostinho, F.R., Quevedo, J., Wihelm Filho, D., Dal-Pizzol, F. 2007. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23(2), 198-204.

Phan-Huy, L.A, He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* 4(2), 89-96.

Rodrigo, R., Guichard, C., Charles, R., 2007. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Fundam Clin Pharmacol* 21, 111-27.

Saiyed, H., Dewan, A., Bhatnagar, V., Shenoy, U., Shenoy, R., Rajmohan, H., Patel, K., Kashyap, R., Kulkarni, P., Rajan, B., Lakkad, B., 2003. Endosulfan and male reproductive development. *Environ. Health. Perspect.* alth 16 (111), 1958-1962.

Salmon, A. B. , Leonard, S., Masamsetti, V., Pierce, A., Podlutsky, A., Podlutskaya, A. J., Podlutskaya, N., Richardson, A., Austad, S.N., Chaudhuri, A. R. 2009. The long lifespan of two bat species is correlated with resistance to protein oxidation and enhanced protein homeostasis. *Fed. Proc.* 23 (7), 2317-2326.

Salvo, L.M., Bairy, A.C.D., Ventura, E.C., Marques, M.R.F., Silva, J.R.M.C., Klemz C., Assis, H.C.S. 2012. Assessment of the sublethal toxicity of organochlorine pesticide endosulfan in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *J Environ Sci. Health. A Tox Hazard Subst Environ Eng* 47(11), 1652-1658.

Sevgiler Y, Uner N. 2010. Tissue-specific effects of fenthion on glutathione metabolism modulated by NAC and BSO in *Oreochromis niloticus*. *Drug Chem Toxicol.* 33(4), 348-356.

Simmons, N. B. 2005. Order Chiroptera. En: D. E. Willson y D. M. Reader, (Eds.). *Mammal Species of the world: taxonomic and geographic reference*, Third Edition. Volumen 1. Johns Hopkins University Press. P ags. 312-529.

Shao, B., Zhu, L., Dong, M., Wang, J., Wang, J., Xie, H., Zhang, Q., Du, Z., Zhu, S. 2012. DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology* 21(5), 1533-1540.

Swanepoela, R.E., Raceya, P.A., Shore, R.F. b, Speakmana, J.R., 1999. Energetic effects of sublethal exposure to lindane on pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus*) *Environ Pollut B.* 104, 169-177.

Toni, C., Ferreira, D., Kreutz, L.C., Loro, V.L., Barcellos, J.G., 2011. Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cypirinus carpio*) acutely exposed to different concentrations. *Chemosphere* 83, 579-584.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39(1), 44-84.

Vizzotto, L. D., Taddei, V. 1973. Chave para determinação de Quirópteros brasileiros. São José do Rio Preto, 72p.

Zhang, J.F., Wang, X.R., Guo, H.Y., Wu, J.C., Xue, Y.O., 2004. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defences of the gold fish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 110-116.

Weber, J., Halsall, C.J., Muir, D., Teixeira, C., Small, J., Solomon, K.; Hermanson, M., Hung, H., Bidleman, T., 2010. Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Sci. Total Environ.* 15 (408), 2966-2984.

Capítulo 2

Alterações nas enzimas Superóxido Dismutase e Catalase em tecidos extra-hepáticos de morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*) expostos a doses comerciais do inseticida endosulfan

Resumo

A exposição de morcegos frugívoros a concentrações biologicamente ativas de pesticidas pode causar bioacúmulo em seus tecidos e reduzir suas populações. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos crônicos do inseticida organoclorado endosulfan nas enzimas antioxidantes e na peroxidação lipídica em tecidos extra-hepáticos de morcegos frugívoros *Artibeus lituratus*. Morcegos machos (n = 15) foram coletados com redes de neblina em fragmentos de Mata Atlântica em Viçosa-MG, Brasil, e mantidos em gaiolas no morcegário da Universidade Federal de Viçosa. Frutos de mamão foram imersos em solução de endosulfan (0,00 g/L; 1,05 g/L; 2,1 g/L) com espalhante adesivo (0,015 g/L), diariamente, e oferecidos aos animais (n= 5 por tratamento) durante 35 dias. Os parâmetros avaliados foram a atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), e os produtos da peroxidação lipídica no tecido nervoso, rins e testículos. Nos rins dos morcegos expostos ao inseticida a atividade da CAT e SOD foi menor em relação ao controle. No tecido nervoso a atividade da enzima CAT aumentou e da SOD diminuiu nos animais tratados com End 1,05 g/L. A atividade da enzima GST e a peroxidação lipídica do tecido nervoso e rins não diferiram entre os tratamentos. Os testículos não apresentaram alterações nas concentrações das enzimas SOD e CAT. Conclui-se que, o

tecido nervoso e os rins sofreram estresse oxidativo, indicando que morcegos frugívoros são vulneráveis à exposição a doses comerciais do inseticida endosulfan.

