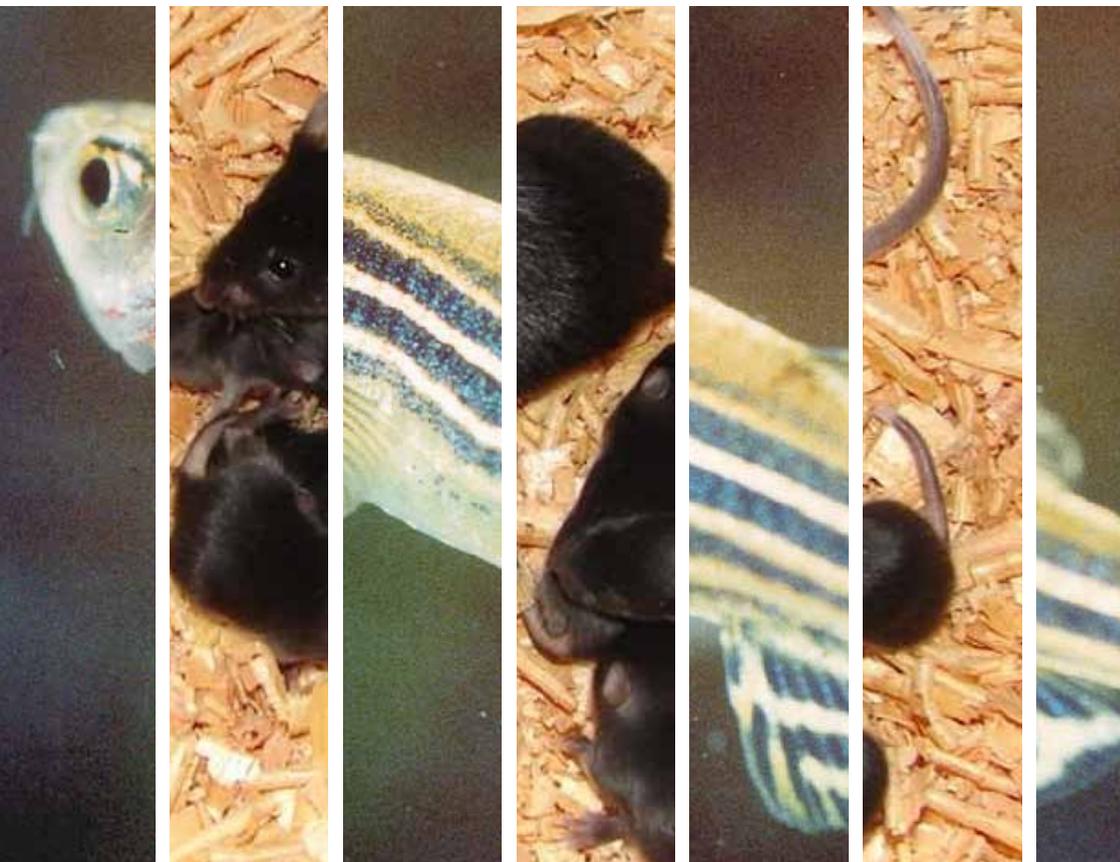


Avaliação dos Efeitos Adversos de Entomopatógenos sobre Peixes e Camundongos



ISSN 1676-918X
ISSN online 2176-509X
Agosto, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 237

Avaliação dos Efeitos Adversos de Entomopatógenos sobre Peixes e Camundongos

*Eduardo Cyrino Oliveira-Filho
Felipe Rosa Ramos
Daphne Heloisa de Freitas Muniz
Madaí Cruz Lopes
Ricardo da Silva Oliveira
Roberto Teixeira Alves
Cesar Koppe Grisolia
Rose Gomes Monnerat*

Embrapa Cerrados
Planaltina, DF
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina, DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Fernando Antônio Macena da Silva*

Secretária-Executiva: *Marina de Fátima Vilela*

Secretária: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Jussara Flores de Oliveira Arbués*

Equipe de revisão: *Francisca Elijani do Nascimento*

Jussara Flores de Oliveira Arbués

Assistente de revisão: *Elizelva de Carvalho Menezes*

Normalização bibliográfica: *Marilaine Schaun Pelufé*

Editoração eletrônica: *Fabiano Bastos*

Capa: *Fabiano Bastos*

Fotos da capa: *Dominique Adrians e Felipe Rosa Ramos*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

Alexandre Moreira Veloso

1ª edição

1ª impressão (2009): tiragem 100 exemplares

Edição online (2009)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Cerrados

A945 Avaliação dos efeitos adversos de entomopatógenos sobre peixes e camundongos / Eduardo Cyrino Oliveira Filho... [et al.]. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2009.

