

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

**AGROTÓXICOS E FISILOGIA DE GILDAS
ALIMENTARES DE MORCEGOS EM DIFERENTES
PAISAGENS**

Camila Guimarães Torquetti dos Santos

Belo Horizonte
2020

Camila Guimarães Torquetti dos Santos

**EFEITOS DA PAISAGEM NA FISIOLOGIA DE DIFERENTES
GRUPOS FUNCIONAIS DE MORCEGOS: AGROTÓXICOS E
PADRÕES DE USO DO SOLO**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito para a obtenção do grau de Doutora
em Ciência Animal.

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Benito Soto Blanco
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Tereza
Bittencourt Guimarães
Coorientadora: Profa. Dra. Marília Martins
Melo

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2020

S237a Santos, Camila Guimarães Torquetti dos. 1982–
Agrotóxicos e fisiologia de guildas alimentares de morcegos em diferentes paisagens/ Camila
Guimarães Torquetti Santos – 2020.
130f:il.

Orientador: Benito Soto Blanco

Coorientadoras: Ana Tereza Bittencourt Guimarães

Marília Martins Melo

Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

Área de Concentração: Medicina e Cirurgias Veterinárias

Bibliografia: f. 18; f. 48 – 63; f. 93 – 98; f. 120 - 128

Anexo: f. 130.

1. Fisiologia vegetal - Teses - 2. Morcegos - Teses – 3. Histopatologia veterinária - Teses -
I. Blanco, Benito Soto - II. Guimarães, Ana Tereza Bittencourt – III. Melo, Marília Martins -
IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

ATA DE DEFESA DE TESE DE CAMILA GUIMARÃES TORQUETTI DOS SANTOS

As 14:00 horas do dia 27/07/2020, reuniu-se, na Escola de Veterinária UFMG a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado dos Cursos em 28/03/2020, para julgar em exame final, a defesa da tese intitulada:

AGROTÓXICOS E FISIOLÓGIA DE QUILÔMOS ALIMENTÍCIOS DE
MORCEGOS EM DIFERENTES MATRIZES

_____ como requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência Animal, área de concentração em Toxicologia.

Aberto a sessão, o(a) Presidente da Comissão, Benito Soto Blanco, após informar aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Tese, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da Tese, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Dr.(a). Benito Soto Blanco	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr.(a). Ana Tereza Britencourt Guimarães	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr.(a). Marcelo Pires Nogueira de Carvalho	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr.(a). Sílvia Romão	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr.(a). Sonia Aparecida Talamoni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr.(a). Camila Palhares Teixeira	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a): Aprovado
 Reprovado

Para concluir o Doutorado, o(a) candidato(a) deverá entregar 01 volume encadernado da versão final da Tese, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de aceite de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado do Curso. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 27/07/2020.

Assinatura dos membros da banca:

ANA TEREZA B. GUIMARÃES

Sílvia Romão

Sônia Aparecida Talamoni

Benito Soto Blanco

Camila Palhares Teixeira

Sílvia Romão

Benito Soto Blanco

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Veterinária

Av. Antônio Carlos, 6627

Caixa Postal 967 - CEP 31271-970

Belo Horizonte - Minas Gerais

Telefone: (31) 3409-2633/2094/64

www.ufmg.br

E-mail: esv@vet.ufmg.br

Normas Regulamentares do curso de Tese de Doutorado

(Este documento não deverá contar recurso e não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador)

FOLHA DE APROVAÇÃO

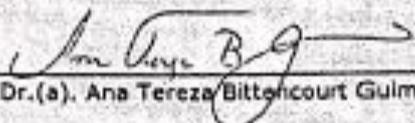
CAMILA GUIMARÃES TORQUETTI DOS SANTOS

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Toxicologia.

Aprovada em 27/07/2020, pela banca constituída pelos membros:



Dr.(a). Benito Soto Blanco
Presidente - Orientador(a)



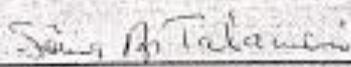
Dr.(a). Ana Tereza Bittencourt Guimarães



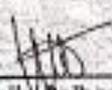
Dr.(a). Marcelo Pires Nogueira de Carvalho



Dr.(a). Sílvia Romão



Dr.(a). Sonia Aparecida Talamoni



Dr.(a). Camilla Palhares Teixeira



AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, prof. Benito Soto Blanco, pela oportunidade de executar esse trabalho, a confiança depositada em mim, pelo apoio e compreensão nas horas mais difíceis.

À minha amiga, coorientadora e companheira de congressos, profa. Ana Tereza Bittencourt Guimarães, pelo incentivo, pelas discussões, análises estatísticas e conversas aleatórias que tivemos. Sua ajuda e otimismo foram fundamentais para a conclusão do trabalho.

À profa. Mariella Bontempo Freitas pelas orientações e parceria para a realização das análises de estresse oxidativo.

À profa. Leiliane Coelho André pela oportunidade, confiança e parceria para a realização das análises de resíduos de agrotóxicos e micronúcleo.

À profa. Marília Martins Melo pelas orientações e suporte.

À Mirna D'Auriol pela amizade que construímos, pelo carinho, pelas discussões literárias e por todo suporte dentro e fora do laboratório.

À Renata Freitas, da UFV, pela dedicação nas análises de estresse oxidativo.

Às patologistas Thaynara e Fabíola pelas análises histopatológicas.

Ao Diretor Geral do IFTM – Campus Uberaba, Rodrigo Afonso Leitão, pela autorização para coleta de morcegos na instituição e aos professores Robson Thuler e Ana Isa pelo auxílio nos trâmites burocráticos da Instituição.

Ao Sr. Edmeu pela autorização para coleta de morcegos em sua fazenda em Uberaba.

À equipe de Zoonose da Prefeitura de Uberaba, especialmente o Sr. Antônio e Cacildo, pelo auxílio nas coletas na área rural de Uberaba.

Ao Léo Dias e Totó pela ajuda nos trabalhos de campo.

Às ICs Tainá, da Faculdade de Farmácia, Kai e Michele da Escola de Veterinária, pela ajuda nas análises de micronúcleo e de resíduos de agrotóxicos, pela confiança e pelos momentos de descontração.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos morcegos utilizados nessa pesquisa pela valiosa contribuição.

Ao meu estimado esposo, Miguel Caçado, pela ajuda em campo, por todo incentivo, carinho e cumplicidade ao longo de todos esses anos.

Às minhas companheiras de doutorado, Ana Luísa Miranda, Ana Flávia Botelho e Gabriella Matoso pelos momentos de descontração e pela troca de experiências.

À minha grande amiga Ana Luísa Miranda pelas discussões políticas e literárias, pelos passeios descontraídos, por estar presente nos momentos que precisei de ser forte e resiliente.

À família Torquetti pelo apoio incondicional, pela alegria e confiança.

À família Cançado pelo carinho e confiança.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Parte deste trabalho foi escrito durante a pandemia de Covid-19.

“Do rio que tudo arrasta se diz violento, mas ninguém diz que
são violentas as margens que comprimem esse mesmo rio”

Bertolt Brecht

RESUMO

A perda e fragmentação de habitats é uma das maiores ameaças à biodiversidade e à manutenção dos serviços ecossistêmicos, podendo trazer implicações fisiológicas para a fauna silvestre. O objetivo desta tese foi avaliar como alterações na paisagem impactam a higidez de morcegos de diferentes guildas tróficas. No Capítulo 1 foi feita uma revisão bibliográfica abordando o estado da arte a respeito de morcegos e agrotóxicos. Foi observado que as pesquisas sobre o tema estão concentradas no Hemisfério Norte, principalmente nos EUA. Apenas 5% das espécies de todo mundo já foram estudadas, predominantemente espécies insetívoras. Os inseticidas foram os agrotóxicos mais pesquisados, principalmente os organoclorados. Dessa forma, o conhecimento sobre os efeitos de agrotóxicos em morcegos ainda é insuficiente para uma avaliação de risco de suas populações ou seu uso como bioindicadores. No Capítulo 2, foi apresentado um método para determinação de resíduos de 48 tipos de agrotóxicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em músculo de morcego. O método de extração miniaturizado viabiliza análises de resíduos quando a quantidade de amostra é limitada. Além disso, por utilizar menor quantidade de reagentes reduz o custo, impacto no meio ambiente e na saúde dos pesquisadores, sendo, portanto, possível realizar este tipo de avaliações em morcegos como bioindicadores. No Capítulo 3, foi feita uma avaliação das implicações fisiológicas relacionadas a diferentes perfis de uso e ocupação do solo. Foram coletados morcegos de uma área de proteção, o Parque Nacional da Serra do Cipó (PARNA Cipó), MG, e uma área com atividade agropecuária intensa, no município de Uberaba, MG. Apesar das diferenças no uso e ocupação do solo entre as áreas estudadas, os morcegos apresentaram respostas similares. Contudo, foi verificado que as guildas tróficas são afetadas diferentemente. Os morcegos frugívoros de ambas as áreas apresentaram menor atividade das enzimas SOD, CAT e GST e baixas concentrações de MDA, o que pode ser explicado pela maior ingestão de antioxidantes provenientes da dieta, além da menor produção de espécies reativas do oxigênio (EROs). A análise histopatológica do fígado revelou que os animais apresentaram prevalências similares nas duas áreas, com algumas diferenças relacionadas às guildas. Morcegos hematófagos do PARNA Cipó apresentaram maior prevalência de esteatose e, juntamente com morcegos frugívoros de Uberaba, apresentaram maiores frequências de balonamento, sugerindo que esses animais estão submetidos a fatores antropogênicos capazes de induzir distúrbios no metabolismo hepático. Os morcegos hematófagos de Uberaba apresentaram maior prevalência de inflamação portal, e os morcegos insetívoros de Uberaba apresentaram maiores prevalência de inflamação lobular e portal. Embora os perfis de uso e ocupação das áreas sejam diferentes, o estado de saúde dos animais é semelhante, havendo algumas diferenças entre guildas tróficas. Essas diferenças parecem estar relacionadas à maneira como cada grupo responde às alterações ambientais, além de aspectos da biologia e ecologia próprios de cada guilda. Considerando que morcegos de diferentes guildas tróficas apresentam respostas fisiológicas diferentes às alterações na paisagem, ressalta-se a importância de se conhecer as respostas de cada guilda para mensurar os prejuízos relacionados aos serviços ecossistêmicos prestados por esses animais, bem como determinar quais guildas ou espécies podem ser usadas como bioindicadores de qualidade ambiental.

Palavras-chave: agrotóxicos, micro-quechers, histopatologia, estresse oxidativo, paisagem

ABSTRACT

The loss and fragmentation of habitats is one of the greatest threats to biodiversity and the maintenance of ecosystem services, and may have physiological implications for the wild fauna. The objective of this thesis was to evaluate how changes in the landscape may impact the health of bats from different trophic guilds. In Chapter 1, a bibliographic review was made addressing the state of the art regarding bats and pesticides. It was observed that research on the topic is concentrated in the Northern Hemisphere, mainly in the USA. Only 5% of the world's species have been studied, predominantly insectivorous species. Insecticides were the most searched pesticides, mainly organochlorines. Thus, the knowledge about the effects of pesticides on bats is still insufficient for a risk assessment of their populations or their use as bioindicators. In Chapter 2, a method for determining residues of 48 types of pesticides by gas chromatography coupled with mass spectrometry in bat muscle was presented. The miniaturized extraction method makes feasible the analysis when the volume of sample is limited. In addition, by using fewer reagents, it reduces the cost, impact on the environment and on the health of researchers, making it possible, therefore, to carry out this type of evaluation on bats as bioindicators. In Chapter 3, an assessment was made of the physiological changes linked to different lands use and occupation profiles. Bats were collected from a protected area, the Serra do Cipó National Park (PARNA Cipó), MG, Brazil, and an area with intense agricultural activity, in the municipality of Uberaba, MG, Brazil. Despite the differences in land use and occupation between the studied areas, bats showed similar responses. However, it was found that trophic guilds are affected differently. Frugivorous bats in both areas showed lower activity of the enzymes SOD, CAT and GST and low concentrations of MDA, which can be explained by the greater intake of antioxidants from the diet, in addition to the lower production of reactive oxygen species (ROS). Histopathological analysis of the liver revealed that the animals had similar prevalences in the two areas, with some differences related to the guilds. Hematophagous bats from PARNA Cipó had a higher prevalence of steatosis and, together with frugivorous bats from Uberaba, had higher frequencies of ballooning degeneration, suggesting that these animals are subjected to anthropogenic factors capable of inducing disturbances in hepatic metabolism. Hematophagous bats from Uberaba had a higher prevalence of portal inflammation, and insectivorous bats from Uberaba had a higher prevalence of lobular and portal inflammation. Although the profiles of use and occupation of the areas are different, the health status of the animals is similar, with some differences between trophic guilds. These differences seem to be related to the way each group responds to environmental changes, in addition to aspects of biology and ecology specific to each guild. Considering that bats from different trophic guilds present different physiological responses to changes in the landscape, the importance of knowing the responses of each guild to measure the losses related to the ecosystem services provided by these animals is emphasized, as well as determining which guilds or species can be used as bioindicators of environmental quality.

Keywords: pesticides, micro-quechers, histopathology, oxidative stress, landscape

SUMÁRIO

Resumo	10
Abstract.....	11
Introdução	17
Referências Bibliográficas	19
Objetivos.....	20
Objetivo geral.....	20
Objetivos específicos	20
Capítulo 1.....	21
Revisão Bibliográfica: Agrotóxicos em Morcegos.....	21
Introdução	21
Síntese histórica da exposição de morcegos à agrotóxicos.....	30
Espécies e países estudados	31
Bioacumulação.....	35
Agrotóxicos.....	36
Efeitos	45
Considerações Finais.....	47
Referências Bibliográficas	49
Capítulo 2.....	65
Otimização e validação de um método empregando Micro-QuEChERS para determinação de resíduos de agrotóxicos em músculo de morcegos por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas	65
1. Introdução	65
2. Materiais e Métodos.....	66
2.1 Padrões e Reagentes	66
2.2 Equipamentos	67
2.5 Preparo de amostra	68
2.6 Otimização do QuEChERS modificado	70
2.7 Controle do processo	72
2.8 Condições Cromatográficas.....	72
2.8 Otimização das condições cromatográficas.....	75
2.9 Limite de detecção.....	86
3. Resultados e Discussão	91
4. Considerações Finais.....	93

5. Referências Bibliográficas	94
Capítulo 3.....	100
Influência da paisagem e implicações fisiológicas em morcegos de diferentes guildas tróficas	100
1. Introdução	100
2. Materiais e Métodos.....	102
2.1 Área de estudo	102
2.2 Amostragem	103
2.3 Análises do sistema antioxidante.....	104
2.4 Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (RIB)	106
2.6 Análises estatísticas.....	107
3. Resultados	108
3.1 Sistema Antioxidante e Estresse Oxidativo.....	109
3.2 Histopatologia.....	112
4. Discussão	115
5. Considerações Finais.....	120
6. Referências Bibliográficas	121
Conclusões Finais e Futuras Pesquisas	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. 1. Revisão dos estudos de agrotóxicos em morcegos apresentando as espécies estudadas, o tipo de agrotóxico, material biológico e biomarcadores analisados, o país de origem e o tipo de estudo (observacional, qualitativo, experimental manipulativo ou natural).....	23
Tabela 1. 2. Espécies, separadas por família, guildas tróficas e número de trabalhos em que foram alvo de estudos no período de 1951 início de 2018.	34
Tabela 2. 1. Agrotóxicos utilizados na análise cromatográfica com as respectivas fórmulas e pesos moleculares, tempos de retenção (TR) e íons monitorados (m/z).	73
Tabela 2.2. Concentração da solução estoque (SE) e concentração da solução final dos padrões dos agrotóxicos utilizados na análise cromatográfica.	75
Tabela 2.3. Programação do Método 1 com as taxas de aquecimento, temperaturas de forno, os tempos de rampa e o tempo total de corrida (adaptado de LANAGRO, 2017).	77
Tabela 2.4. Programação do Método 2 com as taxas de aquecimento, temperaturas de forno, os tempos de rampa e o tempo total de corrida (Maštovská et al., 2005).	77
Tabela 2.5. Programação do Método 3 com as taxas de aquecimento, temperaturas de forno, os tempos de rampa e o tempo total de corrida (adaptado de Faria et al., 2009).	78
Tabela 2.6. Programação do Método 4 com as taxas de aquecimento, temperaturas de forno, os tempos de rampa e o tempo total de corrida (adaptado de Valenzuela et al., 2019).	78
Tabela 2.7. Agrotóxicos detectados nos testes de volume de injeção dos métodos 1, 2, 3 e 4.....	78
Tabela 2.8. Agrotóxicos, tempos de retenção (TR), percentual de recuperação (%) e temperaturas do injetor.	81
Tabela 2.9. Estimativa do limite de detecção dos agrotóxicos pesquisados. São apresentados valores de tempo de retenção (RT), percentual de recuperação, amostras de branco (Br), média, desvio padrão, e limite de detecção (LD).	88
Tabela 3.1. Espécies e guildas tróficas (N = nectarívora; F = frugívora; H = hematófaga; I = insetívora; O = onívora) dos morcegos capturados no PARNA Serra do Cipó e em Uberaba em 2018 e 2019.	108
Tabela 3.2. Atividade de biomarcadores em morcegos capturados em Uberaba e PARNA Serra do Cipó. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartilico para cada localidade.	109
Tabela 3.3. Frequência de ocorrência de patologias hepáticas em morcegos frugívoros, hematófagos, insetívoros e nectarívoros capturados em Uberaba e no PARNA Serra do Cipó. A – Esteatose; B – Balonamento; C - Inflamação lobular; D - Inflamação portal; E - Corpúsculo de Mallory; F – Fibrose; G – Hiperplasia ductal; H – Hiperemia; I - Degeneração glicogênica (PAS). * indicam a diferença estatística entre as áreas de amostragem em cada guilda.....	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1. Número de estudos sobre agrotóxicos em morcegos publicados entre 1951 e 2018.	30
Figura 1. 2. Mapa mundi com destaque dos países que apresentaram publicações relativas aos efeitos de agrotóxicos em morcegos (cinza) e frequência relativa percentual (círculos em verde) dos estudos em cada país.	31
Figura 1. 3. Estrutura molecular de piretróide do tipo I (permetrina) e do tipo II (Deltametrina).	40
Figura 2. 1. Fluxograma do micro-QuEChERS para análise de agrotóxicos por CG-EM em músculo de morcego.	69
Figura 2.2. Espectro obtido por CG-EM de músculo de morcego fortificado com mistura de 69 agrotóxicos no modo de aquisição <i>full scan</i> . Temperatura de injetor a 250 °C.	83
Figura 2.3. Espectro de músculo de morcego fortificado com mistura de 69 padrões de agrotóxicos. Temperatura de injetor a 250 °C no modo de aquisição SIM.	84
Figura 2.4. Identificação do pico de Azoxistrobina por meio da comparação do método <i>full scan</i> com a biblioteca NIST, mostrando a probabilidade do padrão de Azoxistrobina.	85
Figura 2.5. Identificação do pico de Azoxistrobina através da comparação do método SIM monitorando os íons 344, 388 e 403 com a biblioteca NIST, mostrando a probabilidade do padrão de Azoxistrobina.	85
Figura 2.6. Espectros de músculo de morcego fortificado com Azoxistrobina. (A) Modo <i>full scan</i> ; (B) Todas as massas correspondentes ao tempo de retenção 29,6 min (C) Modo SIM; (D) Íons monitorados de Azoxistrobina m/z 344; 388 e 403.	86
Figura 2.7. Fluxograma dos Métodos A e B.	Erro! Indicador não definido.
Figura 2.8. Sobreposição dos espectros de massa de músculo de morcego fortificado (azul) e branco (preto) com a temperatura do injetor 250 °C. (A) Modo <i>full scan</i> ; (B) Modo SIM, (C) Íons correspondentes ao tempo 29,6 min (Azoxistrobina).	91
Figura 2.9. Faixa de aplicação das cromatografias e líquidas conforme polaridade e volatilidade dos analitos. Adaptado de Giger (2009).	92
Figura 3.1. Padrão de uso e ocupação do solo na área de amostragem na Serra do Cipó e no município de Uberaba. O mapa foi gerado a partir de um ponto central considerando um raio de 8Km (Mendes et al., 2016). As informações de uso e ocupação do solo foram obtidas em IBGE, 2020.	103
Figura 3.2. Médias e erros-padrão relativos à atividade do sistema antioxidante mensurados em morcegos do PARNA Serra do Cipó (área referência) e Uberaba (área impactada) por guildas tróficas. A – MDA; B – SOD; C – CAT; D – GST.	110
Figura 3.3. Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (RIB) avaliados em morcegos do PARNA Serra do Cipó (área referência) e Uberaba (área impactada). Superóxido dismutase, catalase, glutathione S-transferase e lipoperoxidação mensurados em fígado de morcegos capturados em Uberaba e PARNA Serra do Cipó. Os biomarcadores representam a relação com a área referência e a área impactada. Valores	

acima dos valores de referência (linha laranja) indicam indução e valores abaixo dos valores de referência indicam inibição.	111
Figura 3.4. Valores de RIB para as guildas de morcegos das áreas. As letras indicam diferenças estatísticas encontradas entre as áreas avaliadas ($p < 0,05$).	112
Figura 3.5. Fígado de morcego frugívoro de Uberaba sem alteração histológica (HE, 400X).	113
Figura 3.6. Fígado de morcego nectarívoro do PARNA Serra do Cipó com vacúolos lipídicos (seta) e vacúolos pouco delimitados sugestivos de degeneração glicogênica (HE, 400X).	113
Figura 3.7. Fígado de morcego frugívoro de Uberaba com vacúolos PAS positivo (PAS, 400X).	113
Figura 3.8. Fígado de morcego frugívoro de Uberaba com degeneração lipídica micro e macrovacuolar que acometem 70% a 100% dos hepatócitos (HE, 400X).	113
Figura 3.9. Fígado de morcego hematófago do PARNA Serra do Cipó com degeneração lipídica predominantemente macrovacuolar. A seta evidencia hepatócitos balonizados. (HE, 400X).	113
Figura 3.10. Fígado de morcego nectarívoro de Uberaba com infiltrado inflamatório portal eosinofílica moderado (HE, 400 X).	113

INTRODUÇÃO

Morcegos pertencem à ordem Chiroptera, a qual possui mais de 1.300 espécies, cerca de um quarto das espécies de mamíferos do mundo (Fenton; Simmons, 2014). Esses animais são altamente diversificados, tanto em termos morfológicos quanto ecológicos. Dentre os mamíferos, os morcegos apresentam a maior diversidade de hábitos alimentares, uma vez que consomem insetos, frutos, néctar, pólen, flores, folhas, pequenos vertebrados e sangue (Kunz et al., 2011; Fenton; Simmons, 2014). Essa diversidade de hábitos alimentares faz com que os morcegos sejam importantes prestadores de serviços ecossistêmicos uma vez que atuam na polinização, dispersão de sementes, e controle da população de invertebrados (Kunz et al., 2011).

Devido a ampla distribuição geográfica, possibilidade de se estudar diferentes níveis tróficos e serem sensíveis às alterações do habitat em diferentes escalas, morcegos têm sido apontados como bons bioindicadores para estudos de qualidade ambiental (Jones et al., 2009). O impacto das alterações ambientais pode ser avaliado em diferentes níveis de organização biológica de modo que informações sobre efeitos em níveis inferiores, como molecular ou celular, ajudam a prever efeitos em níveis superiores como população (Adams et al., 1989; Köhler; Triebkorn, 2013).

Alterações na paisagem decorrentes de atividades agropecuárias estão relacionadas diminuição da riqueza de espécies e atividade de morcegos (Wickramasinghe et al., 2003; Stahlschmidt et al., 2012) além de mortalidade e outros efeitos relacionados à exposição aos agrotóxicos como apresentado no Capítulo 1 desta tese. Esses efeitos podem ser avaliados por meio de biomarcadores que permitem acessar alterações moleculares, bioquímicas, fisiológicas e histológicas (Depledge et al., 1995). Na ecotoxicologia, os biomarcadores têm sido utilizados tanto para avaliação da situação atual de uma população quanto para compreensão de mecanismos e efeitos que podem se manifestar nos níveis superiores (Adams et al., 1989; Depledge et al., 1995; Forbes et al., 2006).

As regiões tropicais têm sido alvo de grandes alterações na paisagem e vêm sofrendo intensificação da agricultura e do uso de agrotóxicos (Constantini, 2015; Haddad et al., 2015). São regiões que apresentam grande diversidade de espécies de morcegos, mas possuem poucas investigações sobre como esses contaminantes ou as alterações no

hábitat relacionadas à agricultura afetam suas populações. O Brasil é um dos países com maior diversidade de espécies de morcegos do mundo, com 182 espécies (Alberico et al., 2000; Nogueira et al., 2018) e, no entanto, nenhuma investigação foi feita para avaliar a exposição desses animais a agrotóxicos em áreas naturais. Sendo assim, essa tese tem como objetivos atualizar o estado da arte sobre os efeitos de agrotóxicos em morcegos, verificar o potencial de aplicação de técnicas de cromatografia para análise de bioacumulação de agrotóxicos em morcegos, bem como avaliar como alterações na paisagem impactam morcegos de diferentes guildas tróficas.

O delineamento deste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo CEUA 166/2017) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio - Nº 57026-1).

Diante do exposto, esta tese está dividida em três capítulos. No Capítulo 1 foi feita uma revisão sobre o estado da arte envolvendo morcegos e agrotóxicos; no Capítulo 2 foi apresentado um método para extração e determinação de resíduos de agrotóxicos em músculo de morcegos; e no Capítulo 3 foi feita uma avaliação das implicações fisiológicas em morcegos de diferentes guildas em função das alterações na paisagem. Para o preparo do texto final, outros estudos foram desenvolvidos e redigidos, sendo um sobre morcegos do estado de Minas Gerais e outro sobre o uso de ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade na ecotoxicologia. No entanto, esses não serão apresentados por não apresentarem relação direta com os resultados apresentados na tese, mas estão à disposição com a autora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, S.M.; SHEPARD, K.L.; GREELEY JR. M.S.; JIMENES, B.D.; RYON, M.G.; SHUGART, L.R.; MCCARTHY, J.F. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. **Marine Environmental Research**, v. 28, p.459-464, 1989.
- ALBERICO, M., Cadena, A.; Hernández-Camacho, J. Muñoz-Saba, Y. Mamíferos (Synapsida: Theria) de Colombia. **Biota colombiana**, v. 1, n. 1, p. 43–75, 2000.
- CONSTANTINI, D. Land-use changes and agriculture in the tropics: pesticides as an overlooked threat to wildlife. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 7, p. 1837-1839, 2015.
- DEPLEDGE, M.H.; AAGARD, A.; GYÖRKOS, P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 1-3, p. 19-27, 1995.
- FENTON, M.B.; SIMMONS, N.B. Bats: A world of science and mystery. The University of Chicago Press, Chicago, 303 pp.
- FORBES, V.E.; PALMQVIST, A.; BACH, L. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n.1, p. 272-280, 2006.
- JONES, G.; JACOBS, D. S; KUNZ, T. H.; WILLING, M. R.; RACEY, P. A Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators. **Endangered Species Research**, v. 8, p. 93–115, 2009.
- KÖHLER, H.R.; TRIEBSKORN, R. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? *Science*, v. 341, p. 759-765, 2013.
- KUNZ, T.H.; TORREZ, E.B.; BAUER, D.; LOBOVA, T.; FLEMING, T.H. Ecosystem services provided by bats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, n. 1, p. 1-38, 2011.
- NOGUEIRA M.R., I.P. LIMA, G.S.T. GARBINO, R. MORATELLI, V.C. TAVARES, R. GREGORIN, AND A.L. PERACCHI. 2018. Updated checklist of Brazilian bats: versão 2018. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (Sbeq).<<http://www.sbeq.net/updatelist>> acessado em: 15/04/2020.
- STAHLSCHMIDT, P.; BRÜHL, C.A. Bats at risk? Bat activity and insecticide residue analysis of food items in an apple orchard. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 7, p. 1556-1563, 2012.
- WICKRAMASINGHE, L.P.; HARRIS, S.; JONES, G.; VAUGHAN, N. Bat activity and species richness on organic and conventional farms: impact of agricultural intensification. **Journal of Applied Ecology**, v. 40, p. 984-993, 2003.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Atualizar o estado da arte sobre os efeitos de agrotóxicos em morcegos, analisando-se o potencial avaliativo de bioacumulação de agrotóxicos e influência da paisagem sobre diferentes guildas tróficas de morcegos.

Objetivos específicos

- Revisar o conhecimento disponível na literatura a respeito de morcegos e agrotóxicos
- Descrever a otimização e validação de um método de extração miniaturizado para análise multirresíduos de agrotóxicos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
- Avaliar o estresse oxidativo de morcegos de duas áreas com diferentes perfis de uso e ocupação do solo.
- Determinar a presença de alterações histopatológicas no fígado de morcegos;
- Averiguar se as alterações fisiológicas variam entre as guildas dos insetívoros, frugívoros, nectarívoros e hematófagos.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: AGROTÓXICOS EM MORCEGOS

INTRODUÇÃO

O modelo predominante de produção agrícola no mundo é altamente dependente do uso de agrotóxicos. Atualmente são utilizados mais de quatro milhões de toneladas de agrotóxicos no mundo (Zhang et al., 2011). O uso indiscriminado dessas substâncias tem causado grande preocupação, uma vez que seus resíduos têm sido encontrados em praticamente todos os compartimentos ambientais (Chernyak et al., 1996; Majewski et al., 2014; Camenzuli et al., 2016). A contaminação ambiental é uma ameaça à biodiversidade e, conseqüentemente, aos serviços ambientais que mantêm o ecossistema (Clark, 2001; Beketov et al., 2013; Mineau; Whiteside, 2013). Entre os inúmeros serviços ecossistêmicos prestados por seres vivos, pode-se considerar especial atenção aos serviços prestados por morcegos. Existem mais de 1.300 espécies de morcegos em todo mundo, os quais apresentam dieta diversificada, incluindo frutos, flores, pólen, artrópodes e pequenos vertebrados. Os serviços ambientais prestados por esses animais nos ecossistemas em que estão inseridos estão relacionados a essa diversidade de hábitos alimentares, como por exemplo, a polinização e dispersão de sementes (Kunz et al., 2011; Fenton; Simmons, 2014).

Contudo, declínios populacionais de morcegos já foram relacionados à exposição a agrotóxicos (Clark et al., 1988; Mitchell-Jones et al., 1989; Clark, 2001), ocorrendo especialmente via ingestão de alimentos e água contaminados, por inalação e contato dérmico (Clark, 1988; Schmidt et al., 2000).

Nesta revisão foi feita uma atualização das revisões de Clark e Shore (2001) e Bayat e colaboradores (2014), as quais abordam outros contaminantes além de agrotóxicos. Sendo assim, foram compilados 82 artigos que reportam efeitos, bioacumulação de resíduos e exposição de morcegos a agrotóxicos, publicados no período de 1951 a 2018, sendo que todos os dados foram coletados de fontes primárias (Tabela 1. 1).

Foram avaliadas a distribuição temporal e geográfica dos estudos, as espécies de morcegos e as classes de agrotóxicos estudadas e o conhecimento existente na literatura, identificando as lacunas de conhecimento para o direcionamento de pesquisas futuras.

Os estudos foram classificados em qualitativo, quando apenas foi reportada mortalidade de morcegos relacionada ao uso de agrotóxicos; observacional, quando houve coleta de morcegos e determinação de resíduos; experimental natural, quando houve coleta de morcegos, determinação de resíduos e investigação de fatores explicativos (e.g. áreas, espécies, sexo); e experimental manipulativo, quando houve um experimento em condições controladas para avaliação de efeitos e determinação de dose ou concentração.

Tabela 1. 1. Revisão dos estudos de agrotóxicos em morcegos apresentando as espécies estudadas, o tipo de agrotóxico, material biológico e biomarcadores analisados, o país de origem e o tipo de estudo (observacional, qualitativo, experimental manipulativo ou natural)

Espécie	Agrotóxico	Classe	Material biológico	Biomarcador analisado	País	Tipo de estudo	Referência
<i>Miniopterus schreibersii bassanii</i>	DDTs, Hepx, Clds, HCH, HCB	OC	Carcaça (exceto fígado, asas e pelos)	Exposição	Austrália	Observacional	Allinson et al., 2006
<i>Artibeus lituratus</i>	Fentiona	OP	Fígado, músculo e tecido adiposo	Efeito	Brasil	Exp. manipulativo	Amaral et al., 2012
<i>A. lituratus</i>	Espinosina	ESP	Fígado, músculo e tecido adiposo	Efeito	Brasil	Exp manipulativo	Amaral et al., 2012
<i>T. brasiliensis</i>	DDE	OC	Guano	Exposição	EUA	Observacional	Bennet; Thies, 2007
<i>A. lituratus</i>	Endosulfan	OC	Fígado, músculo, tecido adiposo	Exposição, efeito	Brasil	Exp. manipulativo	Brinati et al., 2016
<i>Eptesicus f. fuscus</i>	DDTs, Oxi, dieldrin, Hepx	OC	Carcaça, (exceto trato gastrointestinal), cérebro, conteúdo estomacal	Exposição	EUA	Observacional	Clark; Lamont, 1976a
<i>Myotis grisecens</i>	Dieldrin	OC	carcaça, leite (conteúdo estomacal), cérebro	Exposição	EUA	Observacional	Clark et al., 1978
<i>Myotis lucifugus</i>	DDE	OC	carcaça e cérebro	Determinação de concentração letal no cérebro	EUA	Exp. manipulativo	Clark; Stafford, 1981
<i>T. brasiliensis</i>	DDT, DDE, dieldrin e lindano	OC	pele de animais de coleções científicas	Exposição	EUA	Exp. natural	Clark, 2001
<i>T. brasiliensis; E. fuscus; M. lucifugus; Myotis sodalis; M. grisecens</i>	DDE, dieldrin, Hepx	OC	guano e carcaça (exceto asas, pés, trato gastrointestinal, cabeça e pele)	Exposição	EUA	Observacional	Clark et al., 1981
<i>M. grisecens</i>	DDTs, dieldrin, Hepx, Clds	OC	cérebro, carcaça, insetos (conteúdo estomacal)	Exposição	EUA	Observacional	Clark et al., 1983a
<i>T. brasiliensis</i>	DDTs, lindano, dieldrin, Hepx, Oxi e nonacloro	OC	Guano	Exposição	México	Observacional	Clark et al, 1995
<i>T. brasiliensis</i>	DDE	OC	cérebro e carcaça (exceto asas, pés, trato gastrointestinal, cabeça e pele)	Determinação de concentração letal	EUA	Exp.manipulativo	Clark; Kroll, 1977
<i>M. lucifugus</i>	DDT, DDD, DDE, Clds	OC	cérebro, carcaça (exceto asas, pés, cabeça, trato gastrointestinal, pele) conteúdo estomacal	Exposição	EUA	Observacional	Clark et al, 1978

(Continua)

Tabela 1.1. Continuação

Espécie	Agrotóxico	Classe	Material biológico	Biomarcador analisado	País	Tipo de estudo	Referência
<i>E. fuscus</i>	DDE	OC	cérebro e carcaça (exceto asas, pés, trato gastrointestinal, cabeça, pele)	Determinação de dose letal	EUA	Exp. manipulativo	Clark; Prouty, 1977
<i>M. lucifugus</i>	Dieldrin	OC	cérebro, pele, carcaça (exceto, pés, trato gastrointestinal, cabeça e pele), guano	Determinação de dose	EUA	Exp. manipulativo	Clark; Prouty, 1984
<i>M. grisecens; Pipistrellus subflavus; Lasiurus borealis</i>	Dieldrin e Hepx	OC	cérebro, carcaça (exceto asas, pés, trato gastrointestinal, cabeça e pele), guano e insetos	Exposição	EUA	Observacional	Clawson; Clark, 1989
<i>Miniopterus schreibersi; Myotis myotis</i>	DDT e DDE	OC	Carcaça	Exposição	Itália	Qualitativo	Corrao et al., 1985
<i>E. fuscus</i>	Clorpirifós	OP	Cérebro, sangue	Efeito	EUA	Exp. manipulativo	Eidels et al., 2016
<i>E. fuscus; Lasionycteris noctivagans; L. borealis</i>	Dieldrin, DDTs, Hepx, endosulfan, Cld, bifentrin, lambda cialotrin, permethrina, cipermetrina, esfevlerato, clorpirifós, diazinon, carbaril	OC, PI, OP, CAR,	Carcaça (exceto pele e asas) e cérebro	Exposição	EUA	Observacional	Eidels et al., 2013
<i>M. sodalis; Myotis septentrionalis</i>	Dieldrin, Hepx, Oxi, DDE, clorpirifós, diazinon, metil parathion	OC, OP	Carcaça (exceto cérebro) e guano	Exposição	EUA	Observacional	Eidels et al., 2007
<i>T. brasiliensis</i>	DDT, DDE, DDD, Dieldrin	OC	Carcaça (exceto asas, pés, trato gastrointestinal, cabeça e pele), cérebro	Efeito	EUA	Exp. manipulativo	Geluso et al., 1976
<i>P. pipistrelus</i>	HCHs, Hepx, dieldrin, DDTs, DCB	OC	Carcaça (exceto asa, pé e cabeça)	Exposição	Espanha	Exp. natural	Guillén et al., 1994
<i>M. schreibersi; Rhinolophus ferrumequinum</i>	HCHs, Hepx, dieldrin, DDTs, DCB	OC	Carcaça (exceto asa, pé e cabeça)	Exposição	Espanha	Exp. natural	Hernández, et al., 1993

(Continua)

Tabela 1.1. Continuação

Espécie	Agrotóxico	Classe	Material biológico	Biomarcador analisado	País	Tipo de estudo	Referência
<i>Myotis californicus</i> ; <i>Myotis evotis</i> ; <i>Myotis volans</i> ; <i>E. fuscus</i> ; <i>L.noctivagans</i>	DDTs, Hepx, Oxi, nonacloro, dieldrin	OC	carcaça, cérebro	Exposição	EUA	Exp. natural	Henny et al., 1982
<i>Hipposideros terasensis</i>	Imidacloprid	NIC	Cérebro	Efeito	Taiwan	Exp. manipulativo	Hsiao et al., 2016
<i>P. pipistrellus</i> ; <i>Plecotus auritus</i> ; <i>Myotis nattereri</i> ; <i>Myotis daubentoni</i> ; <i>Myotis mystacinus</i>	DDTs, dieldrin	OC	Fígado, tecido adiposo, carcaça	Exposição, efeito	Inglaterra	Observacional e exp. manipulativo	Jefferies, 1972
<i>M. lucifugus</i> ; <i>Perimyotis subflavus</i> <i>M. septentrionalis</i> ; <i>Myotis leibii</i>	DDT, lindano, Oxi, nonacloro, HCB	OC	Fígado, cérebro, tecido adiposo	Exposição	EUA	Observacional	Kannan et al., 2010
<i>E. fuscus</i>	Dieldrin, endrin	OC	-	Determinação de dose	EUA	Exp. manipulativo	Luckens; Davis, 1965
<i>Epitesicus serotinus</i> ; <i>Myotis emarginatus</i> ; <i>M. mystacinus</i> ; <i>Nyctalus noctula</i> ; <i>Pipistrellus kuhlii</i> ; <i>P. pipistrellus</i> ; <i>Rhinolophus hipposideros</i> ; <i>Vespertilio murinus</i>	HCB, DDT, lindano	OC	Fígado, cérebro, pulmão	Exposição, efeito	Áustria	Exp. natural	Lýftl et al., 2005
<i>Miniopterus schreibersii</i> <i>bassanii</i>	DDTs	OC	Fígado, músculo, tecido adiposo, cérebro	Exposição	Austrália	Exp. natural	Mispagel et al., 2004
<i>E. fuscus</i>	DDT, DDE, Cld e dieldrin	OC	Carcaça (exceto pés, asas e trato gastrointestinal), cérebro, conteúdo estomacal, guano	Exposição	EUA	Exp. natural	O'Shea et al., 2001
<i>P. pipistrellus</i>	Pentaclorofenol, Lindano, cipermetrina, deltametrina, permetrina, TBTO, naftenato de cobre	OC, PI	-	Efeito	Escócia	Exp. manipulativo	Rancey; Swift 1986
<i>P. pipistrellus</i> , <i>E. fuscus</i> , <i>M. lucifugus</i> , <i>L. borealis</i>	DDE, hep x, dieldrin	OC	corpo total e insetos	Exposição	EUA	Exp. natural	Schmidt et al., 2000
<i>Pteropus mariannus</i> , <i>P. pipistrellus</i> , <i>Cynopterus sphinx</i>	DDTs, HCHs, Clds, HCB	OC	Corpo total	Exposição	Índia	Observacional	Senthilkumar et al., 2001
<i>P. pipistrellus</i>	Dieldrin	OC	Cérebro, fígado, tecido adiposo	Efeito	Inglaterra	Exp. manipulativo	Shore et al., 1996