Palavras chaves: atividade antioxidante, catalase, glutathione S-transferase, organoclorado, quiróptero, peroxidação lipídica.

1. Introdução

O consumo estimado de pesticidas no Brasil em 2011 foi de US\$ 8,5 bilhões, 16,3% a mais que o ano de 2010 (Sindag 2012). O país é considerado o maior consumidor de pesticidas no mundo e o oitavo por área cultivada (Rebelo et al., 2010). Pesticidas, embora proporcionem incrementos na produção de alimentos, causam prejuízos severos tanto à saúde pública quanto ao meio ambiente (Abdollahi et al., 2004). Ademais, podem alcançar estuários e corpos d'água, sendo potencialmente tóxicos também a organismos não-alvo, como animais silvestres, (Androustopoulos et al., 2012), entre eles morcegos.

Morcegos são vulneráveis a alterações de habitat como mudanças climáticas (Sherwin et al., 2012) e perturbações em seu local de descanso (Lewis 1995). Também sofrem com a exposição a inseticidas (Amaral et al., 2012a; 2012b; Stahlschmidt e Bruhl 2012), que podem bioacumular -se em seus tecidos e levar ao declínio de suas populações (Fermindez et al., 1993; Gerell e Lundberg 1993; Swanepoel et al., 1999; Clark, Jr. 2001; Kannan et al., 2010). Ao forragear, morcegos frugívoros, como os da espécie *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Chiroptera: Phyllostomidae), encontram com facilidade frutos tratados com inseticidas, cultivados em campos de fruticulturas.

O acaricida e inseticida organoclorado endossulfam [1,2,3,4,7,7 α -hexaclorobiciclo(2,2,1) heptene2,5,6,bis (methylene)sulfide], é classificado como altamente tóxico pela ANVISA e, apesar da sua alta toxicidade, ainda é muito utilizado em diversas culturas no Brasil como mamão, laranja e morango (ANVISA, 2010). Este inseticida está presente em águas de superfície e na biota marinha de diferentes regiões do Ártico, bioacumulando-se no zooplâncton, peixes e mamíferos marinhos (Weber et al., 2010). Em humanos, esta substância pode se bioacumular na placenta, leite e cordão

umbilical (Cerrilo et al., 2005). Além disso, este inseticida também está envolvido na indução de estresse oxidativo (Canlet et al., 2013), em processos envolvendo citotoxicidade (El- Shenawy, 2010), causando desequilíbrio nas funções da hipófise (Caride et al., 2010) e atraso na maturidade sexual de crianças (Saiyed et al., 2003).

Fatores endógenos ou exógenos, como exposição a metais pesados, radiação, poluição ambiental e exposição a diferentes classes de pesticidas podem acarretar um aumento do estresse oxidativo (Abdollahi et al., 2004; Valko et al., 2007; Limón-Pacheco e Gonsebatt 2009). O estresse oxidativo inicia-se por um desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROS), levando à oxidação de lipídios, proteínas e DNA (Genestra, 2007; Pham-Huy et al., 2008). O sistema de defesa antioxidante (enzimático ou não enzimático) limita o excesso da produção de EROS e inibe a oxidação celular. Por isso, a capacidade antioxidante tem sido utilizada como biomarcador de toxicidade por contaminantes (Amin e Hashem 2012).

Este estudo objetivou avaliar os efeitos crônicos do inseticida endosulfan sobre a atividade das enzimas antioxidantes e da peroxidação lipídica no tecido nervoso, rins e testículos de morcegos frugívoros da espécie *Artibeus lituratus*.

2. Materiais e Métodos

2.1- Pesticida

O inseticida organoclorado endosulfan [1,2,3,4,7,7 α -hexaclorobiciclo (2,2,1) heptene2,5,6,bis (methylene) sulfide] foi obtido do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais, Brasil). O espalhante adesivo Will Fix (ácido dodecilbenzeno sulfônico , 30 g/L- 3% m/v) é utilizado por agricultores por aumentar a eficiência de caldas inseticidas e herbicidas, e portanto foi adicionado à calda nos tratamentos.