20 p. — (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X, ISSN online 2176-509X ; 237).

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. *Bacillus sphaericus*. 3. Toxicidade.
I. Oliveira-Filho, Eduardo Cyrino. II. Série.

570 - CDD 21

© Embrapa 2009

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	8
Resultados	12
Conclusões.....	18
Referências	18

Avaliação dos Efeitos Adversos de Entomopatógenos sobre Peixes e Camundongos

Eduardo Cyrino Oliveira-Filho¹; Felipe Rosa Ramos²; Daphne Heloisa de Freitas Muniz³; Madaí Cruz Lopes⁴; Ricardo da Silva Oliveira⁵; Roberto Teixeira Alves⁶; Cesar Koppe Grisolia⁷; Rose Gomes Monnerat⁸

Resumo

Neste estudo, quatro cepas de *Bacillus* foram testadas para avaliar seus efeitos adversos sobre peixes e camundongos. Concentrações foram testadas de acordo com protocolos internacionais na faixa de 10^6 e 10^8 esporos por mililitro para peixes e dose de 10^8 esporos por animal para camundongos. Não houve letalidade em nenhuma das espécies testadas. No estudo de necrose-apoptose com eritrócitos periféricos de *O. niloticus*, foi observado aumento na frequência de células necróticas na exposição a duas cepas de *B. thuringiensis*. Os dados obtidos mostraram que, para os peixes expostos aos microrganismos diluídos na água, não foi observado efeito tóxico, mas, por rotas de exposição não convencionais, tanto *Bt israelensis* como *Bt kurstaki* apresentaram toxicidade, causando mortalidade celular nos eritrócitos periféricos por necrose. A eliminação dos microrganismos nos camundongos foi significativa após 30 dias, mas, para uma cepa de *B. thuringiensis* e uma de *B. sphaericus*, esse tempo não foi suficiente para a eliminação completa dos esporos. Esses resultados confirmam dados da literatura que Bt e Bs apresentam baixa toxicidade para espécies não-alvo.

Temos para indexação: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, toxicidade, mamíferos, biopesticidas.

¹ Biólogo, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Cerrados, cyrino@cpac.embrapa.br

² Biólogo, M.Sc., Diretor Geral, Bio Consultoria Ambiental, BIO, Brasil, felipe@bioconsultoriaambiental.com.br

³ Química, Analista da Embrapa Cerrados, daphne.muniz@cpac.embrapa.br

⁴ Graduada em biomedicina, UniCEUB, bolsista da Embrapa Cerrados, madaitur@yahoo.com.br

⁵ Biólogo, Mestrando em Ciências Animais, UnB, rbioterio@gmail.com

⁶ Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Pesquisador da Embrapa Cerrados, ralves@cpac.embrapa.br

⁷ Biólogo, D.Sc., Professor da UnB, grisolia@unb.br

⁸ Bióloga, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, rose@cenargen.embrapa.br

Evaluation of Adverse Effects of Entomopathogens On Fish and Mice

Abstract

*The toxicological problems related to chemical pesticides have increased interest in the development and use of microbial pest control agents. In the present study four new Brazilian strains of Bacillus were tested to evaluate the potential adverse effects on fish and mice. Fish were exposed in concentrations between 10⁶ and 10⁸ spores per milliliter and by injection for cell assays. Mice were exposed by oral route in a dose of 10⁸ spores per animal. No mortality was observed with fish or mice after exposure for any of the microorganisms tested. In necrosis-apoptosis study on peripheral erythrocytes of *O. niloticus* an increased frequency of necrotic cells caused by exposure to strains of *B. thuringiensis* was found. The obtained data show that in fish exposed through whole body, no toxicity was found, but by non-conventional routes of exposure (e.g. injection) *Bt israelensis* and *Bt kurstaki* showed toxicity causing peripheral erythrocyte cells death by necrosis. Clearance of microorganisms in mice was significant after 30 days but for one strain of *B. thuringiensis* and one of *B. sphaericus* this time was not enough to completely eliminate the spores. These results confirm literature data that *Bt* and *Bs* have low toxicity to non-target species.*

Index terms: Bacillus thuringiensis, Bacillus sphaericus, Fish toxicity, Mammalian Toxicity, Biopesticides.

Introdução

Os insetos são responsáveis por problemas na agricultura e pela transmissão de várias doenças. A principal forma de controle desses organismos tem sido a utilização de produtos químicos, também chamados de agrotóxicos. Os efeitos negativos relacionados ao uso desses produtos são intensamente descritos na literatura, levando à contaminação do ambiente, intoxicação de animais e de seres humanos. De fato, os agrotóxicos ou pesticidas são substâncias bem conhecidas por seu efeito eminentemente letal, com a finalidade de eliminar ou controlar espécies indesejadas. Desse modo, o uso de produtos biológicos, à base de microrganismos, é uma alternativa, visto que as espécies selecionadas já estão presentes na natureza, o que torna esses agentes promissores, quando se fala de sustentabilidade ambiental (OLIVEIRA-FILHO, 2006).