(Continua)

Tabela 1.1. Continuação

Espécie	Agrotóxico	Classe	Material biológico	Biomarcador analisado	País	Tipo de estudo	Referência
<i>P. pipistrellus</i>	Pentaclorofenol e permetrina	OC, PI	Fígado, tecido adiposo, rim e carcaça	Efeito	Inglaterra	Exp. manipulativo	Shore et al., 1991
<i>Sturnira hondurensis</i>	HCH, drines, endosulfan, Cld, DDT, Hep	OC	Carcaça	Exposição	México	Exp. natural	Valdespino, Sosa, 2017
<i>Chaerophon pumilus</i> , <i>Mops condylurus</i> , <i>Nycteris macrotis</i> , <i>Pipistrellus inexpectatus</i> , <i>Nycticeinops schlieffenii</i> , <i>Neoromicia guineensis</i> , <i>Neoromicia somalica</i>	DDTs, Endosulfan	OC	Carcaça	Exposição	Benin	Exp. natural	Stechert et al., 2014
<i>P. pipistrellus</i> , <i>Nyctalus noctula</i> , <i>P. auritus</i> , <i>Plecotus austriacus</i> , <i>M. myotis</i>	DDE, HCB, lindano	OC	Tecido adiposo	Exposição	Alemanha	Exp. natural	Streit et al., 1995
<i>P. pipistrellus</i>	Lindano	OC	Taxa metabólica	Efeito	Inglaterra	Exp. manipulativo	Swanepoel et al., 1999
<i>T. brasiliensis</i>	DDE, DDT, Hep, lindano	OC	Cérebro, carcaça (exceto pés, asas, pele, trato gastrointestinal, embrião e crânio), embrião	Exposição (transferência placentária)	EUA	Observacional	Thies; McBee, 1994
<i>T. brasiliensis</i> , <i>M. velifer</i>	DDE	OC	Cérebro, embrião, carcaça (exceto pés, asas, pele, trato gastrointestinal)	Exposição	EUA	Observacional	Thies; Thies, 1997
<i>T. brasiliensis</i>	DDE	OC	Cérebro, carcaça (exceto pés, asas, pele, trato gastrointestinal), rim, baço e fígado	Exposição, efeito	EUA	Exp. natural	Thies et al., 1996
<i>R. hipposideros</i>	Lindano, endosulfan	OC	Guano	Exposição	França	Exp. natural	Afonso et al., 2016
<i>A. lituratus</i>	Endosulfan	OC	Fígado, tecido adiposo, rim	Efeito	Brasil	Exp. manipulativo	Oliveira et al., 2017
<i>A. lituratus</i>	Deltametrina	PI	Sangue, músculo peitoral, fígado	Efeito	Brasil	Exp. manipulativo	Oliveira et al., 2018

(Continua)

Tabela 1.1. Continuação

Espécie	Agrotóxico	Classe	Material biológico	Biomarcador analisado	País	Tipo de estudo	Referência
<i>Antrozous pallidus</i> , <i>E. fuscus</i> , <i>T. brasiliensis</i> , <i>Leptonycteris</i> <i>sanborni</i> , <i>Macrotus</i> <i>waterhousii</i> , <i>Pipistrellus</i> <i>hesperus</i>	DDTs, toxafeno	OC	Carcaça (exceto feto, glândulas mamárias, trato gastrointestinal, fígado, mandíbula, cérebro)	Exposição	EUA	Observacional	Reidinger, 1976
<i>P. pipistrellus</i>	Lindano	OC	Tecido adiposo, fígado, pele e carcaça	Efeito	Inglaterra	Exp. manipulativo	Boyd et al., 1988
<i>Eidolon helvum</i>	Carbaril	CAR	Sangue, retina, cérebro	Exposição	EUA	Qualitativo	Seling; Lewandowski, 2017
<i>M. grisecens</i>	DDE, Dieldrin	OC	Guano	Exposição	EUA	Observacional	Sasse, 2005
<i>M. lucifugus</i> , <i>E. fuscus</i>	Metil paration	OP	Longevidade e atividade AChE	Efeito	EUA	Exp. manipulativo	Clark Jr., 1986
<i>M. grisecens</i>	Dieldrin, Hepx, Oxi, DDE, Cld, nonaclaro, endrin	OC	Cérebro, carcaça e leite	Exposição	EUA	Exp. natural	Clark Jr et al., 1983b
<i>M. grisecens</i>	DDTs, Dieldrin, Hepx, Oxi, nonaclaro, Endrin, Toxafeno, Mirex	OC	Cérebro, carcaça (exceto pés, asas, pele, trato gastrointestinal), guano, leite	Exposição	EUA	Exp. natural	Clark Jr et al., 1988
<i>E. fuscus</i>	DDT, DDE, HCB, Oxi, dieldrin, Hepx, mirex e nonaclaro	OC	Carcaça (exceto pés, asas, pele, trato gastrointestinal)	Exposição/Efeito	EUA	Exp. manipulativo	Clark; Lamont, 1976b
<i>M. lucifugus</i>	Acefato	OP	Cérebro, soro	Determinação de dose, avaliação da atividade de ChE	EUA	Exp. manipulativo	Clark; Rattner, 1987
<i>M. lucifugus</i>	DDT e Cld	OC	Carcaça - sem análise de resíduos	Exposição	EUA	Qualitativo	Kunz et al., 1977
<i>Myotis dasycneme</i>	pentaclorobenzeno, lindano, diclorobenzofenona, DDTs, pentaclorociclohexano, Dieldrin, Pentaclorofenol,	OC	Carcaça, cérebro, fígado	Exposição	Países baixos	Observacional	Leeuwangh; Voûte, 1985
<i>E. fuscus</i> , <i>M. lucifugus</i>	Hepx, Oxi, nonaclaro, dieldrin	OC	Cérebro	Exposição	EUA	Observacional	Stansley et al., 2001
<i>P. pipistrellus</i>	DDTs, aldrin, Heps, HCB, HCHs, pentaclorobenzeno	OC	carcaça, fígado, rim, cérebro, gordura	Exposição	Alemanha	Observacional	Nagel; Disser, 1990

(Continua)

Tabela 1.1. Continuação

Espécie	Agrotóxico	Classe	Material biológico	Biomarcador analisado	País	Tipo de estudo	Referência
<i>Epitesicus pumilis</i> , <i>Taphozous georgianus</i> , <i>Pteropus alecto gouldii</i>	DDTs, Drines, Lindano, HCB	OC	gordura, carcaça (exceto pele)	Exposição	Austrália	Exp. natural	Best, 1973
<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i>	DDE, DDT, Dieldrin, Clds, hep x	OC	Carcaça (exceto asa, pele, pés, trato gastrointestinal), guano, embrião, cérebro	Exposição	EUA	Exp. natural	Clark et al., 1975
<i>E. fuscus</i>	DDE, Dieldrin	OC	Guano	Exposição	EUA	Observacional	Clark et al., 1986
<i>E. fuscus</i> , <i>M. lucifugus</i> , <i>P. subflavus</i>	DDE	OC	Tecido adiposo	Exposição	EUA	Exp. natural	Clark; Krynitsky, 1983
<i>T. brasiliensis mexicana</i>	DDT, DDE	OC	Não especificado	Exposição	EUA	Observacional	Constantine et al., 1968
<i>T. brasiliensis mexicana</i>	DDTs, Dieldrin, Endrin, toxafeno,	OC	Carcaça (exceto asa, pele, pés, cérebro, trato gastrointestinal), cérebro	Exposição	EUA	Exp. natural	Geluso et al., 1981
<i>Miniopterus schreibersii</i> ; <i>Pipistrellus pipistrellus</i> ; <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> ; <i>Plecotus austriacus</i> ; <i>Myotis myotis</i>	Dieldrin, Hep x, DDTs, lindano, HCH, fenitrothion	OC	Carcaça	Exposição	Espanha	Qualitativo	Guillén et al., 1991
<i>Hipposideros commersoni</i> ; <i>Scotophilus nigrata</i>	DDE, Dieldrin	OC	Fígado, tecido adiposo	Exposição	Nigéria	Observacional	Koeman et al., 1971
<i>Scotophilus borbonicus</i> , <i>Rhinolophus hildebrandti</i> , <i>Nycticeinops schlieffeni</i> , <i>Nycteris thebaica</i> , <i>Scotophilus dinganii</i> , <i>Epitesicus capensis</i>	DDTs	OC	Vísceras	Exposição	Zimbábue	Observacional	Matthiessen, 1985
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i> , <i>P. pipistrellus</i> , <i>M. mystacinus</i> , <i>Plecotus spp</i> , <i>Myotis nattereri</i> , <i>M. daubentoni</i> <i>Myotis brandii</i>	Lindano, Dieldrin	OC	Fígado, pelo, lavado corporal	Exposição	Inglaterra	Observacional	Mitchell-Jones et al., 1989

(Continua)

Tabela 1.1. Continuação

<i>Espécie</i>	Agrotóxico	Classe	Material biológico	Biomarcador analisado	País	Tipo de estudo	Referência
<i>Micropteropus pusillus</i> , <i>Lissonycteris angolensis</i> , <i>Hipposideros commersoni</i> <i>gigas</i>	Dieldrin	OC	Não especificado	Exposição	Camarões	Exp. manipulativo	Müller et al., 1981
<i>Tadarida brasiliensis</i>	DDE, DDT	OC	Carcaça (exceto asas, pés, trato gastrointestinal, cabeça e pele), cérebro	Exposição	EUA	Exp. Natural	White; Krynitsky, 1986
<i>R. hipposideros</i>	DDTs, HCHs, aldrin, dieldrin, HCB	OC	Guano	Exposição	França	Exp. natural	Hamon, 1990
<i>M. grisecens</i>	DDE, Dieldrin, Cld, Hepx	OC	Cérebro, carcaça, guano	Exposição	EUA	Exp. natural	Clawson, 1991
<i>Nycticeius humeralis</i> , <i>L. borealis</i>	Mirex	OC	Corpo total	Exposição	EUA	Exp. natural	Wheeler et al., 1977
<i>A. lituratus</i>	Tebuconazol	Fun	Testículo, epidídimo	Efeito	Brasil	Exp. manipulativo	Machado-Neves et al., 2018
<i>M. lucifugus</i>	DDT, DDE, Oxi, dieldrin	OC	Carcaça (exceto asas, pés, trato gastrointestinal, cabeça e pele)	Exposição	EUA	Observacional	Clark; Krynitsky, 1978
<i>M. lucifugus</i> , <i>E. fuscus</i> , <i>P. subflavus</i>	DDTs, dieldrin, Oxi	OC	Cérebro, carcaça (exceto asa, pele, pés, trato gastrointestinal), leite, insetos mastigados, guano	Exposição	EUA	Exp. natural	Clark; Prouty, 1976
<i>M. grisecens</i>	DDE, DDT, dieldrin, Hepx, nonaclaro, Clds	OC	Cérebro, carcaça (exceto asa, pele, pés, trato gastrointestinal)	Exposição	EUA	Exp. natural	Clark et al., 1980
<i>E. fuscus</i>	DDTs	OC	Cérebro, fígado, rim, lavado da superfície das asas	Exposição	EUA	Qualitativo	Buchweitz et al., 2018
<i>L. borealis</i>	DDT	OC	-	Exposição	EUA	Qualitativo	Benton, 1951
<i>Myotis yumanensis</i>	DDT	OC	-	Exposição	México	Qualitativo	Dalquest, 1951

OC = Organoclorado; OP = Organofosforado; PIR = Piretróide; CAR = Carbamato; NEO = Neonicotinoide; ESP = Espinosina; FUN = Fungicida

DDT = Diclorodifeniltricloroetano, DDD = Diclorodifenildicloroetano, DDE = Diclorodifenildicloroetileno, HCH = Hexaclorociclohexano, HCB = Hexaclorobenzeno, Hep = Heptacloro, Hepx = Heptacloro epóxido, Oxi = Oxiclordano, Cld = Clordano, Clds = clordano + oxiclordano, DCB = diclorobenzofenona, TBTO = óxido de estanho tributílico, DDTs = DDT+DDE+DDD, HCHs = Hexaclorociclohexanos e isômeros α , β , γ , δ , Drines = aldrin, dieldrin, endrin. Heps = heptacloro + heptacloro epóxido.

Síntese histórica da exposição de morcegos à agrotóxicos

O histórico de estudos sobre agrotóxicos em morcegos acompanha a história da ecotoxicologia de animais silvestres. Inicialmente os trabalhos eram voltados para relatos de intoxicações agudas, geralmente acidentais (Rattner, 2009; Kendall, 2016). Os primeiros relatos envolvendo morcegos foram publicados em 1951 (Benton, 1951; Dalquest, 1951) e, até o final da década de 80, a maioria dos trabalhos relatavam exposição por meio de determinação de resíduos, relacionavam mortalidade de colônias à exposição ou determinavam concentração e dose letal.

Neste período, os inseticidas organoclorados eram os principais agrotóxicos estudados, especialmente o DDT e seus metabólitos. Os organoclorados (OCs) foram largamente utilizados até a década de 70, quando seus efeitos na reprodução de populações de algumas aves de rapina começaram a ser observados (Ratcliffe, 1967). Esses efeitos somados à preocupação pública, motivada pelo livro *Primavera Silenciosa*, publicado em 1969 por Rachel Carson, levaram a proibição ou restrição do uso desses compostos em vários países (Rattner, 2009). As décadas de 70 e 80 foram as que apresentaram maior número de publicações, havendo uma diminuição e pouca variação nas décadas seguintes (Figura 1. 1).

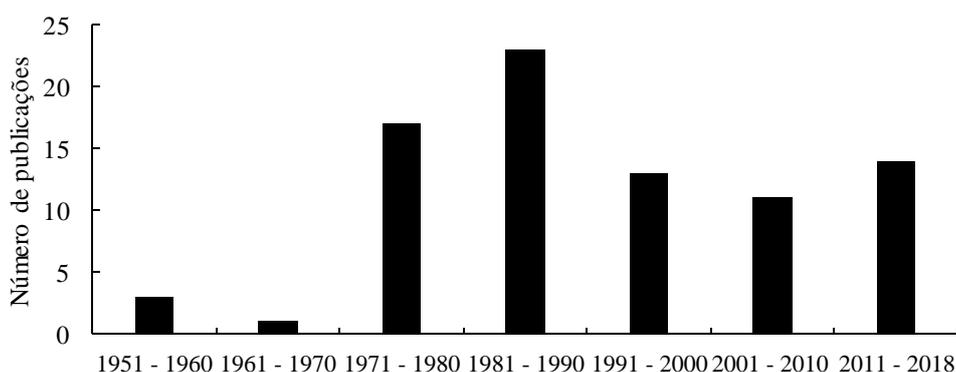


Figura 1. 1. Número de estudos sobre agrotóxicos em morcegos publicados entre 1951 e 2018.

O uso de inseticidas de outras classes foi intensificado após as restrições impostas aos OCs (Clark, 1988; Mitra; Maitra, 2018), mas os efeitos desses inseticidas em morcegos só começaram a ser investigados após 2010, por meio de biomarcadores histopatológicos, genotóxicos e parâmetros bioquímicos e metabólicos. Embora tenha

havido um avanço nas técnicas analíticas para detecção de contaminantes em diferentes matrizes e concentrações, a quantidade de estudos ainda é insuficiente quando comparado com a quantidade de ingredientes ativos utilizados na atualidade (Köhler; Triebkorn, 2013; Kendall, 2016).

Espécies e países estudados

De modo geral, os estudos se concentram em áreas de clima temperado, tendo sido desenvolvidos sobretudo em países com alto potencial científico, como os EUA e países da Europa, correspondendo a 57% e 20%, respectivamente, do total de estudos (Figura 1. 2).

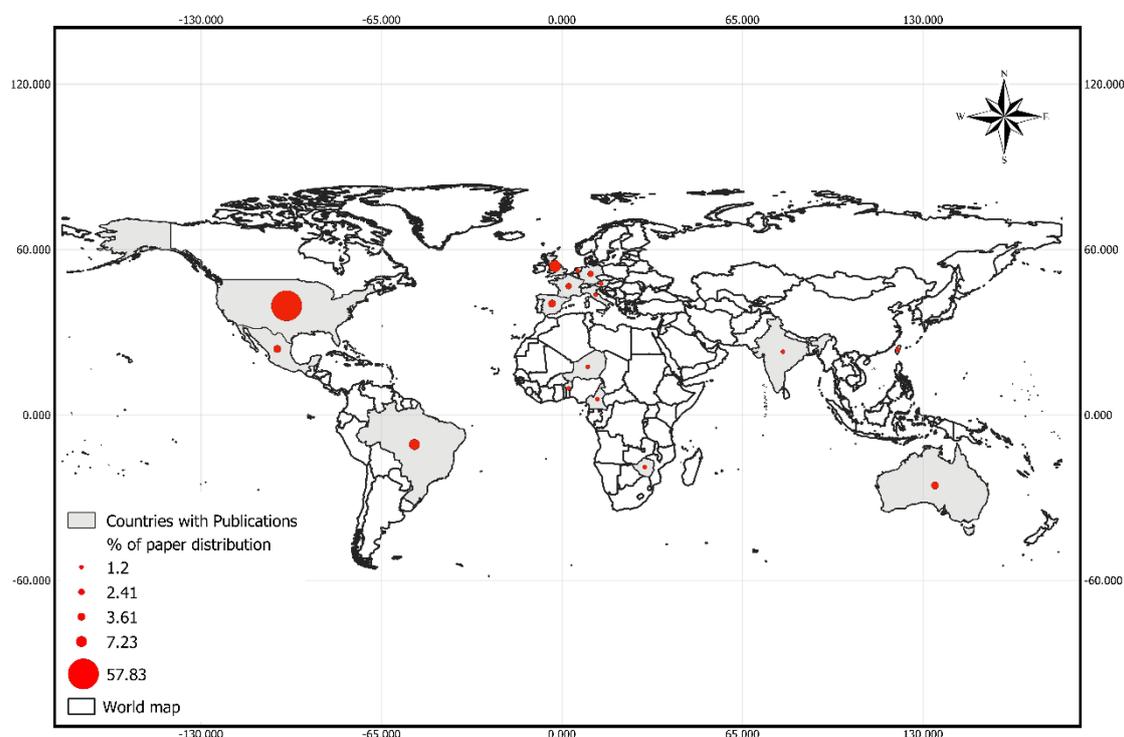


Figura 1. 2. Mapa mundi com destaque dos países que apresentaram publicações relativas aos efeitos de agrotóxicos em morcegos (cinza) e frequência relativa percentual (círculos em verde) dos estudos em cada país.

De acordo com a literatura consultada, 66 espécies, distribuídas em nove famílias, já foram objeto de estudos envolvendo agrotóxicos (Tabela 1. 2). Esse número representa aproximadamente 5% das espécies de todo mundo, que somam mais de 1.300 espécies, distribuídas em 20 famílias (Fenton; Simmons, 2014). Clark e Shore (2001) contabilizaram 63 espécies na revisão sobre contaminantes orgânicos, principalmente OCs e PCBs, em morcegos. Isso mostra que mesmo após quase duas décadas de pesquisas, o número de espécies estudadas permaneceu praticamente inalterado.

A Família Vespertilionidae foi a mais estudada, representando cerca de 73% (n=42) das espécies estudadas (Tabela 1. 2). Esta família apresenta a maior riqueza de espécies, ampla distribuição geográfica e dieta quase exclusivamente insetívora, com exceção de algumas espécies que consomem peixes (Altenbach, 1989). Embora tenha sido a família mais estudada, cerca de 50% dos trabalhos foram conduzidos com apenas quatro espécies, sendo elas *Eptesicus fuscus* (n = 17), *Pipistrellus pipistrellus* (n=14), *Myotis lucifugus* (n = 13) e *M. grisescens* (n = 9). As espécies mais estudadas têm relação com a distribuição geográfica dos trabalhos. À exceção de *P. pipistrellus*, cuja distribuição compreende Europa, parte do Oriente Médio e Ásia, todas as demais ocorrem nos EUA, país que lidera o número de pesquisas sobre o tema.

Do total de espécies já estudadas, quase todas são insetívoras. Morcegos desta guilda trófica têm sido considerados bons modelos para avaliação e monitoramento da contaminação ambiental, uma vez que eles possuem características biológicas e ecológicas que os tornam mais suscetíveis à exposição e bioacumulação (Zukal et al., 2015). Por serem animais voadores e de pequeno porte, possuem altas taxas metabólicas, necessitando consumir grande número de presas, o que aumenta as chances de contaminação por via oral (Clark et al., 1988). Embora o consumo de presas varie conforme condição reprodutiva, espécie e estação climática, é estimado que um morcego possa consumir mais de 100% de sua massa corporal em apenas uma noite (Kunz et al., 2011). São animais que apresentam elevada longevidade, característica que aumenta o tempo de exposição e acumulação de contaminantes ao longo da vida (Wilkinson; South, 2002). Além disso, ocupam elevado nível trófico na cadeia alimentar, o que os torna mais suscetíveis à bioacumulação (Jones et al., 2009), sendo importante guilda para investigação da acumulação destes produtos ao longo da cadeia alimentar.

Entretanto, algumas dessas características, como longevidade, taxa metabólica e posição na cadeia trófica, são comuns a morcegos de outras guildas tróficas. É possível que morcegos de diferentes guildas sejam afetados de maneira diferente, uma vez que a exposição aos agrotóxicos, bem como seus efeitos, podem variar conforme os hábitos alimentares, forrageio, comportamento e metabolismo (Stansley et al., 2001; Wickramasinghe et al., 2003; Schneeberger et al., 2014).

Somente 13% dos trabalhos consultados investigaram outras guildas tróficas (Tabela 1. 2). O único trabalho encontrado com morcego nectarívoro foi com a espécie

Leptonycteris sanborni, no qual não há relato de efeitos, apenas determinação de resíduos e metabólitos de DDT (Reidinger, 1976). Efeitos letais e subletais causados por agrotóxicos em insetos polinizadores têm sido reportados em várias partes do mundo (Desneux et al., 2007; Goulson, 2013), mas os efeitos causados em vertebrados polinizadores ainda são negligenciados (Bishop et al., 2018; Graves et al., 2019). Com relação aos morcegos frugívoros, foram encontrados 10 trabalhos com oito espécies, sendo dois filostomídeos (*Artibeus lituratus* e *Sturnira hondurensis*) e seis pteropodídeos (*Cynopterus sphinx*, *Eidolon helvum*, *Lissonycteris angolensis*, *Micropteropus pusillus*, *Pteropus alecto gouldii*, *Pteropus mariannus*). Embora estes animais possam estar expostos direta ou indiretamente aos agrotóxicos, existe pouca informação disponível para avaliar o impacto da contaminação em suas populações. Morcegos frugívoros podem ser uma boa alternativa para esses estudos de biomonitoramento por serem mais fáceis de capturar que os insetívoros (Valdespino; Souza, 2017), e serem indicativo da exposição direta ao uso de agrotóxicos em cultivares. Não foi encontrado nenhum trabalho com morcegos hematófagos, onívoros ou carnívoros, sendo, portanto, mais uma lacuna de investigação na ciência.

As regiões tropicais são as que apresentam a maior diversidade e riqueza de espécies (Mickleburgh et al., 2002; Alberico et al., 2000). Por outro lado, são áreas que vêm sofrendo grande pressão de uso de agrotóxicos utilizados na produção de *commodities*, como por exemplo, grãos, óleo de palma, cana de açúcar entre outras (Schiesari; Grillitsch, 2011; Schreinemachers; Tipraqsa, 2012; Constantini, 2015). Dos estudos consultados, apenas nove dos estudos foram conduzidos nessa nestas áreas. Áreas tropicais são particularmente interessantes para estudos com ecotoxicologia de morcegos porque, diferentemente das áreas temperadas, possuem espécies com diversos hábitos alimentares (*e.g.* frugívoros, nectarívoros, insetívoros, hematófagos e carnívoros) (Mickleburgh et al., 2002; Clare, et al., 2011).

Tabela 1. 2. Espécies, separadas por família, guildas tróficas e número de trabalhos em que foram alvo de estudos no período de 1951 início de 2018.

Famílias *	Espécies	Guilda trófica	Número de trabalhos
(Número de espécies)			
Emballonuridae (54)	<i>Taphozous georgianus</i>	Insetívoro	1
Hipposideridae (9)	<i>Hipposideros commersoni</i>	Insetívoro	1
	<i>Hipposideros gigas</i>	Insetívoro	1
	<i>Hipposideros terasensis</i>	Insetívoro	1
Miniopteridae (29)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Insetívoro	4
	<i>Chaerephon pumilus</i>	Insetívoro	1
Molossidae (113)	<i>Mops condylurus</i>	Insetívoro	1
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Insetívoro	14
	<i>Nycteris macrotis</i>	Insetívoro	1
Nycteridae (16)	<i>Nycteris thebaica</i>	Insetívoro	1
	<i>Artibeus lituratus</i>	Frugívoro	6
Phyllostomidae (204)	<i>Leptonycteris sanborni</i>	Nectarívoro	1
	<i>Macrotus waterhousii</i>	Insetívoro	1
	<i>Sturnira hondurensis</i>	Frugívoro	1
	<i>Cynopterus sphinx</i>	Frugívoro	1
	<i>Eidolon helvum</i>	Frugívoro	1
	<i>Lissonycteris angolensis</i>	Frugívoro	1
Pteropodidae (198)	<i>Micropteropus pusillus</i>	Frugívoro	1
	<i>Pteropus alecto gouldii</i>	Frugívoro	1
	<i>Pteropus mariannus</i>	Frugívoro	1
	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Insetívoro	3
Rhinolophidae (97)	<i>Rhinolophus hildebrandt</i>	Insetívoro	1
	<i>Rhinolophus hipposideros</i>	Insetívoro	3
	<i>Antrozous pallidus</i>	Insetívoro	1
	<i>Eptesicus capensis</i>	Insetívoro	1
	<i>Eptesicus fuscus</i>	Insetívoro	17
	<i>Eptesicus pumilis</i>	Insetívoro	1
	<i>Eptesicus serotinus</i>	Insetívoro	1
Vespertilionidae (455)	<i>Lasionycteris noctivagans</i>	Insetívoro	2
	<i>Lasiurus borealis</i>	Insetívoro	4
	<i>Myotis brandtii</i>	Insetívoro	1
	<i>Myotis californicus</i>	Insetívoro	1
	<i>Myotis dasycneme</i>	Insetívoro	1
	<i>Myotis daubentoni</i>	Insetívoro	2
	<i>Myotis emarginatus</i>	Insetívoro	1

<i>Myotis evotis</i>	Insetívoro	1
<i>Myotis grisecens</i>	Insetívoro	9
<i>Myotis leibii</i>	Insetívoro	1
<i>Myotis lucifugus</i>	Insetívoro	13
<i>Myotis myotis</i>	Insetívoro	2
<i>Myotis mystacinus</i>	Insetívoro	2
<i>Myotis nattereri</i>	Insetívoro	2
<i>Myotis septentrionalis</i>	Insetívoro	2
<i>Myotis sodalis</i>	Insetívoro	2
<i>Myotis velifer</i>	Insetívoro	1
<i>Myotis volans</i>	Insetívoro	1
<i>Neoromicia guineensis</i>	Insetívoro	1
<i>Neoromicia somalica</i>	Insetívoro	1
<i>Nyctalus noctula</i>	Insetívoro	2
<i>Nycticeinops schlieffeni</i>	Insetívoro	2
<i>Nycticeius humeralis</i>	Insetívoro	1
<i>Perimyotis subflavus</i>	Insetívoro	1
<i>Pipistrellus hesperus</i>	Insetívoro	1
<i>Pipistrellus inexpectatus</i>	Insetívoro	1
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	Insetívoro	1
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Insetívoro	14
<i>Pipistrellus subflavus</i>	Insetívoro	3
<i>Plecotus auritus</i>	Insetívoro	2
<i>Plecotus austriacus</i>	Insetívoro	2
<i>Plecotus sp.</i>	Insetívoro	1
<i>Scotophilus borbonicus</i>	Insetívoro	1
<i>Scotophilus dinganii</i>	Insetívoro	1
<i>Scotophilus nigrita</i>	Insetívoro	1
<i>Vespertilio murinus</i>	Insetívoro	1

* Fenton; Simmons, 2014

Bioacumulação

Os registros de bioacumulação de agrotóxicos em morcegos na literatura são, em grande parte, de inseticidas organoclorados, os quais são reconhecidamente persistentes e com grande potencial para bioacumulação (Stockholm Convention, 2009). Compostos lipofílicos são armazenados no tecido adiposo desses animais, podendo provocar efeitos tardios quando essa gordura é mobilizada para migração ou hibernação (Clark; Prouty, 1976; Geluso et al., 1976).

Os dados disponíveis na literatura referente às concentrações de agrotóxicos acumulados sugerem que, ao longo dos anos, houve uma mudança no padrão de exposição, de modo que hoje os morcegos estão expostos às concentrações mais baixas. A diminuição das concentrações de resíduos de OCs ocorreu principalmente após a proibição e restrição do uso desses inseticidas (Bayat et al., 2014). Entretanto, ainda que sejam proibidos, é importante que a presença de seus resíduos seja investigada, uma vez que há registros destes resíduos em morcegos em locais onde tais produtos não são, ou não foram, utilizados oficialmente (Kannan et al., 2010; Buchweitz et al., 2018).

A bioacumulação de resíduos de agrotóxicos de outras classes também precisa ser investigada em função da pequena proporção de estudos. Tal tipo de investigação se torna relevante, visto que, na atualidade, estas outras classes de agrotóxicos têm sido utilizadas com maior intensidade, assim como têm sido amplamente introduzidas no mercado mais recentemente. Inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides também já foram detectados em morcegos e embora sejam considerados de baixo potencial para bioacumulação, são compostos cuja entrada no ambiente é contínua e intensa. Resíduos destas classes foram encontrados tanto em tecidos de morcegos quanto no guano, podendo ser um indicativo de exposição oral recente ou nas proximidades dos abrigos (Eidels et al., 2007; 2013).

As variações nas concentrações de resíduos detectadas podem ser explicadas pelas diferenças relacionadas à dieta (Clawson; Clark, 1989; O'Shea et al., 2001), idade e sexo (Clark; Lamont, 1976b; Guillén et al., 1994; Thies; Thies, 1997), biologia da espécie e hábitos de forrageio (Streit et al., 1995), tipos de abrigos utilizados (Racey; Swift, 1986; Luffl et al., 2005), metabolismo (Hernandez et al., 1993) e estação climática (Thies; Thies, 1997). Comparações entre estudos são difíceis de serem formuladas por causa da ausência de padronização quanto aos tecidos utilizados, métodos de extração e determinação dos resíduos e análises estatísticas (Bayat et al., 2014).

Agrotóxicos

Foi encontrado um total de 37 substâncias ou seus metabólitos nos artigos que tem morcegos como objeto de estudo. Desse número, apenas duas são utilizadas como fungicidas, uma do grupo triazol e outra da classe dos organoclorados. Todas as outras

substâncias são utilizadas como inseticidas, os quais estão divididos em seis classes, sendo elas: organoclorado (n=20), organofosforado (n=6), piretróide (n=6), carbamato (n=2), espinosina (n=1) e neonicotinoide (n=1). Essas são as classes de inseticidas mais consumidas no mundo. Efeitos causados por inseticidas são mais estudados, embora a quantidade de inseticidas utilizados tenha sido superada por herbicidas e fungicidas. (Köhler; Triebkorn, 2013; Hossain, 2015; Zhang et al., 2018). O uso de fungicidas tem aumentado continuamente, mas seus efeitos têm recebido menor atenção quando comparado aos inseticidas ou herbicidas (Zhang et al., 2018; Zubrod et al., 2019). Não foi encontrado nenhum estudo que investigou efeitos ou relatou exposição de morcegos a herbicidas, sendo tal fato de grande relevância uma vez que o produto mundialmente mais utilizado é o Glifosato, herbicida da classe das glicinas modificadas.

Inseticidas Organoclorados

Inseticidas organoclorados (OCs) são compostos formados por carbono, hidrogênio e cloro em sua estrutura. São lipofílicos, quimicamente estáveis, persistentes e podem ser classificados em três subgrupos conforme sua estrutura química, sendo eles: hexaclorociclohexano e seus isômeros, como, por exemplo, o lindano (γ -HCH); os Ciclodienos, como aldrin, dieldrin, endrin, clordano, heptacloro e endosulfam; e dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) e análogos, como metoxicloro e dicofol (Maroni et al., 2000). De modo geral, todos atuam no sistema nervoso central causando hiperexcitação, mas com mecanismos de ação diferentes. Os compostos do grupo do DDT interferem nos canais de sódio retardando seu fechamento e provocando um aumento no período de excitabilidade (Vijverberg, et al., 1982; Davies et al., 2007). Tanto os ciclodienos como os hexaclorociclohexanos interagem com receptores do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA), bloqueando sua ação inibitória no sistema nervoso central (Guíasuddin; Matsumura, 1982; Bloomquist, 1993).

Os OCs foram largamente utilizados na agricultura e controle de insetos vetores de doenças tropicais entre as décadas 1940 e 1980. Resíduos de OCs já foram encontrados no solo, água, neve, ar e em animais de todo planeta, inclusive em regiões remotas, onde não houve uso destes compostos (Ramesh et al., 1992; White; Krynitsky, 1986; Simonich; Hites, 1995; Bigot et al., 2016; Camenzuli et al., 2016). Devido a elevada toxicidade, persistência e potencial para bioacumulação e biomagnificação, vários OCs foram banidos em diversos países. Atualmente, muitos desses compostos estão incluídos na lista de Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) elaborada na Convenção

de Estocolmo. Nesta convenção, foi firmado um compromisso para eliminação e restrição de agrotóxicos como dieldrin, aldrin, endrin, clordano, heptacloro, endosulfam, hexaclorociclohexanos, entre outros (Stockholm Convention, 2018).

Os OCs foram os agrotóxicos que apresentaram maior número de citações, em 89% dos trabalhos, que incluem 21 tipos de compostos ou metabólitos destes, sendo os mais citados: DDTs (DDT, DDE, DDD) (68%), Drines (dieldrin, aldrin, edrin) (48%), HPEs (heptacloro, heptacloro-epóxido) (28%) CHLs (clordano, oxiclordano) (25%) e HCHs (hexaclorociclohexano e Lindano) (24%).

O DDT é provavelmente o inseticida mais conhecido e foi amplamente utilizado entre as décadas de 1940 e 1970. Inicialmente, foi utilizado no controle de vetores de doenças como tifo e malária, e posteriormente passou a ser usado na agricultura (IARC, 1974; Turusov et al., 2002). Em decorrência da elevada persistência e dos impactos ambientais provocados em populações de todos os níveis tróficos, esse inseticida começou a ser banido a partir da década de 70 e seu uso foi diminuindo continuamente, persistindo em alguns países, com uso restrito para o controle de vetores de doenças como malária, leishmaniose e dengue (Turusov et al., 2002; Coleman et al., 2015; Viljoen et al., 2016; Van den Berg et al., 2017).

O dieldrin foi introduzido na década de 50 e também foi muito utilizado na agricultura e controle de vetores (Maroni et al., 2000). É também produto da epoxidação do inseticida aldrin, o qual é dificilmente encontrado em quantidades significativas em animais expostos, uma vez que essa conversão é rápida (Zitko, 2003). De modo similar, o heptacloro, após sofrer epoxidação, dá origem ao heptacloro-epóxido (Gannon; Bigger, 1958). A epoxidação, tanto do aldrin quanto do heptacloro, pode ocorrer em organismos e no ambiente (Bann et al., 1956; Gannon; Bigger, 1958; Gannon; Decker, 1958).

O lindano, ou γ -hexaclorociclohexano, é um dos oito isômeros que formam o hexaclorociclohexano técnico (HCH). É o isômero que possui propriedade inseticida e foi um dos OCs mais utilizados após a segunda guerra (Willett et al., 1998), e embora tenha sido banido de alguns países a partir da década de 50, seu uso persistiu até meados de 2000 (Vijgen et al., 2011).

Do total de artigos encontrados com OCs (n=73), 60 trabalhos relatam exposição por meio da determinação de resíduos ou por verificação de morte após aplicação de DDT (Benton, 1951; Dalquest, 1951). Alguns poucos estudos experimentais manipulativos

determinaram dose letal (Clark; Kroll, 1977; Clark et al., 1978; Clark; Prouty, 1984; Luckens; Davis, 1965) e poucos avaliaram efeitos por meio de parâmetros metabólicos, histopatológicos e genotóxicos (Jefferies, 1972; Thies et al., 1996; Swanepoel et al., 1999; Brinati et al., 2016).

Piretróides

Os piretróides (Figura 1. 3) são inseticidas sintéticos derivados de piretrinas, substâncias encontradas naturalmente em flores do gênero *Chrysanthemum* (Katsuda, 1999). As piretrinas são compostos instáveis ao ar e à luz, e por isso seu uso como inseticida na agricultura foi limitado. Os primeiros piretróides foram desenvolvidos na década de 1940, mas ainda apresentavam fotoinstabilidade e, em 1973 foi desenvolvida a permetrina, o primeiro piretroide com fotoestabilidade adequada para o uso na agricultura em maior escala (Elliot et al., 1973; Soderlund et al., 2002).

Os piretroides se tornaram populares na década de 1980 porque apresentavam ação eficaz e amplo espectro contra insetos resistentes aos organofosforados e carbamatos. Além disso, piretroides têm menor toxicidade aguda para mamíferos e sofrem degradação mais rapidamente no ambiente que os inseticidas anteriores (Katsuda, 1999). Atualmente, estão entre os inseticidas mais utilizados em todo mundo, sendo empregados na agricultura, saúde pública e ambientes domésticos (Katsuda, 1999; Zhang et al., 2018).

Estes inseticidas podem ser subdivididos em dois grupos de acordo com a toxicidade e a estrutura química. Os piretróides do tipo I (aletrina, permetrina, bifentrina entre outros) não possuem o grupo ciano ligado ao carbono α na porção álcool do composto, enquanto os piretróides do grupo II (fenvalerato, deltametrina, cipermetrina entre outros) possuem o grupo ciano na porção álcool (Thatheyus; Selvam, 2013) (Figura 1. 3). De modo geral, são inseticidas neurotóxicos, que alteram a voltagem nos canais de sódio retardando seu fechamento e criando um estado de hiperexcitação. Os piretróides do tipo II, além de apresentarem esse efeito mais prolongado que os do tipo I, podem se ligar aos receptores GABA, bloqueando os canais de cloro (Forshaw et al., 2000; Bradberry et al., 2005).

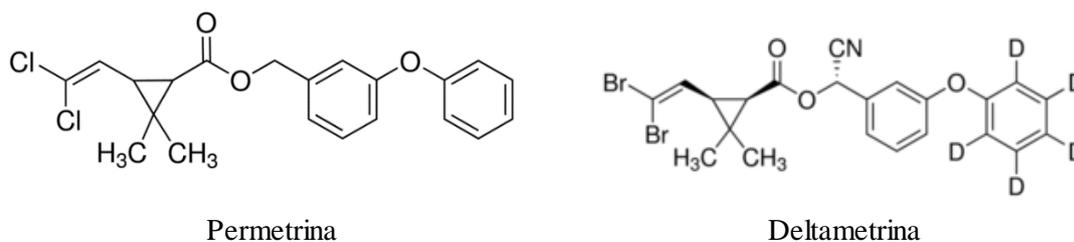


Figura 1. 3. Estrutura molecular de piretróide do tipo I (permetrina) e do tipo II (Deltametrina).

Os piretróides são absorvidos por via oral e pouco absorvidos pela via dérmica. São considerados seguros por serem metabolizados em compostos menos tóxicos e não sofrerem bioacumulação, apesar de serem lipofílicos (Soderlund et al., 2002). Entretanto, resíduos de piretróides já foram encontrados em tecido adiposo de cachorro (Andrade et al., 2010), fígado de golfinhos (Alonso et al., 2012), peixes (Corcellas et al., 2015), leite bovino e humano (Corcellas et al., 2012; Bedi et al., 2015). A persistência desses compostos no ambiente varia conforme a estrutura química e as condições ambientais, mas de modo geral são degradados no solo e sedimento (Meyer et al., 2013).