2.2- Animais e tratamento experimental

Morcegos machos adultos (n= 15) da espécie *A. lituratus* foram coletados com redes de neblina na Mata do Paraíso do Campus da UFV (MG) e na fazenda do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro em Araponga (MG), sudeste do Brasil. Esses animais foram identificados com a Chave de Identificação de Morcegos Brasileiros (Vizzoto e Taddei 1973), separados, pesados e mantidos em morcegário. Após dois dias em cativeiro, quando foram alimentados com mamão os animais foram divididos em três grupos: grupo controle (n= cinco), alimentados com frutos sem tratamento; grupo End 1 (n= cinco), alimentados com frutos tratados com endossulfam a 1,05 g/L mais espalhante adesivo (0,015 g/L); grupo End 2 (n= cinco), alimentados com frutos com endossulfam 2,01 g/L mais espalhante adesivo (0,015 g/L). O mamão foi o fruto escolhido e oferecido aos animais devido ao fato desse morcego aceitar facilmente esta dieta em cativeiro. As frutas foram mergulhadas na calda de endosulfan em recipiente adaptado para se evitar a perda da camada externa do inseticida. Após a secagem do inseticida, as frutas foram partidas (aproximadamente 200 g cada porção) e oferecidas aos animais

durante 35 dias com a casca voltada para cima, visando simular a situação encontrada por morcegos na natureza. Os animais foram alimentados por volta das 18:00 h quando também receberam água *ad libitum*. Após 35 dias de tratamento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical seguido de decapitação, e os rins, tecido nervoso e testículos foram retirados, pesados e congelados a -80°C.

2.3- Preparo das amostras

Os rins (50 mg), tecido nervoso (80 mg) e testículos (50 mg) dos animais foram homogeneizados em tampão fosfato (pH 7,0) e a suspensão centrifugada (12000 rpm à 4°C por 10 minutos) para se determinar a atividade das enzimas SOD e GST e os produtos da peroxidação lipídica. A determinação da atividade da enzima CAT foi realizada em homogenatos com tampão triton X-100.

2.4- Enzimas antioxidantes

2.4.1- Catalase

A CAT foi mensurada no sobrenadante dos tecidos (testículo, rim, tecido nervoso) e determinada pela taxa de queda do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (10 mmol L^{-1}) em espectrofotômetro a 240nm durante 60s (Aebi et al., 1984) e expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

2.4.2-Superóxido dismutase

A atividade da SOD (testículo, rim, tecido nervoso) foi realizada em leitor de Elisa a 570 nm e foi baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação

do pirogalol. Os resultados foram expressos em U SOD/g de tecido (Dieterich et al., 2000 modificado).

2.4.3- Glutathione S-transferase

A determinação da atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) foi mensurada apenas no sobrenadante dos homogenatos de rim e tecido nervoso. A GST foi mensurada através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno e estimada pela variação da absorbância em 340 nm por 60s. A formação do conjugado ocorre espontaneamente no substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em reação não enzimática, sendo acelerada pela atividade das enzimas GST. Uma unidade (U) de GST equivale à quantidade de enzima que forma 1mol do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno por minuto. O coeficiente de extinção molar do CDBN 340= $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos (Habig et al., 1976) e os resultados expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

2.5- Determinação do produto da peroxidação lipídica

As substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico são, em sua maioria, produtos da peroxidação lipídica, sendo o malondialdeído (MDA) importante marcador para monitorar a taxa de lipoperoxidação. A dosagem MDA foi realizada no sobrenadante dos homogenatos dos tecidos somente dos tecidos renal e nervoso, adicionada a solução TBARS (ácido tricloroacético 15% e 0,375% de ácido tiobarbitúrico, e HCL 0,25 N), colocados em banho maria por 15 minutos, resfriados, centrifugados a 3500 rpm/ min e o sobrenadante mensurado em espectrofotometria a 535 nm (Buege e Aust 1978). O

coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^5 \text{ M cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos e os resultados expressos em $\mu\text{mol TBARS g}^{-1}$.

2.6- Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de homogeneidade de variância com o teste Shapiro-Wilk e à análise de variância (ANOVA). As médias entre grupos foram comparadas com o teste de Newman-Keuls para os dados paramétricos e de Kruskal-Wallis (ANOVA) para os não-paramétricos com nível de significância de $p < 0,05$.

3. Resultados

A atividade da enzima CAT foi menor no tecido renal dos animais dos grupos End 1 e End 2 ($p = 0,0002$) em relação ao controle. A atividade da enzima SOD diminuiu no grupo End 1 ($p = 0,002$) em relação aos animais controle (Tabela 1). A atividade da GST (Tabela 2) no tecido renal dos morcegos dos grupos não diferiu do grupo controle. Os produtos da peroxidação lipídica também não apresentaram diferença nos rins dos morcegos dos dois grupos tratados em relação ao controle (Tabela 3).