Atualmente vários agentes biológicos têm demonstrado eficiência no controle de pragas agrícolas e no controle de vetores de doenças humanas, incluindo o mosquito *Aedes aegypti* (MONNERAT et al., 2004, 2005, 2007). De acordo com a legislação nacional (Lei 7.802/89 e normas complementares), os bioinseticidas são caracterizados como agrotóxicos e afins, e, por isso, devem solicitar registro junto aos órgãos reguladores. Um dos requisitos para o registro é a realização de ensaios toxicológicos com os agentes propostos, visando à geração de informações sobre segurança para a população e para o meio ambiente (OLIVEIRA-FILHO, 2005). Todavia, os produtos registrados com finalidade domissanitária, ou seja, para uso no ambiente doméstico, e para o controle de vetores, são regidos pela Lei 6.360/76 (vigilância sanitária), não sendo, portanto, passíveis de avaliação ambiental, o que deixa uma lacuna para o caso de possíveis efeitos sobre organismos não-alvo (MAXIMIANO et al., 2005).

A avaliação toxicológica preditiva é de grande importância para o gerenciamento de risco do uso de produtos químicos, e também deve ser realizada com agentes microbiológicos, visando investigar o efeito

de potenciais toxinas. Deve-se ressaltar que a presença de toxinas perigosas tem sido um dos principais problemas dos entomopatógenos já amplamente conhecidos (LACEY; SIEGEL, 2000). Desse modo, a utilização de bioinseticidas letais para organismos não-alvo pode comprometer espécies úteis do ponto de vista agropecuário, espécies aquáticas mantidas em condições de cultivo (aquicultura), ou qualquer espécie que se utilize da água contaminada; bem como prejudicar a manutenção da vida aquática (OLIVEIRA-FILHO, 2008).

Este estudo avaliou a toxicidade aguda de cepas de *Bacillus thuringiensis kurstaki* e *israelensis* e de *Bacillus sphaericus* H5, para os peixes *Danio rerio* e *Oreochromis niloticus*, bem como a citotoxicidade dessas cepas nos ensaios de viabilidade celular com eritrócitos de *O. niloticus* e de proliferação celular na medula óssea de camundongos "swiss". Além disso, realizou-se um estudo para avaliar a toxicidade e patogenicidade oral aguda, assim como a taxa de eliminação, das mesmas cepas e de mais uma de *B. sphaericus*, em camundongos C57BL6, visando gerar dados sobre a periculosidade ambiental desses entomopatógenos e orientar a escolha de um futuro bioinseticida.

A escolha das espécies teste baseou-se no fato de serem amplamente utilizadas em ensaios laboratoriais e, portanto, já serem bem conhecidas e recomendadas para trabalhos dessa natureza.

Material e Métodos

Microrganismos testados

Quatro microrganismos entomopatogênicos foram testados neste estudo. Duas cepas de *Bacillus thuringiensis* de diferentes sorotipos: *B. thuringiensis* sorotipo *kurstaki*, possuindo as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1B, tóxicas a larvas de lepidópteros (Monnerat et al., 2007), *B. thuringiensis* sorotipo *israelensis*, possuindo as proteínas Cry4A, Cry4B, Cry11 e cyt1, tóxicas a larvas de dípteros (Monnerat et al., 2005); e duas cepas de *B. sphaericus* sorotipo H5 possuindo proteínas de 51 kDa e 42 kDa, respectivamente, tóxicas a larvas de dípteros (MONNERAT et al., 2004). Essas cepas foram isoladas de solos

brasileiros e armazenadas na Coleção de Bacilos Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

As cepas foram testadas em concentrações máximas de 10^6 esporos/mL, de acordo como proposto pelas normas da Agência Americana de Meio Ambiente (USEPA, 1996a), nos testes de toxicidade aguda para peixes e máxima de 10^8 esporos/mL nos estudos de citotoxicidade e toxicidade/patogenicidade oral aguda (USEPA, 1996b). As concentrações e doses foram determinadas por diluições seriadas após contagem do número de esporos em um concentrado contendo em torno de 10^8 – 10^{10} esporos/mL em meio NYSM (SILVA et al., 2002).