Dentre os piretróides mais utilizados, a cipermetrina é o inseticida mais frequentemente detectado no ambiente e organismos, seguido de permetrina, deltametrina, fenvalerato e bifentrin (Tang et al., 2018). A exposição a estes compostos está relacionada à carcinogenicidade (Shukla et al., 2002), genotoxicidade (Chauhan et al., 2007; Sankar et al., 2010), estresse oxidativo (Kale et al., 1999; Oliveira et al., 2018), alterações endócrinas (Du et al., 2010; Al-Hamdani; Yajurvedi, 2017) e imunológicas (Punareewattana et al., 2001; Wang et al., 2017).

Foram encontrados quatro trabalhos com inseticidas piretróides em morcegos, sendo três deles experimentais manipulativos, que avaliaram efeito e toxicidade de cipermetrina, deltametrina e permetrina nas espécies *Pipistrellus pipistrellus* e *Artibeus lituratus* (Shore et al., 1991; Rancey; Swift, 1986; Oliveira et al., 2018). Os efeitos relatados incluem estresse oxidativo no fígado e no músculo, além de alterações no metabolismo de carboidrato (Oliveira et al., 2018). O quarto trabalho reporta a presença de resíduos de bifentrin, lambda-cialotrin, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato em *Eptesicus fuscus* (Eidels et al., 2013), mas sem mencionar efeitos.

Organofosforados e Carbamatos

Inseticidas organofosforados (OFs) e carbamatos (CARs) possuem ação neurotóxica, atuando como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual é responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh), um neurotransmissor do sistema colinérgico. Quando o impulso nervoso atinge à fenda sináptica, a ACh é liberada na terminação nervosa e conduz a mensagem ao nervo adjacente. A transmissão do impulso é interrompida após a hidrólise do neurotransmissor pela AChE. Sendo assim, com a inativação da AChE, a transmissão do impulso não é interrompida ocorrendo um acúmulo de ACh na fenda sináptica e resultando em superestimulação (Costa, 2018). A fosforilação ou carbamilação da AChE, por OFs e CARs respectivamente, resulta em compostos intermediários, os quais são mais estáveis apresentando baixa taxa de hidrólise e regeneração. A hidrólise da AChE carbonilada é mais rápida que a fosforilada e por isso carbamilação é considerada um processo reversível. Por outro lado, a hidrólise da AChE fosforilada é tão baixa que a inativação da enzima é considerada irreversível (Kwong, 2002).

Os OFs se tornaram bastante populares na década de 70, em substituição aos OCs que passaram a ser banidos ou usados com restrição. Existem mais de 200 agrotóxicos organofosforados. São substâncias menos persistentes, porém apresentam maior toxicidade aguda quando comparados com OCs e ainda hoje são bastante utilizados devido ao baixo custo quando comparados com inseticidas mais novo (DuBois, 1971; Costa, 2018).

Os CARs por sua vez são agrotóxicos derivados do ácido carbâmico. O primeiro composto utilizado como inseticida foi introduzido no mercado em 1956 com o nome Carbaril. Dentre todos os inseticidas desta classe, este foi o mais utilizado em todo mundo (Agrawal; Sharma, 2010).

Embora sejam degradados mais facilmente que os OCs, resíduos de alguns OFs e CARs podem se acumular em pequenas concentrações em tecidos e órgãos de animais não alvo sendo excretados lentamente, ou podem permanecer por meses no solo e na vegetação (Kwong, 2002; Bondarenko et al., 2004; Roy et al., 2004; Tilak et al., 2004; Vengayil et al., 2011). Além disso, alguns inseticidas podem ser reaplicados repetidas vezes em uma mesma área, tornando a exposição mais prolongada ou intermitente.

Nos estudos revisados aqui, foram encontrados seis OFs, sendo eles clorpirifós (N=4), diazinon (N=2), metil paration (N=2), fentiona (N=1) e acefato (N=1) e apenas um carbamato, o carbaril (N=2).

Efeitos subletais causados por OFs e CARs descritos para mamíferos incluem interferências no comportamento (Grue et al., 1997; Story; Cox, 2001), na reprodução (Grue et al., 1997; Gupta et al., 2017), estresse oxidativo (Agrawal; Sharma, 2010), alterações metabólicas e endócrinas (Story; Cox, 2001; Amaral et al., 2012a), no sistema imunológico (Galloway; Handy, 2003; Dhouib et al., 2016) e na termorregulação (Grue et al., 1997; Eidels et al., 2016).

Nesta revisão, os artigos encontrados envolvendo morcegos e OFs incluem investigação de efeitos no metabolismo energético e lesões hepáticas causados por fentiona em *Artibeus lituratus* (Amaral et al., 2012), determinação de curva dose-resposta para efeitos subletais no comportamento e termorregulação causados por clorpirifós em *Eptesicus fuscus* (Eidels et al., 2016); determinação de resíduos de clorpirifós, diazinon, metil paration nas espécies *Myotis sodalis*, *M. septentrionalis* (Eidels et al., 2007), *E. fuscus* e *Lasiurus borealis* (Eidels et al., 2013); determinação de toxicidade aguda do acefato em *Myotis lucifugus* (Clark; Rattner, 1987) e metil paration em *M. lucifugus* e *E. fuscus* (Clark, 1986). Com relação aos CARs, foram encontrados apenas dois trabalhos com o inseticida carbaril, sendo um deles um relato de intoxicação de *Eidolon helvum* em um zoológico (Seling; Levandowsky, 2017) e outro uma avaliação de resíduos em *L. borealis* nos EUA (Eidels et al., 2013).

Neonicotinóides

Os neonicotinóides são inseticidas de ação sistêmica que atuam como agonistas nos receptores nicotínicos de acetilcolina no sistema nervoso, gerando excitação contínua nas membranas neuronais (Simon-Delso et al., 2015). De modo geral, apresentam maior toxicidade para insetos do que para vertebrados porque se ligam mais fortemente aos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos (Tomizawa; Casida, 2005). Essa classe de inseticidas foi introduzida em meados de 1990 e se tornou bastante popular a partir de 2000 em resposta ao aumento de resistência aos inseticidas já utilizados e da maior especificidade dos compostos deste grupo. Atualmente é uma das classes mais utilizadas em todo mundo (Simon-Delso et al., 2015; Wood; Goulson, 2017).

Esses inseticidas são altamente solúveis em água e podem ser persistentes em águas superficiais, subterrâneas e no solo (Morrissey et al., 2015; Wood; Goulson, 2017). Embora sua toxicidade seja considerada menos preocupante aos mamíferos, estudos têm demonstrado alterações na memória espacial (Hsiao et al., 2016), no crescimento e desenvolvimento, locomoção (Bhardwaj et al., 2010), indução de estresse oxidativo e inflamação no sistema nervoso e fígado (Duzguner; Erdogan, 2010), danos genotóxicos e citotóxicos (Karabay; Oguz, 2005; Demsia et al., 2007), além de terem sido classificados como disruptores endócrinos (Mikolić; Karačonji, 2018).

Foi encontrado somente um trabalho que investiga efeitos desta classe de inseticidas em morcegos, no qual foram observadas alterações na memória espacial de *Hipposideros terasensis*, causadas por apoptose em áreas do hipocampo, após exposição crônica a baixas doses de Imidacloprido, um dos neonicotinóides mais usados no mundo (Hsiao et al., 2016).

Espinosinas

Foi encontrado um trabalho classificado como experimental natural que investiga os efeitos do inseticida natural espinosade em *Artibeus lituratus* (Amaral et al., 2012b). O princípio ativo deste inseticida, pertencente ao grupo das espinosinas, metabólitos da bactéria *Sacharopolyspora spinosa*, atua no sistema nervoso, ativando os receptores nicotínicos e GABA (Salgado, 1998a; 1998b). Este inseticida apresenta vantagens em relação aos inseticidas sintéticos comumente utilizados, pois tem atividade relativamente seletiva, apresenta menor toxicidade, não sendo carcinogênico, mutagênico ou teratogênico para mamíferos, além de não ser persistente no ambiente (Kirst, 2010). Em Amaral e colaboradores (2012), não foi observado alteração no metabolismo energético, tendo sido registrado poucas alterações histopatológicas no fígado quando utilizado o espinosade nas doses recomendadas pelo fabricante.

Fungicidas

Os fungicidas são compostos utilizados para tratar doenças causadas por fungos ou controlar a infestação desses organismos. Até meados de 1940, os fungicidas utilizados eram compostos inorgânicos, tais como sulfato de cobre, cloreto de mercúrio, polissulfeto de cálcio, dentre outros. Com a expansão da indústria agroquímica, após a Segunda Guerra, teve início o desenvolvimento de fungicidas sintéticos e, em 1934, o primeiro fungicida sintético, um ditiocarbamato, foi introduzido no mercado (Russell,

2005). Desde então, o uso desses compostos tem aumentado ao longo dos anos (Zhang et al., 2018).

Nesta revisão, foram encontrados quatro estudos com fungicidas, sendo três com um fungicida clorado, o pentaclorofenol e um com tebuconazol. Os estudos encontrados com pentaclorofenol verificaram efeitos em morcegos relacionados ao tratamento de madeiras, avaliaram letalidade nos animais expostos a diferentes concentrações e reportaram exposição por meio da determinação de resíduos em *Pipistrellus pipistrellus* e *Myotis dasycneme* (Leeuwangh, Voûte, 1985, Racey; Swift, 1986, Shore et al., 1991). O pentaclorofenol é um biocida com ação em vários organismos, como insetos, moluscos, plantas e fungos (Seiler, 1991). Resíduos de pentaclorofenol foram encontrados no ar, água, solo, sedimentos e em organismos (Zheng et al., 2011). Devido aos potenciais efeitos citotóxico (Dorsey; Tchounwou, 2004; Fernández-Freire et al., 2005), desregulador endócrino (Orton et al., 2009; Guo; Zhou, 2013), genotóxico e teratogênico (Ateeq et al., 2002; Farah et al., 2003), foi banido ou passou a ser usado com restrição em vários países (Stockholm Convention, 2018).

O tebuconazol é um fungicida do grupo triazol, que atua inibindo a enzima lanosterol 14 α -demetilase, cuja função está relacionada a produção de ergosterol em fungos e leveduras (Kwok; Loeffler, 1993). Entretanto, esse composto também tem ação em vertebrados, nos quais compromete a síntese e metabolismo de esteroides ao inibir a enzima aromatase (Vingaard et al., 2000; Sanderson et al., 2002). Sendo assim, o tebuconazol é um desregulador endócrino, que compromete a espermatogênese, a fertilidade masculina e desenvolvimento (Taxvig et al., 2007; Joshi et al., 2016; Machado-Neves, 2018; Yang et al., 2018). Além disso, pode provocar alterações neurocomportamentais (Moser et al., 2001) e induzir estresse oxidativo (Yang et al., 2018). O único trabalho com tebuconazol reportou lesões histomorfométricas em testículos e epidídimos de *A. lituratus* expostos ao fungicida (Machado-Neves, 2018).

Fungicidas de outros grupos químicos, como por exemplo, carbendazim, prochloraz, vinclozolim, procimidona dentre outros, também são classificados como desreguladores endócrinos (Lu et al., 2004; Gray Jr. et al., 2006), além de estarem relacionados a alterações no sistema imune, danos genotóxicos e desencadear apoptose (Calviello et al., 2006; Jiang et al., 2015). De modo geral, os fungicidas são lipofílicos e, assim como os demais agrotóxicos, podem se dispersar e permanecer no ambiente (Singh; Dureja, 2000; Battaglin et al., 2010; Zubrod et al., 2019). No entanto, os efeitos

ecotoxicológicos deste grupo de agrotóxicos têm recebido menos atenção quando comparado com inseticidas e herbicidas, de modo que o comportamento dessas substâncias nos ecossistemas, bem como seus efeitos na biota aquática e terrestre, ainda são pouco compreendidos (Fenner et al., 2013; Zubrod et al., 2019).

Outras substâncias

Foram encontrados dois trabalhos que relatam intoxicações que não foram incluídas nas análises por estarem fora do escopo desta revisão. Um deles relata intoxicação em *Cynopterus brachyotis*, após tratamento profilático com ivermectina (DeMarco et al., 2002), e o outro relata mortalidade de morcegos da espécie *Mystacina tuberculata* causada por rodenticida durante a execução de um programa de controle de roedores na Nova Zelândia (Dennis; Gartrell, 2015).

Efeitos

A maior parte dos estudos são observacionais e, embora o número de estudos classificados como experimental natural ou experimental manipulativo sejam equivalentes, há pouca informação disponível para avaliar os efeitos causados por agrotóxicos em populações de morcegos, mostrando, portanto, uma lacuna na investigação científica.

Morcegos podem ser afetados por agrotóxicos direta ou indiretamente. Dos artigos encontrados nesta revisão, a maioria são estudos qualitativos que reportam casos de intoxicação ou estudos que avaliam toxicidade de algum composto. Poucos trabalhos fazem um diagnóstico das populações de vida livre. De modo geral, há pouca informação disponível para avaliar os danos de agrotóxicos em populações de morcegos, dificultando a interpretação sobre o efeito relacionado à perda dos serviços ecossistêmicos promovidos por este grupo de mamíferos. No entanto, assim como tem ocorrido na ecotoxicologia de animais silvestres, os estudos têm focado nos efeitos subletais em processos fisiológicos, sucesso reprodutivo e *fitness* causados por exposições crônicas (Kendall, 2016).

Alguns agrotóxicos podem causar perda de coordenação e deixar os animais debilitados, comprometendo o voo e a capacidade de orientação. Esses efeitos, embora não causem a morte dos indivíduos, podem dificultar o forrageio e deixá-los mais vulneráveis à

predação ou aumentar o risco de quedas (Clark; Rattner, 1987; Clark; Shore, 2001; Eidels et al., 2007; Hsiao et al., 2016).

Estudos têm demonstrado alterações no metabolismo energético dos morcegos (Swanepoel et al., 1999; Amaral et al., 2012a; 2012b; Brinati et al., 2016; Oliveira et al., 2018). Essas alterações podem ter consequências graves considerando as complexidades metabólicas dos morcegos, como metabolismo elevado, pequena reserva energética e aumento da frequência de períodos de torpor e hibernação (Geiser; Stawski, 2011; Stawski et al., 2014). Embora o torpor seja observado em famílias de morcegos tropicais e subtropicais, a hibernação ainda é pouco documentada (Geiser; Stawski, 2011; Stawski et al., 2014)

O aumento do gasto energético pode significar maior tempo de forrageio e, conseqüentemente, maior exposição aos predadores, além de menor aporte energético para reprodução, termorregulação ou hibernação (Swanepoel et al., 1999; O'Shea et al., 2002).

A metabolização de agrotóxicos pode aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio e induzir o estresse oxidativo (Banerjee et al., 2001). Efeitos na capacidade antioxidativa de morcegos também tem sido avaliada. Aparentemente, esses animais são mais resistentes ao estresse oxidativo, especialmente morcegos frugívoros, os quais, potencialmente, ingerem maior quantidade de antioxidantes em sua dieta (Wilhelm Filho et al., 2007; Salmon et al., 2009; Schneeberger et al., 2014). Entretanto, mesmo apresentando maior resistência, os morcegos frugívoros expostos a doses pequenas de agrotóxicos, seguindo as recomendações de fabricantes, apresentaram dano oxidativo no fígado e músculo (Oliveira et al., 2017, 2018).

Interferências na atividade reprodutiva de morcegos ainda são pouco estudadas. Vários agrotóxicos são classificados como desreguladores endócrinos, com potencial de comprometimento da atividade reprodutiva (Mckinlay et al., 2008; Hayes et al., 2010; Machado-Neves et al., 2018). O sucesso reprodutivo também pode ser impactado pela transferência de resíduos de agrotóxicos através da placenta ou leite (Clark; Lamont, 1976a, 1976b; Thies; McBee, 1994), uma vez que filhotes podem ser mais sensíveis que adultos (Kunz et al., 1977). Além disso, a exposição precoce a esses contaminantes está relacionada a malformações e problemas no desenvolvimento (Campbell et al., 1997; Greulich; Pflugmacher, 2003). A diminuição do sucesso reprodutivo em populações de morcegos é preocupante, considerando a baixa capacidade reprodutiva desses animais, o

que significa a possibilidade de um declínio rápido e recuperação lenta da população (Jones et al., 2009).

Assim como outros poluentes, os agrotóxicos provocam efeitos imunotóxicos (Kannan et al., 2010; Galloway; Handy, 2003; Wang et al., 2017), e a exposição crônica a esses compostos tem sido relacionada ao aumento da suscetibilidade a doenças em vários grupos animais (Albert et al., 2007; Mason et al., 2014). Porém, informações sobre esses efeitos no sistema imune de morcegos ainda são escassas.

Efeitos genotóxicos e mutagênicos causados por agrotóxicos são frequentemente investigados utilizando os testes cometa e micronúcleo (Bull et al., 2006; Bolognesi et al., 2011). Em morcegos, esses testes já foram utilizados para avaliar danos no DNA, mas poucos trabalhos relacionados com agrotóxicos (Thies et al., 1996; Meehan, et al., 2004; Naidoo et al., 2015; Benvindo-Souza et al., 2019).

Morcegos também podem ser afetados indiretamente pelo uso de agrotóxicos em resposta às mudanças na abundância e diversidade de presas (Wickramasinghe, 2004; Long; Kurta, 2014), além das alterações na paisagem e qualidade do hábitat decorrentes da agricultura intensiva (Wickramasinghe, 2003). Morcegos têm sido considerados potenciais bioindicadores porque fornecem respostas aplicáveis a outros táxons, possuem hábitos alimentares diversificados sendo, portanto, considerados em diferentes grupos funcionais alimentares, relativa estabilidade taxonômica e ampla distribuição (Jones et al., 2009). No entanto, o conhecimento disponível sobre suas respostas à contaminação ambiental ainda é insuficiente para o uso deste grupo como bioindicadores.

Considerações Finais

Pesquisas envolvendo morcegos e agrotóxicos estão sendo feitas há mais de 60 anos, entretanto, o conhecimento sobre os efeitos de agrotóxicos em morcegos ainda é insuficiente para uma avaliação de risco das populações de morcegos ou seu uso como bioindicadores. Essas pesquisas estão concentradas no hemisfério norte, predominantemente nos EUA. A maioria das informações obtidas diz respeito à guilda dos insetívoros, enquanto há pouca informação referente aos morcegos frugívoros, nectarívoros, carnívoros e hematófagos. Durante todo o período analisado, os inseticidas

organoclorados foram os mais frequentes nos estudos. O número de pesquisas que avaliam os efeitos em morcegos não acompanhou o aumento do número de ingredientes ativos utilizados.

Pesquisas futuras devem investigar efeitos, principalmente aqueles causados pela exposição crônica, que possam colocar em risco a viabilidade das populações em longo prazo, bem como dos serviços ambientais prestados por esses animais. Para uma avaliação mais precisa, é necessário investigar como morcegos de outras guildas alimentares respondem a exposição aos agrotóxicos. Por fim, é preciso dar atenção às populações naturais expostas a misturas de agrotóxicos entre outros contaminantes, nas quais os efeitos podem ser ainda mais graves, mas que, no entanto, permanecem desconhecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, E.; TOURNANT, P.; FOLTÊTE, J.C.; GIRAUDOUX, P.; BAURAND, P.E.; ROUÉ, S.; CANELLA, V.; VEY D.; SCHEIFLER, R. Is the lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*) exposed to causes that may have contributed to its decline? A non-invasive approach. **Global Ecology and conservation**, v. 8, p. 123-137, 2016.
- AGRAWAL, A.; SHARMA, B. Pesticides induces oxidative stress in mammalian systems. **International Journal of Biological & Medical Research**, v. 1, n. 3, p. 90-104, 2010.
- ALBERICO, M., CADENA, A.; HERNÁNDEZ-CAMACHO, J. MUÑOZ-SABA, Y. Mamíferos (Synapsida: Theria) de Colombia. **Biota Colombiana**, v. 1, n. 1, p. 43-75, 2000.
- ALBERT, A.; DROUILLARD, K.; HAKKNER, D.; DIXON, B. Dietary exposure to low pesticide doses causes long-term immunosuppression in the leopard frog (*Rana pipiens*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 1179-1185, 2007.
- AL-HAMDANI, N.M.H.; YAJURVEDI, H.N. Effect of cypermethrin on the ovarian activity and its impact on fertility and pubertal onset of offspring. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Science**, v. 6, n. 4, p. 374-382, 2017.
- ALLINSON, G. *et al.* Organochlorine and trace metal residues in adult southern bent-wing bat (*Miniopterus schreibersii bassanii*) in southeastern Australia. **Chemosphere**, v. 64, n. 9, p. 1464-1471, 2006.
- ALONSO, M.B.; FEO, M.L.; CORCELLAS, C.; VIDAL, L.G.; BERTOZZI, C.P.; MARIGO, J.; SECCHI, E.R.; BASSOI, M.; AZEVEDO, A.F.; DORNELES, P.R.; TORRES, J.P.M.; LAILSON-BRITO, J.; MALM, O.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. Pyrethroids: A new threat to marine mammals? **Environemntal International**, v. 47, p. 99-106, 2012.
- ALTENBACH, J.S. Prey capture by the fishing bats *Noctilio leporinus* and *Myotis vivesi*. **Journal of Mammalogy**, v. 70, n. 2, p. 421-424, 1989.
- AMARAL, T.; CARVALHO, T. F.; SILVA, M. C.; GOULART, L. S.; *et al.* Metabolic and Histopathological Alterations in the Fruit-Eating Bat *Artibeus lituratus* induced by the Organophosphorous Pesticide Fenthion. **Acta Chiropterologica**, v. 14, n. 1, p. 225-232, 2012a.
- AMARAL, T.; CARVALHO, T.; SILVA, M.; BARROS, M.; *et al.* Short-term effects of a spinosyn's family insecticide on energy metabolism and liver morphology in frugivorous bats *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 2, p. 299-304, 2012b.
- ANDRADE, F.H.E.; FIGUEIROA, F.C.; BERSANO, P.R.O.; BISSACOT, D.Z.; ROCHA, N.S. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminantes. **Diagnostic Pathology**, v. 5, n. 1, 2010.
- ATEEQ, B.; FARAH, M.A.; ALI, M.N.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, v. 514, p. 105-113, 2002.

- BANERJEE, B.D.; SETH, V.; AHMED, R.S. Pesticide-induced oxidative stress: Perspectives and Trends. **Reviews on Environmental Health**, v. 16, n. 1, p. 1-40, 2001.
- BANN, J.M.; DECINO, T.J.; EARLE, N.W.; SUN, Y.P. The fate of Aldrin and Dieldrin in the Animal Body. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.4, n. 11, p. 937-941, 1956.
- BATTAGLIN, W.A.; SANDSTROM, M.W.; KUIVILA, K.M.; KOLPIN, D.W.; MEYER, M.T. Occurrence of Azoxystrobin, Propiconazole, and selected other fungicides in US streams, 2005-2006. **Water air and soil pollution**, v. 2018, n. 1-4, p. 307-322, 2011.
- BAYAT, S.; GEISER, F.; KRISTIENSEN, P.; WILSON, S.C. Organic contaminants in bats: Trends and new issues, **Environment International**, v. 63, p. 40-52, 2014.
- BEDI, J.S.; GILL, J.P.S.; AULAKH, R.S.; KAUR, P. Pesticides residues in bovine milk in Punjab, India: spatial variation and risk assessment to human health. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 69, n. 2, p. 230-240, 2015.
- BEKETOV, M.A.; KEFFORD, B.J.; SCHÄFER, R.B.; LIESS, M. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 27, p. 11039-11043, 2013.
- BENNETT, B. S.; THIES, M. L. Organochlorine pesticide residues in guano of Brazilian free-tailed bats, *Tadarida brasiliensis* Saint-Hilaire, from East Texas. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 78, n. 3-4, p. 191-194, 2007.
- BENTON, A.H. Effects on wildlife of DDT used for control of Dutch Elm Disease. **The Journal of Wildlife Management**, v. 15, n. 1, p. 20-27, 1951.
- BENVINDO-SOUZA, M.; BORGES, R.E.; PACHECO, S.M.; SANTOS, L.R.S. Micronucleus and other nuclear abnormalities in exfoliated cells of buccal mucosa of bats at different trophic levels. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 172, p. 120-127, 2019.
- BEST, S.M. Some organochlorine pesticide residues in wildlife of the Northern territory, Australia, 1970-71. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 26, p. 1161-70, 1973.
- BIGOT, M.; CURRAN, M.A.J.; MOY, A.D.; MUIR, D.C.G.; HAWKER, D.W.; CROPP, R.; TEIXEIRA, C.F.; NASH, S.M.B. Brief communication: Organochlorine pesticide in an archived firn core from Law Dome, East Antarctica. **The Cryosphere**, v. 10, p. 2533-2539, 2016.
- BISHOP, C.A.; MORAN, A.J.; TOSHACK, M.C.; ELLE, W.; MAISONNEUVE, F. ; ELLIOT, J.E. Hummingbirds and bumble bees exposed to neonicotinoid and organophosphate insecticide in the Fraser Valley, British Columbia, Canada. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9999, n. 9999, p. 1-10, 2018.
- BLOOMQUIST, J.R. Toxicology, mode of action and target site-mediated resistance to insecticides acting on chloride channels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 106, n. 2, p. 301-314, 1993.
- BOLOGNESI, C.; CREUS, A.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; MARCOS, R. Micronuclei and pesticide exposure. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 19-26, 2011.

- BONDARENKO, S.; GAN, J.; HAVER, D.L.; KABASHIMA, J.N. Persistence of selected organophosphate and carbamate insecticides in waters from a coastal watershed. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 11, p. 2649-2654, 2004.
- BOYD, I.L.; MYHILL, D.G.; MITCHELL-JONES, A.J. uptake of gamma-HCH (Lindane) by Pipistrelle bats and its effect on survival. **Environmental Pollution**, n. 51, p. 95-111, 1988.
- BRADBERRY, S.M.; CAGE, S.A.; PROUDFOOT, A.T.; VALE, J.A. Poisoning due to Pyrethroids. **Toxicological Reviews**, v.24, n.2, p. 93-106, 2005.
- BRINATI, A. *et al.* Low, Chronic Exposure to Endosulfan Induces Bioaccumulation and Decreased Carcass Total Fatty Acids in Neotropical Fruit Bats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 97, n. 5, p. 626–631, 3 nov. 2016.
- BUCHWEITZ, J.P.; CARSON, K.; REBOLLOSO, S.; LEHNER, A. DDT poisoning of big brown bats, *Eptesicus fuscus*, in Hamilton, Montana. **Chemosphere**, v. 201, p. 1-5, 2018.
- BULL, S.; FLETCHER, K.; BOOBIS, A.R.; BATTERSHILL, J.M. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticides applicators: a review. **Mutagenesis**, v. 21, n. 2, p. 93-103, 2006.
- CALVIELLO, G.; PICCIONI, E.; BONINSEGNA, A.; TEDESCO, B.; MAGGIANO, N.; SERINI, S.; WOLF, F.I.; PALOZZA, P. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, n. 2, p. 87-96, 2006.
- CAMENZULI, L.; SCHERINGER, M.; HUNGERBÜHLER, K. Local organochlorine pesticide concentrations in soil put into a global perspective. **Environmental Pollution**, v. 217, p. 11-18, 2016.
- CAMPBELL, C.G.; SEIDLER, J.J.; SLOTKIN, T.A. Chlorpyrifos interferes with cell development in rat brain regions. **Brain Research Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 179-189, 1997.
- CHAUAN, L.K.S.; KUMAR, M.; PAUL, B.N.; GOEL, S.K.; GUPTA, S.K. Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or isoprotruron on human peripheral lymphocytes and mouse bone marrow cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, n. 8, p. 636-643, 2007.
- CHERNYAK, S.M.; RICE, C.P.; McCONNELL, L.L. Evidence of currently-used pesticides in air, ice, fog, seawater and surface microlayer in the Bering and Chukchi Seas. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, n. 5, p. 410-419, 1996.
- CLARE, E.L., LIM, B.K., FENTON, M.B., HEBERT, P.D.N. Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, e22648. doi:10.1371/ journal.pone.0022648, 2011.
- CLARK, D.R. Toxicity of methyl Parathion to Bats: Mortality and Cordination Loss. **Environmental Toxicology na Chemistry**, v. 5, p. 191-195, 1986.
- CLARK, D.R. Environmental contaminantes and the management of bat populations in the United States. In: SZARO, R.C.; SEVERSON, K.E.; PATTON, D.R. (Eds). Management of Amphibians, Reptiles, and Small Mammals in North America: Proceedings of the Symposium, July 19-21, 1988, Flagstaff, Arizona. 409-413p.

- CLARK, D. R. DDT and the decline of free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) at Carlsbad Cavern, New Mexico. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, p. 537–543, 2001.
- CLARK, D.R.; KRYNITSKY, A.J. DDE in brow and white fat of hibernating bats. **Environmental Pollution (Series A)**, v. 31, p. 287-299, 1983.
- CLARK, D.R.; BAGLEY, F.M.; JOHNSON, W.W. Northern Alabama colonies of the endangered grey bat *Myotis grisescens*: organochlorine contamination and mortality. **Biological Conservation**, v. 43, p. 213-225, 1988.
- CLARK, D. R.; CLAWSON, R. L.; STAFFORD, C. J. Gray bats killed by dieldrin at two additional Missouri caves: Aquatic macroinvertebrates found dead. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 214–218, 1983a.
- CLARK, D.R.; BUNCK, C.M.; CROMARTIE, E. Year and age effects on residues of dieldrin and heptachlor in dead gray bats, Franklin County, Missouri - 1976, 1977, and 1978. **Environmental toxicology and Chemistry**, v. 2, p. 387-393, 1983b.
- CLARK, D. R.; KROLL, J. C. Effects of DDE on experimentally poisoned free-tailed bats [*tadarida brasiliensis*): lethal brain concentrations. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 3, n. 5–6, p. 893–901, dez. 1977.
- CLARK, D. R.; KUNZ, T. H.; KAISER, T. E. Insecticides applied to a nursery colony of little brown bats (*Myotis lucifugus*): lethal concentrations in brain tissues. **Journal of Mammalogy**, v. 59, n. 1, p. 84–91, 17 fev. 1978.
- CLARK, D. R. JR.; KRYNITSKY, A. Organochlorine Residues and Reproduction in the Little Brown Bat, Laurel, Maryland-June 1976. **Pesticide Monitoring Journal**, v. 12, n. 3, p. 113-116, 1978.
- CLARK, D. R.; LAMONT, T. G. Organochlorine residues in females and nursing young of the big brown bat (*Eptesicus fuscus*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 15, n. 1, p. 1–8, jan. 1976a.
- CLARK, D.R. LAMONT, T.G. Organochlorine residues and reproduction in the Big Brown Bat. **The Journal of Wildlife Management**, v. 40, n. 2, p. 249-254, 1976b.
- CLARK, D.R.; LaVAL, R.K.; SWINEFORD, D.M. Dieldrin-induced mortality in an endangered species, the gray bat (*Myotis grisescens*). **Science**, v. 199, n. 4335, p. 1357-1359, 1978.
- CLARK, D.R.JR.; LaVAL, R.K.; KRYNITSKY, A.J. Dieldrin and heptachlor residues in dead gray bats Franklin county, Missouri – 1976 versus 1977. **Pesticide Monitoring Journal**, v. 13, n. 4, p. 137-140, 1980.
- CLARK, D. R.; LAVAL, R. K.; TUTTLE, M. D. Estimating pesticide of bats from guano analyses. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 214–220, ago. 1981.
- CLARK, D.R.; MARTIN, C.O.; SWINEFORD, D.M. Organochlorine insecticide residues in the free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*) at Bracken cave, Texas. **Journal of Mammalogy**, v. 56, n. 2, p. 429-443, 1975.
- CLARK, D. R.; MORENO-VALDEZ, A.; MORA, M. A. Organochlorine residue in bat guano from nine Mexican caves, 1991. **Ecotoxicology**, v. 4, p. 258–265, 1995.
- CLARK, D. R. JR.; PROUTY, R. M. Organochlorine residues in three bat species from four localities in Maryland and West Virginia, 1973. **Pesticide Monitoring Journal**, v.

10, n. 2, p. 44-53, 1976.

CLARK, D. R.; PROUTY, R. M. Experimental feeding of DDE and PCB to female big brown bats (*Eptesicus fuscus*). **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 2, n. 4, p. 917–928, 20 mar. 1977.

CLARK, D.R.; PROUTY, R.M. Disposition of dietary dieldrin in the little brown bat and correlation of skin levels with body burden. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 33, p. 177 - 183, 1984.

CLARK, D.R.; RATTNER, B.A. Orthen toxicity to little brown bats (*Myotis lucifugus*): acetylcholinesterase, inhibition, coordinatin loss, and mortality. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 6, p. 705-708, 1987.

CLARK, D.R.; SHORE, R.F. Chiroptera. In: SHORE, R.F.; RATTNER, B.A. Eds. Ecotoxicology of wild mammals. London, England: John Wiley and Sons, Ltd. 2001, p. 159-214.

CLARK, D. R.; STAFFORD, C. J. Effects of DDE and PCB (Aroclor 1260) on experimentally poisoned female little brown bats (1978): Lethal brain concentrations. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 7, n. 6, p. 925–934, 1981.

CLARK, D.R.; WENNER, A.S.; MOORE, J.F. Metal residues in bat colonies, Jackson county, Floridam 1981-1983. **Florida Field Naturalist**, v. 14, n. 2, p. 38-45, 1986.

CLAWSON, R.L. Pesticides contamination of endangered gray bats and their prey in Boone, Franklin, and Camden Counties, Missouri. **Transactions of the Academy of Science**, v. 25, p. 13-19, 1991.

CLAWSON, R.L.; CLARK Jr., D.R. Pesticide Contamination of Endangered Gray bats and their food base in Boone County, Missouri, 1982. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, p. 431 - 437, 1989.

COLEMAN, M.; FOSTER, G.M.; DEB, R.; SINGH, R.P.; ISMAIL. H.M.; SHIVAM, P.; GHOSH, A.K.; DUNKLEY, S.; KUMAR, V.; COLEMAN, M.; HEMINGWAY, J.; PAINE, M.J.I.; DAS, P. DDT-based indoor residual spraying subotimal for visceral leishmaniasis elimination in India. **Proceedings of the National Academy os Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 28, p. 8573-8578, 2015.

CONSTANTINE, D.G.; TIERKEL, E.S.; KLECKNER, M.; HAWKINS, D.M. Rabies in New Mexico cavern bats. **Public Health Report**, v. 83, n. 3, p. 303-316, 1968.

CONSTANTINI, D. Land-use changes and agricultural in the tropics: pesticides as an overlocked threat to wildlife. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 7, p.1837-1839, 2015.

CORCELLAS, C.; FEO, M.L.; TORRES, J.P.; MALM, O.; OCAMPO-DUQUE, W.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. Pyrethroids in human breast milk: Occurrence and nursing daily intake estimation. **Environmental International**, v. 47, p. 17-22, 2012.

CORRAO, A.; CATALANO, E.; ZAVA, B. Destructive effects of chlorinated pesticides on a bats colony (Chiroptera). **Mammalia**, v.49, n. 1, p. 125-130, 1985.

COSTA, L.G. Organophosphorus Compounds at 80: Some old and new issues. **Toxicological Sciences**, v. 162, n. 1, p. 24-35, 2018.

DALQUEST, W.W. Mammals of the Mexican State of San Luis Potosi. **LSU Historical Dissertations and Theses**. 7990. Louisiana State University Press. https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_disstheses/7990

- DAVIES, T.G.E.; FIELD, L.M.; USHERWOOD, P.N.R.; WILLIAMSON, M.S. DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels. **IUBMB Life**, v. 59, n. 3, p. 151-162, 2007.
- DeMARCO, J.H.; HEARD, D.J.; FLEMING, G.J.; LOCK, B.A.; SCASE, T.J. Ivermectin toxicosis after topical administration in dog-faced fruit bats (*Cynopterus brachyotis*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 33, n. 2, p. 147-150, 2002.
- DENNIS, G.C.; GARTRELL, B.D. Nontarget mortality of New Zealand Lesser short-tailed bats (*Mystacina tuberculata*) caused by diphacione. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 51, n. 1, p. 177-186, 2015.
- DESNEUXM N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **The Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 81-106, 2007.
- DHOUIB, I.; JALLOULI, M.; ANNABI, A.; MARZOUKI, S.; GHARBI, N.; ELFAZAA, S.; LASRAM, M.M. From immunotoxicity to carcinogenicity: the effects of carbamate pesticides on the immune system. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 10, p. 9448-9458, 2016.
- DORSEY, W.C.; TCHOUNWOU, P.B. Pentachlorophenol-induced cytotoxic, mitogenic, and endocrine-disrupting activities in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Internation Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 1, n. 2, p. 90-99, 2004.
- DU, G.; SHEN, O.; SUN, H.; FEI, J.; LU, C.; SONG, L.; XIA, Y.; WANG, S.; WANG, X. Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. **Toxicological Sciences**, v. 116, n. 1, p. 58-66, 2010.
- DUBOIS, K.P. The toxicity of organophosphorus compounds to mammals. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 44, n. 1-2-3, p. 231-240, 1971.
- EIDELS, R.R.; WHITAKER Jr., J.O.; SPARKS, D.W. Insecticide residues in bats and guano from Indiana. **Proceedings of the Indiana Academy of Science**, v. 116, n. 1, p. 50-57, 2007.
- EIDELS, R.R.; WHITAKER Jr., J.O.; LYDY, M.J.; SPARKS, D.W. Screening of insecticides in bats from Indiana. **Proceedings of the Indiana Academy of Science**, v. 121, n. 2, p. 133-142, 2013.
- EIDELS, R.R.; SPARKS, D.W.; WHITAKER Jr.; SPRAGUE, C.A. Sub-lethal effects of Chlorpyrifos on Big Brown Bats (*Epitesicus fuscus*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 71, p. 322-335, 2016.
- ELLIOT, M.; FARNHAM, A.W.; JANES, N.F.; NEEDHAM, P.H.; PULMAN, D.A.; STEVENSON, J. H. A photostable pyrethroid. **Nature**, v. 246, n. 5429, p. 169-170, 1973.
- FARAH, M.A.; ATEEQ, B.; ALI, M.N.; AHMAD, W. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test on freshwater fish *Channa punctatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 1, p. 25-29, 2003.
- FENNER, K.; CANONICA, S.; WACKETT, L.P.; ELSNER, M. Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. **Science**, v. 341, p. 752-758, 2013.

- FENTON, M.B.; SIMMONS, N.B. Bats: A world of science and mystery. The University of Chicago Press, Chicago, 303 pp.
- FERNÁNDEZ-FREITE, P.; LABRADOR, V.; MARTÍN, J.M.; HAZEN, M.J. Cytotoxic effects in mammalian vero cells exposed do pentachlorophenol. **Toxicology**, v. 210, n. 1, p. 37-44, 2005.
- FORSHAW, P.J.; LISTER, T.; RAY, D.E. The role of voltage-gated chloride channels in type II pyrethroid insecticide poisoning. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 163, p. 1-8, 2000.
- GALLOWAY, T.; HANDY, R. Immunotoxicity of organophosphorus pesticides. **Ecotoxicology**, v. 12, p. 345-363, 2003.
- GANNON, N.; BIGGER, J.H. The conversion of Aldrin and Heptachlor to their epoxids in soil. **Journal of Economic Entomology**, v. 51, n. 1, p. 1-2, 1958.
- GANNON, N.; DECKER, G.C. The conversion of heptachlor to its epoxide on plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 15, n. 1, p. 3-7, 1958.
- GEISER, F.; STAWSKI, C. Hibernation and torpor in tropical and subtropical bats in relation to energetics, extinctions, and the evolution of endothermy. **Integrative and Comparative Biology**, v. 51, n. 3, p. 337-348, 2011.
- GELUSO, K.N.; ALTENBACH, J.S.; WILSON, D.E. Bat mortality: Pesticide poisoning and migratory stress. **Science**, v. 194, p. 184-186, 1976.
- GELUSO, K.N.; ALTENBACH, J.S.; WILSON, D.E. Organochlorine residues in young mexican free-tailed bats from several roosts. **The American Midland Naturalist**, v. 105, n. 2, p. 249-257, 1981.
- GHIASUDDIN, S.M.; MATSUMURA, F. Inhibition of gamma-aminobutyric acid (GABA)-induced chloride uptake by gamma-BHC and heptachlor epoxide. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 141-144, 1982.
- GOULSON, D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, p. 977-987, 2013.
- GRAVES, E.E.; JELKS, K.A.; FOLEY, J.E.; FILIGENZI, M.S.; POPPENGA, R.H.; ERNEST, H.B.; MELNICOE, R.; TELL, L.A. Analysis of insecticide exposure in California hummingbirds using liquid chromatography-mass spectrometry. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 15, p. 15458-15466, 2019.
- GRAY Jr., L.E.; WILSON, V.S.; STOKER, T.; LAMBRIGHT, C.; FURR, J.; NORIEGA, N.; HOWDESHELL, K.; ANKLEY, G.T.; GUILLETTE, L. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 1, p. 96-104, 2006.
- GRUE, C.E.; GILBERT, P.L.; SEELEY, M.E. Neurophysiological and behavioral changes in non-target wildlife exposed to organophosphate and pesticides: Thermoregulation, food consumption and reproduction. **American Zoologist**, v. 37, p. 369-388, 1997.
- GREULICH, K.; PFLUGMACHER, S. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 65, p. 329-336, 2003.