No tecido nervoso, a atividade da CAT foi maior ($p = 0,03$) nos morcegos dos grupos End 1 em relação aos grupos controle e End 2. Os animais do grupo End 1 apresentaram diminuição na atividade da enzima SOD ($p = 0,0002$) quando comparado aos grupos controle e End 2 (Tabela 1). A atividade da enzima GST (Tabela 2) e os produtos da peroxidação lipídica (Tabela 3) não sofreram alterações no tecido nervoso dos dois grupos tratados quando comparadas ao grupo controle.

Nos testículos a atividade da enzima CAT não diferiu entre os grupos (End 1 $p = 0,16$; End 2 $p = 0,74$) (Tabela 1) assim como a atividade da SOD ($p = 0,07$).

Tabela 1- Atividade da enzima catalase ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$) e superóxido dismutase (U SOD g^{-1}) nos tecidos de morcego frugívoro *A. lituratus* (n = 5) tratados com inseticida endosulfan por 35 dias.

Enzimas Antioxidantes	Tratamento	Tecidos		
		Nervoso	Rim	Testículo
Catalase	Controle	$8,78 \pm 0,72^a$	$712,9 \pm 48,81^a$	$42,9 \pm 5,50^a$
	End 1	$26,54 \pm 0,76^b$	$376,5 \pm 1,71^b$	$56,0 \pm 7,71^a$
	End 2	$9,29 \pm 1,57^a$	$338,6 \pm 25,59^b$	$39,9 \pm 5,19^a$
Superóxido dismutase	Controle	$345,10 \pm 1,47^a$	$92,65 \pm 3,86^a$	$126,4 \pm 15,42^a$
	End 1	$149,6 \pm 3,89^b$	$57,79 \pm 7,90^b$	$279,0 \pm 61,74^a$
	End 2	$332,9 \pm 2,10^a$	$96,95 \pm 3,81^a$	$154,6 \pm 36,81^a$

Controle; endosulfan End 1= 1,05 g/L; End 2 endosulfan = 2,1g/L. Letras diferente indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 2- Atividade da enzima glutathione S- transferase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) nos tecidos de morcego frugívoro *A. lituratus* (n = 5) tratados com inseticida endosulfan por 35 dias.

Tratamento	Tecidos	
	Nervoso	Rim
Controle	$1,103 \pm 0,54^a$	$5,42 \pm 0,27^a$
End 1	$1,109 \pm 0,95^a$	$3,24 \pm 0,63^a$
End 2	$1,170 \pm 0,06^a$	$4,61 \pm 1,32^a$

Controle; endosulfan End 1= 1,05 g/L; End 2 endosulfan = 2,1g/L. Letras diferente indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 3- Produtos da peroxidação lipídica (nmol MDA g⁻¹) nos tecidos nervoso e renal de morcego frugívoro *A. lituratus* (n = 5) tratados com inseticida endosulfan por 35 dias.

Tratamento	Tecidos	
	Nervoso	Rim
Controle	33,25 ± 2,62 ^a	111,56 ± 0,27 ^a
End 1	39,29 ± 6,24 ^a	99,01 ± 0,63 ^a
End 2	53,49 ± 21, 42 ^a	124,5 ± 1,32 ^a

Controle; endosulfan End 1= 1,05 g/L; End 2 endosulfan = 2,1g/L. Letras diferente indicam diferenças significativas (p< 0,05).

4- Discussão

Pesticidas causam diversos danos aos sistemas biológicos e mesmo assim são lançados no ambiente. A toxicidade destes compostos está associada à produção de radicais livres levando a alterações nas enzimas antioxidantes, ao estresse oxidativo (Abdollahi et al., 2004) e a alterações nos parâmetros reprodutivos (Saiyed et al., 2003; Caride et al., 2010). Assim como o fígado, o tecido nervoso e os rins também são sensíveis para danos oxidativos por exposição à pesticida (Srivastava e Shivanandappa, 2005; El-Dermerdash, 2013).

A primeira enzima responsável pela defesa antioxidante da célula é a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio. Em seguida, a catalase (CAT) realiza a desintoxicação celular convertendo o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (Fujioka e Casida, 2007).

A atividade da enzima CAT diminuiu no tecido renal dos animais tratados com inseticida endossulfam 1,05 e 2,01 g/L. Resultados semelhantes foram observados nos rins de camundongos tratados com o inseticida organofosforado metomil (El-Demerdash et al., 2013) e em peixes expostos ao endossulfam (Pandey et al., 2001) e ao piretróide deltametrina (Amim e Hashem, 2012; Xing et al., 2012). Outros autores não observaram diferenças na atividade desta enzima em ratos tratados com inseticida organofosforado malation (Possamai et al., 2007) e/ou no tecido renal de peixes expostos aos herbicidas ácido diclorofenoxiacético e o organofosforado azinfosmetil (Oruc et al., 2004).