Procedimentos para ensaios com peixes

Ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio*

Os ensaios de toxicidade aguda com o peixe zebra (*D. rerio*) foram conduzidos por 30 dias em sistema de exposição semiestático, conforme protocolo padronizado (USEPA, 1996a). Os peixes foram adquiridos de um fornecedor comercial da região de Brasília. Após aclimação dos peixes durante 7 dias no Laboratório de Ecotoxicologia da Embrapa Cerrados, a exposição teve início em copos béquer de 3.000 mililitros contendo água mole sintética (pH 7.5 ± 0.1 , dureza da água 40-48 mg/L em CaCO_3), mantidos à temperatura de 25 ± 1 °C, sob um ciclo de iluminação de 16 horas de luz e 8 horas no escuro. Vinte peixes (2,0 a 3,0 centímetros de comprimento) foram expostos em duplicata (dez por béquer) às concentrações de 1×10^6 e de 5×10^6 esporos/mL das cepas testadas, de acordo com o protocolo utilizado (USEPA, 1996a). Os peixes foram alimentados diariamente com ração; as soluções foram renovadas uma vez por semana; e diariamente também foi registrada a mortalidade dos indivíduos até o final do experimento.

Ensaio de necrose/apoptose com *Oreochromis niloticus*

Os peixes da espécie *O. niloticus* utilizados neste estudo foram obtidos em cultivo na região de Brasília, onde as condições de criação são controladas e monitoradas constantemente. Os peixes selecionados possuíam entre 7 cm e 10 cm e foram climatizados no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, com água filtrada e desclorada

por uma semana antes do ensaio. Para a exposição, os peixes foram colocados em aquários (sete peixes por grupo), injetados via intra-abdominal com 0,2 mililitros das cepas testadas, na concentração de 1×10^8 esporos/mL (grupo testado), e observados por 72 horas. O grupo controle positivo foi injetado com ciclofosfamida na dose de 30 mg.kg^{-1} de peso e o grupo controle negativo foi injetado somente com água. A ciclofosfamida (Genuxal-Asta Medica) é um conhecido agente alquilante do DNA comumente utilizado em estudos de genotoxicidade. Após 72 horas da injeção, para o teste de apoptose, 0,1 mL de sangue periférico foi obtido por punção cardíaca e diluído em 2 mL de soro fetal bovino. Um esfregaço de $15 \mu\text{L}$ da suspensão celular foi corado e as lâminas preparadas para análise em microscópio de fluorescência. Cerca de 500 eritrócitos periféricos foram analisados por grupo e classificados em viáveis, necróticos ou apoptóticos.

Procedimentos para ensaios com camundongos

Ensaio de genotoxicidade na medula óssea

Camundongos “Swiss” do Biotério Central da Universidade de Brasília foram aclimatados às condições do laboratório por uma semana antes do início do estudo. Machos e fêmeas (dez a doze semanas), pesando em média $30 \pm 2 \text{ g}$, foram alimentados com ração e água *ad libitum* e mantidos à temperatura de $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ e em fotoperíodo de 12 horas de luz. Foram utilizados seis animais por grupo, sendo 3 machos e 3 fêmeas. O grupo controle negativo recebeu somente água filtrada ($100 \mu\text{L}$, via oral) e os outros receberam $100 \mu\text{L}$ de cada uma das cepas testadas. Todos ficaram em observação por 24 horas. Após esse período, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e foram realizadas as preparações na medula óssea para identificação de eritrócitos policromáticos e normocromáticos, de acordo com o protocolo proposto por Schmid (1975). Os esfregaços sanguíneos foram fixados em lâmina com metanol e corados com Giemsa. Mil células por animal foram observadas e classificadas como policromáticas (PCE) ou normocromáticas (NCE). A relação PCEs/NCEs foi determinada pelas primeiras 1.000 células PCEs ou NCEs contadas.

Ensaio de toxicidade e patogenicidade oral aguda

Camundongos C57BL6 machos e fêmeas foram obtidos do Biotério do Centro Universitário de Brasília (Labocien-UniCEUB) e aclimatados às condições do laboratório de Genética da UnB por uma semana antes do início do estudo. Os animais utilizados possuíam de 10 a 12 semanas de idade, com variação de peso não excedendo 20 % da média de cada sexo. Durante a exposição, os animais foram mantidos em caixas plásticas individuais a temperatura de 22 ± 3 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz. A avaliação foi realizada conforme protocolo da Agência Ambiental Americana (USEPA, 1996b).