- GUILLÉN, A.; IBAÑEZ, C.; PÉREZ J.L.; HERNÁNDEZ, L.; GONZÁLEZ, M.J. Efecto de los biocidas en las poblaciones de murciélagos. In: BENZAL, J. DEPAZ, O. (Eds.). Ministerio de Agricultura e Pesca y Alimentación. Madrid, Spain: Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza, Colección Técnica, p. 211-226, 1991.
- GUILLÉN, A.; IBAÑEZ, C.; PÉREZ, J.L.; HERNÁNDEZ, L.M.; GONZÁLEZ, M.J.; FERNÁNDEZ, M.A.; FERNÁNDEZ, R. Organochlorine residues in Spanish common pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, p. 231-237, 1994.
- GUO.,; ZHOU, B. Thyroid endocrine system disruption by pentachlorophenol: An *in vitro* and *in vivo* assay. **Aquatic Toxicology**, v. 142-142, p. 138-145, 2013.
- GUPTA, R.C.; MUKHERJEE, I.R.M.; DOSS, R.B.; MALIK, J.K.; MILATOVIC, D. Organophosphate and Carbamates. In: GUPTA, R.C. (Ed.) Reproductive and Developmental Toxicology (2^{ed.}). Elsevier, p. 609-631, 2017.
- HAMON, B. Recherches d'organochlores dans du guano d'une colonie estivale de petits rhinolophes (*Rhinolophus hipposiders* Bechstein, 1800) en habitat humain (Meurthe-et-Moselle). **Bulletin des Académie & Société Lorraines des Sciences**, v. 29, n. 3, p. 129-137, 1990.
- HAYES, T.B.; KHOURY, V.; NARAYAN, A.; NAZIR, M.; PARK, A.; BROWN, T.; ADAME, L.; CHAN, E.; BUCHHOLZ, D.; STUEVE, T.; GALLIPEAU, S. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Proceedings of the National Academy Science**, v. 107, n. 10, p. 4612-4617, 2010.
- HERNÁNDEZ, L.M.; IBAÑEZ, C.; FERNÁNDEZ, M.A.; PÉREZ, J.L. Organochlorine insecticide and PCB residues in two bat species from four localities in Spain. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, p. 871-877, 1993.
- HENNY, C.J.; MASER, C.; WHITAKER Jr., J.O.; KAISER, T.E. Organochlorine residues in bats after a forest spraying with DDT. **Northwest Science**, v. 56, n. 4, p. 329-337, 1982.
- HOSSAIN, M.M. Recent perspective of herbicide: Review of demand and adoption in world agriculture. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v. 13, n. 1, p. 19-30, 2015.
- HSIAO, C.J., LIN, C.L.; LIN, T.Y.; WANG, S.E.; WU, C.H. Imidacloprid toxicity impairs spatial memory of echolocation bats through neural apoptosis in hippocampal CA1 and medial entorhinal cortex areas. **Neuroreport**, v. 27, n. 6, p. 462-268, 2016.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: Some organochlorine pesticides. v. 5, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1974.
- JEFFERIES, D.J. Organochlorine insecticide residues in British bats and their significance. **Journal of Zoology**, v. 166, n. 1, p. 245-263, p. 1972.
- JIANG, J.; WU, S.; WANG, Y.; AN, X.; CAI, L.; ZHAO, X.; WU, C. Carbendazim has the potential to induce oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption during zebrafish larvae development. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1473-1481, 2015.

- JONES, G.; JACOBS, D.S.; KUNZ, T.H.; WILLING, M.R.; RACEY, P.A. Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators. **Endangered Species Research**, v. 8, p. 93-115, 2009.
- JOSHI, S.C.; GULATI, N.; SHARMA, B.; SHARMA, P. Effects of tebuconazole (a fungicide) on reproduction of male rat. **International Journal of Pharma Research and Health Sciences**, v. 4, n. 6, p. 1489-1494, 2016.
- KALE, M.; RATHORE, N.; JOHN, S.; BHATNAGAR, D. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactiveoxygen species. **Toxicology Letters**, v. 105, p. 197-205, 1999.
- KANNAN, K.; YUN, S.H.; RUDD, R.J.; BEHR, M. High concentrations of persistent organic pollutants including PCBs, DDT, PBDEs and PFOS in little brown bats with white-nose syndrome in New York, USA. **Chemosphere**, v. 80, p. 613-618, 2010.
- KATSUDA, Y. Development of and future prospects for pyrethroid chemistry. **Pesticides Science**, v. 55, p. 775-782, 1999.
- KENDALL, R.J. Wildlife Toxicology: Where we have been and where we are going. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 6, n. 348, doi:10.4172/2161-0525.1000348, 2016.
- KIRST, H.A. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, p. 101-111, 2010.
- KOEMAN, J.H.; RIJKSEN, H.D.; SMIES, M.; NA'ISA, B.K.; MACLENNAN, J.R. Faunal changes in a swamp habitat in Nigeria sprayed with insecticide to exterminate glossina. **Netherlands Journal of Zoology**, v. 41 n. 4, p. 434-463, 1971.
- KÖHLER, H.R.; TRIEBSKORN, R. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? **Science**, v. 341, p. 759-765, 2013.
- KUNZ, T.H.; ANTHONY, E.L.P.; RUMAGE, W.T. Mortality of little brown bats following multiple pesticide applications. **The Journal of Wildlife Management**, v. 41, n. 3, p. 476-483, 1977.
- KUNZ, T.H.; TORREZ, E.B.; BAUER, D.; LOBOVA, T.; FLEMING, T.H. Ecosystem services provided by bats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, n. 1, p. 1-38, 2011.
- KWONG, T.C. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 24, p. 144-149, 2002.
- KWOK, I.M-Y.; LOEFFLER, R.T. The biochemical mode of action of some newer azole fungicides. **Pest Management Science**, v. 39, n. 1, p. 1-11, 1993.
- LEEUWANGH, P.; VOÛTE, A.M. Bats and woodpreservatives. Pesticides residues in the Dutch Pond bat (*Myotis dasycneme*) and its implications. **Mammalia**, v. 49, n. 4, p. 517-524, 1985.
- LONG, B.L.; KURTA, A. Activity and diet in conventional versus organic apple orchards in Southern Michigan. **The Canadian Field-Naturalist**, v. 51, n. 2, p. 158-164, 2014.
- LU, S-Y.; LIAO, J.W.; KUO, M-L.; WANG, S-C.; HWANG, J-S.; UENG, T-H. Endocrine-disrupting activity in carbendazim-induced reproductive and developmental

- toxicity in rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 67, p. 1501-1515, 2004.
- LUCKENS, M.M.; DAVIS, W.H. Toxicity of Dieldrin and Endrin to bats. **Nature**, v. 207, p. 879-880, 1965.
- LÝFTL, S.; FREITAG, B.; DEUTZ, A.; STEINECK, T.; TATARUCH, F. Concentrations of organochlorine pesticides and PCB's in the liver of european bats (Microchiroptera). **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 14, n. 3, p. 167-172, 2005.
- MACHADO-NEVES, M.; NETO, M.J.O.; MIRANDA, D.C.; SOUZA, A.C.F.; CASTRO, M.M.; SERTORIO, M.N.; CARVALHO, T.F.; MATTA, S.L.P.; FREITAS, M.B. Dietary exposure to tebuconazole affects testicular and epididymal histomorphometry in frugivorous bats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 101, n. 2, p. 197-204, 2018.
- MAJEWSKI, M.S.; COUPE, R.H. ; FOREMAN, W.T.; CAPEL, P.D. Pesticides in Mississippi air and rain: a comparison between 1995 and 2007. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 1283-1293, 2014.
- MARONI, M.; COLOSIO, C.; FERIOLI, A.; FAIT, A. Organochlorine Pesticides, **Toxicology**, v. 143, n. 1, p. 61-75, 2000.
- MASON, R.; TENNEKES, H.; SÁNCHEZ-BAYO, F.; JEPSEN, P.U. Immune suppression by neonicotinoid insecticides at the root of global wildlife declines. **Journal of Environmental Immunology and Toxicology**, v.1, n. 1, p. 3-12, 2014.
- MATTHIESSEN, P. Contamination of wildlife with DDT insecticide residues in relation to tsetse fly control operations in Zimbabwe. **Environmental Pollution (Series B)**, v. 10, p. 189-211, 1985.
- MCKINLAY, R.; PLANT, J.A.; BELL, J.N.B.; VOULVOULIS, N. Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. **Environment International**, v. 34, p. 168-183, 2008.
- MEEHAN, K.A.; TRUTER, E.J.; SLABBERT, J.P.; PARKER, N.I. Evaluation of DNA damage in a population of bats (Chiroptera) residing in an abandoned monazite mine. **Mutation Research**, v. 557, p. 183-190, 2004.
- MEYER, B.N.; LAM, C.; MOORE, S.; JONES, R.L. Laboratory degradation rates of 11 pyrethroids under aerobic and anaerobic conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 4702-4708, 2013.
- MICKLEBURGH, S.P.; HUTSON, A.M.; RACEY, P.A. A review of the global conservation status of bats. **Oryx**, v. 36, n. 1, 2002.
- MIKOLIĆ, A.; KARAČONJI, I.B. Imidacloprid as reproductive toxicant and endocrine disruptor: investigations in laboratory animals. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 69, p. 103-108, 2018.
- MINEAU, P.; WHITESIDE, M. Pesticide acute toxicity is a better correlates of U.S. grassland bird declines than agricultural intensification. **PlosOne**, v. 8, n. 2, e57457, 2013.
- MITCHELL-JONES, A.J.; COOKE, A.S.; BOYD, I.L.; STEBBINGS, R.E. Bats and remedial timber treatment chemicals – a review. **Mammal Review**, v. 19, n. 3, p. 93-110, 1989.

- MITRA, A.; MAITRA, S.K. Reproductive toxicity of organophosphate pesticides. **Annals of Clinical Toxicology**, v. 1, n. 1: 1004, 2018.
- MISPAGEL, C.; ALLINSON, M.; ALLINSON, G.; ISEKI, N.; GRANT, C.; MORITA, M. DDT and metabolites residues in the southern bent-wing bat (*Miniopterus schreibersii bassanii*) of south-eastern Australia. **Chemosphere**, v. 55, p. 997-1003, 2004.
- MORRISSEY, C.A.; MINEAU, P. ; DEVRIES, J.H. ; SANCHEZ-BAYO, F. ; LIESS, M. ; CAVALLARO, M.C. ; LIBER, K. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. **Environmental International**, v. 74, p. 291-303, 2015.
- MOSER, V.C.; BARONE Jr., S.; SMIALOWICZ, R.J. ; HARRIS, M.W.; DAVIS, B.J.; OVERSTREET, D.; MAUNEY, M.; CHAPIN, R.E. The effects of perinatal tebuconazol exposure in adult neurological, immunological, and reproductive function in rats. **Toxicological Sciences**, v. 62, n. 2, p. 339-352, 2001.
- MÜLLER, P.; NAGEL, P.; FLACKE, W. Ecological side effects of Dieldrin application against tsetse flies in Adamaoua, Cameroon. **Oecologia**, v. 50, p. 187-194, 1981.
- NAGEL, V.A.; DISSER, J. Rückstand von Chlorkohlenwasserstoff-Pestiziden in einer Wochenstube der Zwergfledermandarinen (*Pipistrellus pipistrellus*). **Zeitschrift für Säugetierkunde**, v. 55, p. 217-225, 1990.
- NAIDOO, S.; VOSLOO, D.; SCHOEMAN, M.C. Haematological and genotoxic responses in and urban adaptor, the banana bats, foraging at wastewater treatment works. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 114, p. 304-311, 2015.
- OLIVEIRA, J.M.; BRINATI, A.; MIRANDA, L.D.L.; MORAIS, D.B.; ZANUNCIO, J.C.; GONÇALVES, R.V.; PELUXIO, M.C.G.; FREITAS, M.B. Exposure to the insecticide endosulfan induces liver morphology alterations and oxidative stress in fruit-eating bats (*Artibeus lituratus*). **International Journal of Experimental Pathology**, v. 98, n. 1, p. 17-25, 2017.
- OLIVEIRA, J.M.; LOSANO, N.F.; CONDESSA, S.S.; FREITAS, R.M.P.; CARDOSO, S.A.; FREITAS, M.B.; OLIVEIRA, L.L. Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decrease of energy reserve in tissue of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 684-682, 2018.
- ORTON, F.; LUTZ, I.; KLOAS, W. ; ROUTLEDGE, E.J. Endocrine disrupting effects of herbicides and pentachlorophenol: In vitro e in vivo evidence. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 2144-2150, 2009.
- O'SHEA, T.J.; EVERETTE, A.L.; ELLISON, L.E. Cyclodiene insecticide, DDE, DDT, Arsenic, and Mercury contamination of Big Bats (*Epitesicus fuscus*) foraging at a Colorado Superfund Site. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, p. 112-120, 2001.
- O'SHEA, T. J.; D. R. CLARK, Jr. An overview of contaminants and bats, with special reference to insecticides and the Indiana bat. In: KURTA, A.; KENNEDY, J. (Eds.) The Indiana bat: biology and management of an endangered species. Austin, Texas: Bat Conservation International. p. 237-253, 2002.
- PUNAREEWATTANA, K.; SMITH, B.J.; BLAYLOCK, B.L.; LONGSTRETH, J.; SNODGRASS, H.L.; GOGAL, R.M.Jr.; PRATER, R.M.; HOLLADAY, S.D. Topical

- permethrin exposure inhibits antibody production and macrophage function in C57B1/6N mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 133-139, 2001.
- RACEY, P.A.; SWIFT, S.M. The residual effects of remedial timber treatments on bats. **Biological Conservation**, v. 35, p. 205-214, 1986.
- RAMESH, A.; TANABE, S.; KANNAN, K.; SUBRAMANIAN, A.N.; KULMARAN, P.L.; TATSUKAWA, R. Characteristic trend of persistente organochlorine contamination in wildlife from a tropical agricultural watershed, South India. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 23, p. 26-36, 1992.
- RATCLIFF, D. Decrease in eggshell weight in certain birds of prey. **Nature**, v. 215, p. 208-210, 1967.
- RATTNER, B.A. History of wildlife toxicology. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 773-783, 2009.
- REIDINGER Jr, R.F. Organochlorine Residues in Adults of Six southwestern Bats Species. **The Journal of Wildlife Management**, v. 40, n. 4, p. 677-680, 1976.
- ROY, S.; ROY, S.; KUMAR, R.; SHARMA, C.B.; PEREIRA, B.J. Biodegradation and bioaccumulation of fenitrothion in rat liver. **Biomedical Chromatography**, v. 18, p. 132-1236, 2004.
- RUSSELL, P.E. A century of fungicide evolution. **Journal of Agricultural Science**, v. 143, n. 1, p. 11-25, 2005.
- SALGADO, V.L.; SHEETS, J.J.; WATSON, G.B.; SCMIDT, A.L. Studies on the mode of action of Spinosad: the internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 60, p. 103-110, 1998a.
- SALGADO, V.L. Studies on the mode of action of Spinosad: Insect Symptoms and physiological correlates. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 60, p. 91-102, 1998b.
- SALMON, A.B.; LEONARD, S.; MASAMSETTI, V.; IERCE, A.; PODLUTSKY, A.J.; PODLUTSKAYA, N.; RICHARDSON, A.; AUSTAD, S.N.; CHAUDHURI, A.R. The long lifespan of two bat species is correlated with resistance to protein oxidation and enhanced protein homeostasis. **FASEB JOURNAL**, v.23, n. 7, p. 2317-2326, 2009.
- SANDERSON, J.T.; BOERMA, J.; LANSBERGEN, G.W.A.; VAN DEN BERG, M. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 182, p. 44-54, 2002.
- SANKAR, P.; TELANG, A.G.; MANIMARAN, A. Curcumin protects against cypermethrin-induced genotoxicity in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 289-291, 2010.
- SASSE, D.B. Pesticide residues in guano of gray bats (*Myotis grisecens*) in Arkansas. **Journal of the Academy of Science**. V. 59, n. 2, p. 214-17, 2005.
- SCHNEEBERGER, K.; CZIRJÁK, G.A. VOIGT, C.C. Frugivory is associated with low measures of plasma oxidative stress and high antioxidant concentration in free-ranging bats. **Naturwissenschaften**, v. 101, n. 4, p. 285-290, 2014.
- SCHIESARI, L.; GRILLITSCH, B. Pesticides meet megadiversity in the expansion of biofuel crops. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 9, n. 4, p. 215-221, 2011.

- SCHMIDT, A.; BRACK Jr, V.; ROMMÉ, R.; TYRELL, K.; GEHRT, A. Bioaccumulation of pesticides in bats from Missouri. **ACS Symposium**, Series 771, p. 8-21, 2000.
- SCHREINEMACHERS, P.; TIPRAQSA, P. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. **Food Policy**, v. 37, p. 616-626, 2012.
- SEILER, J.P. Pentachlorophenol. **Mutation Research**, v. 257, n. 1, p. 27-47, 1991.
- SELIG, M.; LEWANDOWSKI, A. Suspected carbaryl toxicity in a captive colony of straw-colored fruit bats (*Eidolon helvum*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 48, n. 4, p. 1247-1249, 2017.
- SENTHILKUMAR, K.; KANNAN, K.; SUBRAMANIAN, A.; TANABE, S. Accumulation of Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in sediments, aquatic organisms, birds, birds eggs and bat collected from South India. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 8, n. 1, p. 35-47, 2001.
- SHORE, R.F.; MYHILL, D.G.; FRENCH, M.C.; LEACH, D.V.; STEBBINGS, R.E. Toxicity and tissue distribution of pentachlorophenol and permethrin in pipistrelle bats experimentally exposed to treated timber. **Environmental Pollution**, v. 73, p. 101-118, 1991.
- SHORE, R.F.; MYHILL, D.G.; WRIGHT, J. A comparison of the toxicity to laboratory mice and pipistrelle bats *Pipistrellus pipistrellus* of exposure to remedially-treated timber. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 2, n. 1-2, p. 125-129, 1996.
- SHUKLA, Y.; YADAV, A.; ARORA, A. Carcinogenic and cocarcinogenic potential of cypermethrin on mouse skin. **Cancer Letters**, v. 182, p. 33-41, 2002.
- SIMON-DELISO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L.P.; BONMATIN, J.M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C.; FURLAN, L.; GIBBONS, D.W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOUSON, D.; KREITZWEISER, D.P.; KRUPKE, C.H.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E.A.D.; MORRISSEY, C.A.; NOOME, D.A.; PISA, L.; SETTELE, J.; STARK, J.D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; PRAGH, J.V.; VAN DER SLUIJS, J.P.; WHITEHORN, P.R.; WIEMERS, M. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 5-34, 2015.
- SIMONICH, S.L.; HITES, R.A. Global Distribution of Persistent Organochlorine Compounds. **Science**, v. 269, p. 1851-1854, 1995.
- SINGH, N.; DUREJA, P. Persistence of hexaconazole, a triazole fungicide in soils. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 35, n. 5, p. 549; 558, 2000.
- SODERLUND, D.M.; CLARK, J.M.; SHEETS, L.P.; MULLIN, L.S.; PICCIRILLO, V.J.; SARGENT, D.; STEVENS, J.T.; WEINER, M.L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, p. 3-59, 2002.
- STANSLEY, W.; ROSCOE, D.E.; HAWTHORNE, E.; MEYER, R. Food Chain Aspects of Chlordane Poisoning in Birds and Bats. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.40, n. 2, p. 285-291, 2001.
- STAWSKI, C.; WILLIS, C.K.R.; GEISER, F. The importance of temporal heterothermy in bats. **Journal of Zoology**, v. 292, n. 2, p. 86-100, 2014.

STECHELT, C.; KOLB, M.; BAHADIR, M.; DJOSSA, B.A.; FAHR, J. Insecticide residues in bats along a land use-gradient dominated by cotton cultivation in northern Benin, West Africa. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 8812-8821, 2014.

STOCKHOLM CONVENTION. Stockholm Convention on persistent organic pollutants. 2018. <http://chm.pops.int/>. Disponível em: <http://chm.pops.int/TheConvention/Overview/TextoftheConvention/tabid/2232/Default.aspx>. Acesso em 30/04/2018.

STORY, P.; COX, M. Review of the effects of organophosphorous and carbamate insecticides on vertebrates. Are there implications for locust management in Australia? **Wildlife Research**, v. 28, p. 179-193, 2001.2001

STREIT, B.; WINTER, S.; NAGEL, A. Bioaccumulation of selected organochlorines in bats and tits: influence of chemistry and biology. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 2, n. 4, p. 194-199, 1995.

SWANEPOEL, R.E.; RACEY, P.A.; SHORE, R.F.; SPEAKMAN, J.R. Energetic effects of sublethal exposure to lindane on pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus*). **Environmental Pollution**, v. 104, p. 169-177, 1999.

TANG, W.; WANG, D.; WANG, J.; WU, Z.; LI, L.; HUANG, M.; XU, S.; YAN, D. Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. **Chemosphere**, v. 191, p. 990-1007, 2018.

TAXVIG, C.; HASS, U.; AXELSTAD, M.; DALGAARD, M.; BOBERG, J.; ANDEASEN, H.R.; VINGGAARD, A.M. Endocrine-disrupting activities *in vivo* of the fungicides tebuconazole and epoxicanazole. **Toxicology Science**, v. 100, n. 2, p. 464-473, 2007.

THATHEYUS, A.J.; SELVAM, A.D.G. Synthetic pyrethroids: Toxicity and Biodegradation. **Applied Ecology and Environmental Sciences**, v. 1, n. 3, p. 33-36, 2013.

THIES, M.L.; McBee, K. Cross-Placental Transfer of organochlorine pesticides in mexican free-tailed bats from Oklahoma and New Mexico. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 27, p. 239-242, 1994.

THIES, M.L.; THIES, K.M. Organochlorine residues in bats from Eckert James River Cave, Texas. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 673-680, 1997.

THIES, M.L.; THIES, K.; McBEE, K. Organochlorine pesticide accumulation and genotoxicity in mexican free-tailed bats from Oklahoma and New Mexico. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 30, p. 179-187, 1996.

TILAK, K.S.; VEERAIHAH, K.; RAO, D.K. Toxicity and bioaccumulation of Chlorpyrifos in indian carp *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton), and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 73, n. 5, p. 933-941, 2004.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, .E. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selectiv action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 247-268, 2005.

- TURUSOV, V.; RAKITSKY, V.; TOMATIS, L. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, Persistence and Risks. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 2, p. 125-128, 2002.
- VALDESPINO, C.; SOSA, V.J. Effect of landscape tree cover, sex and season on the bioaccumulation of persistent organochlorine pesticides in fruit bat of riparian corridors in eastern Mexico. **Chemosphere**, v. 175, p. 373-382, 2017.
- VAN DEN BERG, H.; MANUWEERA, G.; KONRADSEN, F. Global trends in the production and use of DDT for control of malaria and other vector-borne diseases. **Malaria Journal**, v. 16, n. 401, 2017.
- VENGAYIL, D.T.; SINGH, J.; SINGH, A.L.; DAS, V.K.; SINGH, P.B. Bioaccumulation of carbamate and pyrethroid insecticides in fishes of the river Gomti at Jaunpur during breeding season. **Journal of Ecophysiology and Occupational Health**, v. 11, p. 1-8, 2011.
- VIJGEN, J.; ABHILASH, P.C.; LI, Y.F.; LAL, R.; FORSTER, M.; TORRES, J.; SINGH, N.; YUNUS, M.; TIAN, C.; SCÄFFER, A.; WEBER, R. Hexachlorocyclohexene (HCH) as new Stockholm Convention POPs – a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, p. 152-162, 2011.
- VIJVERBERG, H.; VAN DER ZALM, J.; VAN DER BERCKEN, J. Similar mode of action of pyrethroids and DDT ions sodium channel gating in myelinated nerves. **Nature**, 295, n. 5850, p. 601-603, 1982.
- VILJOEN, I.M.; BORNMAN, R.; BOWMAN, H. DDT exposure of frogs: A case study from Limpopo Province, South Africa. **Chemosphere**, v. 159, p. 335-341, 2016.
- VINGGAARD, A.M.; HNIDA, A.; BREINHOLT, V.; LARSEN, J.C. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity *in vitro*. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 3, p. 227-234, 2000.
- WANG, X.; GAO, X.; HE, B.; ZHU, J.; LOU, H.; HU, Q.; JIN, Y.; FU, Z. cis-bifenthrin induces immunotoxicity in adolescent male C57BL/6 mice. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 7, p. 1849-4856, 2017.
- WICKRAMASINGHE, L.P.; HARRIS, S.; JONES, G.; VAUGHAN, N. Bat activity and species richness on organic and conventional farms: impacts of agricultural intensification. **Journal of Applied Ecology**, v. 40, p. 984-993, 2003.
- WICKRAMASINGHE, L.P.; HARRIS, S.; JONES, G.; JENNINGS, N.V. Abundance and species richness of nocturnal insects on organic and conventional farms: Effects of agricultural intensification on bat foraging. **Conservation Biology**, v. 18, n. 5, p. 1283-1292, 2004.
- WILHELM-FILHO, D.; ALTHOFF, S.L.; DAFRÉ, A.L.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats. **Comparative Biochemistry and Physiological Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 214-220, 2007.
- WILKINSON, G.S.; SOUTH, J.M. Life history, ecology and longevity in bats. **Aging cell**, v. 1, n. 2, p. 124-131, 2002.
- WILLETT, K.; ULRICH, E.M.; HITES, R.A. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. **Environmental Science & Technology**, v. 32, n. 15, 1998.

- WHEELER, W.B.; JOUVENAZ, D.P.; WOJCIK, D.P.; BANKS, W.A.; VANMIDDELEM, C.H.; LOFGREN, C.S.; NESBITT, S.; WILLIAMS, L.; BROWN, R. Mirex residues in Nontarget organisms after application of 10-5 bait for fire ant control, Northeast Florida – 1972-74. **Pesticides Monitoring Journal**, v. 11, n. 3, p. 146-156, 1977.
- WHITE, D.H.; KRYNITSKY, A.J. Wildlife in some areas of New México and Texas accumulate elevated DDE residues, 1983. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 15, p. 149-157, 1986.
- WOOD, T.J.; GOULSON, D. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 17285-17325, 2017.
- YANG, J-D.; LIU, S-H.; LIAO, M-H.; CHEN, R.M.; LIU, P-Y.; UENG, T-H. Effects of tebuconazole on cytochrome P450 enzymes, oxidative stress, and endocrine disruption in male rats. **Environmental Toxicology**, v. 33, n. 8, p. 899-907, 2018.
- ZHANG, W.; JIANG, F.; OU, J. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, p. 125-144, 2011.
- ZHANG, W. Global pesticides use: Profile, trend, cost/benefit and more. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1-27, 2018.
- ZHENG, W.; WANG, X.; YU, H.; TAO, X.; ZHOU, Y.; QU, W. Global trends and diversity in Pentachlorophenol levels in the environment and in humans: a meta-analysis. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 11, p. 4668-4675, 2011.
- ZITKO, V. Chlorinated Pesticides: Aldrin, DDT, Endrin, Dieldrin, Mirex. In: Fiedler, H. (Eds) Persistent Organic Pollutants. **The Handbook of Environmental Chemistry** (v. 3 Series: Anthropogenic Compounds), v. 30. Springer, Berlin, Heidelberg. 2003.
- ZUBROD, J.P.; BUNDSCHUH, M.; ARTS, G.; BRÜL, C.; IMFELD, G.; KNÄBEL, A.; PAYRAUDEAU, S.; RASMUSSEN, J.J.; ROHR, J.; SCARMÜLLER, A.; SMALLING, K.L.; STEHLE, S.; SCHULZ, R.; SCHÄFER, R.B. Fungicides – an overlooked pesticide class? **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 7, p. 3347-3365, 2019.
- ZUKAL, J.; PIKULA, J.; BANDOUCHOVA, H. Bats as bioindicators of heavy metal pollution: history and prospect. **Mammalian Biology**, v. 8, n. 3, p. 220-227, 2015.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO EMPREGANDO MICRO-QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MÚSCULO DE MORCEGOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

1. INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental por agrotóxicos tem causado impactos diretos e indiretos nos ecossistemas (Köhler; Triebkorn, 2013). Há registros de diminuição da biodiversidade (Geiger et al., 2010; Beketov et al., 2013) e declínios populacionais de alguns animais, como morcegos (Clark et al., 1988; Mitchell-Jones et al., 1989; Clark, 2001), aves (Mineau; Whiteside, 2013) e anfíbios (Sparling et al., 2001; Davidson, 2004).

A exposição de animais a agrotóxicos pode ser avaliada por meio da determinação de resíduos bioacumulados em tecidos, que usualmente é feita por técnicas cromatográficas associadas a analisadores de massas que permitem a separação e detecção de componentes de uma mistura com alta sensibilidade analítica (Alder et al., 2006; Lehotay et al., 2008). Devido à natureza complexa das amostras e à presença de agrotóxicos em baixa concentração (resíduos), é obrigatória a execução de uma etapa prévia de preparo da amostra, na qual é feita a extração e concentração dos analitos de interesse, além da remoção de possíveis interferentes (Hercegová et al., 2007).

O método de extração QuEChERS (acrônimo de Quick, Easy, Effective, Cheap, Rugged and Save) foi desenvolvido para ser um método multiresíduo simples e passível de ser executado em qualquer laboratório, não havendo a necessidade de equipamentos sofisticados (Anastassiades et al., 2003). O método foi proposto para extração de resíduos de agrotóxicos em matrizes vegetais, mas, por sua simplicidade e eficiência, foi difundido e otimizado para uso em outros tipos de matrizes, como tecidos animais (Sartaelli et al., 2012; Brandhonneur et al., 2015), leite (Jeong et al., 2012; Luzardo et al., 2013), mel (Sampaio et al., 2012; Tette et al., 2016), água (Brondi et al., 2011; Cerqueira et al., 2014), solo (Asenio-Ramos et al., 2010; Bragança et al., 2012), dentre outros.

O QuEChERS original requer 10 g de amostra (Anastassiades et al., 2003), uma quantidade nem sempre disponível quando se trata de amostras pequenas. Neste sentido,

a miniaturização do QuEChERS é uma alternativa para a realização da análise em amostras com essa limitação (Brandhonneur et al., 2015; Stöckelhuber et al., 2017; Jesús et al., 2018). Além disso, o método miniaturizado utiliza menor quantidade de reagentes e solventes, sendo relativamente mais barato e gerando menor impacto na saúde dos executores e no meio ambiente (Gałuska et al., 2013).

Morcegos (Microchiroptera) são animais de pequeno porte e com grande variedade de hábitos alimentares, o que os tornam importantes agentes na manutenção de ecossistemas, por meio da dispersão de sementes, polinização e controle de populações de insetos e pequenos vertebrados (Kunz et al., 2011). Os primeiros relatos de mortalidade de morcegos relacionados a agrotóxicos foram publicados no início da década de 1950 (Benton, 1951; Dalquest, 1951). Posteriormente, outros trabalhos, por meio da determinação de resíduos, relataram a exposição de morcegos a agrotóxicos, avaliaram efeitos e determinaram doses e concentrações letais, principalmente de organoclorados conforme apresentado no Capítulo 1. Nos últimos anos tem havido um interesse maior em avaliar efeitos relacionados à exposição crônica a essas substâncias, no entanto, avaliações de populações naturais ainda são escassas (Stechert et al., 2014; Valdespino; Sosa, 2017).

A determinação de resíduos de agrotóxicos em espécies de morcegos de menor porte pode ser um desafio considerando a pequena massa corporal desses animais, que podem pesar menos que 10 g (Altringham, 2011). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi descrever a otimização e validação de um QuEChERS miniaturizado para análise multirresíduos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) utilizando aproximadamente 250 mg de tecido muscular de morcegos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Padrões e Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram grau analítico para HPLC: acetonitrila (JTBaker, México), acetato de etila (JTBaker, México), hexano (Merck, Alemanha), amina primária e secundária (PSA) (Agilent, USA), octadecilsilano (C18) (Agilent, USA), sulfato de magnésio (Sigma-Aldrich, USA), acetona (Scharlau, Espanha). A água ultrapura foi obtida pelo sistema de purificação direct Q UV3 Milipore (Merck,

Alemanha). Para os padrões de agrotóxico foi utilizado uma solução estoque de um mix de agrotóxicos cedidos pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) contendo 69 agrotóxicos (Tabela 2. 1).

2.2 Equipamentos

Todos os equipamentos foram de precisão, sendo utilizado Balança analítica Ohaus modelo Explorer D = 0,1 mg, Centrífuga Fanem Excelsa Baby 1, Centrífuga modelo 2K15 Sigma, Agitador vórtex marca Ika MS3 digital.

2.3 Coleta de morcegos

Duas áreas com diferentes pressões antrópicas foram escolhidas para a coleta dos morcegos, Uberaba (19°45'43''S e 48°06'05''W), caracterizada por intensa atividade agropecuária (Seapa, 2018), e uma Unidade de Conservação, o Parque Nacional (PARNA) da Serra do Cipó (ICMBio, 2009). As coletas foram realizadas em 2018 e 2019 com o uso de redes-de-neblina de 10 a 12 metros de comprimento, as quais foram abertas ao anoitecer em trilhas, fragmentos de mata e nas proximidades de abrigos diurnos. As redes permaneceram abertas por aproximadamente quatro horas (18:00 as 22:00 horas) tendo sido vistoriadas em intervalos de 20 a 30 minutos. Procedimentos de captura foram conduzidos conforme recomendações da American Society of Mammalogists (Sikes et al., 2016). Ao todo foram coletados 148 morcegos, sendo 78 em Uberaba e 70 no PARNA. Os animais foram acondicionados em sacos de pano individuais até a realização da eutanásia. Para a eutanásia, os animais foram colocados em um saco plástico com algodão embebido de Isoflurano para indução da perda de consciência, e posteriormente foi aplicada injeção intraperitoneal de anestésico Cloridrato de Cetamina e então armazenados em freezer -20 °C até a realização das análises.

O delineamento deste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo CEUA 166/2017) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio - N° 57026-1).

2.5 Preparo de amostra

A escolha dos tecidos para análise de resíduos foi feita considerando os estudos prévios que demonstraram que resíduos de agrotóxicos e outros xenobióticos podem ser encontrados em maiores concentrações no fígado e nos tecidos adiposo e muscular (Jefferies, 1972; Covaci et al., 2004; Barbieri et al., 2019). A escolha do tecido muscular como matriz se deu por ser o tecido mais abundante, já que o tecido adiposo de morcegos é relativamente escasso (McNab, 1976; Freitas et al., 2006) e a quantidade de fígado é insuficiente para as análises, principalmente se tratando de espécies de menor porte. Fragmentos de tecido adiposo e fígado de alguns morcegos de maior porte foram retirados a fim de realizar análises comparativas entre os diferentes tipos de tecidos.

Para o preparo da amostra foi feita uma adaptação do QuEChERS miniaturizado descrito por Brandhonneur e colaboradores (2015). Os espécimes foram descongelados e fragmentos de músculo peitoral (250 mg) foram retirados e posteriormente, desidratados e homogeneizados com 400 mg de $MgSO_4$. Em cada amostra foi adicionado acetonitrila (1,4 ml), hexano (200 μ l) e Azoxistrobina (1,2 ng/mL) como padrão para controle do processo. As amostras foram agitadas no vórtex por 5 min a 2200 rpm e posteriormente transferidas para freezer a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min. As amostras foram centrifugadas por 20 min a 5000 rpm. Em seguida foi retirado 800 μ l da fase orgânica e colocado em tubo tipo Eppendorf contendo 100 mg de $MgSO_4$, 50 mg de amina primária e secundária (PSA) e 50 mg de C_{18} . Após agitação de 1 min no vórtex a 2200 rpm, as amostras foram colocadas no agitador por 10 min em temperatura ambiente antes de serem centrifugadas por 12 minutos a 12000 rpm e $10\text{ }^\circ\text{C}$. Foi retirado 150 μ l da fase orgânica e colocado em *vial* com *insert* para evaporação do solvente em temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas com 75 μ l de acetona, agitadas no vórtex por 30 segundos a 2200 rpm e 8 μ l da solução foram injetados no CG-EM (Figura 2. 1).

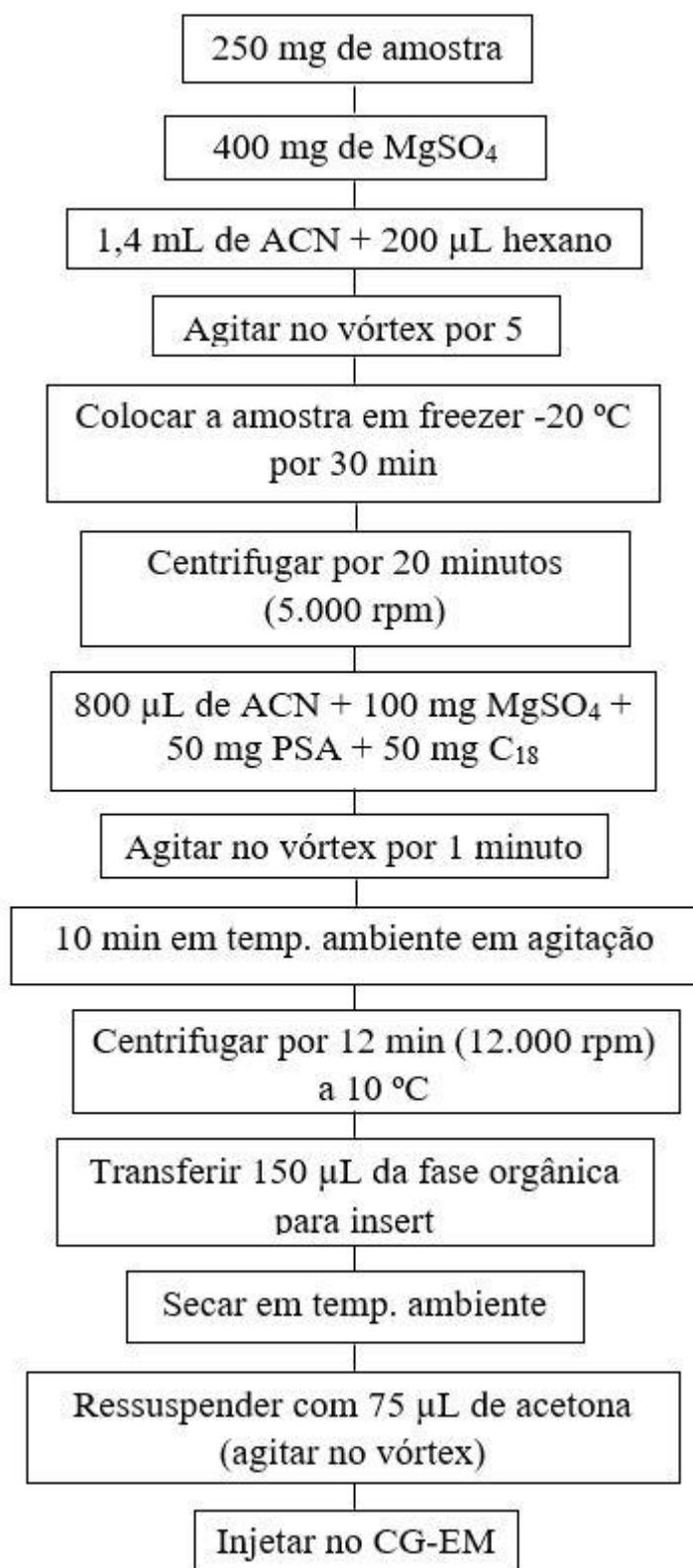


Figura 2. 1. Fluxograma do micro-QuEChERS para análise de agrotóxicos por CG-EM em músculo de morcego.

2.6 Otimização do QuEChERS modificado

Foram comparados dois métodos de extração, um utilizando 1000 mg (método A) e outro utilizando 250 g de tecido muscular de morcegos. Os métodos são descritos abaixo:

Método A

O método A foi baseado no QuEChERS modificado descrito por Oliveira e colaboradores (2015). Para extração, foi utilizada uma mistura de água, acetonitrila e acetato de etila. Após adição de sulfato de magnésio e acetato de sódio, as amostras foram colocadas em freezer -20 °C por uma noite. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, sendo adicionado ao extrato sulfato de magnésio, PSA e C₁₈. Após agitação em temperatura ambiente e centrifugação, as amostras estavam prontas para serem injetadas no CG-MS (Figura 2.2).