A atividade da enzima SOD diminuiu no tecido renal dos morcegos tratados com endossulfam 1,05 g/L. Essa alteração também foi relatada para roedores tratados com o

inseticidas organofosforado metomil (El-Demerdash et al., 2013) e com o inseticida organoclorado lindano (Padma et al., 2011). Diferentemente, peixes expostos ao herbicida ácido diclorofenoxiacético (Oruc et al., 2004) e ratos tratados com o inseticida organofosforado malation (Possamai et al., 2007) não apresentaram alterações na atividade dessa enzima. O declínio da atividade das enzimas SOD e CAT representa uma inibição do sistema de defesa antioxidante nos rins dos morcegos. De fato, já foi descrito que este organoclorado aumenta a produção de radicais livres em tecido animal, que são conhecidos como inibidores da atividade enzimática (Shao et al., 2012).

No tecido nervoso dos morcegos tratados com endossulfam 1,05 g/L, a atividade da enzima CAT aumentou, assim como em ratos tratados com o organoclorado hexaclorociclohexano (Srivastava e Shivanandappa, 2005) e com organofosforado clorfenvinfós (Lukaszewicz-Hussain, 2008). Outros estudos demonstram que a atividade da CAT não se alterou quando peixes foram expostos ao herbicida ácido diclorofenoxiacético (Oruc et al., 2004) e ao fungicida carbamato tatto (Atamaniuk et al., 2013). O tecido nervoso é particularmente vulnerável a danos oxidativos por xenobióticos, porque possui altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados em suas membranas e menores níveis de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Oruc, 2004, Srivastava e Shivanandappa, 2005). O aumento da atividade da enzima CAT neste tecido pode representar um efeito protetor do mesmo contra o estresse oxidativo, ocasionado pela produção excessiva de peróxido de hidrogênio, provavelmente induzida pelo inseticida endossulfam (Srivastava e Shivanandappa, 2005; Lukaszewicz-Hussain, 2008).

Os resultados obtidos no tecido nervoso dos animais tratados com End 1,05 g/L que mostram queda na atividade da enzima SOD, indicam inibição da atividade da

enzima nesse tecido. Este resultado foi similar ao encontrado em ratos tratados com o inseticida organoclorado hexaclorocicloexano (Srivastava e Shivanandappa, 2005) e com o inseticida organofosforado fention (Selmi et al., 2012). Porém o aumento da atividade dessa enzima foi observado em ratos tratados com o inseticida organofosforado clorfenvinfós (Lukaszewicz-Hussain, 2008) e em peixes expostos ao inseticida organofosforado fipronil (Clasen et al., 2012).

Os morcegos tratados com o inseticida endosulfan não apresentaram alterações na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em seus testículos. Ratos expostos por sete dias ao pesticida triazina atrazina também não apresentaram alterações na atividade dessas enzimas (Abarikwu et al., 2010). Por outro lado, ratos tratados com o inseticida organofosforado clorpirifós por 30 dias apresentaram diminuição na atividade das enzimas SOD e CAT (Mandal e Das, 2012). Parece que as doses estudadas não foram capazes de alterar a atividade antioxidante das enzimas CAT e SOD nos testículos dos morcegos tratados. Isso porque nos testículos, as alterações da atividade dessas enzimas podem ser dependentes da dose e do tempo de exposição (Abarikwu et al., 2010).

As respostas diferenciadas da atividade das enzimas SOD e CAT no tecido nervoso e renal dos morcegos tratados podem indicar mecanismos desiguais na regulação da expressão de genes das enzimas (Zhang et al., 2004) ou na competência fisiológica de cada órgão (Astiz et al., 2009). Alguns fatores como o comportamento alimentar da espécie, o tempo de exposição e dose do poluente utilizado, também podem levar os tecidos a respostas antioxidantes diferenciadas após exposição à xenobióticos (Oruc e Usta, 2007; Toni et al., 2011).

A GST é uma enzima antioxidante que contribui para a segunda fase da desintoxicação de xenobióticos do organismo, por meio da eliminação de conjugados com glutathione, sendo muito importante para a proteção dos tecidos contra o estresse oxidativo (Fujioka e Casida, 2007). Neste estudo, o inseticida endossulfam não alterou a atividade da enzima GST no tecido renal e nervoso dos morcegos tratados. Este resultado também foi observado no tecido renal e nervoso de ratos tratados com fungicida carbamato tattoo por 96h (Atamaniuk et al., 2013), e no tecido nervoso de peixes expostos por 24h a doses sub-letais de endossulfam (Crupkin et al., 2013). Porém em ratos tratados com inseticida organoclorado hexaclorociclohexano, a atividade da enzima aumentou no tecido nervoso (Srivastava e Shivanandappa, 2005).

