

# Toxicidade materna e fetotoxicidade de ratas *wistar* tratadas com Tebuconazol, durante o período organogênico.

Juliane da Silva Soares\*<sup>1</sup> & Mara Regina Calliari Martin<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo – UPF

\*julianebiologia@gmail.com, mcalliari@upf.br.

**Abstract. Maternal toxicity and fetotoxicity of *wistar* rats exposed to Tebuconazole during the organogenic period.** Tebuconazole is a synthetic agrochemical action systemic antifungal triazole. The maternal exposure to triazoles, during pregnancy, can cause adverse effects on maternal-placental-fetal united, resulting in alterations in the development of the fetus, thus it becomes essential to characterize these effects. This study aimed to analyze behavioral aspects of rats and physical development, sensory and motor litter. We used pregnant *wistar* rats treated orally with Tebuconazole doses (20 and 50 mg / kg / day) and rats in the Control Group with distilled water during the organogenic period (6<sup>th</sup> to 15<sup>th</sup>). After birth, there was the maternal reproductive performance: time of pregnancy, number of live pups, stillbirths, congenital malformations and the weight of the litter. Observed maternal behavior and lactation. Litters were weighed, daily from the 2<sup>nd</sup> to the 9<sup>th</sup> day after birth and the 10<sup>th</sup> dpn to 2<sup>th</sup> of lactation, the individual weight. Also pups evaluated in the physical, sensoral development and motor activity in the open field. The results showed signs of acute toxicity in pregnant rats treated with 50 mg / kg / day occurring decrease in body weight gain, reducing the number of corpora lutea and maternal deaths as compared to controls and to the group 20mg/kg / days. In litters of rats exposed to doses of 20 and 50mg/kg/day there was a delay in the development of sensory and motor activity. Treatment with Tebuconazole, in subtoxic doses caused maternal toxicity, adverse effects on reproductive performance and fetotoxic.

**Keywords:** Developmental biology, embriofetotoxicity, Fungicide, Triazoles.

**Resumo.** O Tebuconazol é um agroquímico sintético de ação sistêmica, antifúngico do grupo dos triazóis. A exposição aos triazóis, durante o período gestacional, pode causar efeitos adversos na unidade materno-placentária-fetal, resultando em alterações no desenvolvimento do conceito, dessa forma torna-se imprescindível a caracterização desses efeitos. Objetivou-se analisar aspectos comportamentais das ratas e o desenvolvimento físico, sensorial e motor das ninhadas. Utilizou-se ratas *Wistar* prenhes, tratadas por via oral com o Tebuconazol nas doses (20 e 50 mg/kg/dia) e as ratas do Grupo Controle com água destilada, durante o período organogênico (6º ao 15º dia). Após o nascimento, observou-se a performance reprodutiva materna: tempo de prenhez, número de filhotes vivos, natimortos, malformações e ou anomalias e o peso total da ninhada. Observou o comportamento materno e a

lactação. Pesaram-se as ninhadas diariamente, do 2º até o 9º dia-pós-nascimento e a partir do 10º dpn ao 21º dia de lactação verificou-se o peso individual. Também avaliou-se nos filhotes o desenvolvimento físico, a análise sensorial e a atividade motora em campo aberto. Os resultados mostraram sinais de intoxicação aguda nas ratas prenhes tratadas com a dose de 50 mg/kg/dia ocorrendo diminuição do ganho de peso corporal, redução do número de corpos lúteos e mortes maternas, quando comparados aos controles e ao grupo 20mg/kg/dia. Nas ninhadas de ratas expostas às doses de 20 e 50mg/kg/dia houve retardo no desenvolvimento sensorial e da atividade motora. O tratamento com o Tebuconazol, em doses subtóxicas causou toxicidade materna, efeitos adversos na performance reprodutiva e efeitos fetotóxicos.

**Palavras-chave:** Biologia do desenvolvimento, Embriofetotoxicidade, Fungicida, Triazóis.

## INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos têm sido utilizados em grande escala na agricultura gerado uma série de transtornos e modificações para o ambiente. Os triazóis são substâncias sintéticas hetero-aromáticas importantes por serem utilizados em diferentes áreas, tais como medicamentos e agroquímicos (MELO *et al.*, 2006). O Tebuconazol, um derivado triazólico, apresenta atividade antifúngica e ação sistêmica, amplamente usado na agricultura em diversas culturas como o trigo, soja, milho, cevada, alho, cebola, uva, tomate, batata, café, cacau, morango, amendoim, maçã, pêssego, entre outras (MELO *et al.*, 2006; GIAVINI & MENEGOLA, 2010; ANVISA, 2011).