Método B

O método B foi baseado no QuEChERS miniaturizado proposto por Brandhonneur e colaboradores (2015). A extração foi feita utilizando sulfato de magnésio e solução de acetonitrila e hexano. Após agitação no vórtex, as amostras foram colocadas em freezer -20 °C por 30 minutos. Posteriormente foram centrifugadas e a fase orgânica foi adicionado à mistura de sulfato de magnésio, PSA e C₁₈. Após agitação em temperatura ambiente e centrifugação, as amostras foram secas em temperatura ambiente por uma noite. As amostras foram ressuspendidas com acetona para então serem injetadas no CG-MS. Este foi o método que apresentou o melhor resultado porque apresentou cromatograma mais limpo, menor linha de base e picos mais bem definidos. Os procedimentos de ambos os métodos estão ilustrados na Figura 2.2.

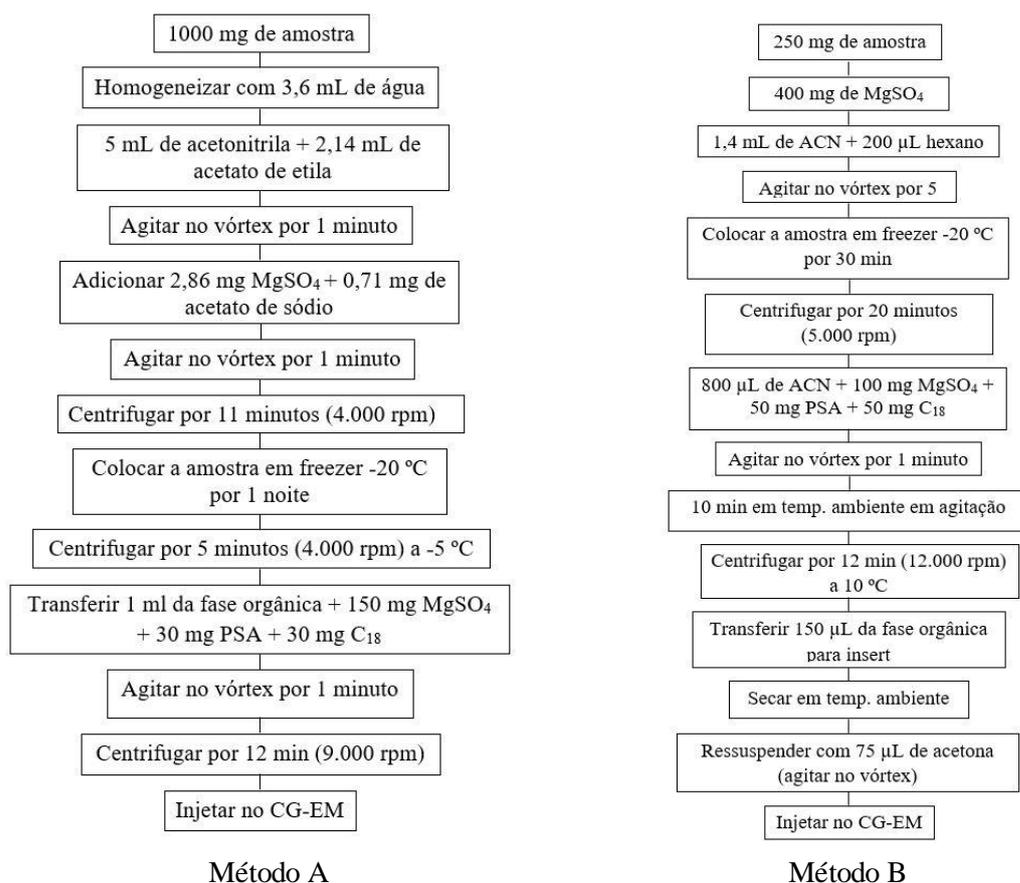


Figura 2.2. Fluxograma dos Métodos A e B.

Após a definição do melhor método de extração, o fragmento de músculo de morcego foi fortificado com solução estoque de agrotóxicos e extraído, como descrito anteriormente, para determinação tempo de retenção e íons filhos para montagem do modo SIM (Figura 2.3 e Figura 2.4).

A acetonitrila é um dos solventes mais comumente utilizados em extrações porque permite extração de grande número de agrotóxicos e minimiza a extração de lipídios, carboidratos e proteínas presentes na matriz (Lehotay et al., 2001). Os lipídios são compostos que merecem maior atenção porque, além de comprometerem a qualidade dos resultados, em longo prazo podem se depositar no sistema de injeção ou coluna cromatográfica, prejudicando o sistema cromatográfico (Hajšlová; Zrostlíková, 2003). O hexano adicionado à extração auxilia na remoção de compostos lipofílicos, já que estes são menos solúveis em acetonitrila (Przybylski; Segard, 2009). Os sais secantes, como sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e sulfato de sódio (Na_2SO_4), atuam na remoção de água residual da solução e facilitam a remoção de componentes polares da matriz

(Lehotay, 2000; Lehotay et al., 2001; Anastassiades et al., 2003). O MgSO_4 tem sido preferido porque tem maior poder secante que o Na_2SO_4 (Lehotay et al., 2001). Além disso, o calor liberado na reação química de hidratação do MgSO_4 pode contribuir para a extração de agrotóxicos (Anastassiades et al., 2003).

Os sorventes PSA e octadecilsilano (C_{18}) proporcionam limpeza dos extratos mediante remoção de interferentes coextraídos da matriz (Anastassiades et al., 2003; Lehotay et al., 2010; Georgakopoulos et al., 2011). O PSA é uma amina primária e secundária com estrutura bidentada que confere efeito quelante capaz de reter ácidos graxos livres, carboidrato e outros compostos polares que podem estar presentes na matriz (Anastassiades et al., 2003). O C_{18} é importante para a remoção de ácidos graxos e outros componentes apolares (Georgakopoulos et al., 2011). Tais sorventes proporcionam ótimos resultados na limpeza dos extratos, no entanto o elevado custo pode ser um fator limitante.

2.7 Controle do processo

O fungicida azoxistrobina foi escolhido para controlar o processo de extração (padrão lote G128076, Dr. Ehrenstorfer, Alemanha; concentração 1016 ng/ μL ; solução estoque (SE) 1,00 ng/ μL), porque dentre os padrões de agrotóxicos disponíveis esse era o que tinha menor probabilidade de estar presente nas amostras (Ibama, 2017; Sisagua, 2019). A curva de calibração para azoxistrobina (1,2 ng/mL) foi montada nas concentrações 0,02; 0,06; 0,10; 0,16 e 0,20 ng/ μL . Foi preparada uma solução de uso (30 μL SE/25 mL de acetonitrila) e todas as amostras, incluindo os brancos, foram fortificadas com 440 μL de azoxistrobina. A extração foi considerada adequada quando a taxa de recuperação da azoxistrobina variou entre 80 e 110% (Brasil, 2003).

2.8 Condições Cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás (modelo 7890A) acoplado ao espectrômetro de massas quadrupolo (modelo 5975C) com amostrador automático (modelo Sampler 80), todos da Agilent Technologies. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna capilar DB-5 (30m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm ; Agilent Technologies, USA), utilizando o hélio (99,999%, Air Products, Brasil) como gás de arraste com fluxo a 1,2 mL.min⁻¹. As condições cromatográficas utilizadas foram:

temperatura do injetor a 250 °C e volume de injeção de 8 µl em modo *splitless*; rampa de temperatura da coluna foi iniciada em 60 °C, seguida de 3 rampas com taxa de aquecimento 20 °C/min até 160 °C; seguido uma taxa de 5 °C/min até 255 °C; e posteriormente 20 °C/min até temperatura final de 280 °C onde permaneceu por 7 min. O tempo de pós-corrída foi de 2 min a 280 °C com fluxo de hélio a 2,6 mL.min⁻¹. Tempo total de corrida foi 32,25 min. Entre as injeções, a seringa foi lavada três vezes com acetona:água (1:1 v/v) e três vezes com acetonitrila. As condições analíticas utilizadas para o espectrômetro de massas foram: voltagem de ionização por impacto de 70 eV; temperatura da fonte de ionização a 230 °C; temperatura do quadrupolo a 150 °C; e temperatura de interface a 300 °C.

O *software* usado para aquisição dos dados foi o MSD ChemStation. A aquisição dos dados foi iniciada no tempo de 3,5 min, no modo *full scan* com faixa de massa analisada entre 50 e 450 m/z e no modo SIM (*Selective Ion Monitoring*) com tempos de retenção e íons monitorados conforme Tabela 2. 1. A confirmação dos analitos foi realizada confrontando os resultados obtidos com o banco de dados da biblioteca NIST (*National Institute of Standards and Technology*). Para a identificação dos analitos foi utilizado o modo SIM e os íons monitorados são apresentados na Tabela 2. 1.

Tabela 2. 1. Agrotóxicos utilizados na análise cromatográfica com as respectivas fórmulas e pesos moleculares, tempos de retenção (TR) e íons monitorados (m/z).

Agrotóxico	Fórmula Molecular	Peso molecular	TR	Íon 1 (m/z)	Íon 2 (m/z)	Íon 3 (m/z)
Alacloro	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	269,77	12,63	269,00	188,00	160,00
Aldrim	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	364,91	13,95	292,90	262,90	79,00
Azoxistrobina	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	344,00	29,64	403,10	388,10	344,00
Bifentrina	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	422,868	21,98	422,10	181,00	186,00
Bromofos Metil	C ₈ H ₈ BrCl ₂ O ₃ PS	365,996	14,61	330,80	212,80	124,80
Bromopropilato	C ₁₇ H ₁₆ Br ₂ O ₃	428,12	21,93	427,80	340,80	182,80
Captana	C ₉ H ₈ Cl ₃ NO ₂ S	300,589	15,57	263,80	148,90	78,90
Carbofenotiona	C ₁₁ H ₁₆ ClO ₂ PS ₃	342,865	19,72	341,90	156,90	96,90
Ciflutrina	C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃	434,288	26,14	433,00	226,00	162,00
Cipermetrina	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	415,07	26,45	315,10	181,00	162,90
Clorfenapir	C ₁₅ H ₁₁ BrClF ₃ N ₂ O	407,61	17,99	407,90	247,00	58,90

Clortalonil	$C_8Cl_4N_2$	265,911	11,12	265,80	228,90	193,90
Clorpirifos Metílico	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	320,90	12,38	285,80	124,90	78,90
Clortiofos	$C_{11}H_{15}Cl_2O_3PS_2$	361,245	18,93	359,90	268,80	96,80
DDD 2,4	$C_{14}H_{10}Cl_4$	320,041	17,54	234,90	198,90	165,00
DDE 4,4	$C_{14}H_8Cl_4$	318,025	16,18	317,80	245,90	176,00
DDT 2,4	$C_{14}H_9Cl_5$	354,486	18,84	353,80	234,80	198,80
Dicofol	$C_{14}H_9Cl_5O$	370,486	14,39	249,90	138,90	110,90
Dieldrim	$C_{12}H_8Cl_6O$	377,87	17,41	379,80	276,80	251,90
Endossulfam I	$C_9H_6Cl_6O_3S$	403,82	16,49	240,80	206,90	194,80
Endossulfam II	$C_9H_6Cl_6O_3S$	403,82	18,22	407,70	268,80	170,00
Endossulfam sulfato	$C_9H_6Cl_6O_4S$	419,81	19,86	421,80	386,80	236,80
Endrim	$C_{12}H_8Cl_6O$	380,91	18,11	379,90	262,80	80,90
Fenarimol	$C_{17}H_{12}Cl_2N_2O$	330,03	24,02	330,00	218,90	138,90
Fenitrotiona	$C_9H_{12}NO_5PS$	277,02	13,39	276,90	260,00	124,90
Fenpropatrina	$C_{22}H_{23}NO_3$	349,4229	22,28	349,10	181,00	97,00
Fenvarelato	$C_{25}H_{22}ClNO_3$	419,900	28,05	419,10	167,00	124,90
Folpete	$C_9H_4Cl_3NO_2S$	296,558	15,77	294,00	103,90	75,80
Fosalone	$C_{12}H_{15}ClNO_4PS_2$	366,99	23,02	366,90	181,90	120,90
Heptacloro	$C_{10}H_5Cl_7$	369,82	12,82	371,80	271,80	99,90
Heptacloro epóxido	$C_{10}H_5Cl_7O$	389,317	15,25	387,80	352,90	80,90
α -HCH	$C_6H_6Cl_6$	290,83	9,71	353,70	218,80	180,80
β -HCH	$C_6H_6Cl_6$	290,83	10,42	253,80	218,80	180,80
γ -HCH	C_6Cl_6	284,782	10,63	253,80	218,80	180,80
σ -HCH	$C_6H_6Cl_6$	290,83	11,47	253,70	218,80	180,80
Lamda-cialotrina	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$	449,10	23,89	449,10	209,00	181,00
Metoxiclor	$C_{16}H_{15}Cl_3O_2$	344,01	22,12	344,00	227,00	152,00
Mirex	$C_{10}Cl_{12}$	539,63	23,60	331,70	271,60	236,70
Ovex	$C_{12}H_8Cl_2O_3S$	303,161	16,93	301,90	174,90	110,90
Oxifluorfem	$C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$	361,700	17,67	361,00	299,90	252,00
Paration Metil	$C_8H_{10}NO_5PS$	263,00	12,59	262,90	124,90	108,90

Permetrina	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	390,08	25,27	207,00	183,00	162,90
Procimidona	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	296,149	15,69	282,90	254,90	96,00
Profenofós	$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$	371,94	17,23	373,90	338,90	138,90
Protiofós	$C_{11}H_{15}Cl_2O_2PS_2$	345,245	17,04	308,90	266,90	112,80
Quintozene	$C_6Cl_5NO_2$	295.335	10,48	294,80	264,60	236,70
Tetradifona	$C_{12}H_6Cl_4O_2S$	353,88	22,81	355,80	239,10	98,00
Trifluralina	$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$	335,2790	9,15	306,00	290,00	263,90
Vinclozolina	$C_{12}H_9Cl_2NO_3$	286.111	12,52	284,90	211,90	197,90

2.8 Otimização das condições cromatográficas

Foi utilizada uma solução estoque (SE) de padrões contendo 69 agrotóxicos cedida pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED). O preparo da solução a ser injetada no CG-EM foi de 1000 μ L da solução estoque em acetonitrila:acetato de etila (7:3 v/v). A concentração final de cada agrotóxico está descrita na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Concentração da solução estoque (SE) e concentração da solução final dos padrões dos agrotóxicos utilizados na análise cromatográfica.

Agrotóxico	Concentração SE (ng/ μ L)	Concentração final (ng/ μ L)
Alacloro	1,00	0,200
Aldrim	1,00	0,200
Azoxistrobina	1,00	2,00
Bifentrina	1,00	0,200
Bromofos Metil	1,00	0,200
Bromopropilato	1,00	0,201
Captana	2,01	0,402
Carbofenotiona	1,00	0,200
Ciflutrina	2,01	0,401
Cipermetrina	1,00	0,200
Clorfenapir	0,50	0,100
Clorotalonil	1,00	0,200
Clorpirifos Metílico	0,50	0,100

Clortiofos	1,01	0,201
DDD 2,4	0,50	0,100
DDE 4,4	0,50	0,100
DDT 2,4	0,50	0,100
Dicofol	1,00	0,200
Dieldrim	1,00	0,200
Endossulfam I	1,00	0,200
Endossulfam II	1,00	0,200
Endossulfam sulfato	1,00	0,200
Endrim	1,00	0,201
Esfenvarelato	1,00	0,200
Fenarimol	1,00	0,200
Fenitrotiona	1,00	0,200
Fenpropatrina	1,00	0,200
Folpete	2,00	0,400
Fosalone	1,00	0,200
Heptaclo	1,00	0,200
Heptaclo epóxido	1,00	0,200
α - hexaclorociclohexano	1,00	0,200
β - hexaclorociclohexano	1,00	0,200
γ - hexaclorociclohexano	1,00	0,200
σ -hexaclorociclohexano	1,00	0,200
Lamda-cialotrina	1,01	0,201
Metoxiclor	1,00	0,200
Mirex	0,50	0,100
Ovex	1,00	0,200
Oxifluorfem	2,00	0,400
Paration Metil	2,00	0,400
Permetrina	1,01	0,201
Procimidona	1,00	0,200

Profenofós	2,00	0,401
Protiofós	2,00	0,400
Quintozene	0,50	0,100
Tetradifona	2,00	0,401
Trifluralina	1,00	0,200
Vinclozolina	1,00	0,200

Para a otimização das condições cromatográficas foram testadas metodologias descritas na literatura e utilizadas no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO). As temperaturas de forno dos métodos utilizados estão descritas nas Tabelas 2.3 – 2.6. O volume de injeção inicial foi de 1 µL de padrões de agrotóxicos em acetonitrila:acetato em modo *splitless*, com temperatura do injetor a 250 °C e gás de arraste variando entre 1,0 e 1,2 mL/min. A coluna capilar DB-5 e a temperatura de fonte 230 °C.

Tabela 2.3. Programação do Método 1 com as taxas de aquecimento, temperaturas de forno, os tempos de rampa e o tempo total de corrida (adaptado de LANAGRO, 2017).

	Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Tempo de corrida (min)
Inicial		80	0	0
Rampa 1	20	160	0	4
Rampa 2	5	255	0	23
Rampa 3	20	280	1	25,25

Tabela 2.4. Programação do Método 2 com as taxas de aquecimento, temperaturas de forno, os tempos de rampa e o tempo total de corrida (Maštovská et al., 2005).

	Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Tempo de corrida (min)
Inicial		80	1,5	1,5
Rampa 1	20	180	0	6,5
Rampa 2	5	230	0	16,5
Rampa 3	25	290	10	28,9

Tabela 2.5. Programação do Método 3 com as taxas de aquecimento, temperaturas de forno, os tempos de rampa e o tempo total de corrida (adaptado de Faria et al., 2009).

	Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Tempo de corrida (min)
Inicial		60	1	1
Rampa 1	30	180	0	5
Rampa 2	5	300	0	29
Rampa 3	50	325	0	29,5

Tabela 2.6. Programação do Método 4 com as taxas de aquecimento, temperaturas de forno, os tempos de rampa e o tempo total de corrida (adaptado de Valenzuela et al., 2019).

	Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Tempo de corrida (min)
Inicial		60	0	0
Rampa 1	20	160	0	5
Rampa 2	5	255	0	24
Rampa 3	20	280	7	32,25

Os métodos 1 e 4 foram os que apresentaram os melhores resultados. Estes métodos foram testados novamente com volume de injeção de 2 µL. O método 4 foi escolhido porque apresentou espectro com menor linha de base, menos ruído e melhor definição dos picos (Figura 2.3). Em seguida o método escolhido foi testado com os volumes de injeção de 5 µL e 8 µL. O volume de injeção de 8 µL foi o que possibilitou detecção de maior número de agrotóxicos. Os resultados são apresentados na Tabela 2.7.

Tabela 2.7. Agrotóxicos detectados nos testes de volume de injeção dos métodos 1, 2, 3 e 4.

Volume de injeção	1 µL				2 µL		5 µL	8 µL
	M1	M2	M3	M4	M1	M4	M4	M4
Alacloro	X	X			X	X	X	X
Aldrim	X	X	X	X	X	X	X	X
Azoxistrobina							X	X
Bifentrina		X					X	X
Bromofos					X	X		X
Bromopropilato							X	X
Captana							X	X
Carbofenotiona							X	X

Ciflutrina							X	X
Cipermetrina						X	X	X
Clordano	X	X	X	X	X	X	X	X
Clorfenapir							X	X
Clorfenvifós								
Clorotalonil							X	X
Clorpirifós								X
Clorpirifós metil					X		X	X
Clortiofós							X	X
DDD 2,4					X	X	X	X
DDE 2,4		X		X	X	X		X
DDE 4,4	X	X	X	X		X	X	X
DDT 2,4					X	X	X	X
DDT 4,4							X	X
Deltametrina								
Diclorobenzofenona 4,4								
Dicofol								
Dicofol grupo								
Dieldrin	X	X	X		X	X	X	X
Difenoconazol								
Endossulfan Alfa I	X	X	X	X	X	X	X	X
Endossulfan Beta II	X	X			X	X	X	X
Endossulfan Sulfato						X	X	X
Endrin				X	X	X	X	X
Esfenvalerato							X	
Fempropatrina							X	X
Fenarimol							X	X
Fenitrotiona							X	X
Fenvalerato								X
Fipronil								
Fluquinconazol								
Folpete							X	X
Fosalone							X	
α - hexaclorociclohexano					X	X	X	X
β - hexaclorociclohexano					X	X	X	X

σ -hexaclorociclohexano	X	X		X	X	X	X	X
γ - hexaclorociclohexano	X			X	X		X	X
Heptacloro	X	X						
Heptacloro epoxido	X			X	X	X	X	X
Hexaclorobenzeno	X				X			
Iprodiona								
Lamda Cialotrina							X	X
Metolacloro								
Metoxicloro							X	X
Mirex							X	X
Ovex (Clorfenson)					X	X		X
Oxifluorfeno						X		X
Paration etil								
Paration metil								X
Pendimentalina								
Permetrina								X
Phitalimide								
Pirimicarb								
Pirimifós etil								
Pirimifós metil								
Procimidona	X				X	X		X
Profenofós								X
Propoxur								
Protiofós	X	X	X	X	X	X	X	X
Quintozeno								
Tetradifon						X		X
THPI								
Trifluralina	X	X	X	X	X	X	X	X
Vinclozilone	X	X			X	X	X	X
Total	16	14	7	11	23	25	40	49

Para verificar a ocorrência de degradação de agrotóxicos no sistema de injeção, as temperaturas do injetor também foram testadas em 100 °C, 150 °C, 200 °C, 250 °C. A temperatura que apresentou melhor resultado foi 250 °C (Tabela 2.8).

Tabela 2.8. Agrotóxicos, tempos de retenção (TR), percentual de recuperação (%) e temperaturas do injetor.

Temperatura do injetor	100 °C		150 °C		200 °C		250 °C	
Agrotóxico	TR 1	%						
4,4 DDT	-	-	20,13	40,9	-	-	-	-
Alacloro	12,491	14,6	12,667	87,9	12,686	75,4	12,634	90,3
Aldrim	13,81	95,8	13,985	98,5	13,995	96,3	13,949	97,2
Azoxistrobina	-	-	-	-	-	-	29,64	77,5
Bifentrina	21,821	58,3	22,016	57,2	-	-	21,982	79,5
Bromofos	14,483	86,6	14,649	97,7	14,668	95,1	14,613	97,2
Bromopropilato	21,752	72,5	21,967	31,5	-	-	21,934	90
Captana	15,421	78,5	15,617	93,7	-	-	15,57	72
Carbofenotiona	19,553	85,5	19,758	94,1	19,778	97,5	19,724	96,2
Cialotrina lambda	-	-	-	-	23,962	52,2	23,894	93,5
Ciflutrina	-	-	-	-	-	-	26,141	69,4
Cipermetrina	-	-	-	-	-	-	26,454	49,4
Clordana	16,125	6,35	-	-	-	-	-	-
Clorfenapir	-	-	18,027	62,6	18,037	93,6	17,989	74,4
Clorotalonil	-	-	-	-	-	-	11,115	52,9
Clorpirifos Metil	-	-	-	-	12,433	55,1	12,381	75,1
Clortiofós I	18,781	59,6	18,966	75,8	18,986	72,2	18,934	78,8
Clortiofós III	-	-	18,506	71,1	18,536	72,1	-	-
DDD 2,4	17,393	31	17,578	42,3	17,597	36,3	17,54	38,1
DDE 4,4	17,178	29,1	17,363	71,3	17,383	72,1	17,326	70,5
DDT 2,4	18,683	49,1	18,878	73,5	18,888	72,2	18,836	72,3
Dicofol	-	-	-	-	-	-	14,388	13,8
Dieldrin	17,256	67,3	17,451	83,4	17,461	85,5	17,413	89,3
Endossulfan Alfa I	16,33	34,4	16,534	43,5	15,544	41,7	16,487	41,6
Endossulfan Beta II	-	-	18,32	35,7	-	-	18,223	20,4
Endossulfan sulfato	19,71	76,4	19,915	77,3	19,935	96,3	19,86	90,3
Endrin	17,949	78,4	18,154	90,2	18,164	87,7	18,115	86,5
Fempropatrina	22,143	24,9	-	-	22,329	55,9	22,284	73,1
Fenarimol	-	-	-	-	24,118	56	24,021	94,5
Fenitrotiona	13,263	27,4	13,439	95,2	13,458	93,1	13,393	94,4
Fenvalerato alpha	-	-	-	-	-	-	28,047	69,9

Folpete	-	-	15,822	58,8	-	-	15,766	54,6
Fosalone	-	-	-	-	-	-	23,024	89,9
HCH Gama	10,524	33,8	-	-	-	-	-	-
Heptacloro	12,686	37,4	12,852	95	12,862	82,5	12,819	87,6
Heptacloro epoxido	15,098	55,5	15,234	93,2	15,304	82,6	15,248	90,9
α - hexaclorociclohexano	9,754	43,6	9,735	31,1	9,765	25,4	9,713	35,9
β - hexaclorociclohexano	-	-	10,504	31,8	10,514	31,5	10,424	39,1
γ - hexaclorociclohexano	-	-	10,67	27,8	10,679	30,1	10,628	32,1
σ -hexaclorociclohexano	11,371	29,8	11,536	32,2	10,845	32,1	11,466	32,3
Metoxicloro	21,967	65,3	22,173	39,6	22,173	47	22,119	88,2
Mirex	-	-	-	-	23,679	64,2	23,62	88,9
Ovex (Clorfenson)	16,778	87,1	16,739	78,4	17,002	85,1	16,925	93,1
Oxifluorfenó	17,51	71	17,695	88,2	17,714	95,8	17,667	95,3
Paration metil	12,452	27,8	12,628	94,6	12,628	78,6	12,585	96,7
Permetrina	-	-	-	-	25,31	12,8	25,272	42,1
Procimidona	-	-	15,744	62,6	15,753	93,4	15,688	86,5
Profenofós	17,07	95,1	17,265	93,1	17,275	94,4	17,228	91,2
Protiofós	16,859	83,4	16,855	90,9	17,099	96,6	17,043	94,7
Tetradifon	-	-	-	-	-	-	22,81	76,4
Trifluralina	9,179	97,3	9,17	97,7	9,189	98,4	9,148	97,6
Vinclozilone	12,598	24,6	12,559	89,4	12,569	93,3	12,517	91
Total	31		36		36		49	

De acordo com o guia de validação de métodos e procedimentos de controle de qualidade para análise de resíduos de pesticidas, para que a análise por CG-EM com analisador de massa simples quadrupolo seja válida, é necessário que a aquisição dos dados seja feita no método *full scan*, com faixa limitada de m/z e modo SIM (*Selective Ion Monitoring*) monitorando três íons (European Commission, 2017).

No modo *full scan* foi realizada uma varredura completa de massas no intervalo de 50 e 450 m/z , sendo gerados espectros completos que podem conter mais de uma substância no mesmo tempo de retenção. Esse modo de aquisição de dados apresenta menor sensibilidade quando os analitos pesquisados se encontram em baixas concentrações e em presença de altas concentrações de interferentes da matriz (Peña et al., 2002; Soboleva et al., 2004).

A sensibilidade e seletividade do método podem ser melhoradas utilizando-se o modo SIM, no qual o analisador de massas é programado para monitorar somente íons característicos dos compostos pesquisados (Soboleva et al., 2004). Para a programação desse modo, foram informados três íons-filhos de cada agrotóxico pesquisado em seus respectivos tempos de retenção (Tabela 2. 1) (Figura 2.3 e Figura 2.4).

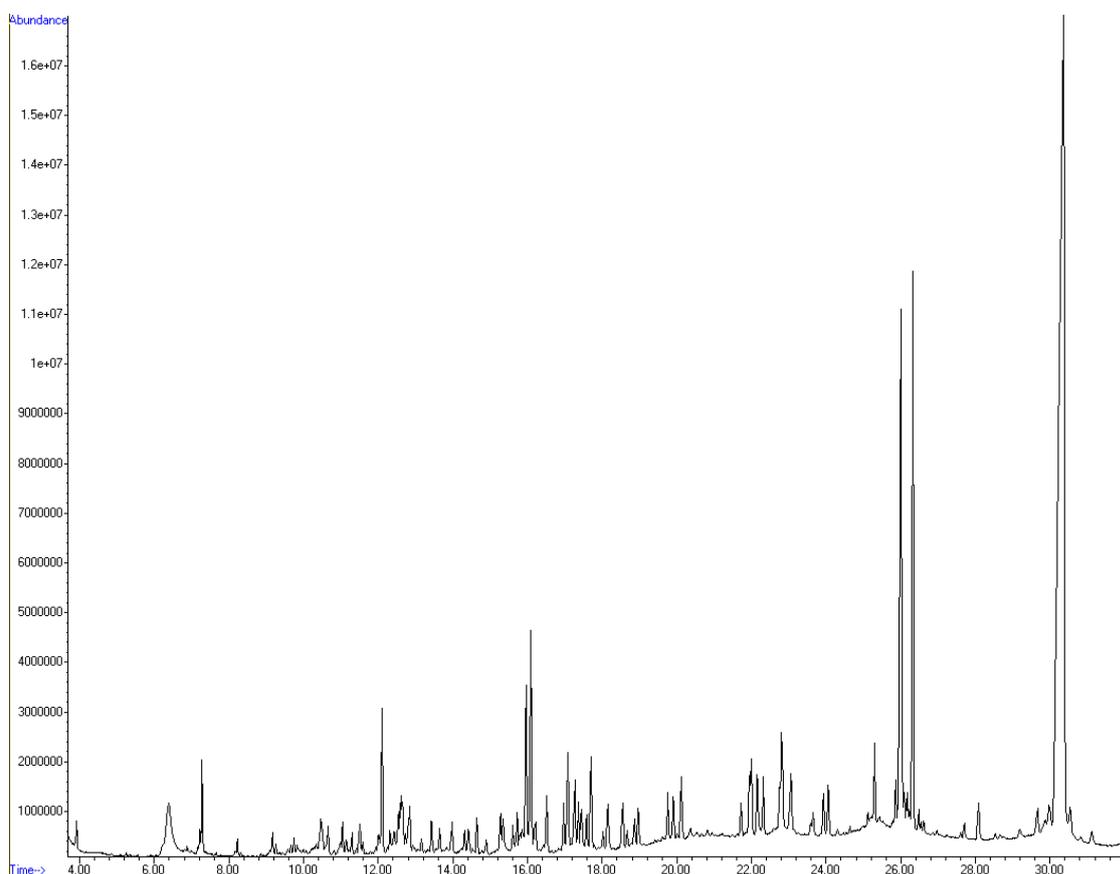


Figura 2.3. Espectro obtido por CG-EM de músculo de morcego fortificado com mistura de 69 agrotóxicos no modo de aquisição *full scan*. Temperatura de injetor a 250 °C.

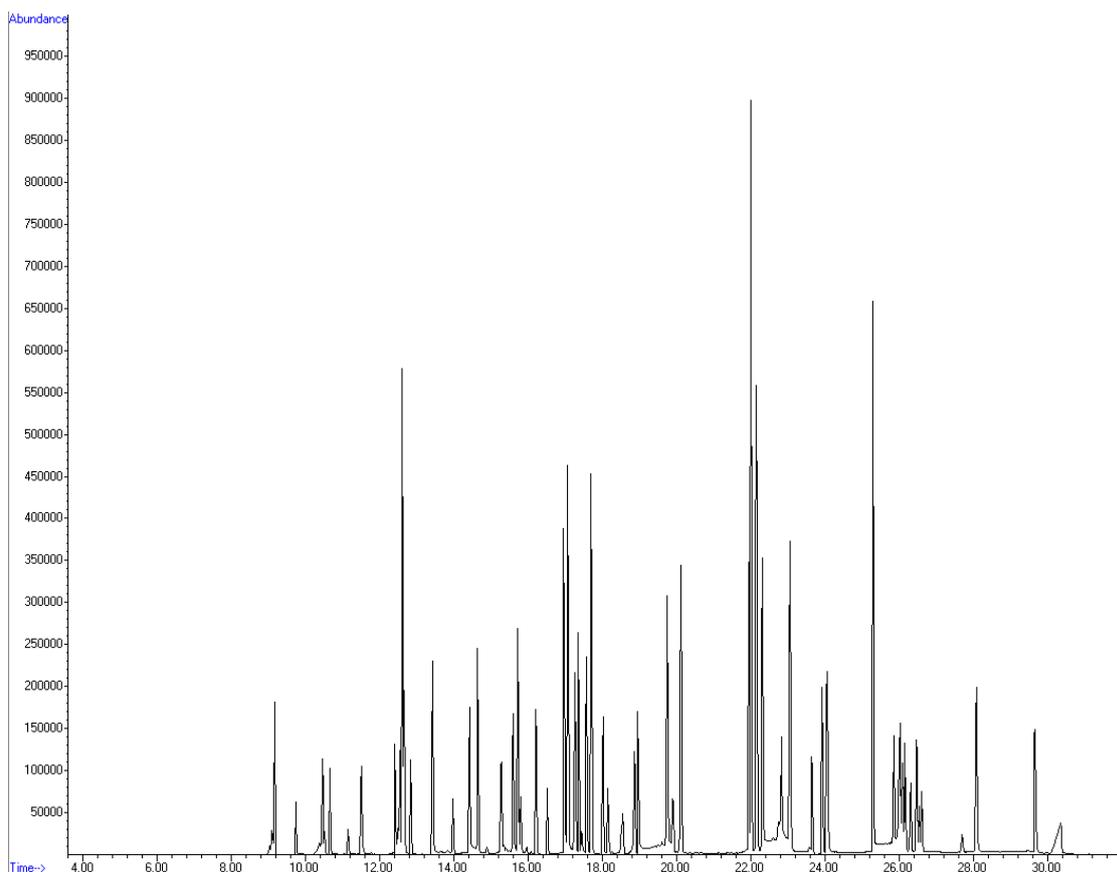


Figura 2.4. Espectro de músculo de morcego fortificado com mistura de 69 padrões de agrotóxicos. Temperatura de injetor a 250 °C no modo de aquisição SIM.

A identificação e confirmação dos agrotóxicos no espectro foram feitas por comparação do espectro de massas obtido no modo *full scan* e comparados com a biblioteca NIST (Tahboub et al., 2005). Para confirmação da identificação do analito foi considerada uma probabilidade mínima de 70 % entre o espectro obtido no modo *full scan* e a base de dados da biblioteca. Esse percentual foi considerado adequado uma vez que os testes foram realizados com padrões analíticos. As Figura 2.5 e Figura 2.6 ilustram as diferenças de probabilidade na comparação dos espectros obtidos nos modos *full scan* e SIM, com os dados da biblioteca NIST. Essas diferenças ocorrem porque no modo *full scan* é possível visualizar todos os íons presentes (Figura 2.7 A e B), enquanto no modo SIM são visualizados apenas os íons selecionados para monitoramento do analito (Figura 2.7 D). No espectro do modo SIM é feita a quantificação do analito por meio da estimativa da área do pico correspondente (Figura 2.7 C).

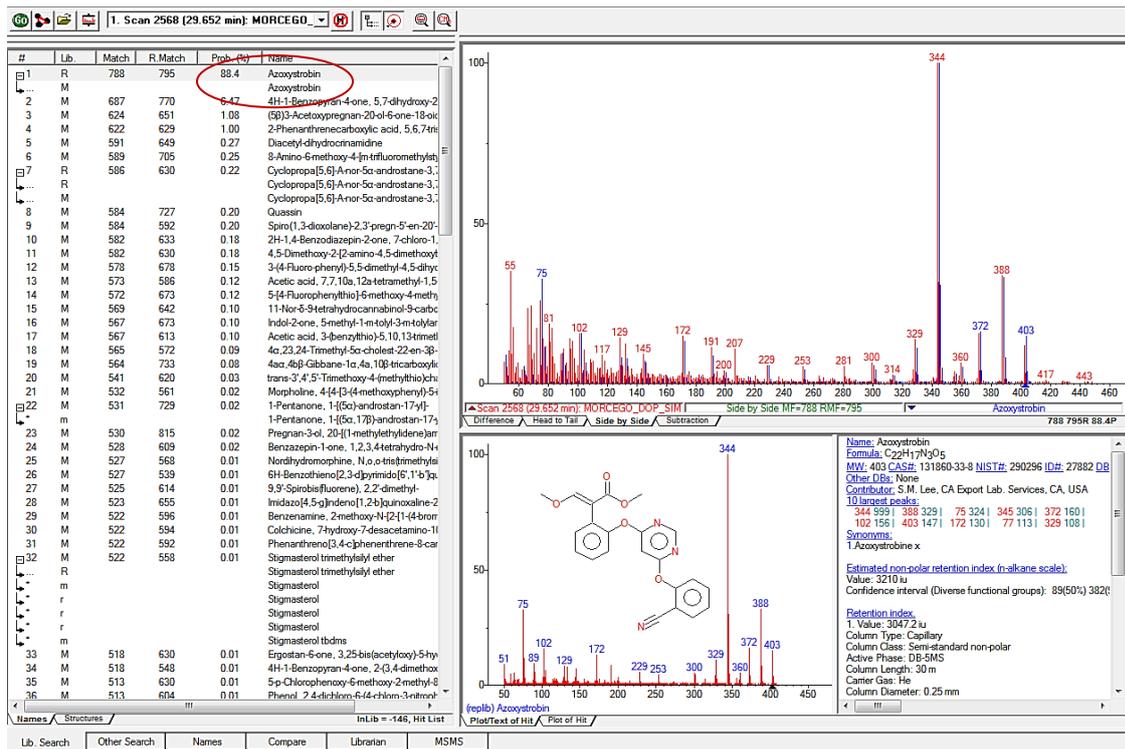


Figura 2.5. Identificação do pico de Azoxistrobina por meio da comparação do método *full scan* com a biblioteca NIST, mostrando a probabilidade do padrão de Azoxistrobina.

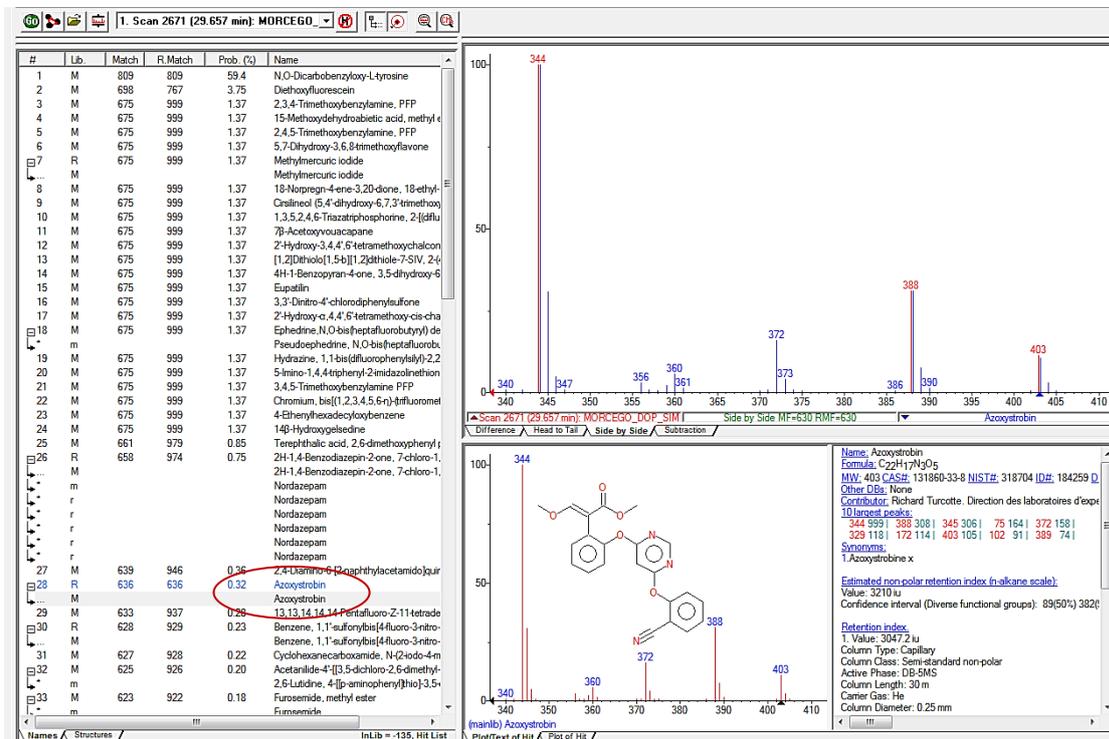


Figura 2.6. Identificação do pico de Azoxistrobina através da comparação do método SIM monitorando os íons 344, 388 e 403 com a biblioteca NIST, mostrando a probabilidade do padrão de Azoxistrobina.

