



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio Ambiente
 Ministério da Agricultura e do Abastecimento
 Rod. SP 340 Km 127,5 Bairro Tanquinho Velho
 Caixa Postal 69 Cep: 13820-000
 Jaguariúna, SP Fone (019) 867-8700 Fax (019) 867-8740

Pesquisa em Andamento

Embrapa Meio Ambiente



Nº. 7, novembro/99, p.1-3.

TESTES TOXICOPATOLÓGICOS EM RATOS EXPOSTOS A BIOPESTICIDA: CRITÉRIOS DE QUANTIFICAÇÃO DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

Vera Lucia S. S. Castro¹
 Deise M. F. Capalbo²
 Carla Mazon Soares³

Embora a análise ecotoxicológica venha sendo utilizada para os pesticidas químicos, os testes empregues para tanto não se aplicam na sua totalidade aos pesticidas de origem biológica. Fatores como a possibilidade de proliferação do microrganismo no organismo-teste e a ação patogênica do biopesticida, entre outros, exigem cada vez mais estudos aprofundados das interações entre o agente microbiano de controle e o ambiente, bem como o estabelecimento de parâmetros definidos e metodologias padronizadas de análise.

Os protocolos de avaliação de risco de biopesticidas, em relação ao homem, geralmente descrevem testes que são realizados em 3 fases hierárquicas, realizadas em animais de laboratório. A primeira (Fase I) consiste em uma bateria de testes de curta duração desenvolvidos para avaliar o potencial de toxicidade, patogenicidade e infectividade. Na segunda (Fase II) é avaliada uma situação particular quando se observa toxicidade ou infectividade na Fase I, porém não há evidência de patogenicidade. Já a terceira (Fase III), contém testes para avaliar a patogenicidade detectada na Fase I e testes para detectar efeitos particulares adversos de parasitas intracelulares de células de mamíferos.

Apesar de esses testes serem de grande valor na análise dos prováveis prejuízos causados pelos biopesticidas, deve ainda ser estabelecido o entendimento do nível no qual a interação do microrganismo com o organismo não-alvo possa ser considerada segura, em especial quando o microrganismo persiste nos tecidos animais, mas não causa sinais evidentes de toxicidade ou patogenicidade após a exposição. Nesse caso, é importante que se determine a probabilidade da sobrevivência do microrganismo e da sua capacidade de causar danos ao organismo animal. Para tanto, é necessário quantificar o microrganismo em amostras biológicas em intervalos regulares, a fim de determinar sua persistência e infectividade.

¹ Médica Veterinária, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente - Cx. Postal 69, CEP 13.820-000, Jaguariúna, SP.

² Engenheira de Alimentos, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente.

³ Bióloga, Embrapa Meio Ambiente.

Três tópicos foram verificados: a adequação da metodologia proposta para análise toxicopatológica; os limites de detecção do microrganismo em análises biológicas; e a eficiência do procedimento de desinfecção do material usado em laboratório.

Foi utilizado produto comercial, a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt), em forma de pó molhável, fornecido pela Novo Nordisk lote A/5 (Dinamarca), com potência 32.000 IU/mg. Foi realizada, na Embrapa Meio Ambiente, a dosagem de esporos viáveis presentes no produto, revelando a presença de $6,00 \times 10^8$ UFC(Unidades Formadoras de Colônias)/g.

No primeiro experimento para verificar a persistência e a infectividade do Bt em amostras biológicas, foram utilizados ratos Wistar, de aproximadamente 250g, mantidos em condições padronizadas de luz (ciclo claro/escuro 12h) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Todos os animais, livres de parasitas ou patógenos e as fêmeas nulíparas e não prenhas, foram mantidos individualmente em gaiolas de polipropileno.

A dose utilizada foi 1×10^8 unidades de microrganismos/animal teste para o Bt, por via oral em volume de 1,0ml e 0,3ml por via respiratória. Foram utilizados dois tratamentos: (i) microrganismo ativo (AT), (ii) o veículo de administração do tratamento AT isento do microrganismo como controle (CT).