O mecanismo de atividade fungicida é a inibição da biossíntese do ergosterol, que é importante para a integridade e a manutenção da função da membrana celular dos fungos (LARINI, 1999; MOSER *et al.*, 2001). Os imidazóis inibem a incorporação do acetato de ergosterol, inibindo a lanosterol desmetilase, por interferência no

citocromo P-450, trazendo como consequência alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, prejudicando a captação dos nutrientes, o que se traduz por inibição do crescimento do fungo gerando necrose e por fim a morte do mesmo (GIAVINI & MENEGOLA, 2010).

A ampla utilização desses agentes antifúngicos e a possível exposição durante o período gestacional requer a necessidade de caracterização ampla e adequada dos efeitos tóxicos sobre o conceito (GIAVINI & MENEGOLA, 2010). Os efeitos sobre o desenvolvimento intrauterino do conceito variam conforme a espécie exposta, a via e a dose de exposição materna, pois a exposição a doses elevadas pode levar a intoxicação, alterando os padrões de homeostase materna, necessários para o controle hormonal adequado e para o bom desenvolvimento embriofetal (CALLIARI, 1998).

O tipo de malformação depende ainda da fase evolutiva do embrião e da afinidade do agente químico pelo tecido embrionário, sendo que

para cada espécie existem períodos diferentes de sensibilidade (LEMONICA, 2008). Nos mamíferos, o período organogênico está mais suscetível à ação de agentes triazólicos (GIAVINI & MENEGOLA, 2010).

Dentre os efeitos embriofetotóxicos dos triazóis destacam-se: malformações que incluem anormalidades craniofaciais, nos arcos braquiais, esqueléticas, defeitos nos membros (MENEGOLA *et al.*, 2001; FARAG & IBRAHIN, 2007; DI RENZO *et al.*, 2007; GIAVINI & MENEGOLA, 2010).

MOSER *et al.* (2001) verificaram que a exposição por via oral de ratas prenhes ao Tebuconazol, durante todo o período pré-natal e de lactação produziu efeitos adversos, revelando alteração comportamental significativa em tarefas cognitivas e espaciais nos filhotes das ratas tratadas. Em contraste, análises histopatológicas cerebral posteriores revelaram necrose no hipocampo e no neocortex cerebral, em alguns filhotes nos grupos tratados com 20 e 60 mg/kg/dia.

Neste trabalho objetivou-se avaliar os efeitos do fungicida Tebuconazol, em doses subtóxicas, em ratas *Wistar* prenhes, durante o período organogênico (6º ao 15º dias da prenhez), caracterizando o comportamento materno, lactação e performance reprodutiva, assim como a avaliação da prole, considerando-se malformações, ganho de peso, desenvolvimento físico, motor e sensorial.

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo CEUA/UPF, protocolo nº 001/2011. Foram utilizadas 26 ratas

de linhagem *Wistar*, adultas, virgens, com peso variando entre 180 e 200 g. Os animais, provenientes da colônia do Biotério da UPF, foram mantidos durante o período experimental, no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB). As ratas foram alojadas individualmente, durante os períodos da prenhez e da lactação, com suas respectivas ninhadas, em gaiolas de polipropileno com tampas metálicas, medindo 18x45x30 cm, providas de camas de maravalha, bebedouros para água e ração peletizada.

Após o acasalamento as ratas prenhes foram distribuídas, aleatoriamente, em três grupos experimentais, cada qual com 10 animais tratados, por via oral (gavage), durante o período organogênico (6º ao 15º dia da prenhez). O Grupo Controle recebeu água destilada (1mL); Grupo Tratado Dose 1 (20 mg/kg/dia de Tebuconazol) e o Grupo Tratado Dose 2 (50 mg/Kg/dia de Tebuconazol). Após o nascimento e a identificação do sexo dos filhotes, cada ninhada foi pareada, sendo que cada mãe ficou com seis filhotes (três fêmeas e três machos).

