# AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO À AGROTÓXICOS SOBRE O APRENDIZADO E MEMÓRIA EM RATOS.

Alana Garcia (PROVIC), Edmar Miyoshi - edmar@uepg.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde

**Área de conhecimento: Farmacologia**
**Subárea de conhecimento: Neuropsicofarmacologia**

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson, Memória, Paraquat, Clorpirifós, Mancozeb.

## Resumo

Sabe-se que os herbicidas, fungicidas e inseticidas promovem riscos à saúde humana, podendo afetar múltiplos sistemas. Com isso, objetivou-se neste estudo avaliar o efeito da administração de baixas doses de Paraquat isoladamente e das associações com Mancozeb e Clorpirifós no aprendizado e memória de ratos. Para isso, foram utilizados 48 ratos machos da linhagem Wistar, separados em 4 grupos (12 por grupo), de acordo com o agente exposto: (1) água (veículo), (2) Paraquat 1mg/kg (herbicida), (3) Paraquat 1mg/kg + Mancozeb 3mg/kg (herbicida + fungicida) e (4) Paraquat 1mg/kg + Clorpirifós 0,3mg/kg (herbicida + inseticida). A exposição ocorreu por via oral (gavagem) durante 28 dias. Após o tratamento, os animais foram submetidos aos testes de reconhecimento social e de objeto. Como resultado têm-se que os animais submetidos ao tratamento apresentaram prejuízo em ambos os testes. Desta forma, conclui-se que a exposição à baixas doses de paraquat isolado ou em associação de forma crônica promove um prejuízo no aprendizado e memória dos animais.

## Introdução

O uso de agrotóxicos é parte fundamental do modelo agrícola contemporâneo, sem o qual seria inviável garantir a segurança alimentar necessária ao bem-estar humano, por outro lado, seu impacto social e ambiental demanda constante preocupação por parte da sociedade (IBAMA, 2018). Segundo a EMBRAPA, atualmente são utilizados 2,5 milhões toneladas de agrotóxicos a nível mundial, no Brasil o consumo anual é superior a 300 mil toneladas, representando um aumento de 700% nos últimos 40 anos.

Os agrotóxicos são divididos em classes de acordo com o que combatem (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003), os que se destacam atualmente são o Paraquat, Mancozeb e Clorpirifós, sendo eles herbicidas, fungicidas e inseticidas respectivamente (AGROFIT, 2018). Tais agentes, tem a possibilidade de causar alterações comportamentais e alterações a nível de Sistema Nervoso Central (SNC), porém, os mecanismos permanecem incertos.

Com base nisso, objetivou-se neste estudo avaliar o efeito da administração crônica de baixas doses de Paraquat isoladamente e das associações com Mancozeb e Clorpirifós no aprendizado e memória de ratos.

## Materiais e Métodos

*ANIMAIS*

A pesquisa utilizou ratos machos da linhagem Wistar (12 por grupo) inicialmente com três meses de idade e com peso aproximado de 290 gramas. A manipulação da amostra seguiu o protocolo de recomendações da COBEA (Código Brasileiro de Experimentação Animal) e esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob o protocolo 040/2016.

*DIVISÃO DOS GRUPOS E TRATAMENTO*

Dividiu-se os animais em quatro grupos, separados pelo tipo de tratamento fornecido: (1) água (veículo), (2) Paraquat 1 mg/kg (herbicida), (3) Paraquat 1mg/Kg + Mancozeb 3mg/Kg (herbicida + fungicida) e (4) Paraquat 1 mg/Kg + Clorpirifós 0,3 mg/Kg (herbicida + inseticida). As doses foram administradas por via oral (gavagem) e para cálculo da dose a ser administrado, foi usado a seguinte fórmula: 2 ml para 1000g de peso. Este tratamento teve duração de 28 dias.