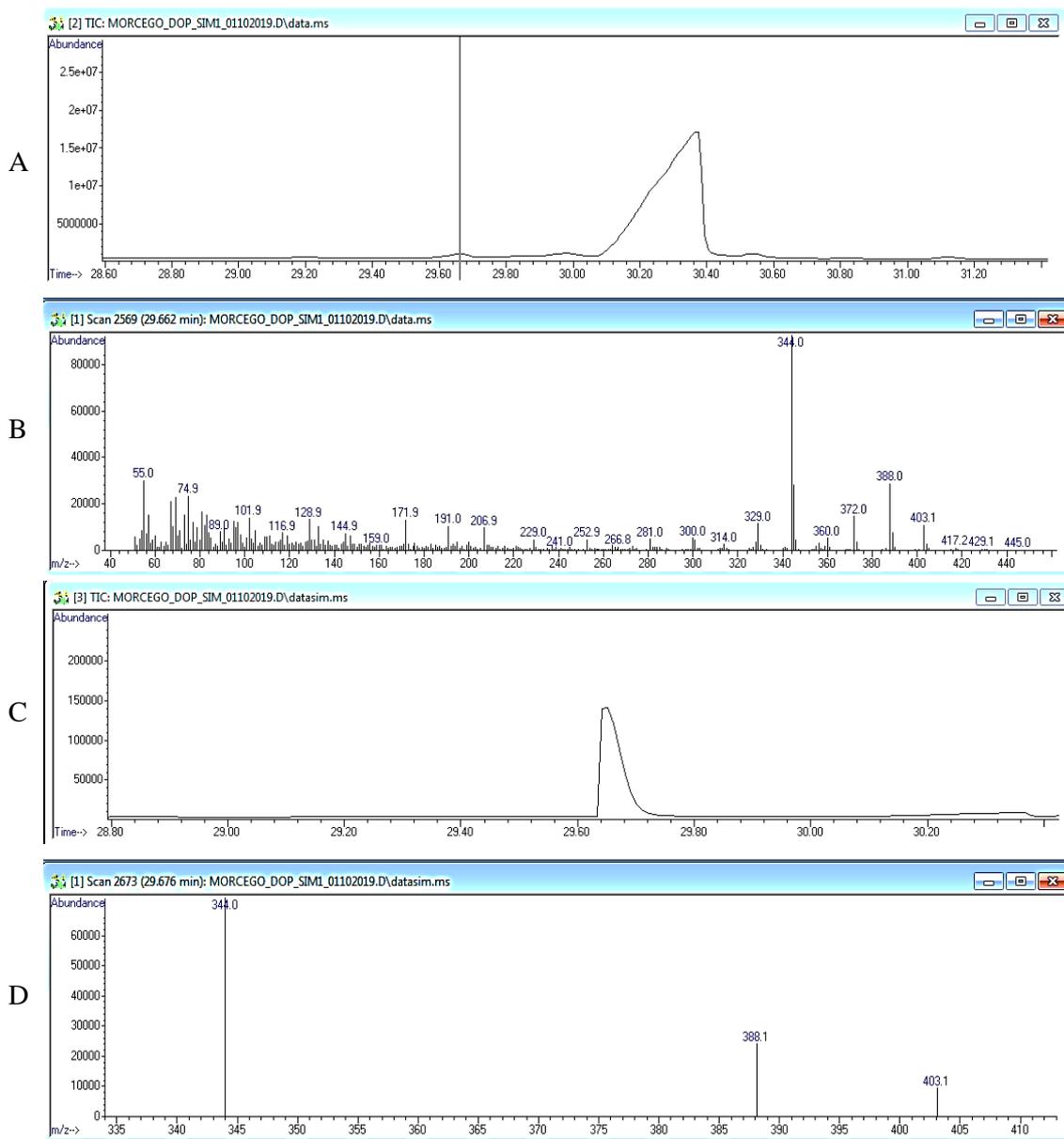


Figura 2.7. Espectros de músculo de morcego fortificado com Azoxistrobina. (A) Modo *full scan*; (B) Todas as massas correspondentes ao tempo de retenção 29,6 min (C) Modo SIM; (D) Íons monitorados de Azoxistrobina m/z 344; 388 e 403.

2.9 Limite de detecção

De acordo com a EUROACHEM/CITAC (2016), o limite de detecção é a menor concentração detectada pelo equipamento e pode ser calculado por meio da fórmula:

$$LD = \text{desvio padrão} \times 3$$

O desvio padrão é obtido por meio da leitura de 10 amostras de branco (extrato obtido somente com músculo de morcego) registrando a área correspondente ao tempo de retenção de cada agrotóxico conforme Tabela 2.9.

Para o cálculo do limite de detecção foi utilizado apenas um morcego capturado no PARNA Serra do Cipó, que por ser a área de referência não era esperado encontrar resíduos de agrotóxicos em grandes concentrações. Foi escolhido um morcego de maior porte pela maior disponibilidade de tecido muscular tornando possível o preparo de 10 extratos para as leituras e cálculo do desvio padrão. Por ser o mesmo indivíduo é esperado pouca variação nos valores obtidos nas leituras. Estas variações são decorrentes dos limites do aparelho e métodos de extração.

Tabela 2.9. Estimativa do limite de detecção dos agrotóxicos pesquisados. São apresentados valores de tempo de retenção (RT), percentual de recuperação, amostras de branco (Br), média, desvio padrão, e limite de detecção (LD).

Agrotóxico	RT	%	Br 1	Br 2	Br 3	Br 4	Br 5	Br 6	Br 7	Br 8	Br 9	Br 10	Média	Dp	LD
Trifluralina	9,15	97,6	2043	392,46	699,5	487,45	558,58	620,63	438,71	456,33	479,35	477,9	665,391	467,27	1402
HCH Alfa	9,71	35,9	3689	4236	5018	2984	8325	2417	3536	7056	5266	2360	4488,7	1867,91	5604
HCH Beta	10,42	39,1	12109	41623	58228	28357	50579	18257	37564	35796	64342	16404	36325,9	16943,89	50832
Hexaclorobenzeno	10,63	32,1	8297	15235	13440	6923	19142	6647	11693	15260	14214	6924	11777,5	4154,33	12463
Clorotalonil	11,16	52,9	8558	14604	22980	14261	38127	14135	15647	29629	28681	11456	19807,8	9080,17	27241
HCH Delta	11,47	32,3	19610	24382	26387	15610	44447	17944	19723	28774	25147	14992	23701,6	8203,15	24609
Clorpirifos Metil	12,38	75,1	130489	142343	159944	108573	245422	166261	125721	166381	305770	171203	172210,7	56800,25	170401
Vinclozilone	12,52	91	97984	101031	116554	92238	183003	94437	124547	129035	154102	89624	118255,5	28995,68	86987
Paration metil	12,59	96,7	84447	144622	183259	118590	282095	106693	168330	176825	221101	119154	160511,6	56303,56	168911
Alacloro	12,63	90,3	69039	124949	156396	94374	216707	101303	148276	143057	186285	106548	134693,4	42487,12	127461
Heptacloro	12,82	87,6	47267	45201	70125	41846	58604	45472	46041	47800	56776	42734	50186,6	8458,18	25375
Fenitrotiona	13,39	94,4	48222	34608	43033	36778	108687	36684	51429	55345	74043	51421	54025	21292,26	63877
Aldrim	13,95	97,2	552015	45514	53056	43444	71166	43270	52391	51137	62385	43948	101832,6	150304,90	450915
Dicofol	14,39	13,8	156942	115137	137824	111611	211428	133041	107409	126481	160282	164523	142467,8	30104,87	90315
Bromofos	14,61	97,2	86641	89876	78252	74398	147443	86116	97972	85280	117988	137034	100100	24018,28	72055
Heptacloro epoxido	15,25	90,9	76427	62123	80103	62908	106165	65395	71759	54191	87785	57803	72465,9	14973,71	44921
Captana	15,57	72	129334	107718	163171	136553	226928	156752	192599	174087	175168	114598	157690,8	34961,06	104883

Continua

Tabela 2.9. Continuação

Agrotóxico	RT	%	Br 1	Br 2	Br 3	Br 4	Br 5	Br 6	Br 7	Br 8	Br 9	Br 10	Média	Dp	LD
Procimidona	15,69	86,5	114114	200096	253525	196678	348450	283216	349806	274484	284880	181480	248672,9	71457,31	214372
Folpete	15,77	54,6	96548	162250	220326	149401	297201	227201	227287	278817	284225	241410	156524	61354,62	184064
Endossulfan Alfa I	16,49	41,6	29804	18479	33385	17247	19317	15799	5607	15160	7960	9875	17263,3	8405,06	25215
Ovex (Clorfenson)	16,93	93,1	120921	92274	87446	90991	144132	81068	95860	103973	123360	95288	103531,3	18757,17	56272
Protiofós	17,04	94,7	122746	101237	116926	98506	188973	81368	116500	112599	147025	102423	118830,3	28589,13	85767
Profenofós	17,23	91,2	48057	43327	49604	44231	92414	33913	52942	45503	68333	37602	51592,6	16225,92	48678
DDE 4,4	17,33	70,5	17374	16272	18478	14893	23843	14209	18784	18235	24909	16871	18386,8	3315,94	9948
Dieldrin	17,41	89,3	8454	9370	10213	7529	10608	8076	9481	11665	13324	10353	9907,3	1647,39	4942
DDD 2,4	17,54	38,1	7312	16198	18125	15210	21014	14166	15976	17046	20324	18709	16408	3669,19	11008
Oxifluorfenó	17,67	95,3	26630	21278	18868	28005	18425	19266	22208	26771	21120	21147	22371,8	3331,79	9995
Clorfenapir	17,99	74,4	47543	37696	40862	28744	35611	26167	38145	34506	61409	39345	39002,8	9395,30	28186
Endrin	18,12	86,5	144436	112033	96241	95723	126711	77004	107061	84673	175170	113210	113226,2	27846,99	83541
Endossulfan Beta II	18,22	20,4	136075	83041	128847	90451	133186	101115	106359	111445	192103	117931	120055,3	29272,27	87817
DDT 2,4	18,84	72,3	15951	14927	13307	12711	17016	11315	14225	14576	21388	14919	15033,5	2612,30	7837
Clorpirifós	18,93	78,8	86708	69840	52453	48501	116693	43738	82051	71223	101317	42988	71551,2	23983,91	71952
Carbofenotona	19,72	96,2	154266	126782	132992	124967	202932	102050	139702	122168	183511	108117	139748,7	30464,97	91395
Endossulfan sulfato	19,86	90,3	129798	111874	116890	106641	179000	88664	117681	104387	167101	92155	121419,1	28347,78	85043
Bromopropilato	21,93	90	29851	27365	27188	24486	33298	29349	33439	29185	41546	33919	30962,6	4565,86	13698

continua

Tabela 2.9. Continuação

Agrotóxico	RT	%	Br 1	Br 2	Br 3	Br 4	Br 5	Br 6	Br 7	Br 8	Br 9	Br 10	Média	Dp	LD
Bifentrina	21,98	79,5	33504	27912	30423	26036	35400	28429	34181	29569	44763	34229	32444,6	5078,33	15235
Metoxicloro	22,12	88,2	44270	27536	48408	39822	49666	32812	40725	39943	64217	39992	42739,1	9494,075	28482
Fempropatrina	22,28	73,1	160566	26515	146628	121634	108476	76032	133769	122096	194394	112811	120292,1	43522,44	130567
Tetradifon	22,81	76,4	3532800	1309225	974603	151203	1363547	820629	1240226	1123422	3069623	1008550	1459382,8	981945,32	2945836
Fosalone	23,02	89,9	927062	952247	867187	725149	908040	702082	898430	874149	1351934	816229	902250,9	169183,28	507550
Mirex	23,62	88,9	74861	68986	68624	55927	66125	52469	61869	63673	93701	61470	66770,5	10877,95	32634
Cialotrina lambda	23,89	93,5	42432	40894	38695	33308	39530	31948	37089	37006	50758	40065	39172,5	4945,55	14837
Fenarimol	24,02	94,5	56036	55748	52574	45276	53302	42906	49117	49185	65223	46921	51628,8	6130,06	18390
Permetrina	25,27	42,1	436240	518438	499138	482284	508886	520798	460368	502950	627606	585776	514248,4	53311,78	159935
Ciflutrina	26,14	69,4	323440	369152	349973	344182	355182	344393	359836	359951	405557	361502	357316,8	20108,86	60327
Cipermetrina	26,45	49,4	37987	100549	101417	86668	98227	81257	88309	89554	121781	94524	90027,3	20336,56	61010
Fenvalerato alpha	28,057	69,9	97265	106892	127084	105648	127244	102995	116742	113589	159926	113357	117074,2	17002,46	51007
Azoxistrobina	29,64	77,5	57357	71692	77083	72552	71288	78061	90093	77483	89206	60899	74571,4	9942,20	29827

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi descrito um método para determinação de resíduos de 48 tipos de agrotóxicos por cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massa (CG-EM) em músculo de morcego. Não foram detectados resíduos de agrotóxicos acima dos limites de detecção nos morcegos provenientes de Uberaba e PARNA Serra do Cipó (Figura 2.8). Nos extratos obtidos a partir de fígado e tecido adiposo também não foram detectados resíduos.

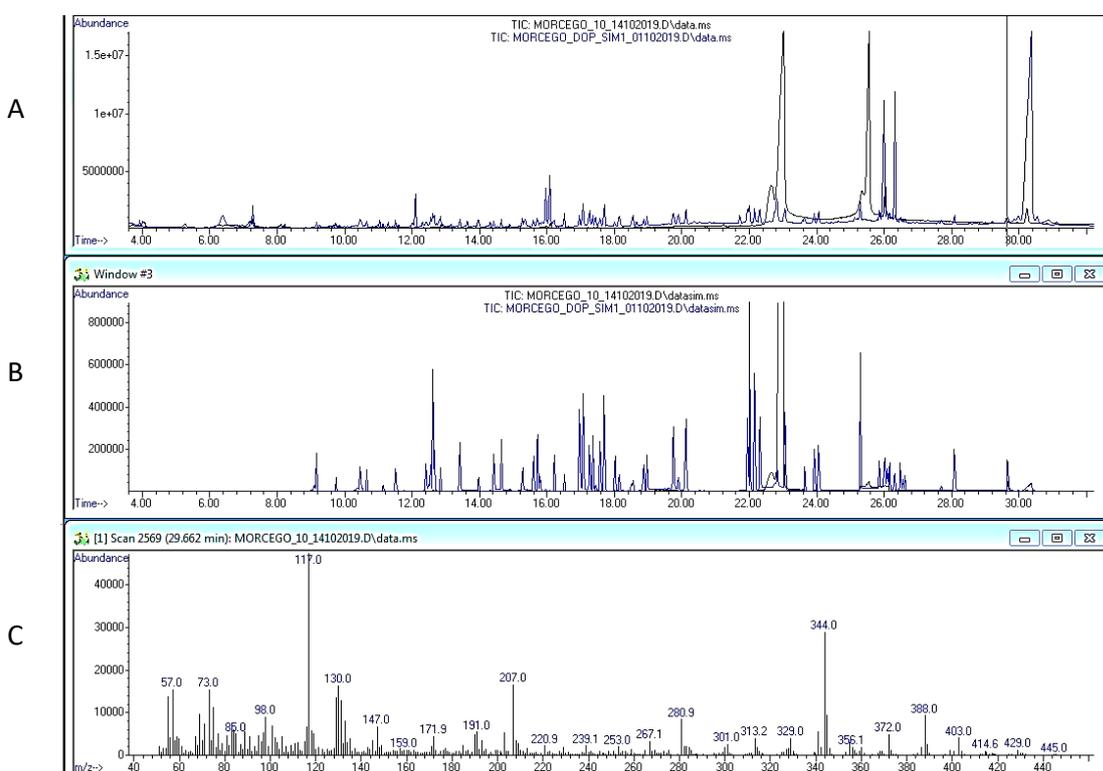


Figura 2.8. Sobreposição dos espectros de massa de músculo de morcego fortificado (azul) e branco (preto) com a temperatura do injetor 250 °C. (A) Modo *full scan*; B) Modo SIM, C) Íons correspondentes ao tempo 29,6 min (Azoxistrobina).

O PARNA Serra do Cipó é uma unidade de conservação de proteção integral e no seu entorno não há atividade agrícola intensa (ICMBio, 2009). Por outro lado, Uberaba está entre os principais municípios produtores de grãos e cana-de-açúcar no estado de Minas Gerais (SEAPA, 2018), e o uso de agrotóxico nessas culturas é superior ao uso em demais cultivos no Brasil (Bombardi, 2017). A literatura que trata da contaminação ambiental por agrotóxicos no município ainda é escassa. No entanto, análises de resíduos da água que abastece a cidade revelaram contaminação por alaclor, atrazina, carbendazim, clordano, DDT, DDD, DDE, diuron, glifosato, lindano, mancozeb,

permetrina, trifluralina, 2,4-D, 2,4,5-T, aldicarb, aldrin, carbofurano, clorpirifós, endossulfan, endrin, metamidofós, metalacloro, molinato, parationa metílica, pendimentalina, profenofós, simazina, tebuconazol e terbufós (Sisagua, 2019). Sendo assim, embora resíduos de agrotóxicos não tenham sido detectados, é plausível supor que os morcegos estejam expostos à contaminação ambiental por agrotóxicos em Uberaba, porém apresentando concentrações talvez inferiores às definidas nos limites de detecção.

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica que permite a separação dos compostos utilizando um gás inerte como fase móvel, de modo que os analitos são volatilizados antes de serem introduzidos na coluna cromatográfica, onde serão retidos por tempos determinados, dependendo de sua afinidade com a coluna. A detecção dos analitos ocorre na saída da coluna (Bonato, 2017). Análises por CG são ideais quando os analitos estudados são voláteis e/ou apolares e/ou estáveis termicamente em temperaturas elevadas (Maurer, 1998; Lehotay et al., 2005). Em contrapartida, para analitos polares, não voláteis e/ou termolábeis, a cromatografia líquida (CL) é a mais recomendada (Maurer, 1998; LeDoux, 2011) (Figura 2.9). Na CL, a fase móvel é um solvente que, juntamente com a amostra, é arrastado para a coluna onde acontecerá a separação dos constituintes da amostra, por afinidade com a coluna (Collins et al., 2006). Essa técnica é mais recomendada para análises multiresíduos (Liška; Slobodník, 1996; Hernández et al., 2005) pois permite a determinação de maior número de agrotóxicos e metabólitos que por CG (Alder et al., 2006).

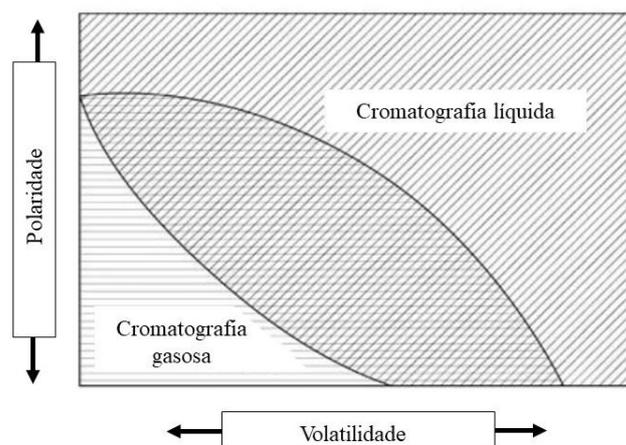


Figura 2.9. Faixa de aplicação das cromatografias e líquidas conforme polaridade e volatilidade dos analitos. Adaptado de Giger (2009).

Muitos agrotóxicos utilizados atualmente são menos persistentes e os produtos de sua metabolização são polares e não voláteis, sendo detectados mais eficientemente por CL que por CG (Aprea et al., 2002; Hernández et al., 2005). Embora CG seja uma técnica eficiente para a análise multirresíduos de agrotóxicos, o perfil dos agrotóxicos utilizados sofreu modificações ao longo dos anos de modo que os agrotóxicos utilizados hoje são mais metabolizáveis e menos bioacumulativos como apresentado no Capítulo 1.

Considerando as limitações da técnica utilizada neste trabalho, a avaliação da exposição de morcegos a agrotóxicos poderia ser complementada por meio de análises em CL-EM, que permite a determinação de resíduos polares, voláteis e termolábeis (Granby et al., 2004; Alder et al., 2006; Giger, 2009). Adicionalmente, a exposição também pode ser avaliada mediante pesquisa por metabólitos, embora seja menos comum devido à maior complexidade e ao custo das análises (Aprea et al., 2002; Barr; Needham, 2002). Produtos da metabolização também podem ser investigados em outras matrizes como sangue e guano, as quais podem indicar exposição recente e não requerem eutanásia dos animais (Clark, 1981). Estudos anteriores avaliaram a exposição de morcegos insetívoros mediante determinação de resíduos de inseticidas organoclorados e organofosforados conforme apresentado no Capítulo 1. No entanto, existe uma carência de informações a respeito de morcegos de outras guildas tróficas bem como agrotóxicos de outras classes, sendo necessário maior investimento em pesquisas nesta linha.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foi descrito um método que permite a determinação de resíduos de 48 tipos de agrotóxicos por CG-EM em músculo de morcego. A miniaturização do método viabiliza análises de resíduos quando a quantidade de amostra é limitada. Além disso, consome menos reagentes proporcionando redução de custo e impacto no meio ambiente e saúde dos pesquisadores.

Não foram detectados resíduos de agrotóxicos acima dos limites de detecção nos morcegos analisados. Contudo, a presença de resíduos de agrotóxicos nestes animais não pode ser descartada uma vez que podem estar presentes agrotóxicos em concentrações inferiores aos limites de detecção ou resíduos de agrotóxicos que não foram pesquisados.

Considerando que a CG-EM é ideal para composto apolares, voláteis e estáveis termicamente, é recomendado que avaliações de exposição a agrotóxicos sejam conduzidas utilizando outras técnicas de modo complementar. A determinação de resíduos por CL-EM e pesquisas por metabólitos, pode fornecer informações já que permite a detecção de compostos com diferentes propriedades químicas e produtos da metabolização.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, R.; SALEM, N.M.; ESTAITIEH, H. Occurrence of organochlorine pesticide residues in eggs, chicken and meat in Jordan. **Chemosphere**, v. 78, n. 6, p. 667-671, 2010.

ALBUQUERQUE, F.A.; RIBEIRO, J.S.; KUMMROW, F.; NOGUEIRA, A.J.A.; MONTAGNER, C.C.; UMBUZEIRO, G.A. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science Processes & Impacts**, v. 18, p. 779-787, 2016.

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. Residues analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 838-865, 2006.

ALTRINGHAM, J.D. **Bats, from evolution to conservation**. New York: Oxford University Press, 2011.

APREA, C.; COLOSIO, C.; MAMMONE, T.; MINOIA, C.; MARONI, M. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 769, p. 191-219, 2002.

ASENIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RAVELO-PÉREZ, L.M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A. Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 6, p. 2307-2319, 2010.

BARBIERI, M.V.; POSTIGO, C.; GUILLE-ARGILES, N.; MONLLOR-ALCAROZ, L.S.; SIMIONATO, J.I.; STELLA, E.; BARCELÓ, E.; ALDA, M.L. Analysis of 52 pesticides in fresh fish muscle by QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS determination. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 958-967, 2019.

BARR, D.D.; NEEDHAM, L.L. Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. **Journal of Chromatography**, v. 778, p. 5-29, 2002.

BEKETOV, M.A.; KEFFORD, B.J.; SCHÄFER, R.B.; LIESS, M. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 27, p. 11039-11043, 2013.

BOMBARDI, L.M. Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia. São Paulo, USP, p. 296, 2017.

BENTON, A.H. Effects on Wildlife of DDT used for control of Dutch Elm Disease. **The Journal of Wildlife Management**, v. 15, n. 1, p. 20-27, 1951.

- BONATO, P.S. Cromatografia Gasosa. *In*: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (Eds.) *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Editora da Unicamp, 6ª ed. P. 202 – 271, 2017.
- BRAGANÇA, I.; PLÁCIDO, A.; PAÍGA, P.; DOMINGUES, V.F.; DELERUEMATOS, C. QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. **Science of the Total Environment**, v. 433, p. 281-289, 2012.
- BRANDHONNEUR, N.; MENDES, M.S.; LEPVRIER, E.; ESSEIVA, E.F.; CHEVANNE, F.; CORRE, P.L. A micro-QuEChERS method coupled to GC-MS for the quantification of pesticides in specific maternal and fetal tissues. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 104, p. 90-63, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF., 02 jun. 2003. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b. Acesso em: 06 fev. 2020.
- BRONDI, S.H.G.; MACEDO, A.N.; VICENTE, G.H.L.; NOGUEIRA, A.R.A. Evaluation of the QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry for the analysis pesticides residues in water and sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, n. 1, p. 18-22, 2011.
- CERQUEIRA, M.B.R.; GUILHERME, J.R.; CALDAS, S.S.; MARTINS, M.L.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E.G. Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. **Chemosphere**, v. 107, p. 74-82, 2014.
- CLARK, D.R. Bats and environmental contaminants: a review. Special Scientific Report – Wildlife nº 235. United State Department of the Interior Fish and Wildlife Service. Washington, D.C. 1981.
- CLARK, D.R.; BAGLEY, F.M.; JOHNSON, W.W. Northern Alabama colonies of the endangered grey bat *Myotis grisescens*: organochlorine contamination and mortality. **Biological Conservation**, v. 43, p. 213-225, 1988.
- CLARK, D. R. DDT and the decline of free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) at Carlsbad Cavern, New Mexico. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, p. 537–543, 2001.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456p.
- COVACI, A.; GHEORGHE, A.; SCHEPENS, P. Distribution of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenils and α -HCH enantiomers in pork tissues. **Chemosphere**, v. 56, p. 757-766, 2004.
- DALQUEST, W.W. Mammals of the Mexican state of San Luis Potosi. Thesis....332p. 1951.
- DAVIDSON, C. Declining downwind: Amphibian population declines in California and historical pesticides use. **Ecological Applications**, v. 14, n. 6, p. 1892-1902, 2004.

EUROPEAN COMMISSION, DG-SANTE: Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/11813/2017, Brussels.

FARIA, V.H.F.; DIAS, B.M.; COSTA, M.C.M.; SILVA, V.R.; DRUMMOND, A.L.; FRANCO, V.P.; CUNHA, M.R.R.; FRANKLIN, H.M.O.H.; PEIXOTO, T.M.A.G. Avaliação de resíduos de agrotóxicos em polpas de morango industrializadas. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 19, p. 49-56, 2009.

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

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, A.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013.

GEIGER, F. et al., 2010. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. **Basic and Applied Ecology**, v. 11, p. 97-105, 2010.

GIGER, W. Hydrophilic and amphiphilic water pollutants: using advanced analytical methods for classic and emerging contaminants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 37-44, 2009.

GEORGAKOPOULOS, P.; ZACHARI, R.; MATARAGAS, M.; ATHANASOPOULOS, P.; DROSINOS, E.H.; SKANDAMIS, P.N. Optimisation of octadecyl (C₁₈) sorbent amount in QuEChERS analytical method for the accurate organophosphorus pesticide residues determination in low-fatty baby foods with response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 128, n. 2, p. 536-542, 2001.

GRANBY, K.; ANDERSEN, J.H.; CHRISTENSEN, H.B. Analysis of pesticides in fruit, vegetable and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p. 165-176, 2004.

HAJŠLOVÁ, J.; ZROSTLÍKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 181-197, 2003.

HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1-2, p. 54-73, 2007.

HERNÁNDEZ, F.; SANCHO, J.V.; POZO, O.J. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticides residues in biological samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 934-946, 2005.

JARDIM, A.N.O.; CALDAS, E.D. Brazilian monitoring programs for pesticides residues in food – Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, p. 607-616, 2012.

JEFFERIES, D.J. Organochlorine insecticide residues in British bats and their significance. **Journal of Zoology**, v. 166, n. 1, p. 245-263, 1972.

JEONG, I-S.; KWAK, B-M.; AHN, J-H.; JEONG, S-H. Determination of pesticides in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 133, p. 473-481, 2012.

JESÚS, F.; HLADKI, R.; GÉREZ, N.; BESIL, N.; NIELL, S.; FERNÁNDEZ, G.; HEINZEN, H.; CESIO, M.V. Miniaturized QuEChERS based methodology for multiresidue determination of pesticides in odonate nymphs as ecosystem biomonitors. **Talanta**, v. 178, n. 1, p. 410-418, 2018.

KÖHLER, H.R.; TRIEBSKORN, R. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? **Science**, v. 341, p. 759-765, 2013.

KUNZ, T.H.; TORREZ, E.B.; BAUER, D.; LOBOVA, T.; FLEMING, T.H. Ecosystem services provided by bats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, n. 1, p. 1-38, 2011.

LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO DE MINAS GERAIS – LANAGRO. MET/LP/PL/011-V.5 – Método multirresíduo para análise de agrotóxicos em matrizes vegetais, animais e aquosas por CG-MS/MS. 2017

LeDOUX, M. Analytical methods applied to the determinations of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1021-1036, 2011.

LEHOTAY, S. Analysis of pesticide residues in mixed fruit and vegetable extracts by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 3, p. 680-697, 2000.

LEHOTAY, S.; LIGHTFIELD, A.R.; HARMAN-FETCHO, J.A.; DONOGHUE, D.J. Analysis of pesticides residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 4589-4596, 2001.

LEHOTAY, S.; KOK, A.; HIEMSTRA, M.; BODEGRAVEN, P.V. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 595-614, 2005.

LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA, K.; AMIRAV, A.; FIALKOV, A.B.; ALON, T.; MARTOS, P.A.; KOK, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Identification and confirmation of chemical residues in food by chromatography-mass spectrometry and other techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 1070-1090, 2008

LEHOTAY, S.J.; SON, K.A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticides residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2548-2560, 2010.

LIŠKA, I.; SLOBODNÍK, J. Comparison of gas and liquid chromatography for analysing polar pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 733, n. 1-2, p. 235-258, 2016.

LUZARDO, O.P.; RUIZ-SUÁREZ, N.; ALMEIDA-GONZÁLEZ, M.; HENRÍQUE-HERNÁNDEZ, L.A.; ZUMBADO, M.; BOADA, L.D. Multi-residue method for the determination of 57 persistent organic pollutants in human milk and colostrum using a QuEChERS-based extraction procedure. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 29, p. 9523-9536, 2013.

MAURER, H.H. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. **Journal of Chromatography B**, v. 713, p. 3-25, 1998.

- MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S.J.; ANASTASSIADES, M. Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticide residues in food matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 24, p. 8129-8137, 2005.
- MCNAB, B. Seasonal fat reserves of bats in two tropical environments. **Ecology**, v. 57, p. 332-338, 1976.
- MEIJER, S.N.; HALSALL, C.L.; HARNER, T.; PETERS, A.J.; OCKENDEN, W.A.; JOHNSTON, A. E.; JONES, K.C. Organochlorine Pesticide Residues in Archived UK Soil. **Environmental Science & Technology**, v. 35, p. 1989-1995, 2001.
- MINEAU, P.; WHITESIDE, M. Pesticide acute toxicity is a better correlate of U.S. grassland bird declines than agricultural intensification. **PloS One**, v. 8, n. 2, e57457, 2013.
- MITCHELL-JONES, A.J.; COOKE, A.S.; BOYD, I.L.; STEBBINGS, R.E. Bats and remedial timber treatment chemicals – a review. **Mammal Review**, v. 19, n. 3, p. 93-110, 1989.
- PEÑA, F.; CÁRDENAS, S.; GALLEGO, M.; CALCÁRCEL, M. Analysis of phenylrea herbicides from plants by GC/MS. **Talanta**, v. 56, p. 727-734, 2002.
- PRZYBYLSKI, C.; SEGARD, C. Method for routine screening of pesticides and metabolites in meat based baby-food using extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 11, p. 1858-1867, 2009.
- SALAS, J.H.; GONZÁLEZ, M.M.; NOA, M.; PÉREZ, N.A.; DÍAZ, G.; GUTIÉRREZ, R.; ZAZUETA, H.; OSUNA, I. Organophosphorus pesticides residues in mexican commercial pasteurized milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4468-4471, 2003.
- SAMPAIO, M.R.F.; TOMASINI, D.; CARDOSO, L.V.; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E.G. Determination of pesticides residues in sugarcane honey by QuEChERS, and liquid chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 197-205, 2012.
- SARTARELLI, N.C.; MACEDO, A.N.; SOUSA, J.P.; NOGUEIRA, A.R.A.; BRONDI, S.H.G. Determination of chlorfenvinphos, fipronil and cypermethrin residues in meat and bovine fat using QuEChERS method and gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 35, n. 13, p. 1895-1908, 2012.
- SEAPA, Secretaria do Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio – Minas Gerais – 2017-2027. 3 ed. 2018.
- SIKES, R.S.; ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS. Guidelines of the American society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. **Journal of Mammalogy**, v. 97, n. 3, p. 663-688, 2016.
- SILVA, V.; MOL, H.G.J.; ZOMER, P.; TIENSTRA, M.; RITSEMA, C.J.; GEISSEN, V. Pesticides residues in Europe agricultural soils-A hidden reality unfolded. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 1532-1545, 2019.

SPARLING, D.W.; FELLERS, G.M.; McCONNELL, L.L. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 20, n. 7, p. 1597-1595, 2001.

SOBOLEVA, E.; AHAD, K.; AMBRUS, A. Applicability of some mass spectrometric criteria for the confirmation of pesticide residues. *Analyst*, v. 129, p. 1123-1129, 2004.

STECHERTS, C.; KOLB, M.; BAHADIR, M.; DJOSSA, B.A.; FAHR, J. Insecticide residues in bats along a land use-gradient dominated by cotton cultivation in northern Benin, West Africa. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 14, p. 8812-8821, 2014.

ŠTĚPÁN, R.; TICHÁ, J.; HASJŠLOVÁ, J.; KOVALCZUK, T.; KOCOUREK, V. Baby food production chain: Pesticides residues in fresh apples and products. *Food Additives & Contaminants*, v. 22, n. 12, p. 1231-1242, 2005.

STÖCKELHUBER, M.; MÜLLER, C.; VETTER, F.; MINGO, V.; LÖTTERS, S.; WAGNER, N.; BRACHER, F. Determination of pesticides adsorbed on arthropods and gastropods by a Micro-QuEChERS approach and GC-MS/MS. *Chromatographia*, v. 80, n. 5, p. 825-829, 2017.

TAHBOUB, Y.R.; ZAATER, M.F.; AL-TALLA, Z.A. Determination of the limits of identification and quantitation of selected organochlorine and organophosphorous pesticide residues in surface water by full-scan gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1098, p. 150-155, 2005.

TETTE, P.A.S.; OLIVEIRA, F.A.S.; PEREIRA, E.N.C.; SILVA, G.; GLÓRIA, M.B.A.; FERNANDES, C. Multiclass method for pesticides quantification in honey by means modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, v. 211, p. 130-139, 2016.

VALDESPINO, C.; SOSA, V.J. Effect of landscape tree cover, sex and season on the bioaccumulation of persistent organochlorine pesticides in fruit bats of riparian corridors in eastern Mexico. *Chemosphere*, v. 175, p. 373-382, 2017.

VALENZUELA, E.F.; MENEZES, H.C.; CARDEAL, Z.L. New passive sampling device for effective monitoring of pesticides in water. *Analytica Chimica Acta*, v. 1054, p. 26-37, 2019.

VIGIAGUA, Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano. SISAGUA – Controle Semestral. Disponível em <http://sisagua.saude.gov.br/sisagua/paginaExterna.jsf>. Acesso em: 01/02/2020.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Preventing Disease through Healthy Environments - Exposure to highly hazardous pesticides: A major public health concern. WHO, Geneva, 2019.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DA PAISAGEM E IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS EM MORCEGOS DE DIFERENTES GILDAS TRÓFICAS

1. INTRODUÇÃO

A fragmentação de habitats é uma das maiores ameaças à biodiversidade e à manutenção dos serviços ecossistêmicos (Pereira et al., 2010; Haddad et al., 2015). Estudos recentes têm apontado consequências fisiológicas em animais silvestres relacionadas à fragmentação de habitats e alterações na paisagem (Mazerolle; Hobson, 2002; Janin et al., 2011; Isaksson, 2015). Essas alterações estão relacionadas ao aumento da exposição à contaminação ambiental (Naidoo et al., 2015; Rodríguez-Estival, 2016), poluição sonora (Kight; Swaddle, 2011; Blickley et al., 2012) e luminosa (Bedrosian et al., 2011; Dominoni et al., 2013), diminuição da oferta e qualidade de alimentos (Robles et al., 2003) e maior propensão às doenças infecciosas (Daszak et al., 2001; Gillespie; Chapman, 2006).

Determinar como alterações individuais interferem no ecossistema ainda é um grande desafio, devido à complexidade ecológica e à dificuldade de se fazer extrapolações de resultados obtidos em laboratórios para a grande diversidade de espécies (Rattner, 2009; Köhler; Triebkorn, 2013). Diante da inviabilidade de se estudar todos os grupos de organismos de um ecossistema, alguns animais têm sido utilizados como organismos bioindicadores, com o objetivo de se obter precocemente informações de alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (biomarcadores) em resposta às alterações ambientais (Andrade et al., 2004; Burguer, 2006; Jones, 2012).

Morcegos são considerados bons bioindicadores porque ocupam uma ampla área geográfica e são sensíveis às alterações no habitat em diferentes escalas (Gehrt; Chelvig, 2003; Gorresen et al., 2005; Jones et al., 2009; Ducci et al., 2015). Além disso, a diversidade de hábitos alimentar deste grupo permite avaliar vários níveis tróficos da cadeia alimentar (Jones et al., 2009). Os morcegos insetívoros, particularmente, têm sido apontados como modelos para avaliação e monitoramento da contaminação ambiental, uma vez que eles possuem características biológicas e ecológicas que os tornam mais suscetíveis à exposição e bioacumulação de xenobióticos

(Zukal, et al., 2012). São animais que apresentam altas taxas metabólicas, consomem grande quantidade de presas por noite, ocupam elevada posição trófica na cadeia (Clark, 1988; Jones et al., 2009), além de apresentarem elevada longevidade (Wilkinson; South, 2002).

O uso de morcegos como bioindicadores ainda é limitado e existem lacunas de conhecimento relacionadas às respostas fisiológicas e alterações do habitat (Cunto; Bernard, 2012; Jones, 2012). Na região Neotropical, existe grande riqueza e diversidade de espécies de morcegos (Alberico et al., 2000; Nogueira et al., 2018). Nesta região, existem inúmeras áreas que vêm sofrendo intensa pressão de atividades agropecuárias e desmatamento que podem gerar danos na saúde destes animais e comprometer os serviços ecossistêmicos (Fearnside, 2001; Sano et al., 2010; Constantini, 2015). A diversidade de hábitos alimentares deste grupo reflete sua importância como prestadores de serviços ecossistêmicos, uma vez que estão envolvidos na polinização, dispersão de sementes e controle das populações de invertebrados e pequenos vertebrados (Kunz et al., 2011; Fenton; Simmons, 2014).

Parâmetros de estresse oxidativo e biomarcadores histológicos podem ser utilizados como biomarcadores para avaliação do estado de saúde do animal. Biomarcadores histológicos são amplamente utilizados porque as técnicas são simples, de baixo custo e fornecem informações relevantes sobre o estado de saúde do animal (Costa et al., 2011). Já os parâmetros de estresse oxidativo permitem avaliar o balanço oxidante-antioxidante. Um desbalanço no sistema antioxidante em favor dos oxidantes caracteriza o estresse oxidativo, condição em ocorre oxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Halliwell; Gutteridge, 2015). O status do sistema antioxidante de um organismo pode ser acessado mediante avaliação da atividade de enzimas do sistema antioxidante como por exemplo, catalase, superóxido dismutase e glutathione S-transferase além da quantificação de produtos da oxidação como o malondialdeído, um produto da lipoperoxidação (Oliveira et al., 2017; 2018).