Os animais foram divididos em oito grupos. Quatro grupos de controle negativo com 3 machos e 3 fêmeas por grupo, os quais receberam 100 μ L de água desclorada e filtrada e foram mantidos próximos aos testados. Os grupos testados receberam uma dose única (100 μ L) de uma suspensão celular contendo 10^8 - 10^9 esporos por mililitro (UFC/ mL) das cepas de *Bacillus*, crescidas em meio NYSM (YOUSTEN, 1984). A administração oral foi realizada por gavagem para todos os animais. O período de observação foi de 30 dias, com cuidadoso exame externo e registro de qualquer sintoma diferenciado de efeitos adversos. O peso dos animais foi registrado antes e ao final do experimento. Para estimar a taxa de eliminação dos microrganismos, fezes dos animais foram coletadas semanalmente, visando quantificar as bactérias numa porção de 1 grama de fezes para cada animal. As fezes foram dissolvidas em 1 mL de água, submetidas a choque térmico (80 °C por 12 minutos), e diluições seriadas foram inoculadas em ágar NYSM, contendo 100 mg/L de penicilina para *B. thuringiensis* ou estreptomicina para *B. sphaericus*, em placas de Petri e finalmente incubadas a 30 °C por 24 horas (SILVA et al., 2002; WHO, 1985). Após esse período, as colônias foram contadas e analisadas morfológicamente por microscopia de contraste de fases, para confirmar a presença da respectiva cepa. Após 30 dias, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e a necropsia foi realizada em cada animal para avaliar a infectividade e a persistência do microrganismo em órgãos selecionados. Para cada grupo testado, a presença dos microrganismos foi quantificada nos pulmões, intestino delgado, cecum e grosso, após diluição e solução salina/peptona e

crescimento no respectivo meio de cultura. Todo o experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Animais de Laboratório da Universidade de Brasília (CEUA-UnB).

Análise estatística

Os dados dos ensaios de necrose/apoptose em *O. niloticus* foram submetidos ao teste t para amostras pareadas, assim como as diferenças entre grupos controle e tratados no ensaio com camundongos. Os cálculos foram realizados com auxílio do programa SigmaStat 3.5.

Diferenças no ganho de peso do corpo, assim como proporção de eliminação entre os grupos, foram avaliadas por One-Way Anova seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett, com auxílio do programa Dunnett (Versão 1.5) da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos.

Resultados

Ensaio com peixes

Não houve mortalidade ou qualquer alteração de comportamento visível nos peixes *D. rerio* e *O. niloticus* expostos às concentrações de todas as cepas testadas. Essa observação sugere que as concentrações letais dessas cepas para 50 % de mortalidade (CL50) dessas espécies de peixe são maiores que 5×10^6 esporos/mililitro.

No estudo de necrose-apoptose sobre eritrócitos periféricos de *O. niloticus*, foi observado um aumento na frequência de células necróticas, causada pela exposição as cepas de *Bt israelensis* e *Bt kustaki* (Tabela 1, $p < 0,05$). Por outro lado, a exposição ao Bs H5 não evidenciou efeito citotóxico em nenhum dos sistemas testados (t-test $p > 0,05$), em comparação com o grupo controle. Além disso, nenhuma das cepas estudadas induziu apoptose, que significa genotoxicidade. Em contraste, os peixes expostos a ciclofosfamida, um controle químico positivo, apresentaram um aumento significativo no número de células necróticas e apoptóticas (Tabela 1, $p < 0,05$).

Tabela 1. Porcentagem de células viáveis, necróticas e apoptóticas após análise de 500 eritrócitos periféricos de *O. niloticus*, nos grupos referentes aos cinco tratamentos.

Tratamentos	Viáveis	Necrose	Apoptose	% Viabilidade	% Necrose	% Apoptose
<i>Bt israelensis</i>	465,2 ± 68	36,0 ± 7	2,8 ± 1,1	93,4	7,2*	0,5
<i>Bt kurstaki</i>	473,8 ± 75	25,6 ± 6	2,1 ± 0,9	94,5	5,1*	0,4
Bs H5	477,2 ± 26	22,5 ± 9	0,5 ± 0,2	95,4	4,5	0,1
Água (Controle Negativo)	483,0 ± 18	12,3 ± 5	4,6 ± 1,8	96,8	2,7	0,5
Ciclofosfamida (Controle Positivo)	443,3 ± 32	29,4 ± 9	27,0 ± 10	88,8	5,8*	5,4*

* $p < 0,05$, teste t. Diferenças entre grupos testados e grupo controle negativo.

Ensaio com camundongos

Os dados de cinética nas células da medula óssea dos camundongos indicaram ausência de efeitos sobre a proliferação celular das cepas testadas, o que significa ausência de citotoxicidade (Tabela 2). Também não houve efeito tóxico em função do tempo, após observações em 48 e 96 horas.

Tabela 2. Médias e porcentagens de células normocromáticas (NCE) observadas na medula óssea dos camundongos após 48 e 96 horas de exposição aos tratamentos.