*TESTES COMPORTAMENTAIS*

Após o período de tratamento, foram realizados os testes comportamentais. O teste de reconhecimento social teve como objetivo a avaliação da memória de curta-duração. Ele foi realizado expondo um rato jovem ao animal testado por duas vezes consecutivas durante 5 minutos e com intervalo de 30 minutos entre elas. Durante as apresentações, foi registrado o tempo que o rato adulto investiga o rato jovem (cheirar, lamber, aproximação). Para interpretação dos dados, este foi expresso através da razão entre as investigações da segunda exposição (em segundos) dividida pelo tempo da primeira exposição (RID - Ratio of Investigation Duration). Um menor valor da RID, significa um menor tempo de investigação e reflete a capacidade de o animal lembrar do que foi apresentado para ele anteriormente.

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado após o teste de reconhecimento social, e teve por objetivo avaliar a memória de reconhecimento. O teste se deu em duas etapas. Na primeira, foram colocados dois objetos idênticos em lados opostos aparato, os animais permaneciam três minutos para investigar tais objetos. Após no máximo uma hora da primeira etapa, o animal foi recolocado no aparato com um dos objetos sendo substituído por outro distinto e o animal teve novamente três minutos para investigação. A partir dos valores referentes ao tempo de investigação (aproximação da narina dois centímetros do respectivo objeto), foi possível calcular o escore de discriminação (ED), obtido a partir da mensuração do tempo gasto pelos animais na exploração do novo objeto (b), do tempo do objeto já conhecido (a), pelo tempo total de exploração desses dois objetos (e2). Seguindo a fórmula: $ED = \frac{b-a}{2}$. Com isso, caso o animal não tenha comprometimento na capacidade de reconhecimento o tempo de exploração do novo objeto é maior que o tempo de exploração do objeto já conhecido.

*ANÁLISE ESTATÍSTICA*

Os dados foram expressos através da média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Primeiramente, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados, caso fossem paramétricos, era realizado a análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do teste post-hoc de Tukey. Caso os dados fossem não paramétricos, era realizado o teste de Kruskall-Wallis com post-hoc de Dunns.

As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando p ≤ 0,05. Os dados foram analisados utilizando o software estatístico GraphPad Prism 5.0.1.

**Resultados e Discussão**

No teste de reconhecimento social, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, os dados apresentaram-se não paramétricos. Posteriormente, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis onde foi verificado que os grupos tinham diferença estatística e posteriormente comparação múltipla de Dunns.
Com isso, observamos que houve diferença significativamente estatística entre o grupo controle quando comparado ao grupo Paraquat (p_ 0,01), Paraquat e Mancozeb (p_ 0,01) e Paraquat e Clorpirifós (p_ 0,001), porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações. Demonstrando dessa forma, que a exposição a esses agentes causa um pior déficit na memória social, porém, nenhuma associação realizada foi capaz de potencializar e/ou minimizar esse efeito.
Os dados foram apresentados de acordo com a razão entre as investigações (RID), expostos na Figura 1.

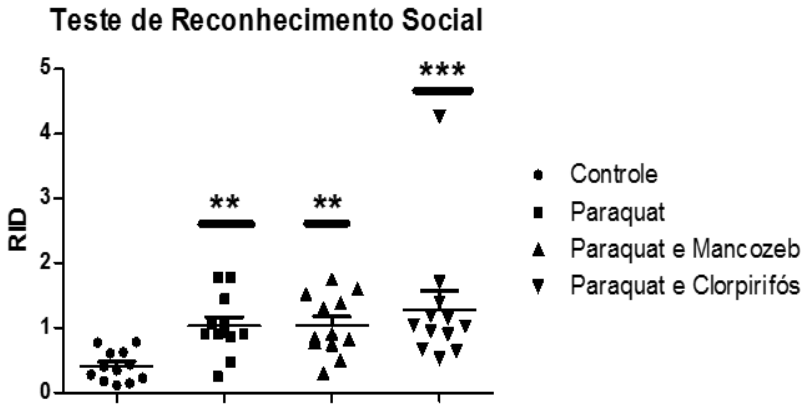



**Figura 1** - Resultados do Teste de Reconhecimento Social. Análise realizada a partir da razão entre as investigações (RID).