### **Procedimento experimental**

**Acasalamento e datação da prenhez.** As ratas foram colocadas para acasalar, no final da tarde, numa proporção de três fêmeas por macho em cada gaiola. Na manhã seguinte ao acasalamento, realizou-se o esfregaço vaginal nas fêmeas para o diagnóstico e datação da prenhez. Na presença de espermatozóides, considerou-se este dia como “dia zero da gestação” (CALLIARI, 1998).

**Avaliação da performance reprodutiva materna.** As ratas de cada um dos grupos experimentais foram acompanhadas até o 21º dia da prenhez, quando ocorre o parto normal, para avaliação do tempo da prenhez (dias), determinação do sexo dos filhotes, número de filhotes vivos (machos e fêmeas) e de natimortos, peso total da ninhada e o peso da ninhada experimental (seis filhotes: três machos e três fêmeas).

**Avaliação de anomalias e/ou malformações.** Ao nascimento, todos os filhotes de cada ninhada, foram submetidos ao exame macroscópico, com auxílio de uma lupa (9,5 cm de diâmetro), quanto à presença de anomalias e/ou malformações externas. Realizou-se análise minuciosa dos olhos, boca, implantação das orelhas, conformação craniana, membros anteriores e posteriores, perfuração anal e cauda.

**Avaliação do comportamento materno e da lactação.** Após o parto, uma vez ao dia, durante todo o período de lactação (21 dias), observou-se o comportamento materno segundo CALLIARI (1998). A quantificação do comportamento materno foi pela atribuição de escores: 0-Ausência de ninho, 1-Presença de ninho, 2-Todos os filhotes no ninho, 3- Todos os filhotes no ninho com a mãe, 4-Todos os filhotes no ninho com a mãe amamentando. Diariamente, verificou-se no abdome dos filhotes, a presença de leite no estômago dos mesmos, sendo esta indicativa da amamentação.

**Avaliação do desenvolvimento físico.**

Diariamente, examinaram-se as crias quanto ao ganho de peso corporal, aparecimento de penugem e pêlos, desdobramento das orelhas, erupção dos dentes incisivos inferiores e superiores, abertura dos olhos e início da puberdade dos machos (descida dos testículos) e das fêmeas (abertura vaginal).

**Avaliação do desenvolvimento sensorial.** Uma série de reflexos surge no decorrer da lactação, como: prensão palmar, endireitamento postural e geotaxia negativa. Examinou-se cada filhote, diariamente, por um período de latência de 15 segundos a 1 minuto, registrando-se o dia em que tais reflexos ocorreram pela primeira vez, em toda a ninhada em sua forma madura. Este era considerado o dia da ontogênese de tais reflexos.

**Avaliação do desenvolvimento neuromotor.** A avaliação da atividade geral foi realizada pela observação direta da atividade motora, sensorial e exploratória dos animais em campo aberto (*open field*) construído segundo o modelo descrito por BROADHURST (1960) e adaptado para avaliar ratos recém-nascidos (CALLIARI, 1998). O aparelho consiste de uma arena circular com fundo e laterais revestidas em acrílico, medindo 40 cm de diâmetro, por 25 cm de altura, sendo o fundo dividido por meio de três círculos concêntricos, em quatro partes que, por sua vez, são subdivididas com segmentos de reta, em 25 partes semelhantes. As observações relativas ao comportamento foram realizadas nos dias 10, 13, 16, 18 e 21 da lactação. Cada filhote foi colocado individualmente no centro da arena e durante três minutos consecutivos, registrou-

se o comportamento dos mesmos, conforme a técnica descrita por CALLIARI (1998), na qual foram observados os seguintes parâmetros: Locomoção (LO), Levantar (LE), Limpeza (LI) e Defecação (D).

**Análise Estatística.** Analisaram-se os dados utilizando-se o software *Instat* versão 3.0, considerando-se  $\alpha \leq 0,05$ . As variáveis foram testadas pelo teste ANOVA complementado com o teste de Comparações Múltiplas de *Tukey*, para dados Paramétricos. O Teste de *Kruskal-Wallis*, complementado com o teste *Mann-Whitman* para

dados não paramétricos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Toxicidade materna

Sinais clínicos de intoxicação das ratas tratadas durante o período organogênico (6<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> dia da prenhez) com o Tebuconazol, foram identificados por hiperatividade para animais tratados com dose de 50 mg/kg/dia. Houve mortalidade materna em três ratas tratadas com esta dosagem, pois

**Tabela 1.** Performance reprodutiva das ratas tratadas com o Tebuconazol, durante o período organogênico, por gavagem, com água destilada (Grupo Controle), 20mg/kg/dia (Grupo Tratado 1) e 50mg/kg/dia (Grupo Tratado 2). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.