Cepas/Tratamentos	Média NCE ± D.P.	% NCE	Teste t (p)
Controle	622 ± 95	38,3	-
<i>Bt kurstaki</i> 48h	564 ± 72	36,0	0,5416
<i>Bt kurstaki</i> 96h	617 ± 110	38,1	0,9564
<i>Bt israelensis</i> 48h	722 ± 180	41,9	0,3909
<i>Bt israelensis</i> 96h	578 ± 120	36,6	0,7163
Bs H5 48h	441 ± 98	30,6	0,0676
Bs H5 96h	475 ± 87	31,3	0,0734

* $p > 0,05$, não significativo

No ensaio de toxicidade e patogenicidade oral aguda, após 30 dias da administração das cepas, não houve mortalidade e nem sinal ou sintoma de doença. Nenhum dos animais expostos ao controle negativo (água) ou às cepas testadas apresentou anormalidades clínicas ou comportamentais. Não houve diferenças significativas entre o ganho de peso dos grupos controle e testados (Tabela 3).

Tabela 3. Ganho de peso em gramas (Δg = peso do último dia – peso do primeiro dia) dos camundongos dos grupos controle e tratados após 30 dias da administração das cepas.

Microrganismos	Ganho de peso(Δg)	
	Controle (média \pm d.p.)	Testado (média \pm d.p.)
<i>B. thuringiensis kurstaki</i>	5,61 \pm 1,14	5,40 \pm 1,19
<i>B. thuringiensis israelensis</i>	5,24 \pm 0,78	5,85 \pm 1,81
<i>B. sphaericus</i> cepa 1	5,50 \pm 1,18	5,69 \pm 1,12
<i>B. sphaericus</i> cepa 2	5,14 \pm 0,80	5,59 \pm 1,21

*Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram avaliados por Anova seguido pelo Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett ($p < 0.05$).

A eliminação dos microrganismos, quantificada nas fezes, revelou uma baixa recuperação de esporos, mostrando eliminação ou degradação teoricamente rápida da maioria dos esporos inoculados (Fig. 1). A presença de esporos em 1 a 3 animais do grupo controle foi registrada e pode ser explicada por causa da manutenção dos animais no mesmo ambiente dos testados, provavelmente envolvendo transporte aéreo de esporos, já que as caixas plásticas foram mantidas lado a lado.

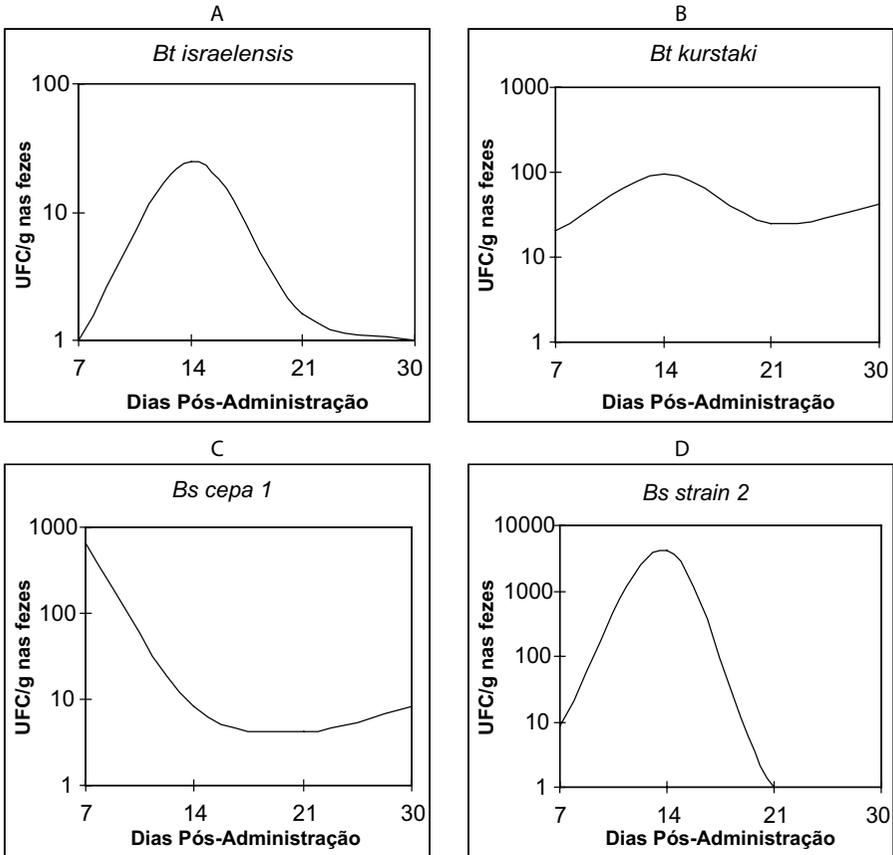


Fig. 1. Quantificação semanal de esporos dos microrganismos testados em Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC/g) nas fezes dos animais inoculados durante 30 dias. Os valores são expressos como a média de UFC/g de fezes dos seis indivíduos de cada grupo.