Considerando o potencial deste grupo como bioindicadores e sua importância ecológica, é necessário compreender como esses animais são afetados pelas alterações na paisagem. Este trabalho teve como objetivo avaliar a condição de saúde de morcegos de diferentes guildas alimentares capturados em duas áreas com diferentes perfis de uso de ocupação do solo, a fim de comparar dados do balanço oxidante-antioxidante e

histopatologia do fígado de morcegos capturados em duas áreas com diferentes pressões antrópicas no estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

O estudo foi conduzido em duas áreas com diferentes pressões antrópicas no estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil (Figura 3.1). A área de menor pressão, considerada a área de referência, está localizada em uma Unidade de Conservação, o Parque Nacional da Serra do Cipó (PARNA Cipó, 19°25'31''S e 43°32'40''W; Figura 3.1). Segundo o sistema de classificação climática de Köppen, o clima na região é do tipo Cwb, caracterizado por verões chuvosos (outubro a março) e invernos secos (abril a setembro) (Sá Júnior et al., 2010). O PARNA Cipó possui 33.800 ha e é circundado pela Área de Proteção Ambiental Morro da Pedreira, que juntamente com o parque protege uma área de 100.000 ha (ICMBio, 2009). A vegetação na região é classificada como área de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado, ambos considerados áreas prioritárias para conservação e classificados como *hotspots* de biodiversidade (Myers et al., 2000).

A área de maior pressão antrópica, considerada área impactada, está localizada no município de Uberaba, inserido na região do Triângulo Mineiro (19°45'43''S e 48°06'05''W; Figura 3.1), cujo clima é classificado como Aw de Köppen, caracterizado por duas estações, uma seca (maio a setembro) e outra chuvosa (outubro a maio) (Sá Júnior et al., 2010). A região está inserida no bioma Cerrado, no entanto, a maior parte da vegetação nativa foi substituída por pastagens e lavouras de milho, soja e cana-de-açúcar (Valera et al., 2016). Atualmente, Uberaba ocupa o segundo lugar no ranking de produtores de grãos no estado de Minas Gerais. Na região do Triângulo Mineiro, além de ser o maior produtor de grãos, esse município está entre os principais produtores de cana-de-açúcar e carne (SEAPA, 2018).

Em cada área de estudo, foi delimitado um raio de 8 Km (Mendes et al., 2016) a partir de um ponto central, o qual foi determinado considerando os pontos de coleta em cada município. Para as áreas delimitadas foram gerados mapas utilizando dados de uso e cobertura do solo obtidos em IBGE (2020) e Projeto MapBiomas (2020).

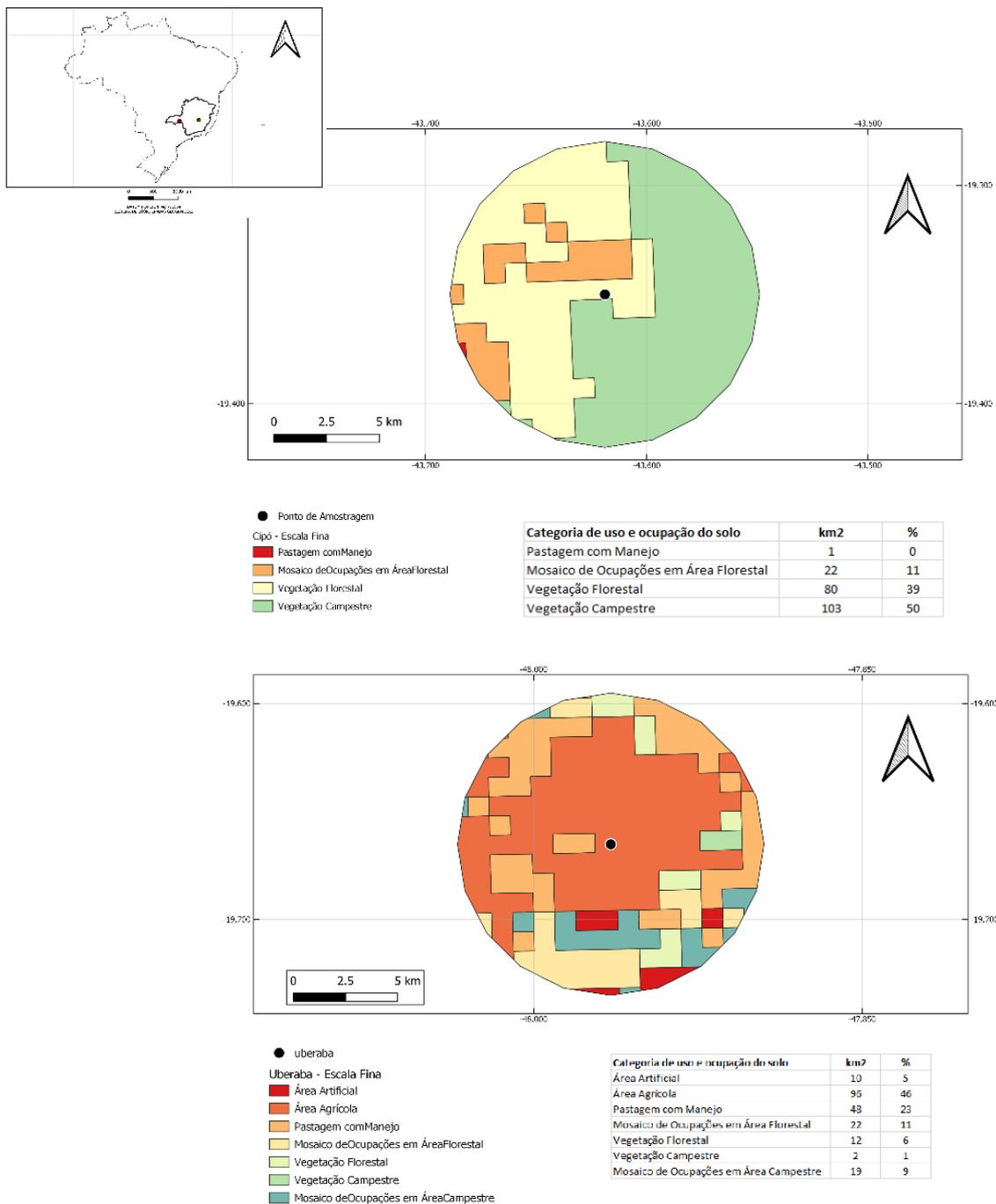


Figura 3.1. Padrão de uso e ocupação do solo na área de amostragem na Serra do Cipó e no município de Uberaba.

2.2 Amostragem

O delineamento experimental deste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo CEUA 166/2017) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio - N° 57026-1).

Os morcegos foram coletados durante 2018 e 2019. Tanto no PARNA Cipó como em Uberaba foram realizadas duas sessões de amostragem, uma na estação chuvosa e uma na seca (Tabela 3.1). Para a captura dos morcegos foram utilizadas redes-de-neblinas que foram abertas ao anoitecer em trilhas, fragmentos de mata e nas proximidades de abrigos diurnos. Procedimentos de captura foram conduzidos conforme recomendações da *American Society of Mammalogists* (Sikes et al., 2016).

Os morcegos foram identificados quanto à taxonomia com auxílio de chaves de identificação (*e.g.* Simmons; Voss, 1998; Lim; Engstrom, 2001; Reis et al., 2017; Lemos et al., 2020). Morcegos capturados foram sexados e avaliados quanto à classe etária e condição reprodutiva. Foram coletados apenas morcegos adultos, condição determinada pela ossificação das epífises das asas (Kunz; Anthony, 1982).

Os animais foram acondicionados em sacos de pano individuais até o momento da eutanásia e retirada de tecidos para as análises laboratoriais. Os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano e eutanasiados, seguido por injeção intraperitoneal de Cloridrato de Cetamina.

2.3 Análises do sistema antioxidante

Para as análises do sistema antioxidante foram retirados fragmentos de aproximadamente 250 mg do fígado. Os fragmentos de tecidos foram pesados, colocados imediatamente em nitrogênio líquido para transporte. No laboratório, os tecidos foram e armazenados em freezer -80 °C até a realização das análises.

As amostras de tecido congelado foram homogeneizadas em solução de tampão fosfato (0,2 mol/L) e ácido etilenodiamino tetra-acético, com pH 7,4. Os homogenatos foram centrifugados a 15.000 g por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado para as análises de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona S-transferase (GST), malondialdeído (MDA) e ensaio de proteínas totais.

Atividade da superóxido dismutase: A atividade da SOD foi determinada medindo-se a redução de auto-oxidação de 50% do pirogalol (Dieterich et al., 2000). Neste método, a auto-oxidação do pirogalol gera radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que catalisam a reação de redução do corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio] a cristais de formazan. A SOD presente na amostra pesquisada compete pelo

radical superóxido, inibindo a redução do MTT a formazan. A mistura da reação foi composta por 30 μL de amostra e 99 μL de solução tampão fosfato (5 mmol/L, pH 7) e 15 μL de pirogalol (100 $\mu\text{mol/L}$). Após a reação permanecer em estufa a 37 °C por cinco minutos, a leitura foi feita em leitor ELISA em 570 nm. A atividade da SOD foi expressa em unidades/miligrama de proteína, sendo 1 U de SOD definida como a quantidade que inibiu a taxa de auto oxidação do pirogalol em 50%.

Atividade da catalase: A atividade da catalase foi avaliada de acordo com a taxa de queda de peróxido de oxigênio (H_2O_2), conforme proposto por Aeby (1984). A reação ocorreu num sistema composto por 1.0 mL de H_2O_2 , 10 μL de amostra homogeneizada em 1.0 mL de tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,0). A reação foi monitorada em espectrofotômetro a 240 nm durante um minuto. Foi utilizado o coeficiente de extinção de $\epsilon_{240} = 0,036 \text{ mmol/L cm}$ para os cálculos. A atividade da catalase foi calculada como U/mg de proteína, sendo uma U a quantidade de enzima necessária para decompor um 1 mmol de H_2O_2 em durante 60 segundos.

Atividade da glutathione S-transferase: A atividade da GST foi mensurada por meio da formação do conjugado glutathione-2,4 dinitrobenzeno. A reação, catalisada pela GST, ocorre espontaneamente entre a glutathione reduzida (GSH) e o substrato sintético 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB) (Habig et al., 1974). Sendo assim, a atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do conjugado. No ensaio, 1.0 mmol/L de CDNB é adicionado a uma solução tampão contendo 1.0 mmol/L de GSH e 10 μL de tecido. A formação do conjugado foi monitorada durante 60 segundos em absorvância de 340 nm. O coeficiente de extinção molar usado para CDNB foi $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ Mmol/L-1/cm-1}$. A atividade da GST foi expressa em U/mg de proteína de modo que, 1.0 U equivale à quantidade de enzima que catalisou a formação de 1.0 μmol de conjugado/min/mL.

Determinação de Malondialdeído: A lipoperoxidação foi avaliada mediante determinação de malondialdeído (MDA), que é o principal subproduto da peroxidação lipídica celular, de acordo com o método proposto por Buege e Aust (1978). Para a dosagem de MDA foi utilizado 0,2 mL de sobrenadante de amostra homogeneizado em 0,4 mL de solução de ácido tricloroacético (15%)/ácido tiobarbitúrico (0,375%)/ácido clorídrico (0,6%). A solução da reação foi mantida em banho-maria por 40 minutos e posteriormente foi resfriada em gelo. Após resfriamento, a solução foi

adicionado 0,6 mL de álcool butílico para posterior agitação no vórtex por dois minutos e centrifugação por 10 minutos a 9000 g. O sobrenadante foi colocado em microplaca para espectrofotômetro (Multiskan GO). A concentração de MDA foi determinada utilizando uma curva padrão de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMPO). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína.

Proteínas totais: A proteína total dos homogenatos de SOD e CAT foi mensurada utilizando-se albumina de soro bovino como padrão de acordo com o método proposto por Lowry e colaboradores (1951). Neste método a amostra é colocada em meio alcalino contendo cobre, que catalisa a reação de redução do reagente Folin-Ciocalteu ao reagir com proteínas. O composto final tem absorvância máxima de 750 nm.

2.4 Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (RIB)

A partir dos resultados obtidos com os biomarcadores do sistema antioxidante, foi calculado o índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (RIB), proposto por Beliaeff e Burgeot, (2002) e modificado por Sanchez e colaboradores (2013). Para o cálculo do RIB, foi calculada a razão entre os valores dos biomarcadores de morcegos da área impactada (Uberaba) e a média dos valores da área de referência (PARNA Cipó), seguida de logaritimização.

$$Y_i = \log (X_i/X_0) \quad (1)$$

As médias gerais (μ) e desvios padrão (s) foram calculados, e os valores logaritimizados (Y_{i+1}) foram padronizados utilizando a fórmula:

$$Z_i = \frac{(Y_i - \mu)}{s} \quad (2)$$

Para criar a linha base centrada em 0 e representar a variação do biomarcador de acordo com essa linha, foi calculada a diferença entre a resposta de cada biomarcador padronizada (Z_i) e a média dos valores de cada biomarcador da área referência (Z_0), obtendo-se o índice de desvio do biomarcador (A) que determina o valor da resposta de cada biomarcador.

$$A = Z_i - Z_0 \quad (3)$$

A soma dos valores de A determina o valor de RIB para cada biomarcador da área afetada. Os dados de cada biomarcador foram representados em gráfico tipo radar, indicando o desvio do biomarcador investigado em relação à área referência. Sendo assim, os valores de RIB dos morcegos do PARNA Serra do Cipó foram considerados os valores de referência, de modo que valores maiores que os valores obtidos para o PARNA Cipó indicam indução do biomarcador e valores inferiores indicam inibição do sistema antioxidante e ocorrência de estresse oxidativo.

$$\text{RIB} = \Sigma (\text{A}) \quad (4)$$

2.5 Análises histopatológicas

Imediatamente após a eutanásia dos animais, fragmentos de fígado foram retirados e fixados em formol 10%. Em laboratório foi realizada a desidratação do material em concentrações crescentes de álcool (70 a 100%) seguida de inclusão em parafina. Posteriormente, o material foi seccionado em micrótomo, com cortes de 7 µm de espessura, e então corado com hematoxilina e eosina para posterior análise em microscopia de luz.

2.6 Análises estatísticas

As variáveis SOD, CAT, GST, MDA foram analisadas quanto ao padrão de distribuição por meio do teste de Shapiro-Wilk. Uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal, os valores destas variáveis foram comparados entre as áreas de amostragem por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney-U. Posteriormente, foi avaliada a interação entre as áreas de amostragem e as guildas por meio da Análise da Variância Permutacional, seguido do teste de acompanhamento de Bootstrap (Ramos; Ferreira, 2009). Os valores de RIB, como seguiram os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, foram comparados entre áreas de amostragem e guildas por meio do teste de ANOVA fator duplo, seguido do teste de acompanhamento de LSD-Fisher.

As frequências de histopatologias foram comparadas entre as localidades por meio do teste de Qui-Quadrado para Independência, e, em caso de significância estatística ($p < 0,05$), foi realizado o teste de Resíduos Ajustados. Todos os testes estatísticos foram

realizados no programa computacional R (R Core Team, 2019), com o nível de significância de 0,05.

3. RESULTADOS

Foram coletados 148 morcegos de 18 espécies, pertencentes a três famílias. A família Phyllostomidae foi a mais representativa, com 14 espécies, seguida da família Vespertilionidae, com três espécies, e Molossidae, com apenas uma espécie. As espécies estão distribuídas em cinco guildas tróficas: frugívora, nectarívora, hematófaga, onívora e insetívora (Tabela 3.1). Uma vez que a guilda de onívoros foi representada apenas por indivíduos coletados no PARNA Serra do Cipó, as análises comparativas foram realizadas apenas com as quatro demais guildas.

Tabela 3.1. Espécies e guildas tróficas (N = nectarívora; F = frugívora; H = hematófaga; I = insetívora; O = onívora) dos morcegos capturados no PARNA Serra do Cipó e em Uberaba em 2018 e 2019.

Família/Espécie	Guilda trófica	PARNA Serra do Cipó	Uberaba	Total
Phyllostomidae				
<i>Anoura caudifer</i>	N	2	0	2
<i>Anoura geoffroyi</i>	N	3	0	3
<i>Artibeus lituratus</i>	F	0	2	2
<i>Artibeus planirostris</i>	F	7	13	20
<i>Carollia perspicillata</i>	F	10	10	20
<i>Diphylla ecaudata</i>	H	6	0	6
<i>Desmodus rotundus</i>	H	17	9	26
<i>Glossophaga soricina</i>	N	12	22	34
<i>Mimon bennettii</i>	I	2	0	2
<i>Phyllostomus discolor</i>	O	1	0	1
<i>Phyllostomus hastatus</i>	O	8	0	8
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	F	1	1	2
<i>Sturnira lilium</i>	F	0	2	2
<i>Vampyressa pusilla</i>	F	0	1	1
Vespertilionidae				
<i>Eptesicus</i> sp.	I	1	0	1
<i>Histiotus velatus</i>	I	0	1	1
<i>Myotis</i> sp.	I	0	6	6
Molossidae				
<i>Molossus molossus</i>	I	0	11	11
Total		33	42	148

3.1 Sistema Antioxidante e Estresse Oxidativo

Ao comparar os valores obtidos em relação ao MDA, em todos os espécimes coletados em cada localidade, foram verificadas diferenças significativas entre as duas localidades, verificando-se valores mais elevados de peroxidação lipídica entre os indivíduos coletados em Uberaba ($p=0,006$; Tabela 3.2). Ressalta-se ainda que os valores obtidos para a atividade da enzima SOD também se mostraram mais elevados entre os animais coletados em Uberaba, porém sem diferenças estatísticas significativas ($p=0,073$).

Na comparação em relação às áreas de amostragem e às guildas, foi verificado que nenhuma variável apresentou interação estatística significativa entre os fatores ($p>0,05$), contudo houve diferenças significativas dos valores de SOD e GST entre as guildas ($p=0,030$ e $p<0,0001$, respectivamente). Foi verificado que os valores de atividade de SOD foram estatisticamente superiores entre os insetívoros e nectarívoros, em especial em Uberaba, e a atividade da GST foi significativamente superior entre os hematófagos e insetívoros, especialmente no PARNA Serra do Cipó (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Atividade de biomarcadores em morcegos capturados em Uberaba e PARNA Serra do Cipó. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartilico para cada localidade.

Biomarcador	PARNA Serra do Cipó (n=35)	Uberaba (n=43)	p-valor
SOD (U/mg de proteína)	2,16 [1,82 – 2,56]	2,54 [1,99 – 3,09]	0,073
CAT (U/mg de proteína)	662,4 [599,5 – 778,1]	672,6 [596,1 – 851,1]	0,581
GST (U/mg de proteína)	12,86 [6,20 – 22,50]	10,83 [6,65 – 16,48]	0,161
MDA ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína)	0,459 [0,10 – 0,523]	0,565 [0,458 – 0,678]	0,006

SOD = Superóxido dismutase; CAT = Catalase; GST = Glutathione S-transferase; MDA = Malondialdeído.

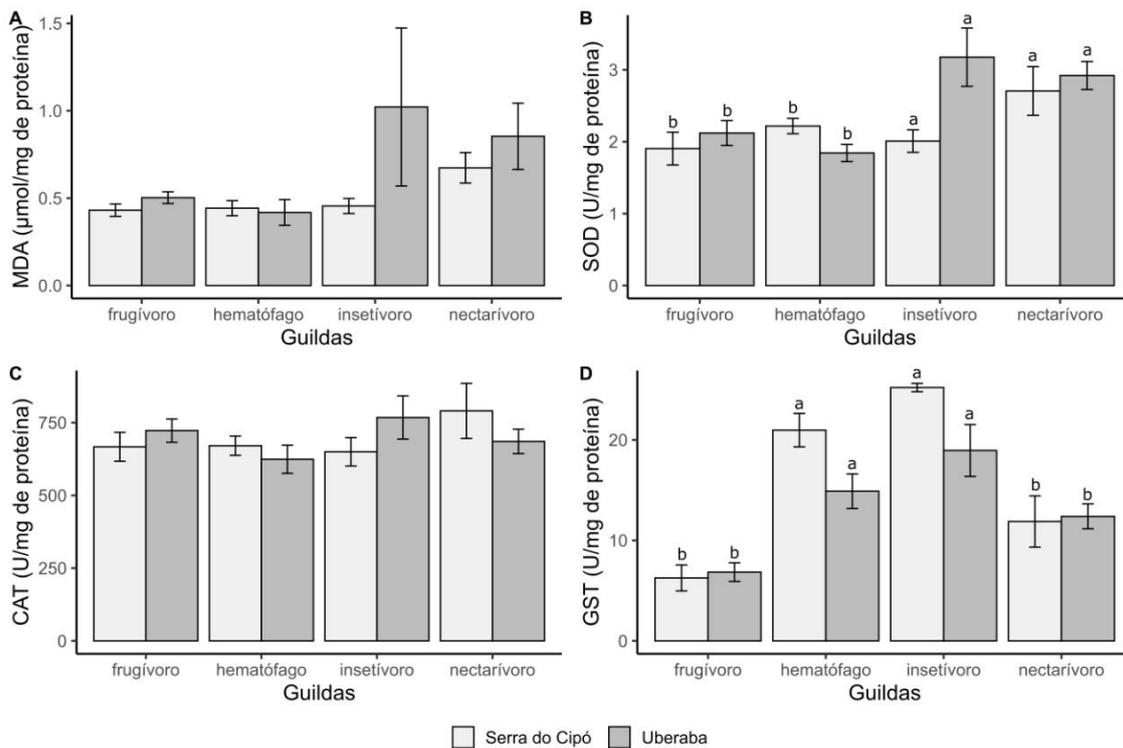


Figura 3.2. Médias e erros-padrão relativos à atividade do sistema antioxidante mensurados em morcegos do PARNA Serra do Cipó (área referência) e Uberaba (área impactada) por guildas tróficas. A – MDA; B – SOD; C – CAT; D – GST.

Os valores de RIB foram calculados para as guildas tróficas de cada área amostrada. Os valores calculados para o PARNA Serra do Cipó foram utilizados como referência para as comparações. No PARNA Serra do Cipó, a ordem dos valores de RIB foi frugívoros < hematófagos < insetívoros < nectarívoros. Em Uberaba, a ordem foi semelhante, havendo uma inversão entre as duas últimas guildas (frugívoros < hematófagos < nectarívoros < insetívoros). Os valores de RIB mostram que as guildas apresentam respostas diferentes e discriminam as respostas (indução ou inibição) de cada parâmetro do sistema antioxidante (Figura 3.3).

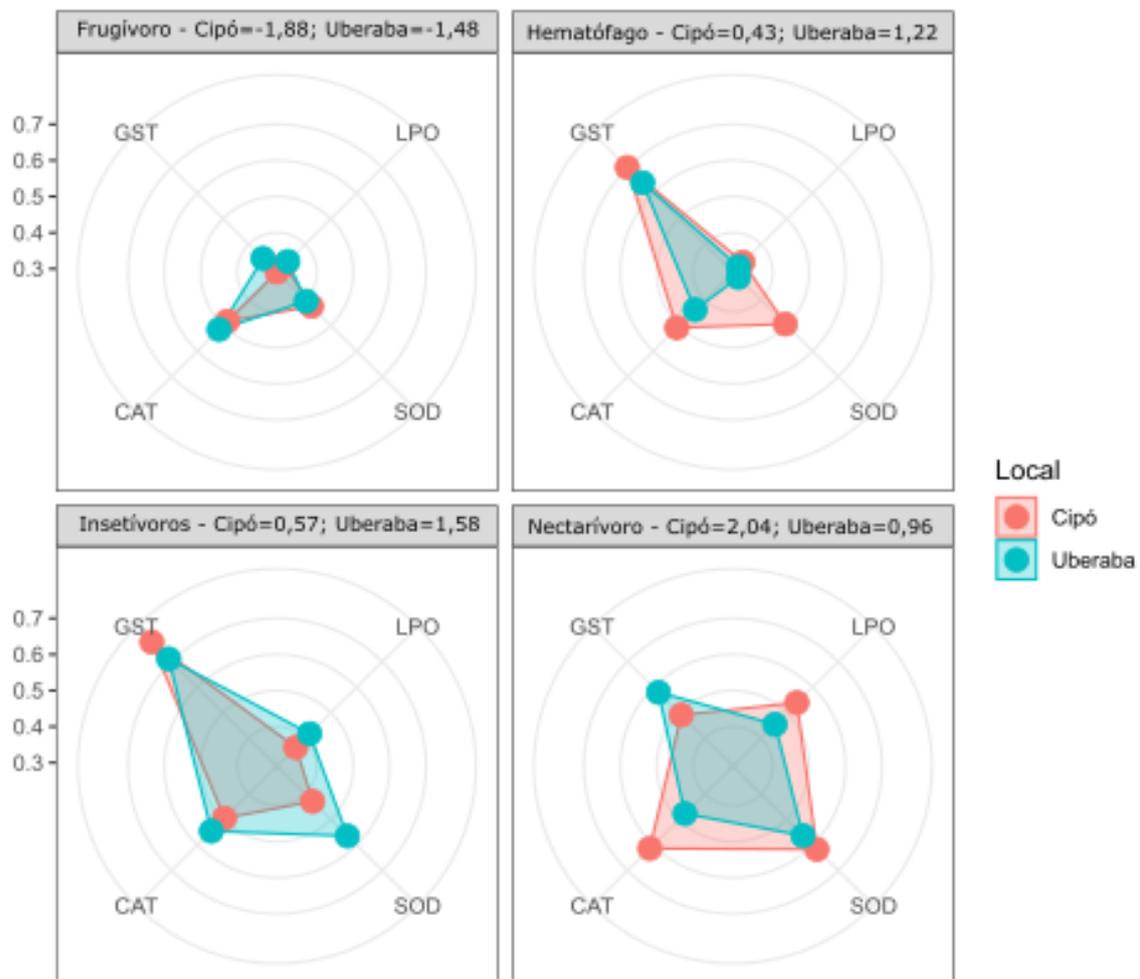


Figura 3.3. Índice de Resposta Integrada de Biomarcadores (RIB) avaliados em morcegos do PARNA Serra do Cipó (área referência) e Uberaba (área impactada). Superóxido dismutase, catalase, glutathione S-transferase e lipoperoxidação mensurados em fígado de morcegos capturados em Uberaba e PARNA Serra do Cipó. Os biomarcadores representam a relação com a área referência e a área impactada. Valores acima dos valores de referência (linha laranja) indicam indução e valores abaixo dos valores de referência indicam inibição.

Assim como verificado para os valores brutos de cada variável, não foram observadas diferenças significativas entre as áreas ($F_{2, 69} = 0,016$; $p = 0,89$), nem na interação entre áreas e guildas ($F_{2, 69} = 0,792$; $p = 0,502$). As diferenças foram observadas somente entre as guildas tróficas ($F_{2, 69} = 8,420$; $p = 0,000$), de modo que os frugívoros apresentaram valores de RIB significativamente menores que os nectarívoros, insetívoros e hematófagos ($p < 0,05$), indicando inibição do sistema antioxidante (Figura 3.4).

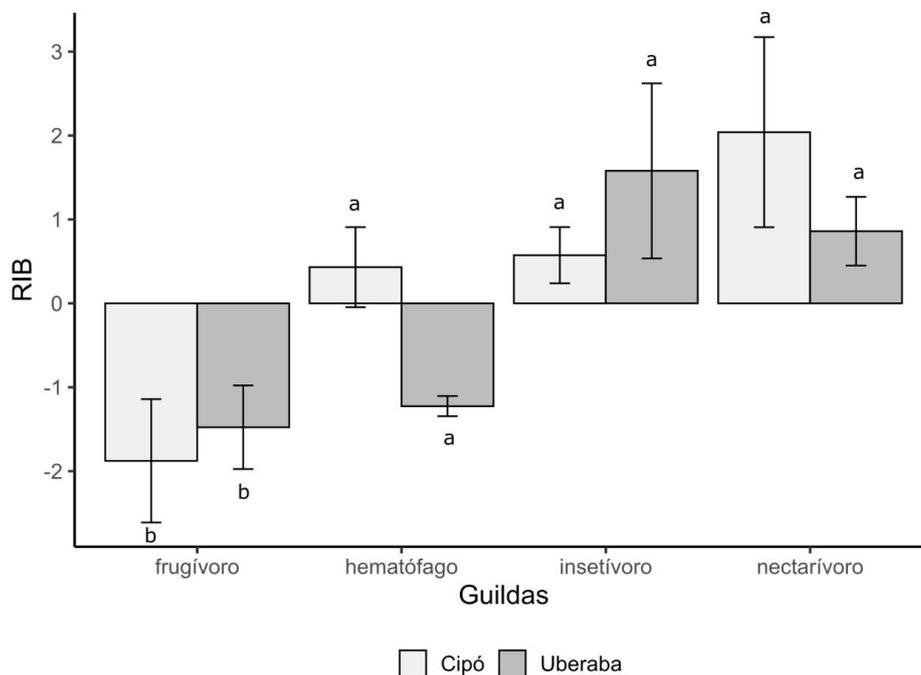


Figura 3.4. Valores de RIB para as guildas de morcegos das áreas. As letras indicam diferenças estatísticas encontradas entre as áreas avaliadas ($p < 0,05$).

3.2 Histopatologia

Foram encontrados nove tipos de lesões hepáticas (Tabela 3.3). Esteatose (68,27%) e inflamação portal foram as lesões mais frequentes (55,86%) seguidas de inflamação lobular (44,83%), balonamento (31,03%), hiperemia (29,65%), degeneração glicogênica (24,14%), Mallory (21,38%), fibrose (21,38%) e hiperplasia (19,31%). As principais alterações histológicas são apresentadas nas Figura 3.5 a 3.10.

Foram observadas diferenças na prevalência de algumas alterações histopatológicas entre as duas localidades. A prevalência de esteatose foi maior em hematófagos do PARNA Serra do Cipó e em insetívoros de Uberaba ($X^2 = 8,68$; $df = 3$; $p = 0,033$). Já o balonamento foi mais frequente entre os hematófagos da Serra do Cipó e frugívoros de Uberaba ($X^2 = 8,38$; $df = 3$; $p = 0,038$). Os insetívoros de Uberaba e hematófagos do PARNA Serra do Cipó apresentaram maior prevalência de infiltração portal ($X^2 = 9,60$; $df = 3$; $p = 0,022$), mas para infiltração lobular houve predominância nos insetívoros de Uberaba ($X^2 = 11,64$; $df = 3$; $p = 0,008$). Para as alterações fibrose ($X^2 = 3,98$; $df = 3$; $p = 0,26$), hiperplasia ductal ($X^2 = 1,84$; $df = 3$; $p = 0,60$), hiperemia ($X^2 = 5,78$; $df = 3$; $p = 0,12$), degeneração glicogênica ($X^2 = 1,04$; $df = 3$; $p = 0,59$) e corpúsculo de Mallory

($X^2 = 3,09$; $df = 3$; $p = 0,37$) não foram encontradas diferenças significativas. Ressalta-se que todas as alterações histopatológicas, quando ocorrentes, mostraram-se entre graus leves a medianos em todas as guildas das duas áreas de amostragem.

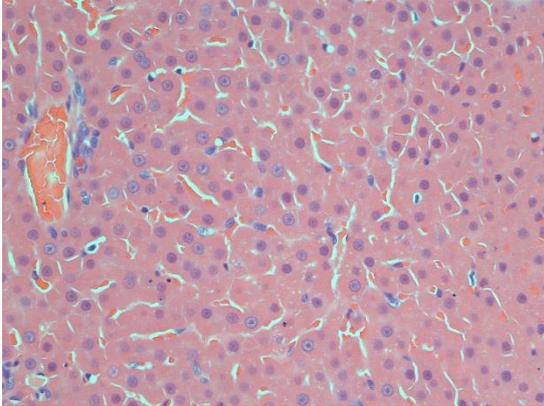


Figura 3.5. Fígado de morcego frugívoro de Uberaba sem alteração histológica (HE, 400X).

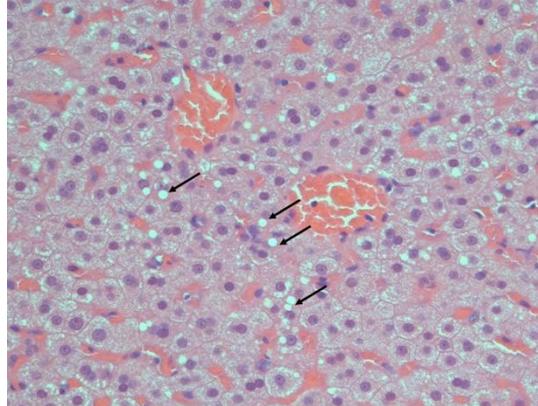


Figura 3.6. Fígado de morcego nectarívoro do PARNA Serra do Cipó com vacúolos lipídicos (seta) e vacúolos pouco delimitados sugestivos de degeneração glicogênica (HE, 400X).

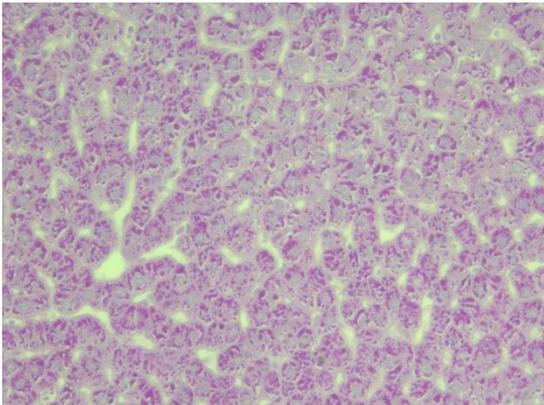


Figura 3.7. Fígado de morcego frugívoro de Uberaba com vacúolos PAS positivo (PAS, 400X).

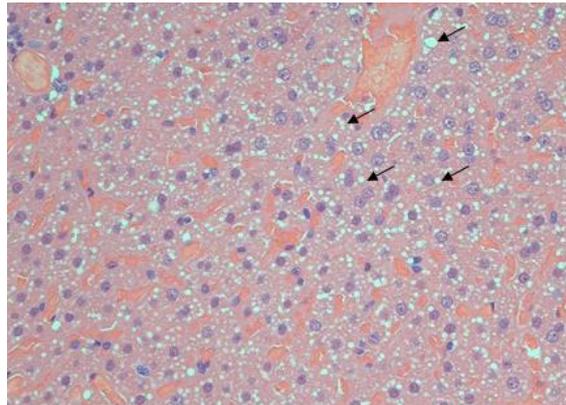


Figura 3.8. Fígado de morcego frugívoro de Uberaba com degeneração lipídica micro e macrovacuolar que acometem 70% a 100% dos hepatócitos (HE, 400X).

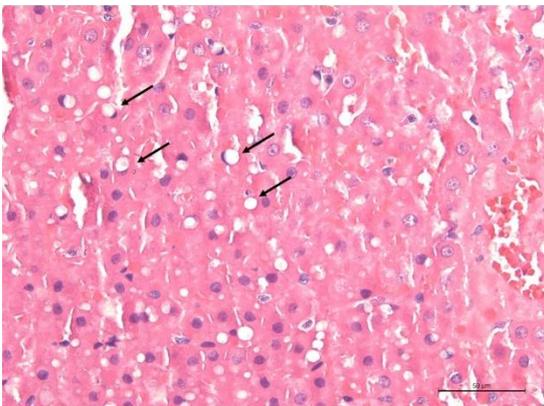


Figura 3.9. Fígado de morcego hematófago do PARNA Serra do Cipó com degeneração lipídica predominantemente macrovacuolar. A seta evidencia hepatócitos balonizados. (HE, 400X).

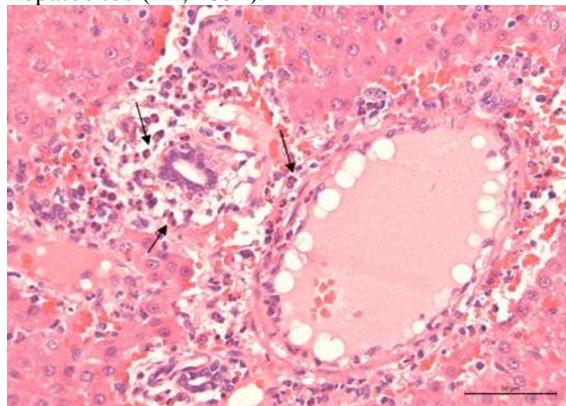


Figura 3.10. Fígado de morcego nectarívoro de Uberaba com infiltrado inflamatório portal eosinofílico moderado (HE, 400 X).

Tabela 3.3. Frequência de ocorrência de patologias hepáticas em morcegos frugívoros, hematófagos, insetívoros e nectarívoros capturados em Uberaba e no PARNA Serra do Cipó. A – Esteatose; B – Balonamento; C - Inflamação lobular; D - Inflamação portal; E - Corpúsculo de Mallory; F – Fibrose; G – Hiperplasia ductal; H – Hiperemia; I - Degeneração glicogênica (PAS). * indicam a diferença estatística entre as áreas de amostragem em cada guilda

Patologia	Métricas	Frugívoros		Hematófagos		Insetívoros		Nectarívoros	
		Cipó	Uberaba	Cipó	Uberaba	Cipó	Uberaba	Cipó	Uberaba
Esteatose	Prevalência	15 (94%)	17 (59%)	15 (65%)*	5 (56%)	2 (67%)*	8 (47%)	14 (82%)	14 (64%)
	Grau da patologia	2 [1 – 3]	1 [0 – 2]	1 [0 – 1]	1 [0 – 1]	1 [0.5 – 1.5]	0 [0 – 1]	1 [1 – 2]	1 [0 – 1.8]
Balonamento	Prevalência	4 (25%)	9 (31%)*	12 (52%)*	3 (33%)	0 (0%)	1 (6%)	3 (18%)	4 (18%)
	Grau da patologia	0 [0 – 0.3]	0 [0 – 1]	1 [0 – 1]	0 [0 – 1]	0	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]
Inflamação Lobular	Prevalência	8 (50%)	15 (52%)	12 (52%)	7 (78%)	0 (0%)	6 (35%)*	11 (65%)	5 (23%)
	Grau da patologia	0.5 [0 – 1]	1 [0 – 1]	1 [0 – 1]	1 [1 – 3]	0	0 [0 – 1]	1 [0 – 1]	0 [0 – 0]
Inflamação Portal	Prevalência	10 (63%)	21 (72%)	10 (43%)*	5 (56%)	0 (0%)	6 (25%)*	10 (59%)	11 (50%)
	Grau da patologia	1 [0 – 1]	1 [0 – 1]	0 [0 – 1]	1 [0 – 1]	0	0 [0 – 1]	1 [0 – 1]	0.5 [0 – 1.8]
Corpúsculo Mallory	Prevalência	5 (31%)	7 (24%)	2 (9%)	2 (22%)	1 (33%)	3 (18%)	4 (24%)	1 (5%)
	Grau da patologia	0 [0 – 1]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	0 [0 – 1]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]
Fibrose	Prevalência	5 (31%)	8 (28%)	4 (17%)	1 (11%)	1 (33%)	2 (12%)	5 (29%)	2 (9%)
	Grau da patologia	0 [0 – 1]	0 [0 – 1]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0.5]	0 [0 – 0]	0 [0 – 1]	0 [0 – 0]
Hiperplasia ductal	Prevalência	3 (19%)	5 (17%)	5 (22%)	3 (33%)	3 (100%)	1 (6%)	2 (12%)	2 (9%)
	Grau da patologia	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	0 [0 – 1]	2 [2 – 2]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]
Hiperemia	Prevalência	5 (31%)	5 (17%)	5 (22%)	4 (44%)	0 (0%)	5 (29%)	8 (47%)	5 (23%)
	Grau da patologia	0 [0 – 1]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	0 [0 – 1]	0 [0 – 0]	0 [0 – 1]	0 [0 – 1]	0 [0 – 0]
PAS	Prevalência	4 (25%)	4 (14%)	3 (13%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (47%)	4 (24%)	6 (27%)

4. DISCUSSÃO

Este estudo apresenta efeitos de alterações na paisagem em alguns parâmetros fisiológicos de morcegos de duas áreas com diferentes pressões antrópicas. Foi observado que as guildas alimentares são afetadas diferentemente e que, embora o uso e ocupação do solo das áreas estudadas seja diferente, os morcegos apresentaram respostas similares.

Morcegos são conhecidos por serem mais resistentes ao estresse oxidativo que outros vertebrados de porte similar. Em estudos comparativos, foi observado que morcegos produzem menor quantidade de espécies reativas do oxigênio (EROs) apesar das altas taxas metabólicas (Brunet-Rossini, 2004; Ungvari et al., 2008; Brown et al., 2009; Hanadhita et al., 2017), além de possuírem concentrações mais elevadas de antioxidantes (Reinke; O'Brien, 2006; Wilhelm Filho et al., 2007). Essa condição parece ser resultado de estratégias evolutivas desenvolvidas para prevenir danos relacionados a grande produção de EROs decorrente da elevada taxa metabólica destes animais (Brunet-Rossini, 2004; Brown et al., 2009), do despertar de estados de torpor e hibernação (Yin et al., 2016), estando relacionada também à maior longevidade (Brunet-Rossini, 2004; Brown et al., 2009; Salmon et al., 2009). Os morcegos frugívoros, particularmente, apresentam maior potencial antioxidante que morcegos onívoros ou animalívoros, porque podem ingerir maior quantidade de antioxidantes, como vitaminas A, C, E, carotenoides e outros, presentes nos alimentos vegetais (Schneeberger et al., 2014; Halliwell; Gutteridge, 2015).