Parâmetro	Grupo Controle (água destilada)	Grupo Tratado 1 (20mg/kg/dia)	Grupo Tratado 2 (50mg/kg/dia)
Tempo de Prenhez <sup>1</sup>	21,12 ± 0,35	22,12 ± 0,83	23,20 ± 1,64 **
Filhotes Nativos <sup>2</sup>	8,50 ± 2,07	7,75 ± 1,83	8,25 ± 2,75
Filhotes Natimortos <sup>2</sup>	0,00 ± 0,00	0,62 ± 0,92	0,37 ± 0,74
Peso total da Ninhada (2 <sup>o</sup> dpn) <sup>1</sup>	55,23 ± 13,27	48,20 ± 10,00	51,29 ± 16,37
Peso da ninhada Experimental <sup>1</sup> # (2 <sup>o</sup> dpn)	40,04 ± 3,75	35,35 ± 3,21	33,83 ± 4,70 *

\*  $p < 0,05$  quando comparado com o Controle.

\*\*  $p < 0,01$  quando comparado com o Controle.

<sup>1</sup> ANOVA complementada com o Teste *Tukey*.

<sup>2</sup> Teste de *Kruskal-Wallis*, complementado pelo Teste de *Dunn*.

# Ninhada de 3 fêmeas e 3 machos.

ocorreram durante o trabalho de parto. TRÖSKEN *et al.* (2004) afirmam que quando os seres vivos se expõem a agrotóxicos ou medicamentos contendo compostos triazóis durante o período gestacional, pode haver alterações da homeostase materna, ocasionando efeitos sobre o desenvolvimento do concepto.

TAXVIG *et al.* (2008) verificaram em estudo com o Tebuconazol, nas doses de 50, 100 e 150mg/kg/dia, em ratas prenhas *wistar*, tratadas durante o período da prenhez, que houve alta frequência de perdas pós-implantação, devido ao aumento significativo no número de reabsorções tardias.

Os sinais clínicos indiretos de intoxicação foram avaliados por meio do ganho de peso materno. Nas ratas tratadas com as duas doses do praguicida, houve uma diminuição do ganho de peso materno, durante o período de tratamento. Entretanto, não houve decréscimo no consumo de ração em ambos os grupos experimentais.

Portanto, estes resultados avaliados em conjunto não nos permitem afirmar que houve toxicidade materna, embora ocorresse uma diminuição no ganho de peso materno, não houve alteração no consumo de ração e de água, nas ratas dos dois grupos tratados.

A performance reprodutiva foi avaliada pelos parâmetros: tempo de prenhez, número de filhotes vivos e natimortos, peso total da ninhada e peso da ninhada experimental. Conforme Tabela 1, nas ratas do Grupo Tratado com a dose de 50 mg/

kg/dia houve prolongamento do tempo de prenhez e consequente retardo nos partos ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao Grupo Controle. Com relação ao peso da ninhada experimental houve um decréscimo do peso das crias cujas ratas foram tratadas com a dose de 50 mg/kg/dia ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle e a dose de 20 mg/kg/ a dia.

Na avaliação do comportamento materno observou-se que não houve diferenças nos cuidados parentais das ninhadas e na lactação dos filhotes em ambos os grupos tratados, comparados aos controles. Esses resultados avaliados em conjunto mostram que o Tebuconazol não interferiu no comportamento materno e nem na produção de leite pelas ratas, embora não tenha sido realizada análise de prolactina.

### **Fetotoxicidade**

Não foram observadas anomalias externas nos filhotes em ambos os grupos tratados com o Tebuconazol. A avaliação do desenvolvimento físico foi realizada a partir do 2º dia pós-nascimento (DPN), através dos parâmetros de aparecimento de penugem, pêlos, desdobramento de orelhas, abertura dos olhos, erupção dos incisivos e puberdade dos machos e das fêmeas. Entretanto, houve um pequeno retardo no desdobramento de orelhas no Grupo Tratado 1 (20mg/kg/dia) em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ). Nos demais parâmetros, não houve diferenças no desenvolvimento físico nos Grupos Tratados se comparado com o Grupo Controle, conforme Tabela 2.