A redução dos esporos nas fezes dos animais tratados com todas as cepas foi significativa nos 30 dias após o início do ensaio (Fig. 1), já que a inoculação inicial foi de 10^8 esporos por animal. Os animais controle contaminados e os inoculados estavam quase que totalmente limpos nesse período. No sétimo dia, a redução nos números de esporos nos animais inoculados foi de sete a oito casas decimais (variações de 10^9 para 10^2 e de 10^8 para 10^0). Variações nesses níveis foram observadas nas semanas seguintes, mas a redução continuou evidente de sete a

nove casas (variações de 10^8 para 10^1 e de 10^9 para 10^0), dependendo do inóculo inicial.

A necropsia nos animais mostrou ausência de danos visíveis aos órgãos, mas esporos de *Bt kurstaki* e de *Bs* cepa 1 foram isolados em órgãos selecionados, com quantidade levemente maior no intestino grosso (Tabela 4). Esse fato pode explicar a presença dessas cepas nas fezes até o trigésimo dia após a administração (Fig. 1).

Tabela 4. Quantificação dos microrganismos testados (UFC/órgão) isolados de órgãos selecionados ao final do experimento (30º dia após a administração).

Microrganismos	Inóculo Inicial p/ Animal	Órgãos			
		Pulmões	Intestino delgado	Ceco	Intestino grosso
<i>Bt kurstaki</i>	$8,7 \times 10^8$	ND*	ND	ND	$1,2 \pm 0,8$
<i>Bt israelensis</i>	$5,9 \times 10^8$	ND	ND	ND	ND
<i>Bs</i> cepa 1	$8,9 \times 10^9$	< 1	< 1	< 1	$1,2 \pm 1,2$
<i>Bs</i> cepa 2	$1,8 \times 10^9$	< 1	ND	ND	< 1

*Não detectado. Valores expressos como média \pm erro padrão por órgão dos seis animais testados de cada grupo.

Discussão

Os peixes tratados com ciclofosfamida na dose de 30 mg/kg apresentaram necrose e apoptose celular provavelmente em virtude da alta dose administrada. Doses menores provavelmente causariam mais apoptose do que necrose em razão de a ciclofosfamida atuar como agente clastogênico e causar fragmentação da cromatina. Brockmann et al. (2006) mostraram que a apoptose inicia-se em doses bem menores do que as doses citotóxicas, quando ocorre a exposição a agentes alquilantes. O controle positivo é utilizado para demonstrar a sensibilidade do sistema teste. No presente estudo, a não indução de apoptose pode significar que as toxinas de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* não atingem o núcleo celular causando danos ao DNA ou à cromatina. Cabe ressaltar que a morte celular por necrose, em contraste com apoptose, que é um evento individual, ocorreu numa grande

população de células, provavelmente pela exposição às cepas em altas concentrações. Essa observação sugere que essa exposição a altas concentrações pode ter sido responsável pela manifestação do efeito adverso, que é questionável em termos de meio ambiente, em virtude da via de contato extremamente invasiva (injeção) para uma avaliação da exposição de peixes.

Quanto aos camundongos e à eliminação dos esporos, vários estudos tem mostrado a presença de *B. thuringiensis* em alimentos, bebidas e ambiente (HONGYU et al., 2000; ZHOU et al., 2008a, b). O presente estudo mostrou que os esporos dos potenciais biopesticidas não causaram qualquer efeito adverso em camundongos após 30 dias da inoculação. Essa ausência de efeitos adversos tem sido observada por vários autores. Innes e Bendell (1989) avaliaram, em 90 dias, os efeitos de uma formulação comercial de *B. thuringiensis kurstaki* sobre populações de mamíferos silvestres. Esses autores observaram que a ingestão de insetos contaminados não gerou qualquer dano a essas populações. Siegel e Shaddock (1990) afirmaram que a simples introdução de um entomopatógeno em mamíferos causa perturbações na flora bacteriana regular, e a recuperação do microrganismo inoculado do hospedeiro pode ocorrer em espaço de tempo variável, sem necessariamente significar uma persistência. Wilcks et al. (2006) detectaram esporos de *B. thuringiensis kurstaki* na ordem de 10^3 a 10^4 UFC/g, em amostras fecais e intestinais de ratos Sprague-Dawley, duas semanas após a inoculação.