Após o teste, todos os animais foram sacrificados e submetidos à necrópsia, com observação macroscópica dos órgãos. Os animais foram sacrificados no dia da administração (dia 0, após 1 hora), e nos dias 3, 7 e 14, após a exposição. Os órgãos selecionados (cérebro, coração, pulmão, baço e sangue) para pesquisa da infectividade e da persistência do AMC no animal foram pesados e homogeneizados com solução salina. Recolheu-se 10g de bolo fecal nos dias determinados, segundo o esquema de sacrifício dos animais durante o teste de exposição dos mesmos ao AMC por via oral.

Entre cada amostra, a haste do homogeneizador de tecidos e o material cirúrgico utilizados foram limpos com solução salina, seguida de solução de hipoclorito a 2% e novamente solução salina esterilizada, esta contida em um tubo distinto daquele da primeira. O homogenado resultante de cada amostra de órgão, tecido ou fezes foi diluído convenientemente e plaqueado em meio adequado e em duplicata. Após o teste, o material utilizado foi autoclavado, lavado com água, detergente, imerso em hipoclorito e enxaguado com água destilada.

O material biológico (fezes, órgãos, tecidos) devidamente homogeneizado foi submetido a diluições seriadas em solução salina estéril, para permitir a contagem de esporos bacterianos. As diluições adequadas foram submetidas a choque térmico ($80^\circ\text{C}/10$ min) e então plaqueadas em nutriente agar e incubadas a 30°C , por 24h. O número de colônias obtidas por placa (entre 25 e 250) foi anotado e o resultado, expresso como média das repetições, é apresentado como UFC/g do material biológico analisado. Até sete dias após a administração, foram encontrados esporos do Bt nas fezes, no pulmão e no baço, sendo o primeiro através de administração por via oral e os dois últimos, através de administração por via respiratória.

No segundo experimento, foi avaliada a desinfecção das gaiolas, dos bebedouros e de outros materiais de biotério que seriam utilizados: eles foram submersos por 5 minutos na suspensão de Bt, idêntica à dose administrada, seguida de lavagem com água e sabão e enxágüe com hipoclorito de sódio a 2 ou 5 %. Foi então realizada a coleta para avaliação da presença de *B. thuringiensis*, através da utilização de cotonetes estéreis umedecidos em solução salina também estéril, passados na superfície do material e, a seguir, colocados em contato com nutriente agar em placas. O plaqueamento foi realizado sem o choque térmico, de forma a recuperar todas as

células vegetativas e os esporos bacterianos. Em uma segunda fase, durante a secagem do material, foi realizada exposição à luz ultravioleta por 90 minutos. A câmara de fluxo laminar foi limpa com álcool etílico 70% e esterilizada com radiação de lâmpada ultravioleta por 20 minutos.

O material cirúrgico e a vidraria utilizados no teste foram previamente esterilizados em autoclave. Para assegurar que o procedimento de limpeza do material cirúrgico, bem como da vidraria durante a necrópsia e homogeneização, evitaria a contaminação por Bt entre as amostras testadas foi colocado um volume de suspensão da bactéria em concentração idêntica à da dose administrada, em tubos iguais àqueles utilizados para homogeneização dos tecidos. Procedeu-se como se estivesse sendo processada uma amostra. Descartou-se o líquido adequadamente e os tubos e a haste do homogeneizador foram lavados de maneira usual, em solução de hipoclorito de sódio 2 ou 5% e água esterilizada.

Utilizando-se cotonetes esterilizados umedecidos em solução salina estéril, foi coletado material dos tubos ainda úmidos e, também, da haste. Cada algodão de cotonete (um cotonete por frasco ou haste) foi colocado em um tubo contendo 4ml de água esterilizada. O tubo foi agitado por 3 minutos em agitador de tubos e, em seguida, parte das amostras foi submetida a plaqueamento (contagem total sem choque térmico), enquanto outra parte foi submetida a choque térmico (80°C/10 minutos), segundo os procedimentos previamente discutidos para contagem de esporos viáveis.

Não foram recuperadas colônias a partir de amostras retiradas da haste e do material de vidro exposto ao hipoclorito. Não foram recuperados esporos de Bt em quantidade significativa, mesmo nos pontos mais críticos (vãos, soldas, reentrâncias) do material metálico, e não se recuperou esporos no material plástico. Pelos resultados de contagem obtidos, a lavagem do material a partir de então tem sido completada com solução de hipoclorito a 2%. A exposição à luz ultravioleta mostrou-se sem resultados significativos.