Os produtos da peroxidação lipídica no tecido nervoso e renal não diferiram entre os morcegos expostos ao endossulfam, quando comparados ao controle. Similarmente, o tecido renal de ratos tratados com inseticida organoclorado lindano (Padma et al., 2011) e organofosforado malation (Possamai et al., 2007) também não apresentou alterações. Os tecidos nervoso e renal de peixes tratados com o herbicida ácido diclorofenoxiacético (Oruc et al., 2004) também não apresentaram alterações na peroxidação lipídica. No entanto, o aumento da peroxidação lipídica foi observado no tecido nervoso de peixes expostos a doses comerciais do inseticida organofosforado fipronil (Clasen et al., 2012) e no tecido renal de peixes expostos ao inseticida organofosforado diazinon (Oruc e Usta, 2007). O malondialdeído é um indicador importante de peroxidação lipídica. Assim como em outros animais em morcegos o produto da peroxidação lipídica é inversamente proporcional à quantidade de vitaminas α -tocoferol (vitamina E) e de carotenóides como o β -caroteno nos tecidos (Filho et al., 2007). A dieta de *A. lituratus* é composta principalmente por frutas (Nowak, 1991,

Passos e Graciolli, 2004) que é rica em vitaminas antioxidantes e carotenóides (Paiva e Russell, 1999). Uma das hipóteses a ser considerada é a de que a dieta desses animais poderia minimizar os efeitos do inseticida endossulfam na peroxidação lipídica.

Em conclusão, doses comerciais do inseticida endossulfam induzem estresse oxidativo no tecido nervoso e renal dos morcegos frugívoros *A. lituratus*, por meio das alterações nas enzimas antioxidantes SOD e CAT. O declínio das atividades das enzimas antioxidantes pode indicar inibição do sistema antioxidante no tecido e levar ao estresse oxidativo. A dieta desses animais, rica em vitaminas antioxidantes, poderá auxiliar na defesa antioxidante contra a oxidação de lipídios. Concluí-se que morcegos frugívoros que dispersam sementes e contribuem para o reflorestamento e conservação das florestas tropicais poderá sofrer modificações por poluentes ambientais. Este estudo também sugere que as enzimas antioxidantes podem ser utilizadas como biomarcadores de toxicidade ambiental em morcegos.

5- Referências

Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymology 105: 121-126.

Abarikwu, S.O., Adesiyun, A.C., Oyeloja, T.O., Oyeyemi, M.O., Farombi, E.O., 2010. Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by an herbicide, atrazine. Archives Environmental Contamination. Toxicology., 58: 874-882.

Abdollahi, M., A. Ranjbar, S. Shadnia, S. Nikfar and A. Rezaie, 2004. Pesticides and oxidative stress: A review. Medical Science Monitor 10: 141-147.

Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Silva, M.C., Goulart, L.S., Barros, M.S., Picanço, M.C., Neves, C. A., Freitas, M. B., 2012 (a). Metabolic and histopathological alterations in the fruit-eating bat *Artibeus lituratus* induced by the organophosphorous pesticide fenthion. Acta Chiropterologica 14 (1): 225-232.

Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Barros, M.S., Picanço, M.C., Neves, C.A., Freitas, M.B., 2012 (b). Short-term effects of spinosyn's family insecticide on energy metabolism and liver morphology in frugivorous bats *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). Brazilian Journal of Biology 72 (2): 299-304.

Amin, K.A., Hashem, K.S., 2012. Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. Veterinary Research 8: 45.

Androustopoulos, V. P., Hernandez, A.F., Liesivuori, J., Tsatsakis, A. M., 2012. A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. Toxicology (article in press).

Atamaniu, T. M., Kubrak, O. I., Husak, V. V., Storey, K. B., Lushchak, V. I., 2013. The Mancozeb-Containing Carbamate Fungicide Tattoo Induces Mild Oxidative Stress in Goldfish Brain, Liver, and Kidney. *Environmental Toxicology* 23: 1-9.

Astiz, M. Alaniz, M. J. T., Marra, C.A. 2009. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(7): 2025-2032.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Ministério da Saúde, Nota Técnica Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo endossulfam. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d3f25b80474586588f6fdf3fbc4c6735/Nota+t%C3%A9cnica.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 01 de maio de 2013

Buege, J.A. Aust, S.D. (1978): Microsomal lipid peroxidation methods. *Enzymol.* 52: 302 - 310.