**Tabela 2.** Avaliação do desenvolvimento físico dos filhotes de ratas tratadas com o Tebuconazol, VO por gavage, durante o período organogênico, com água destilada (Grupo Controle), 20mg/kg/dia (Grupo Tratado 1) e 50mg/kg/dia (Grupo Tratado 2). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.

Grupo	Controle (água destilada)	Grupo Tratado 1 (20mg/kg/dia)	Grupo Tratado 2 (50mg/kg/dia)
Parâmetro			
Penugem	4,37 ± 0,52	4,12 ± 0,35	4,25 ± 0,50
Pêlos	5,87 ± 0,64	6,25 ± 0,70	6,25 ± 0,50
Desdobramento de orelhas	2,62 ± 0,74	3,87 ± 0,83 *	3,25 ± 0,96
Abertura dos olhos	16,62 ± 0,74	17,12 ± 1,25	17,50 ± 0,58
Erupção dos incisivos	6,50 ± 0,53	6,87 ± 0,83	6,75 ± 0,96
Descida dos testículos	18,62 ± 1,40	19,62 ± 1,41	19,75 ± 0,96
Abertura vaginal	40,12 ± 1,73	41,00 ± 1,77	43,00 ± 1,83

\*  $p < 0,05$  quando comparado com o Controle.

ANOVA complementada com o Teste de Comparações Múltiplas de Tukey.

A avaliação do ganho de peso das ninhadas experimentais foi registrada diariamente, a partir do 2º até o 9º dia pós-nascimento. Nas ninhadas cuja rata era do Grupo Tratado 2 (50mg/kg/dia), nota-se uma pequena diferença no ganho de peso em relação ao Grupo Controle ( $p < 0,05$ ), referente ao 2º, 5º e 6º DPN. Os filhotes foram pesados individualmente no 10º, 13º, 16º, 18º e 21º DPN, entretanto o ganho de peso foi semelhante entre os Grupos Tratados e o Grupo Controle. A partir do 10º DPN, os filhotes ficam mais ativos, além de se alimentar do leite materno buscam as migalhas

de ração deixadas pela rata, facilitando o ganho de peso individual. De acordo com CASTRO (2006), no período da lactação ocorre a maturação funcional e o ganho de peso corporal, sendo um indicativo do estado de saúde da prole. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

MOSER *et al.* (2001) trataram ratas prenhes com o Tebuconazol em doses de 10, 20 e 60 mg/kg/dia durante todo o período de gestação e lactação e registraram que o peso dos filhotes ao nascer era reduzido no Grupo Tratado de 60 mg/kg/

**Tabela 3.** Avaliação do ganho de peso dos filhotes das ratas tratadas com o Tebuconazol, VO por gavagem, durante o período organogênico, com água destilada (Grupo Controle), 20mg/kg/dia (Grupo Tratado 1) e 50mg/kg/dia (Grupo Tratado 2). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.

Grupo Parâmetro	Controle (água destilada)	Grupo Tratado 1 (20mg/kg/dia)	Grupo Tratado 2 (50mg/kg/dia)
Ganho de peso da ninhada experimental (dpn)			
2°	40,04 ± 3,75	35,35 ± 3,21	33,83 ± 4,70 *
3°	43,40 ± 4,27	39,48 ± 4,00	37,28 ± 6,06
4°	49,10 ± 5,13	46,06 ± 4,13	41,41 ± 8,30
5°	56,72 ± 6,17	52,59 ± 5,09	43,49 ± 9,50 *
6°	63,57 ± 7,32	59,10 ± 5,26	48,55 ± 12,75 *
7°	70,86 ± 7,82	68,01 ± 6,35	57,38 ± 15,41
8°	79,58 ± 8,85	75,87 ± 6,97	66,82 ± 14,51
9°	89,30 ± 9,59	84,88 ± 7,67	72,77 ± 16,99
Ganho de peso Individual (dpn)			
10°	15,83 ± 1,86	16,18 ± 2,81	15,63 ± 2,78
13°	21,84 ± 2,54	22,24 ± 1,70	21,32 ± 3,15
16°	27,00 ± 3,38	27,53 ± 1,89	25,75 ± 3,76
18°	30,70 ± 4,27	31,04 ± 2,09	29,63 ± 3,15
21°	35,82 ± 4,56	34,47 ± 5,84	33,64 ± 8,02

\*  $p < 0,05$  quando comparado com o Controle.