No teste de reconhecimento de objetos, os dados apresentaram-se paramétricos quando aplicados ao teste de Shapiro-Wilk, posteriormente, foi realizado ANOVA de uma via, onde foi encontrado diferença estatisticamente significativa [F(20,80) = 0,5867; p=0,0107 ]. Para comparação entre os grupos, foi realizado post-hoc de Tukey.
Com isso, foi verificado que os animais do grupo Paraquat (p≤0,001), Paraquat + Mancozeb (p≤0,001) e Paraquat + Clorpirifós (p≤0,001) tiveram menor escore de discriminação quando comparado ao grupo controle, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações. Esses resultados estão discriminados na Figura 2, demonstrando que as exposições aos agentes causaram déficits no escore de discriminação, demonstrando que, esses animais tiveram pior desempenho em reconhecer o objeto familiar do objeto novo, ou seja, pior escore cognitivo e de aprendizado desses animais.

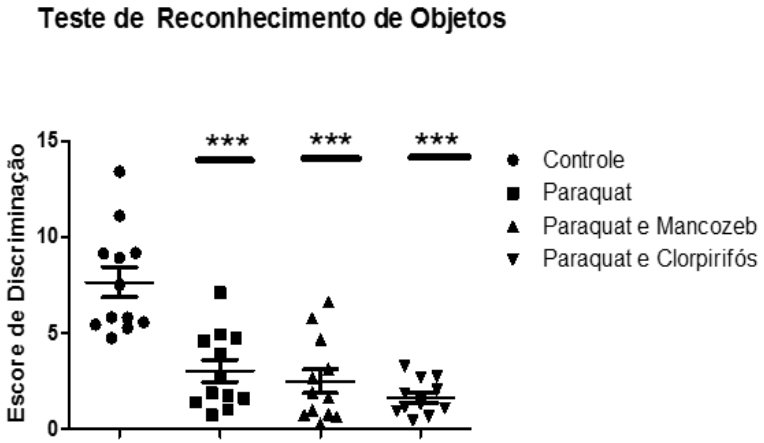



**Figura 2** - Resultados do Teste de Reconhecimento de Objetos avaliado pelo Escore de Discriminação

## Conclusões

Com o presente estudo, pode-se notar que a ingestão crônica a pequenas doses de Paraquat e associações com o Mancozeb e Clorpirifós foi capaz de causar déficits na aprendizagem e memória social e declarativa. Esses achados corroboram com alguns estudos presentes na literatura. No entanto, se faz necessário análises bioquímicas para compreender a via e a etiologia dessas alterações.

## Referências

ARBO, M. et al. Efeito tóxico dos praguicidas maneb e paraquat sobre a atividade da enzima antioxidante catalase em ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 57–61, 2009.

BALTAZAR, M. T. et al. Pesticides exposure as etiological factors of parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—a mechanistic approach. **Toxicology letters**, Elsevier, v. 230, n. 2, p. 85–103, 2014.

DANTZER, R. et al. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology**, Springer, v. 91, n. 3, p. 363–368, 1987.

IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**, www.ibama.gov.br, acesso em jul. 2018.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: **É veneno ou é remédio: agrotóxicos, saúde e ambiente**. [S.l.]: Fiocruz, 2003. p. 21–41.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F. Agência Embrapa de informação tecnológica. **Agrotóxicos no Brasil**, www.agencia.cnptia.embrapa.br, 2018.

TINAKOUA, A. et al. The impact of combined administration of paraquat and maneb on motor and non-motor functions in the rat. **Neuroscience**, Elsevier, v. 311, p. 118 129, 2015.