Os morcegos capturados em Uberaba apresentaram concentrações significativamente maiores de MDA, um subproduto da lipoperoxidação. A lipoperoxidação é uma reação em cadeia que pode ser iniciada pela ação de EROs, sendo considerada uma das maiores causas de dano e morte celular (Hermes-Lima, 2004). Os subprodutos gerados nesse processo também são tóxicos estando relacionados ao desenvolvimento de processos patológicos (Guéraud et al., 2010). Os resultados sugerem que os morcegos de Uberaba apresentam mais danos em nível celular em relação aos morcegos do PARNA. Tais danos podem estar relacionados a maior exposição a agrotóxicos e outros contaminantes presentes na cidade de Uberaba uma vez que a metabolização dessas substâncias produz EROs que podem iniciar a lipoperoxidação e conseqüentemente aumento nas

concentrações de MDA, como já foi observado em outros morcegos (Hermes-Lima, 2004; Oliveira et al., 2017; 2018)

De acordo com os resultados de RIB, os indivíduos amostrados nas duas áreas apresentaram respostas similares, havendo diferenciação da atividade fisiológica apenas entre as guildas. Alterações em parâmetros de estresse oxidativo de morcegos foram observadas em animais expostos a agrotóxicos (Oliveira et al., 2017; 2018), poeira de carvão mineral (Pedroso-Fidelis et al., 2020) e metais pesados (Ruiz et al., 2019). No entanto, a maior parte das pesquisas envolvendo estresse oxidativo em morcegos está focada em estudos de longevidade (Brunet-Rossinni, 2004; Wilhelm Filho et al., 2007; Salmon et al., 2009), dieta (Schneeberger et al., 2014), hibernação (Lee et al., 2002; Yin et al., 2016) e resposta imune (Schneeberger et al., 2013; Lilley et al., 2014), havendo pouca informação relacionada às alterações na paisagem ou atividades antrópicas (Melo et al., 2012). Sendo assim, comparações são difíceis de realizar uma vez que não existem dados disponíveis na literatura para o estabelecimento de uma linha de base para os parâmetros considerando as diferenças relacionadas às espécies e hábitos alimentares (Wilhelm Filho et al., 2007; Schneeberger et al., 2014; Freitas et al., 2019), idade (Jones, 2015) e fatores ambientais (Limón-Pacheco; Gosenbatt, 2009; Rodríguez-Estival, 2016).

Quanto à avaliação das guildas, os frugívoros apresentaram valores de RIB menores que as demais guildas, indicando inibição do sistema antioxidante. Os morcegos frugívoros de ambas as áreas apresentaram menor atividade das enzimas SOD, CAT, GST e baixa concentração de MDA. Menor atividade antioxidante em morcegos frugívoros já foi observada em outros estudos, tendo sido justificada pelo maior aporte de antioxidantes provenientes da dieta e menor produção de EROs (Schneeberger et al., 2014). Em contrapartida morcegos hematófagos possuem dieta rica em proteínas e ferro, estando mais suscetíveis ao estresse oxidativo, principalmente devido o papel de íons ferro como catalisadores em reações de oxidação (Halliwell; Gutteridge, 2015; Freitas et al., 2019). Já os morcegos nectarívoros, com dieta rica em carboidratos, estão suscetíveis à ação de subprodutos da auto-oxidação da glicose associados à formação de EROS e ao dano oxidativo (Folmer et al., 2002; Suwannaphet et al., 2010; Freitas et al., 2019). Morcegos insetívoros também possuem dieta rica em proteínas (Schondube et al., 2001) e possuem maior atividade antioxidante que os frugívoros e nectarívoros (Wilhelm Filho et al., 2007). A maior suscetibilidade ao estresse oxidativo decorrente de

particularidades da dieta destes grupos parece ser compensada por um aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Freitas et al., 2019).

No entanto, considerando a dificuldade de comparações de parâmetros de estresse oxidativo de morcegos, uma vez que não existem dados disponíveis na literatura para o estabelecimento de uma linha de base, fica posta a questão relativa à saúde dos animais residentes nestas duas localidades serem equivalentes. A partir disto, alguns questionamentos são levantados, tais como: os morcegos de Uberaba apresentam uma plasticidade em resposta à exposição crônica ao ambiente antropizado ou a proteção conferida pelo PARNA não é suficiente para evitar impactos na saúde destes animais?

De modo geral, na análise histopatológica do fígado foram observadas prevalências similares entre as duas áreas, apresentando diferenças entre guildas. A maior prevalência de esteatose foi observada em insetívoros de Uberaba e hematófagos do PARNA Serra do Cipó, sendo tal alteração caracterizada pelo acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos como resultado de alterações metabólicas (Burt, 2001). Em morcegos os relatos desta patologia estão associados à exposição a agrotóxicos (Oliveira et al., 2017; 2018), alterações metabólicas decorrentes de estresse ambiental (Snyder et al., 2015), de cativeiro (Gonzalo et al., 2005) e casos nos quais a etiologia não foi determinada (Lankton et al., 2013).

Análises de determinação lipídica no morcego hematófago *Desmodus rotundus* nas estações, seca e chuvosa, revelaram que esta espécie apresenta baixa concentração de lipídios em ambos os períodos (Freitas et al., 2006). Os lipídios armazenados são mobilizados apenas após um período de jejum prolongado, não sendo acompanhado por aumento de concentração sérica de ácidos graxos. Isso indica que os lipídios armazenados são utilizados para o suprimento energético do próprio tecido em que foi armazenado (Freitas et al., 2006). A inabilidade de *D. rotundus* em armazenar e mobilizar lipídios pode ser compensada pela grande disponibilidade de alimento (principalmente gado), como observada em ambas as áreas amostradas no presente estudo, bem como o comportamento de compartilhamento de alimento já descrito para essa espécie (Wilkinson, 1990; Freitas et al., 2006). Considerando esses aspectos fisiológicos e a maior prevalência de esteatose, balonamento e inflamação portal nos hematófagos do PARNA Serra do Cipó, sugere-se que estes animais apresentam um quadro importante de patologia hepática. Contudo, estudos adicionais são necessários

incluindo outras áreas e maior número de amostragens a fim de verificar efeitos relacionados à sazonalidade.

Os morcegos hematófagos do PARNA Cipó e os frugívoros de Uberaba apresentaram maiores frequências de balonamento, indicando que esses animais estão submetidos a fatores antropogênicos capazes de induzir distúrbios no metabolismo hepático. O balonamento é uma degeneração caracterizada por hepatócitos aumentados, sem polaridade, com perda de queratina 8 e 18, acúmulo de lipídios, fosfolipídios oxidados e proteínas ubiquitinadas (Lackner et al., 2008). É um dano característico de lipotoxicidade decorrente do acúmulo de lipídios intermediários no citoplasma dos hepatócitos que induzem o estresse oxidativo, disfunção e eventualmente morte celular (Hirsova; Gores, 2015; Hirsova et al., 2016). Hepatócitos balonizados são células cuja morte celular foi iniciada, mas não executada (Kakisaka et al., 2012). Estas células contribuem para a patogênese porque liberam fatores de reparo que induzem a fibrogênese (Rangwala et al., 2011; Kakisaka et al., 2018). Hepatócitos balonizados já foram observados em animais expostos a agrotóxicos (Sharma et al., 2005; Hamid et al., 2012; Mossa et al., 2015), medicamentos antiparasitários como ivermectina (Omshi et al., 2018), metais pesados (Sarmiento-Ortega et al., 2017; Dohaish, 2018) e outros contaminantes ambientais (Safer; Al-Nughamish, 1999; Zodrow et al., 2004). Esses fatores podem estar relacionados à contaminação ambiental ou alterações na paisagem que comprometem o comportamento alimentar, forrageio ou disponibilidade de alimentos para morcegos hematófagos e frugívoros. Ainda que os morcegos hematófagos tenham sido capturados em uma área de proteção, é plausível supor que esses animais forrageiam nas bordas ou mesmo fora do parque utilizando como presas animais domésticos. Esses animais são frequentemente tratados como fármacos que podem representar mais uma fonte de contaminação.

Os morcegos hematófagos do PARNA apresentaram maior prevalência de inflamação portal, e os morcegos insetívoros de Uberaba apresentaram maiores prevalência de inflamação lobular e portal. Fatores antropogênicos também podem estar relacionados ao processo inflamatório (Isaksson, 2015). A inflamação é uma resposta do organismo com objetivo de proteger o organismo de uma agressão, a qual pode ser causada por agentes exógenos ou endógenos (Kumar et al., 2013). Morcegos insetívoros são considerados mais suscetíveis à contaminação ambiental por ocuparem elevado nível trófico na cadeia, o que os torna mais suscetíveis a bioacumulação e biomagnificação

(Jones et al., 2009). Esses animais podem estar sofrendo com a exposição aos agrotóxicos utilizados nas áreas agrícolas (Eidels et al., 2007; Stechert et al., 2014) e, ainda, submetidos ao estresse causado pela poluição sonora que pode comprometer o forrageio (Schaub et al., 2008; Luo et al., 2015). Considerando o percentual de uso e ocupação do solo na área de amostragem em Uberaba, o qual é constituído predominantemente por área agrícola e pastagem com manejo (Figura 3.1), seria plausível supor que os morcegos capturados nesta área estão mais sujeitos a fatores antropogênicos capazes de induzir o estresse oxidativo e distúrbios no metabolismo hepático. No entanto, embora a composição da paisagem de ambas as áreas amostradas seja diferente, a condição de saúde dos morcegos é, de um modo geral, similar.

O PARNA Cipó é uma das maiores áreas de proteção do estado de Minas Gerais e oferece uma elevada heterogeneidade de habitats importante para conservação de morcegos (Dias-Silva et al., 2018). A região da Serra do Cipó é também importante ponto turístico e, nas últimas décadas, vêm sofrendo uma ocupação desordenada com as construções de pousadas, condomínios e casas de veraneio (Ferreira, 2010). Essas atividades, além de provocarem alterações na paisagem natural, aumentam a pressão de fatores antropogênicos como poluição química, sonora e luminosa que podem comprometer o forrageio, disponibilidade de recursos de alimentos e abrigos além das implicações na saúde desses animais (Russo; Ancillotto, 2014).

Morcegos têm sido considerados indicadores de qualidade ambiental em diferentes abordagens (Jones et al., 2009; Cunto; Bernard, 2012; Zukal et al., 2015). Para este propósito, esses animais devem ser utilizados com cautela, uma vez que as espécies podem responder de maneiras diferentes considerando as histórias de vida e tolerância aos impactos e, portanto, os dados não devem ser generalizados (Zocche et al., 2010; Cunto; Bernard, 2012). Além disso, morcegos percebem o habitat em diferentes escalas, e a qualidade do habitat pode ser influenciada pelo tipo de vegetação assim como pela organização espacial dos recursos na paisagem (Gorresen et al., 2005; Ducci et al., 2015), sendo sensíveis, simultaneamente, a um recurso disponível em uma área limitada e a cobertura vegetal numa escala mais ampla (Gehrt; Chelvig, 2003).

Diante do exposto, considerando que morcegos de diferentes guildas tróficas apresentam respostas fisiológicas diferentes às alterações na paisagem, ressalta-se a importância de se conhecer as respostas de cada guilda para mensurar os prejuízos relacionados aos serviços ecossistêmicos prestados por esses animais, bem como

determinar quais guildas ou espécies podem ser usadas como bioindicadores de qualidade ambiental. Para isso, são necessários novos estudos com o objetivo de entender a fisiologia e como fatores antropogênicos interferem no estado de saúde destes animais, definindo-se linhas de base como parâmetros de comparação.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados neste trabalho contrariam a hipótese que morcegos de unidades de conservação apresentam melhor condição de saúde do que aqueles de áreas mais antropizadas. Embora o perfil de uso e ocupação das áreas sejam diferentes, o estado de saúde dos animais é semelhante, havendo algumas diferenças entre guildas tróficas e em relação à lipoperoxidação. Os morcegos de Uberaba apresentaram mais danos celulares decorrentes da lipoperoxidação. Os hematófagos do PARNA Serra do Cipó apresentaram mais alterações histopatológicas do fígado, e os frugívoros, tanto do PARNA quanto de Uberaba, apresentaram inibição do sistema antioxidante. Essas diferenças podem estar relacionadas à maneira como cada grupo percebe as alterações ambientais, além de aspectos da biologia e ecologia próprios de cada guilda.

As Unidades de Conservação representam áreas importantes para conservação da biodiversidade; no entanto, o entorno dessas áreas tem sofrido um processo de urbanização que reduz o efeito protetor das Unidades. Além disso, é possível que para animais com grande capacidade de dispersão como os morcegos, essa proteção seja ainda menor. Embora morcegos sejam considerados potenciais bioindicadores de qualidade do habitat, o uso destes animais, principalmente espécies neotropicais, é comprometido diante da carência de dados relacionados à sua fisiologia e ao impacto de fatores antropogênicos sobre sua higidez.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBY, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- ALBERICO, M., Cadena, A.; Hernández-Camacho, J. Muñoz-Saba, Y. Mamíferos (Synapsida: Theria) de Colombia. **Biota Colombiana**, v. 1, n. 1, p. 43-75, 2000.
- ANDRADE, V.M.; SILVA, J.; SILVA, F.R.; HEUSER, V.D.; DIAS, J.F.; YONEAMA, M.L.; FREITAS, T.R.O. Fish as bioindicators to assay the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, p. 459-468, 2004.
- BEDROSIAN, T.A.; FONKEN, L.K.; WALTON, J.C.; NELSON, R.J. Chronic exposure to dim light at night suppresses immune responses in Siberian hamsters. **Biology Letters**, v. 7, n. 3, p. 468-471, 2001.
- BELIAEFF, B; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1316-1322, 2002.
- BLICKLEY, J.L.; WORD, K.R.; KRAKAUER, A.H.; PHILLIPS, J.L.; SELLS, S.N.; TAFF, C.C.; WINGFIELD, J.C.; PATRICELLI, G.L. Experimental chronic noise is related to elevated fecal corticosteroid metabolites in lekking male greater sage-grouse (*Centrocercus urophasianus*). **PlosOne**, v. 7, n. 11, e50462, 2012.
- BROWN, J.C.L.; McCLELLAND, G.B.; FAURE, P.A.; KLAIMAN, J.M.; STAPLES, J.F. Examining the mechanisms responsible for lower ROS release rates in liver mitochondria from the long-lived house sparrow (*Passer domesticus*) and big brown bat (*Eptesicus fuscus*) compared to the short-lived mouse (*Mus musculus*). **Mechanisms of Aging and Development**, v. 130, p. 467-476, 2009.
- BRUNET-ROSSINNI, A.K. Reduced free-radical production and extreme longevity in the little brown bat (*Myotis lucifugus*) versus two non-flying mammals. **Mechanisms of Aging and Development**, v. 125, p. 11-20, 2004.
- BUEGE, J.A., AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- BURGUER, J. Bioindicators: Types, development, and use in ecological assessment and Research. **Environmental Bioindicators**, v.1, p. 22-39, 2006.
- BURT, A.D. Steatosis and steatohepatitis. **Current Diagnostic Pathology**, v. 7, p. 141-147, 2001.
- CLARK, D.R. How sensitive are bats to insecticides? **Wildlife Society Bulletin**, v. 16, n. 4, p. 399-403, 1988.
- COSTA, P.M.; CAEIRO, S.; LOBO, J.; MARTINS, M.; FERREIRA, A.M.; CAETANO, M.; VALE, C.; DELVALLS, T.A.; COSTA, M.H. Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and *in situ* testes fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 55-65, 2011.
- CONSTANTINI, D. Land-use changes and agriculture in the tropics: pesticides as an overlooked threat to wildlife. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 7, p. 1837-1839, 2015.

- CUNTO, G.C.; BERNARD, E. Neotropical bats as indicators of environmental disturbance: what is the emerging message? **Acta Chiropterologica**, v. 14, n. 1, p. 143-151, 2012.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta Tropica**, v. 78, n. 2 p. 103-116, 2001.
- DIAS-SILVA, L.; DUARTE, G.T.; ALVES, R.; PEREIRA, M.J.R.; PAGLIA, A. Feeding and social activity of insectivorous bats in a complex landscape: The importance of gallery forests and karst areas. **Mammalian Biology**, v. 88, p. 52-63, 2018.
- DIETERICH, S.; BIELIGIK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. **Circulation**, v. 101, p.33-39, 2000.
- DOHAISH, E.J.A.B. Impact of some heavy metals present in the coastal area of Jeddah, Saudi Arabia on the gills, intestine and liver tissue of *Lutjanus monostigma*. **Journal of Environmental Biology**, v. 39, p. 253-260, 2018.
- DOMINONI, D.; QUETTING, M.; PERTECKE, J. Artificial light at night advances avian reproductive physiology. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 280, 20123017, 2013.
- DUCCI, L.; AGNELLI, P.; FEBBRAARO, M.D.; FRATE, L.; RUSSO, D.; LOY, A.; CARRANZA, M.L.; SANTINI, G.; ROSCIONI, F. Different bat guilds perceive their habitat in different ways: a multiscale landscape approach for variable selection in species distribution modelling. **Landscape Ecology**, v. 30, p. 247-2159, 2015.
- EIDELS, R.R.; WHITAKER Jr., J.O.; SPARKS, D.W. Insecticide residues in bats and guano from Indiana. **Proceedings of the Indiana Academy of Science**, v. 116, n. 1, p. 50-57, 2007.
- FEARNSIDE, P.M. Soybean cultivation as a threat to the environment in Brazil. **Environmental Conservation**, v. 28, n. 1, p. 23-28, 2001.
- FENTON, M.B.; SIMMONS, N.B. Bats: A world of science and mystery. The University of Chicago Press, Chicago, 303 pp.
- FERREIRA, R.A. A Serra do Cipó e seus vetores de penetração turística – um olhar sobre as transformações socioambientais. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo horizonte.
- FOLMER, V.; SOARES, J.C.M.; ROCHA, J.B.T. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, n. 10, p. 1279-1285, 2002.
- FREITAS, M.B.; WELKER, A.F.; PINHIRO, E.C. Seasonal variation and food deprivation in common vampire bats (Chiroptera: Phyllostomidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 4, p. 1051-1055, 2006.
- FREITAS, R.M.P.; OLIVEIRA, J.M.; CASTRO, D.L.J.; SARANDY, M.M.; GONÇALVES, R.V.; FREITAS, M.B. The antioxidant status of three Neotropical bats species with different feeding habits. **Acta Chiropterologica**, v. 21, n. 2, p. 395-402, 2019.

- GEHRT, S.D.; CHELSVIG, J.E. Bat activity in an urban landscape: patterns at the landscape and microhabitat scale. **Ecological Applications**, v. 13, n. 4, p. 939-950, 2003.
- GILLESPIE, T.R.; CHAPMAN, C.A. Prediction of parasite infection dynamics in primate metapopulations based on attributes of forest fragmentation. **Conservation Biology**, v. 20, n. 2, p. 441-448, 2006.
- GONZALO, A.S.; SCHWIEBERT, R.S.; METZNER, W.; LAWSON, G.W. Spontaneous, generalized lipodosis in captive Greater Horseshoe Bats (*Rhinolophus ferrumequinum*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 44, n. 6, p. 49-52
- GORRESEN, P.M.; WILLIG, M.R.; STRAUSS, R.E. Multivariate analysis of scale-dependent associations between bats and landscape structure. **Ecological Applications**, v. 15, n. 6, p. 2126-2136, 2005.
- GUÉRAUD, F.; ARALAY, M.; BRESGEN, N.; CIPAK, A.; ECKL, P.M.; HUC, L.; JOUANIN, I.; SIEMS, W.; UCHIDA, K. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. **Free Radical Research**, v. 44, n. 10, p. 1098-1124, 2010.
- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.
- HADDAD, N.M.; BRUDVIG, L.A.; CLOBERT, J.; DAVIES, K.F.; GONZALEZ, A.; HOLT, R.D.; LOVEJOY, T.E.; SEXTON, J.O.; AUSTIN, M.P.; COLLINS, C.D.; COOK, R.D.; DAMSCHEN, E.I.; EWERS, R.M.; FOSTER, B.L.; JENKINS, C.N.; KING, A.J.; LAURANCE, W.F.; LEVEY, D.J.; MARGULES, C.R.; MEBOURNE, B.A.; NICHOLLS, A.O.; ORROCK, J.L.; SONG, D.X.; TOWNSHEND, J.R. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. **Science Advance**, v. 1, n. 2, e1500052, 2015.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology & Medicine. Oxford University Press, UK, 5ed. 2015.
- HAMID, S.; MAHAJAN, R.; SINGH, H. Carbaryl, a pesticide causes "toxic hepatitis" in albino rats. **Journal of Cytology & Histology**, v. 3; doi:10.4172/2157-7099.1000149, 2012.
- HANADHITA, D.; RAHMA, A.; PRAWIRA, A.Y.; SATJANINGTYAS, A.S.; AGUNGPRIOYONO, S. Comparison of oxidative stress status between lesser short nosed bat (*Cynopterus brachyotis*) and laboratory rat (*Rattus norvegicus*) related to their longevity. **In International Scientific Symposium**, p. 17-18, 2017.
- HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, Kenneth B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaption*. John Wiley & Sons, Inc, Wiley-Liss, NY, NY, pp. 319-368, 2004.
- HIRSOVA P, GORES GJ. Death receptor-mediated cell death and proinflammatory signaling in nonalcoholic steatohepatitis. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v.1, p. 7-27, 2015.
- HIRSOVA, P.; IBRAIM, S.H.; GORES, G.J.; MALHI, H. Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis. **The Journal of Lipid Research**, v. 57, p. 1758-1770, 2016.

- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Monitoramento da Cobertura e Uso da Terra do Brasil 2016-2018**. Rio de Janeiro, 2020.
- ICMBio Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Plano de Manejo do Parque Nacional da Serra do Cipó e Área de Proteção Ambiental Morro da Pedreira**. Brasília, 2009.
- ISAKSSON, C. Urbanization, oxidative stress and inflammation: a question of evolving, acclimatizing or coping with urban environmental stress. **Functional Ecology**, v. 29, p. 913-923, 2015.
- JANIN, A.; LÉNA, J.P.; JOLY, P. Beyond occurrence: Body condition and stress hormone as integrative indicators of habitat availability and fragmentation in the common toad. **Biological Conservation**, v. 144, p. 1008-1016, 2011.
- JONES, G.; JACOBS, D.S.; KUNZ, T.H.; WILLING, M.R.; RACEY, P.A. Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators. **Endangered Species Research**, v. 8, p. 93-115, 2009.
- JONES, G. What bioindicators are and why they are important. In: FLAQUER, C., PUIG-MONTSERRAT, X. (Eds). Proceedings of the International Symposium on the Importance of Bats as Bioindicators. Museum of Natural Sciences Edicions, Granollers, pp. 18-19, 2012.
- JONES, D.P. Redox theory of aging. **Redox Biology**, v. 5, p. 71-79, 2015.
- KAKISAKA, K. CAZANAVE, S.C.; WERNEBURG, N.W.; RAZUMILAVA, N.; MERTENS, J.C.; BRONK, S.F.; GORES, G.J. A hedgehog survival pathway in “undead” lipotoxic hepatocytes. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 844-851, 2012.
- KAKISAKA, K.; SUZUKI, Y.; FUJIWARA, Y.; ABE, T.; YONEZAWA, M.; KURODA, H.; ISHIDA, K.; SUGAI, T.; TAKIKAWA, Y. Evaluation of ballooned hepatocytes as a risk factor for future progression of fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Gastroenterology**, 53, p.1285-1291, 2018.
- KIGHT, C.R.; SWADDLE, J.P. How and why environmental noise impacts animals: an integrative, mechanistic review. **Ecology Letters**, v. 14, p. 1052-1061, 2011.
- KÖHLER, H.R.; TRIEBSKORN, R. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? **Science**, v. 341, p. 759-765, 2013.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. Robbins Patologia Básica. Elsevier, 9ª ed., 2013.
- KUNZ, T.H.; ANTHONY, E.L.P. Age estimation and post-natal growth in the bat *Myotis lucifugus*. **Journal of Mammalogy**, v. 63, n. 1, p. 23-32, 1982.
- KUNZ, T.H.; TORREZ, E.B.; BAUER, D.; LOBOVA, T.; FLEMING, T.H. Ecosystem services provided by bats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, n. 1, p. 1-38, 2011.
- LACKNER, C.; GOGG-KAMERER, M.; ZATLOUKAL, K.; STUMPTNER, C.; BRUNT, E.M.; DENK, H. Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: The value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. **Journal of Hepatology**, v. 48, p. 821-828, 2008.
- LANKTON, J.S.; CHAPMAN, A.; RAMSEY, E.C.; KANIA, S.A.; NEWKIRK, K.M. Preputial demodex species in big brown bats (*Eptesicus fuscus*) in eastern Tennessee. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 44, n. 1, p. 124-129, 2013.

- LEE, M.; CHOI, I.; PARK, K. Activation of stress signaling molecules in bat brain during arousal from hibernation. **Journal of Neurochemistry**, v. 82, n. 4, 867-873, 2002.
- LEMOS, T. H.; TAVARES, V. C.; MORAS, L. M. Character variation and taxonomy of short-tailed fruit bats from *Carollia* in Brazil. **Zoologia**, 37: 1–7. <https://doi.org/10.3897/zoologia.37.e34587>, 2020.
- LILLEY, T.M.; STAUFFER, J.; KANERVA, M.; EEVA, T. Interspecific variation in redox status regulation and immune defense in five bat species: the role of ectoparasites. **Oecologia**, v. 175, p. 811-823, 2014.
- LIM B.K.; ENGSTROM M.D. Species diversity of bats (Mammalia: Chiroptera) in Iwokrama Forest, Guyana, and the Guiana subregion: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, 10, n. 4, p. 613-657, 2001.
- LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v. 674, p. 137-147, 2009.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RABDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.
- LUO, J.; SIEMERS, B.M.; KOSELJ, K. How anthropogenic noise affects foraging. **Global Change Biology**, v. 21, n. 9, p. 3278-3289, 2015.
- MAZEROLLE, D.F.; HOBSON, K.A. Physiological ramifications of habitat selection in territorial male ovenbirds: consequences of landscape fragmentation. **Oecologia**, v. 130, p. 356-363, 2002.
- MELO, B.E.S.; BARROS, M.S.; CARVALHO, T.F.; AMARAL, T.S.; FREITAS, M.B. Energy reserves of *Artibeus lituratus* (chiroptera: Phyllostomidae) in two áreas with different degrees of conservation in Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 1, p. 181-187, 2012.
- MENDES, P.; WITH, K.A.; SIGNORELLI, L.; DE MARCO Jr., P. The relative importance of local versus landscape variables on site occupancy in bats of the Brazilian Cerrado. **Landscape Ecology**, v. 32, n. 4, p. 745-762, 2017.
- MOSSA, A.T.H.; SWELAM, E.S.; MOHAFRASH, S.M.M. Sub-chronic exposure to fipronil induced oxidative stress, biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of male albino rats. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 775-784, 2015.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, F. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- NAIDOO, S.; VOSLOO, D.; SCHOEMAN, M.C. Haematological and genotoxic response in an urban adapter, the banana bat, foraging at wastewater treatment works. **Ecotoxicological and Environmental Safety**, v. 114, p. 304-311, 2015.
- NOGUEIRA M.R., I.P. LIMA, G.S.T. GARBINO, R. MORATELLI, V.C. TAVARES, R. GREGORIN, AND A.L. PERACCHI. 2018. Updated checklist of Brazilian bats: versão 2018. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (Sbeq). <<http://www.sbeq.net/updateslist>>accesseado em: 15/04/2020.

- OMSHI, F.S.H.; ABBASALIPOURKABIR, R.; ABBASALIPOURKABIR, M.; NABYAN, S.; NASHIRI, A.; GHAFOURIKHOSROSHAHI, A. Effect of vitamin A and vitamin C on attenuation of ivermectin-induced toxicity in male Wistar rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 29408-29417, 2018.
- OLIVEIRA, J.M.; BRINATI, A.; MIRANDA, L.D.L.; MORAIS, D.B.; ZANUCIO, J.C.; GONÇALVES, R.V.; PELUZIO, M.C.G.; FREIRTAS, M.B. Exposure to the insecticide endosulfan induces liver morphology alterations and oxidative stress in fruit-eating bats (*Artibeus lituratus*). **International Journal of Experimental Pathology**, v. 98, n. 1, p. 17-25, 2017.
- OLIVEIRA, J.M.; LOSANO, N.F.; CONDESSA, S.S.; FREITAS, R.M.P.; CARDOSO, S.A.; FREITAS, M.B.; OLIVEIRAS, L.L. Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissue of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. **Ecotoxicology and environmental Safety**, v. 148, p. 684-692, 2018.
- PEDROSO-FIDELIS, G.S.; FARIAS, H.R.; MASTELLA, G.A.; BOUFLEUR-NIEKRASZWICZ, L.A.; DIAS, J.F.; ALVES, M.C.; SILVEIRA, P.C.L.; NESI, R.T.; CARVALHO, F.; ZOCHE, J.J.; PINHO, R.A. Pulmonary oxidative stress in wild bats exposed to coal dust: a model to evaluated the impact of coal mining on health. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 191, 110211, 2020.
- PEREIRA, H.M.; LEADLEY, P.W.; ALKEMADE, R.; SCHARLEMANN, J.P.W.; FERNANDEZ-MANJARRÉS, J.F.; ARAÚJO, M.B.; BALVANERA, P.; BIGGS, R.; CHEUNG, W.W.L.; CHINI, L.; COOPER, H.D.; GILMAN, E.L.; GUÉNETTE, S.; HURTT, G.C.; HUNTINGTON, H.P.; MACE, G.M.; OBERDORFF, T.; REVENGA, C.; RODRIGUES, P.; SCHOLLES, R.J.; SUMAILA, U.R.; WALPOLE, M. Scenarios for global biodiversity in the 21st century. **Science**, v. 330, p. 1496-1501, 2010.
- RAMOS, P. S., FERREIRA, D. F. Agrupamento de medias via bootstrap de populações normais e não-normais, **Revista Ceres**, v.56, p.140-149, 2009.
- RANGWALA, F.; GUY, C.D.; LU, J.; SUZUKI, A.; BURCHETTE, J.L.; ABDELMALEK, M.F.; CHEN, W.; DIEHL, A.M. Increased production of sonic hedgehog by ballooned hepatocytes. **Journal of Pathology**, v. 224, n. 3, p. 401-410, 2001.
- RATTNER, B.A. History of wildlife toxicology. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 773-783, 2009.
- REINKE, N.B.; O'BRIEN, G.M. High activity antioxidant enzymes protect flying-fox haemoglobin against damage: an evolutionary adaptation for flight? **Journal of Comparative Physiology B**, v. 176, p. 729-737, 2006.
- REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; BATISTA, C. B.; LIMA, I. P.; PEREIRA, A. D (orgs.). História natural dos morcegos brasileiros: chave de identificação de espécies. 1^a ed. Rio de Janeiro: 416p, 2017.
- ROBLES, C.; GREFF, S.; PASQUALINI, V.; GARZINO, S.; BOUSQUET-MÉLOU, A.; FERNANDEZ, C.; KORBOULEWSKY, N.; BONIN, G. Phenols and flavonoids in Aleppo Pine Needles as bioindicators of air pollution. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, p. 2265-2271, 2003.
- RODRÍGUEZ-ESTIVAL, J.; CARCÍA-DE-BLAS, E.; SMITS, J.E.G. Oxidative stress biomarkers indicate sublethal health effects in a sentinel small mammal species, the

- deer mouse (*Peromyscus maniculatus*), on reclaimed oil sand areas. **Ecological Indicators**, v. 62, p. 66-75, 2016.
- RUIZ, S.R.; EEVA, T.; KANERVA, M.; BLOMBERG, A.; LILLEY, T.M. Metal and metalloid exposure and oxidative status in free-living individuals of *Myotis daubentonii*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 93-102, 2019.
- RUSSO, D.; ANCILLOTTO, L. Sensitivity of bats to urbanization: A review. **Mammalian Biology**, v. 80, n. 3, p. 205-212, 2015.
- SAFER, A.M.; AL-NUGHAMISH, A.J. Hepatotoxicity induced by the anti-oxidant food additive, butylated hydroxytoluene (BHT), in rats: An electron microscopical study. **Histology and Histopathology**, v. 14, p. 391-406, 1999.
- SÁ JÚNIOR, A.; CARVALHO, L.G.; SILVA, F.F.; ALVES, M.C. Application of the Köppen classification for climatic zoning in the state of Minas Gerais, Brazil. **Theoretical and Applied Climatology**, doi 10.1007/s00704-011-0507-8, 2011.
- SALMON, A.B.; LEONARD, S.; MASAMSETTI, V.; PIERCE, A.; PODLUTSKY, A.J.; PODLUTSKAYA, N.; RICHARDSON, A.; AUSTAD, S.N.; CHAUDHURI, A.R. The long lifespan of two bat species is correlated with resistance to protein oxidation and enhanced protein homeostasis. **The FASEB Journal**, v. 23, p. 2317-2326, 2009.
- SÁNCHEZ-CHARDI, A.; MARQUES, C.C.; GABRIEL, S.I.; CAPELA-SILVA, F.; CABRITA, A.S.; LÓPEZ-FUSTER, M.J.; NADAL, J.; MATHIAS, M.L. Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as biomarkers of metal pollution in the shrew *Crocidura russula*. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 3, p. 1332-1339, 2008.
- SANO, E.E.; ROSA, R.; BRITO, J.L.S.; FERREIRA, L.G. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 166, p. 113-124, 2010.
- SARMIENTO-ORTEGA, V.E.; TREVIÑO, S.; FLORES-HERNÁNDEZ, J.A.; AGUILAR-ALONSO, P.; MORONI-GONZÁLEZ, D.; ABURTO-LUNA, V.; DIAZ, A.; BRAMBILA, E. Changes on serum and hepatic lipidome after a chronic cadmium exposure in Wistar rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 635, p. 52-59, 2017.
- SCHAUB, A.; OSTWALD, J.; SIEMERS, B.M. Foraging bats avoid noise. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, p. 3174-3180, 2008.
- SCHNEEBERGER, K.; CZIRJÁK, G.A.; VOIGT, C.C. Inflammatory challenge increases measures of oxidative stress in a free-ranging, long-lived mammal. **The Journal of Experimental Biology**, v. 216, p. 4514-4519, 2013.
- SCHNEEBERGER, K.; CZIRJÁK, G.A.; VOIGT, C.C. Frugivorous is associated with low measures of plasma oxidative stress and high antioxidant concentration in free-ranging bats. **Naturwissenschaften**, v. 101, n. 285-290, 2014.
- SCHONDUBE, J.E.; HERRERA-M, L.G.; MARTÍNEZ DEL RIO, C. Diet and Evolution of digestion and renal function in phyllostomid bats. **Zoology**, v. 104, n. 1, p. 59-73, 2001.
- SEAPA, Secretaria do Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio – Minas Gerais – 2017-2027. 3 ed. 2018.

- SHARMA, Y.; BASHIR, S.; IRSHAD, M.; GUPTA, D.; DOGRA, T.D. Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. **Toxicology**, v. 206, p. 49-57, 2005.
- SIKES, R.S.; THE ANIMAL CARE; USE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS. 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogy for the use of wild mammals in research and education. **Journal of Mammalogy**, v. 97, n. 3, p. 663-688, 2016.
- SIMMONS, N.B.; VOSS R.S. The mammals of Paracou, French Guiana: a neotropical lowland rainforest fauna. Part I. Bats. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 273, p. 1-219, 1998.
- SNYDER, J.M.; TREUTING, P.M.; BRABB, T.; MILLER, K.E.; COVEY, E.; LENCIONI, K.L. Hepatic lipidosis in a Research Colony of Big Brow Bats (*Eptesicus fuscus*). **Comparative Medicine**, v. 65, n. 2, p. 133-139, 2015.
- STECHELT, C.; KOLB, M.; BAHADIR, M.; DJOSSA, B.A.; FAHR, J. Insecticide residues in bats along a land use-gradient dominated by cotton cultivation in northern Benin, West Africa. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 8812-8821, 2014.
- SUWANNAPHET, W.; MEEPROM, A.; YIBCHOK-ANUN, S.; ADISAKWATTANA, S. Preventive effect of grape seed extract against high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 7, p. 1853-1857, 2010.
- UNGVARI, Z.; BUFFENSTEIN, R.; AUSTAD, S.N.; PODLUTSKY, A.; KALEY, G.; CSISZAR, A. Oxidative stress in vascular senescence: lessons from successfully aging species. **Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library**, v. 13, p. 5056-5057, 2008.
- VALERA, C.A.; VALLE JÚNIOR, R.F.; VARANDAS, S.G.P.; SANCHES FERNANDES, L.F.; PACHECO, F.A.L. The role of environmental land use conflicts in soil fertility: A study on the Uberaba River basin, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 562, p. 463-473, 2016.
- WILHELM FILHO, D.; ALTHOFF, S.L.; DAFRÉ, A.L.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 146, p. 214-220, 2007.
- WILKINSON, G.S. Food sharing in vampire bats. **Scientific American**, v. 262, n. 2, p. 76-83, 1990.
- WILKINSON, G.S.; SOUTH, J.M. Life history, ecology and longevity in bats. **Aging cell**, v. 1, p. 124-131, 2002.
- YIN, Q.; GE, H.; LIAO, C.C.; LIU, D.; ZHANG, S.; PAN, Y.H. Antioxidant defenses in the brains of bats during hibernation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, e0152135, 2016.
- ZOCHE, J.J.; LEFFA, D.D.; DAMIANI, A.P.; CARVALHO, F.; MENDONÇA, R.A.; SANTOS, C.E.I.; BOUFLEUR, L.A. Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivorous bats in coal mining areas of Catarinense coal basin, Brazil. **Environmental Research**, v. 110, p. 684-691, 2010.
- ZODROW, J.M.; STEGEMAN, J.J.; TANGUAY, R.L. Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 25-38, 2004.

ZUKAL, J.; PIKULA, J.; BANDOUCHOVA, H. Bats and toxic pollutants. In: FLAQUER, C.; PUIG-MONTSERRAT, X (Eds). Proceedings of the International Symposium on the Importance of Bats as Bioindicators. Museum of Natural Sciences Ediciones, Granollers, p. 75-79. 2012

ZUKAL, J.; PIKULA, J.; BANDOUCHOVA, H. Bats as bioindicators of heavy metal pollution: history and prospect. **Mammalian Biology**, v. 8, n. 3, p. 220-227, 2015.

CONCLUSÕES FINAIS E FUTURAS PESQUISAS

No capítulo 1 “Revisão bibliográfica: Agrotóxicos em morcegos”, foi apresentado um panorama da pesquisa de morcegos com agrotóxicos evidenciando que ainda existe uma carência de informações relacionadas aos efeitos causados pela exposição de morcegos a agrotóxicos, bem como a concentração de tais estudos no hemisfério norte. Tal fato, dificulta uma avaliação do risco das populações expostas bem como o uso destes animais como bioindicadores.

No capítulo 2 “Micro-QuEChERS para determinação de resíduos de agrotóxicos em músculo de morcegos por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas”, foi descrito um método de preparo de amostras miniaturizado que permite determinação de resíduos de 49 tipos de agrotóxicos em músculo de morcegos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. A miniaturização do método permite trabalhar com amostras reduzidas possibilitando análises de morcegos cuja massa corporal pode ser um fator limitante para esse tipo de análise, assim como a minimização da quantidade de custos e garantia da proteção individual do pesquisador.

No capítulo

Em função da indisponibilidade de tempo, algumas análises previstas inicialmente não puderam ser concluídas, portanto este trabalho terá continuidade com as seguintes análises:

- Análise de micronúcleo em esfregaço sanguíneo e mucosa oral.
- Análise histopatológica dos órgãos baço, rim e pâncreas.
- Análises de estresse oxidativo e histopatologia de testículo
- Pesquisa por hemoparasitas
- Identificação de parasitas coletados na cavidade abdominal de alguns morcegos.
- Identificação de parasitas observados nas lâminas histopatológicas

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 166/2017

Título do projeto: Avaliação da exposição de morcegos a pesticidas em áreas com diferentes pressões agrícolas no sudeste do Brasil

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Benito Soto Blanco

Unidade: Escola de Veterinária

Departamento: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 07/08/2017. Validade: 07/08/2017 à 06/08/2022
Belo Horizonte, 07/08/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br