ANOVA complementada com o Teste de Comparações Múltiplas de Tukey.



**Tabela 4.** Avaliação da atividade neuromotora: Locomoção (LO), Levantar (LE), Limpeza (LI) e Defecção (D) dos filhotes de ratas tratadas com o Tebuconazol, durante o período organogênico, VO por gavagem, com água destilada (Grupo Controle), 20mg/kg/dia (Grupo Tratado 1) e 50mg/kg/dia (Grupo Tratado 2). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.

Grupo Parâmetro	Controle (água destilada)	Grupo Tratado 1 (20mg/kg/dia)	Grupo Tratado 2 (50mg/kg/dia)
LO			
10°	17,77 ± 7,25	12,27 ± 7,86 **	9,92 ± 6,53 ***
13°	24,81 ± 9,58	18,31 ± 7,17 **	24,78 ± 15,74 *
16°	35,31 ± 15,74	21,31 ± 9,92 ***	28,58 ± 13,91
18°	38,73 ± 19,35	22,90 ± 15,36 ***	15,12 ± 10,11 ***
21°	49,90 ± 22,31	39,20 ± 1,47 *	32,87 ± 21,47 **
LE			
10°	0,31 ± 0,97	0,02 ± 0,14	0,00 ± 0,00
13°	0,71 ± 1,35	0,42 ± 1,13	0,12 ± 0,34
16°	2,31 ± 2,38	0,58 ± 1,16 ***	0,54 ± 1,06 ***
18°	4,37 ± 4,42	1,65 ± 2,16 ***	1,04 ± 1,83 ***
21°	5,23 ± 3,81	2,15 ± 2,03 ***	2,42 ± 2,02 ***
LI			
10°	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,00 ± -0,13
13°	1,94 ± 3,70	2,52 ± 3,41	1,75 ± 4,02
16°	3,75 ± 4,50	2,98 ± 4,05	3,87 ± 3,66
18°	4,08 ± 3,61	3,79 ± 4,03	3,79 ± 3,81
21°	9,58 ± 5,63	5,50 ± 4,78 ***	4,96 ± 4,56 **
D			
10°	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
13°	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
16°	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18°	0,23 ± 0,63	0,06 ± 0,24	0,00 ± 0,00
21°	0,75 ± 1,12	0,87 ± 1,10	0,46 ± 0,72

\* p<0,05 quando comparado com o Controle.

\*\* p<0,01 quando comparado com o Controle.

\*\*\* p<0,001 quando comparado com o Controle.

ANOVA complementada com o Teste de Comparações Múltiplas de Tukey.

dia, comparado com os outros Grupos e ao Grupo Controle.

FARAG & IBRAHIM (2007) administraram três diferentes doses de outro fungicida triazol Flusilazol (10, 20 e 40 mg/kg/dia), durante o período organogênico, em fêmeas prenhes de camundongos e verificaram que na dose de 40 mg/kg/dia houve sinais de toxicidade, destacando malformações esqueléticas, nos membros e retardo de crescimento.

#### **Avaliação da atividade motora**

O desenvolvimento da atividade neuromotora foi avaliada no teste do campo aberto (*open field*), em quatro parâmetros: o número total de cruzamentos (LO), ou seja foi contado cada vez que o filhote de locomoveu de um quadrado para outro com as quatro patas, que avalia a atividade exploratória do animal, além do número total de levantar (LE), número de limpeza (LI) e o número de bolos fecais, defecação (D).