Bianconi, G. V., Suckow, U. M. S., Cruz-Neto, A. P., Mikich., S. B., 2012. Use of Fruit Essential Oils to Assist Forest Regeneration by Bats. *Restoration Ecology* 20 (2): 211–217.

Clasen, B., Loro, V. L., Cattaneo, R., Moraes, B., López, T., Avila, L. A., Zanella, R., Reimche, G. B., Baldisserotto, B., 2012. Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: Implications for rice–fish cultivation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 77: 45–51.

Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Molina, J., Métais, B., Blas-Y Estrada, F., Gamet-Payrastre, L., 2013. Specific Metabolic Fingerprint of a Dietary Exposure to a Very Low Dose of Endosulfan. *Journal of Toxicology* 1: 1-11.

Caride, A., Lafuente, A., Cabaleiro, T., 2010. Endosulfan effects on pituitary hormone and both nitrosative and oxidative stress in puberal male rats. *Toxicology Letters* 197: 106-112.

Cerrillo, I., Granada, A., Lopez-Espinosa, M. J., Olmos, B., Jimenez, M., Cano, A.; Olea, N., Olea-Serrano, M. F., 2005. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. *Environmental Research* 98: 233-239.

Clark Jr., D.R., 2001. DDT and the decline of free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) at Carlsbad Cavern, New Mexico. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40: 537-543.

Dieterich, S., Bieligg, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., Prestle, J., 2000. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 101: 33-9.

El-Demerdash, F., Dewar, Y., El-Mazoudy, R. H., Attia, A. A., 2013. Kidney antioxidant status, biochemical parameters and histopathological changes induced by methomyl in CD-1 mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* (article in press).

El-Shenawy, N.S. 2010. Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro* 24: 1148-1157.

Fernandez, M.A., Hernandez, L.M., Ibáñez, C., González, M.J., Guillón, A., Porez, J.L., 1993. Congeners of PCBs in three bat species from Spain. *Chemosphere* 6: 1085-1097.

Filho, D.W., Althoff, S.L., Dafré, A.L., Boveris, A. 2007. Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146: 214-220.

Fujioka, K., Casida, J.E. 2007. Glutathione-S-transferase de conjugação de rendimentos pesticidas organofosforados S-fosfo-, S-ário e S-alkylglutathione derivados. *Chem Res Toxicol* 20 (8):1211-7.

Galindo-González, J., Guevara, S., Sosa V. J., 2008. Bat and bird-generated seed rains at isolated trees in pastures in a tropical rainforest. *Conservation Biology* 14: 1693–1703.

Genestra, M., 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signaling cascades and antioxidants: Review *Cellular Signaling* 19: 1807-1819.

Gerell, R. & Lundeberg, K.G., 1993. Decline of a bat *Pipistrellus pipistrellus* population in an industrialized area in south Sweden. *Biological Conservation* 65: 153-157.

Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S- Transferases: The First Enzymatic Step In Mercapturic Acid Formation. *The Journal of Biological Chemistry* 249 (22): 7130-7139.

Kannan, K., Se Hun Yun, Rudd, R. J., Behr, M., 2010. High concentrations of persistent organic pollutants including PCBs, DDT, PBDEs and PFOS in little brown bats with white-nose syndrome in New York, USA. *Chemosphere* 80: 613-618.

Lewis, S. E., 1995. Roost Fidelity of bats: A review. *Journal of Mammalogy* 76 (2): 481-496.

Limón-Pacheco, J. & Gonsébat, M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research* 674: 137-147.

Lukaszewich-Hussain, A., 2008. Subchronic intoxication with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide, affects rat brain antioxidative enzymes and glutathione level. *Food and Chemical Toxicology* 46: 82-86.

Madal, T. K., Das, N. S., 2012. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in chlorpyrifos insecticide-treated rats: a correlation study with testicular oxidative stress and role of antioxidant enzyme defence systems in Sprague-Dawley rats. *International Journal of Andrology* 44: 102-115.

Nowak, R.M. 1994. Chiroptera: Phyllostomidae; Genus *Artibeus*. In: Nowak, R.M. (Ed.), *Walker's Bats of the World*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, pp. 161- 163.

Oruç, E.O., Sevgiler, Y., Uner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 137: 43–51.

Oruç, E. O., Usta, D., 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23 (1): 48-55.

Paiva, S.A.R., Russell, R.M. 1999. B-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition* 18 (5): 426-433.