Do ponto de vista neurológico, ROBERTS & SCOTT (2001) afirmam que o desenvolvimento sensorio-motor adquire importância vital na avaliação evolutiva da maturidade da função motora. A função motora delinea-se por meio de três sistemas que interagem entre si: piramidal, extrapiramidal e cerebelar. O sistema piramidal é responsável pelo movimento voluntário. O sistema extrapiramidal é aquele que se ocupa da motricidade automática. O sistema cerebelar é o

sistema regulador do equilíbrio e da harmonia, controla os movimentos voluntários e involuntários (BEAR *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos mostram claramente que a atividade exploratória foi afetada, devido a exposição fetal ao Tebuconazol, comparando o Grupo Tratado 1 (20mg/kg/dia) e Grupo Tratado 2 (20mg/kg/dia) em relação ao Grupo Controle, conforme apresentado na Tabela 4. A avaliação da atividade de locomoção, nos dias 10º e 18º mostraram que o Grupo Tratado 2 obteve menor atividade em relação ao Grupo Controle ( $p < 0,001$ ), já no Grupo Tratado 1, nos dias 16 e 18, também houve diferença significativa comparando com o Grupo Controle ( $p < 0,001$ ). A avaliação da atividade de levantar nos dias 16º, 18º e 21º tanto o Grupo Tratado 1 e o Grupo Tratado 2 mostraram-se estatisticamente diferentes comparados com o Grupo Controle ( $p < 0,001$ ).

#### **Avaliação da atividade sensorial**

A atividade sensorial de roedores é uma característica fundamental da biologia do animal, Geotaxia negativa é um teste que remete a função vestibular e a propriocepção. ROBERT & SCOTT (2002) descrevem que a área periférica consiste de um conjunto de sensores do movimento, as quais enviam informações ao sistema nervoso central, especificamente ao complexo nuclear e ao cerebelo, sobre a velocidade angular da cabeça, a aceleração linear e a orientação cefálica em relação ao eixo gravitacional. O sistema nervoso central processa

**Tabela 5.** Avaliação do desenvolvimento sensorial – espacial dos filhotes das ratas tratadas com o Tebuconazol, VO por gavagem, durante o período organogênico, com água destilada (Grupo Controle), 20mg/kg/dia (Grupo Tratado 1) e 50mg/kg/dia (Grupo Tratado 2). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.

Grupo / Parâmetro	Controle (água destilada)	Grupo Tratado 1 (20mg/kg/dia)	Grupo Tratado 2 (50mg/kg/dia)
End. postural	4,62 ± 1,06	5,62 ± 1,51	4,75 ± 0,96
Preensão palmar	11,00 ± 1,41	10,87 ± 1,13	12,00 ± 1,41
Geotaxia negativa	11,75 ± 0,89	12,62 ± 1,19	17,50 ± 2,64 ***

\*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado com o Controle.

ANOVA complementada com o Teste de Comparações Múltiplas de Tukey.

esses sinais e os combina com outras informações sensoriais, para estimar a orientação cefálica. A resposta do sistema vestibular central é transmitida aos músculos extraoculares e a medula espinhal, gerando os reflexos. O reflexo vestibulo-ocular gera os movimentos oculares, os quais permitem uma visão nítida, já o reflexo vestibulo-espinhal, que ocorre nos primeiros dias pós-nascimento, gera o movimento corporal de compensação para manter a estabilidade cefálica e postural, evitando quedas.

A avaliação da atividade sensorial realizada a partir do 2º DPN, pela observação diária dos reflexos de endireitamento postural, preensão palmar, e geotaxia negativa, conforme ilustra a Tabela 5.

Os reflexos de endireitamento postural e preensão palmar foram similares entre os Grupos Tratados e Grupo Controle. Entretanto, houve um retardo na geotaxia negativa nos filhotes das

ratas do Grupo Tratado 2 (50mg/kg/dia) quando comparados ao Grupo Controle ( $p < 0,001$ ), indicando um que possivelmente houve alterações estruturais no cérebro dos filhotes.

MOSER *et al.* (2001) realizaram teste avaliativo sensorio-espacial, utilizando o treinamento aquático em ratos e verificaram que houve um retardo no aprendizado em ambos os sexos, na dose de 60 mg/kg/dia de Tebuconazol. No mesmo estudo, as análises histológicas posteriores dos cérebros da prole, revelaram uma diminuição de células piramidais no hipocampo e necrose no Grupo Tratado (60mg/kg/dia).

## CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a exposição oral de ratas ao Tebuconazol, embora em doses subtóxicas, resultou em toxicidade materna:

redução do ganho de peso materno, durante o período de tratamento; retardo no tempo da prenhez e mortalidade materna. Da mesma forma, causou fetotoxicidade: morte fetal, decréscimo do peso corporal e diminuição da atividade comportamental exploratória e sensorial na prole de ratas tratadas com a dose de 50 mg/kg/dia.