Padma, V.V., Sowmya, P., Arun Felix, T., Baskaran, R., Poornima, P., 2011. Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats. *Food and Chemical Toxicology* 49: 991–998.

Pandey, S., Ahmad, S., Parvez, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2001. Effect of Endosulfan on Antioxidants of Freshwater Fish *Channa punctatus* Bloch: 1. Protection Against Lipid Peroxidation in Liver by Copper Preexposure. *Archives Environmental Contamination Toxicology* 41: 345–352.

Passos, F.C., Graciolli, G. 2004. Observação da dieta de *Artibeus lituratus* (Olfers) (Chiroptera, Phyllostomidae) em duas áreas do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21(3): 487-489.

Phan-Huy, L.A, He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* 4 (2): 89-96.

Possamai, F.P., Fortunato, J.J. , Feier, G., Agostinho, F.R., Quevedo, J., Wihelm Filho, D., Dal-Pizzol, F., 2007. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23(2): 198-204.

Rebelo, R.M., Vasconcelos, R.A., Buys, B.D.M.C., Rezende, J.A., Moraes, K.O.C., Oliveira, R.P., 2010. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. IBAMA, Brasília.

Saiyed, H., Dewan, A., Bhatnagar, V., Shenoy, U., Shenoy, R., Rajmohan, H., Patel, K., Kashyap, R., Kulkarni, P., Rajan, B., Lakkad, B., 2003. Endosulfan and male reproductive development. *Children's Health* 16 (111), 1958-1962.

Sindag- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola- Disponível em http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2256, acesso em 22/05/2013.

Selmi, A., El-Fazaa, S.,Gharbi, N., 2012. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in plasma, erythrocyte and brain of rats' pups following lactational exposure to malathion. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34 (3): 753–760.

Shao, B., Zhu, L., Dong, M., Wang, J., Wang, J., Xie, H., Zhang, Q., Du, Z., Zhu, S. 2012. DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology* 21(5): 1533-1540.

Sherwin, H. A., Montgomery, W. I., Lundy, M. G., 2013. The impact and implications of climate change for bats. *Mammal Review* 43: 171-182.

Srivastava, A., Shivanandappa, T., 2005. Hexachlorocyclohexane differentially alters the antioxidant status of the brain regions in rats. *Toxicology* 214: 123-130.

Stahlschmidt, P., Brühl, C.A., 2012. Bats at risk? Bat activity and insecticide residue analysis of food items in an apple orchard. *Environmental toxicology and chemistry* 31 (7): 1556-63.

Swanepoela, R.E., Raceya, P.A., Shore, R.F. b, Speakmana, J.R., 1999. Energetic effects of sublethal exposure to lindane on pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus*) *Environmental Pollution* 104: 169-177.

Toni, C., Ferreira, D., Kreutz, L.C., Loro, V.L., Barcellos, J.G., 2011. Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations. *Chemosphere* 83: 579-584.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1): 44-84.

Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S., Wang, X., 2012. Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Chemosphere* 88: 377-383.

Zhang, J.F., Wang, X.R., Guo, H.Y., Wu, J.C., Xue, Y.O., 2004. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defences of the gold fish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58: 110-116.

Weber, J., Halsall, C.J., Muir, D., Teixeira, C., Small, J., Solomon, K.; Hermanson, M., Hung, H., Bidleman, T., 2010. Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in

the environment and occurrence in the Arctic. *Science of the Total Environment* 15(408): 2966-2984.

CONCLUSÕES GERAIS

As alterações na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) observadas nos tecidos nervoso, hepático e renal dos morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* sugerem que estes animais sofreram uma resposta ao estresse oxidativo após exposição crônica a doses comerciais do inseticida endosulfan. Este resultado indica que estes animais são vulneráveis à exposição a inseticidas, quando em estão expostos a baixas concentrações. Além disso, nosso estudo também demonstrou que as enzimas antioxidantes também podem ser utilizadas como biomarcadores de toxicidade ambiental em morcegos.

Os resultados apresentados permitem inferir que o contato de morcegos frugívoros com pesticidas pode provocar doenças e estresse oxidativo, o que pode representar uma ameaça a conservação desta espécie e contribuir para o declínio de suas populações.

Respostas diferenciadas das enzimas antioxidantes observadas nos tecidos dos morcegos expostos podem indicar mecanismos desiguais na regulação da expressão de genes das enzimas ou na competência fisiológica de cada órgão.

Sugere-se, ainda, que a dieta destes animais, rica em carotenóides e vitaminas antioxidantes como α -tocoferol, pode adicionar defesas antioxidantes não-enzimáticas para as células e minimizar os efeitos do inseticida na oxidação de lipídios e proteína.