Estudos posteriores serão realizados com análises histopatológicas dos cérebros, medulas, fígados, e esôfagos para avaliar possíveis danos estruturais, tanto das ratas como nos filhotes.

### AGRADECIMENTOS

Aos funcionários do Laboratório de Ciências Fisiológicas (ICB/UPF), que sempre foram muito prestativos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. 2011. **Sistema de Informações sobre Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/Agrotóxicologia>>. Acesso em: 2 de setembro de 2011.

AZEVEDO, F. & CHASIN, A.M. (Coord.) 2004. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A.; DALMAZ, C. & QUILLFELDT, J.A. (Rev.). 2008. **Neurociências: desvendando o sistema**

**nervoso**. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED.

CALLIARI, M.R.M. 1998. Effects of prenatal exposure to restraint stress and monocrotophos on behavioral and physical development in the rat. **Genet Mol Biol.** **21**:171.

CARMO J.C; PETERS V.M. & GUERRA M.O. 2004. Cronologia do desenvolvimento embrionário e fetal de ratos, conforme a datação do início da prenhez. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 23, p. 5-16.

DI RENZO, F.; BROCCIA, M.L.; GIAVINI, E. & MENEGOLA, E. 2007. Citral, an inhibitor of retinoic acid synthesis, attenuates the frequency and severity of branchial arch abnormalities induced by triazole-derivative fluconazole in rat embryos cultured in vitro. **Reprod Toxicol. Milan.** **(3-4)**:326-32.

FARAG, A.T. & IBRAHIM, H.H. 2007. Developmental toxic effects of antifungal flusilazole administered by gavage to mice. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.** **80**: 12-7.

GIAVINI, E. & MENEGOLA, E. 2010. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus? **Toxicol Lett.** **198** (2):106-11.

GILBERT, S.F. 2003. **Biologia do Desenvolvimento**. 4.ed. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC Editora.

KANDEL, E.R; SCHWARTZ, J.H. & JESSEL, T.M. (Coord.). 2003. **Princípios da neurociência**. 4. ed.

Barueri: Manole.

LARINI, L. 1999. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Manole.

LENÔNICA, I.P. 2008. Toxicologia da reprodução. *In*: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A. & BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu.

MELO, J.O.F.; DONNICI, C.L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V.; FERREIRA, M.L.G. & CUNHA, A.C. 2006. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Quím. Nova** **29** (3): 569-579.

MENEGOLA, E.; BROCCIA, M.L.; DI RENZO, F. & GIAVINI, E. 2001. Antifungal triazoles induce malformations in vitro. **Reprod Toxicol.** **15** (4):421-7.

MOORE, K.L & PERSAUD, T.V.N. 2004. **Embriologia básica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

MOSER, V.C.; BARONE, S.; SMIALOWICZ, R.J.; HARRIS, M.W.; DAVIS, D.J.; OVERSTREET, D.

MAUNEY, M. & CHAPIN, R.E. 2001. The Effects of Perinatal Tebuconazole Exposure on Adult Neurological, Immunological, and Reproductive Function in Rats. **Toxicological Sciences** **62**: 339–352.

PAUMGARTEN, F.J. 2010. Influence of maternal toxicity on the outcome of developmental toxicity studies. **Jornal Toxicol. Environ. Health A.** **73** (13-14):944-51.

SCHMIDT, A.P.; SPRITZER, D.T.; SCHÜLER-FACCINI, L. & SANSEVERINO, M.T.V. (Coord.). 2001. **Manual de teratogênese**. Porto Alegre: Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

TAXVIG, C.; VINGGAARD, A.M.; HASS, U.; AXELSTAD, M.; METZDORFF, S. & NELLEMAN C. 2008. Endocrine-disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides. **Int J Androl.** **31** (2):170.

TRÖSKEN, E.R; SCHOLZ, K.; LUTZ, R.W.; VÖLKE, W.; ZARN, J.A. & LUTZ, W.K. 2004. Comparative assessment of the inhibition of recombinant human CYP19 (aromatase) by azoles used in agriculture and as drugs for humans. **Endocr Res.** **30** (3):387-94.

**Recebido:** 18/02/2013

**Revisado:** 03/05/2013

**Aceito:** 09/12/2013