A observação de esporos em animais do grupo controle foi, em alguns casos, similar aos níveis observados no grupo testado, e essa observação demonstra a alta vulnerabilidade da contaminação aérea com o pó gerado pelas condições de criação dos animais. Para comprovar essa possibilidade em seres humanos, Jensen et al. (2002) trabalharam com 20 agricultores que tinham aplicado produtos à base de *B. thuringiensis*. Esses autores mostraram que 40 % dos trabalhadores apresentaram a presença de esporos nas fezes, na ordem de 10^2 a 10^3 UFC/g, sem evidência de qualquer efeito danoso sobre a saúde dos trabalhadores.

Conclusões

Este estudo mostrou que não foi observada toxicidade aguda das cepas testadas para peixes, sugerindo que a concentração letal 50 % dessas cepas na água é maior do que 5×10^6 esporos/mililitro. Ao contrário, por uma rota de exposição não convencional (ex.: injeção), *Bt israelensis* e *Bt kurstaki* mostraram toxicidade causando morte celular em eritrócitos periféricos por necrose. Todavia, nos peixes expostos na água, não foi observada toxicidade, confirmando dados da literatura de que Bt e Bs têm baixo risco para espécies aquáticas não-alvo.

Sobre o estudo com camundongos, os resultados indicam ausência de toxicidade e patogenicidade das cepas estudadas, e esse dado, segundo as normas nacionais e internacionais, é um dos primeiros passos para subsidiar o registro e o uso seguro desses entomopatógenos no meio ambiente.

Referências

- BROCKMANN, W. G.; KOSTORYZ, E. L.; EICK, J. D. Correlation of apoptotic potential of simple oxiranes with cytotoxicity. **Toxicology In Vitro**, v. 20, p. 729–735, 2006.
- HONGYU, Z.; ZINIU, Y.; WANGXI, D. Isolation, distribution and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from warehouses in China. **Crop Protection**, v. 19, p. 449-454, 2000.
- INNES, D. G. L.; BENDELL, J. F. The effects on small-mammal populations of aerial applications of *Bacillus thuringiensis*, fenitrothion, and Matacil used against jack pine budworm in Ontario. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, p. 1318-1323, 1989.
- JENSEN, G. B.; LARSEN, P.; JACOBSEN, B. L.; MADSEN, B.; SMIDT, L.; ANDRUP, L. *Bacillus thuringiensis* in fecal samples from greenhouse workers after exposure to *B. thuringiensis*-based pesticides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4900-4905, 2002.
- LACEY, L. A.; SIEGEL, J. P. Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 253-273.

MAXIMIANO, A. A.; FERNANDES, R. O.; NUNES, F. P.; ASSIS, M. P.; MATOS, R. V.; BARBOSA, C. G. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, p. 483-491, 2005.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; DIAS, D. S.; MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; JONES, G. W.; SOARES, C. M.; SOUZA-DIAS, J. M. C.; BERRY, C. Screening of brazilian *Bacillus sphaericus* strains for high toxicity against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Journal of Applied Entomology**, v. 128, p. 469-473, 2004.

MONNERAT, R. G.; DIAS, D.; SILVA, S.; MARTINS, E.; BERRY, C.; FALCÃO, R.; GOMES, A. M. M.; PRAÇA, L.; SOARES, C. M. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains effective against mosquitoes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 103-106, 2005.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P.; MARTINS, E.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, v. 41, p. 291-295, 2007.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. Segurança de agentes microbiológicos para o controle de pragas: avaliação toxicológica, regulamentação e situação atual. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, p. 71-75, 2005.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. Histórico da avaliação de segurança de microrganismos para controle de pragas: agentes químicos X agentes biológicos. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G. (Ed.). **Fundamentos para a Regulação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos para Controle de Pragas**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. v. 1, p. 295-306.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. Avaliação da periculosidade ambiental de bioinseticidas como uma nova perspectiva para a ecotoxicologia no Brasil. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2008.

SILVA, S. F.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. **Comparação entre três métodos de isolamento de bacilos entomopatogênicos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. (Circular Técnica, 14). Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/ct014.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2008.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SIEGEL, J. P.; SHADDUCK, J. A. Clearance of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* from mammals. **Journal of Economic Entomology**, v. 83, p. 347-355, 1990.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Microbial pesticide test guidelines OPPTS 885.4200 **Freshwater fish testing, Tier I**. Washington: USEPA, 1996a. EPA 712-C-96-332.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Microbial pesticide test guidelines. OPPTS 885.3050. **Acute oral toxicity/pathogenicity**. Washington: USEPA, 1996b. EPA 712-C-96-315.

WHO (World Health Organization). **Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide**. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3, 1985. 24 p.

WILCKS, A.; HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B.; LICHT, T. R. Persistence of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides in the gut of human-flora-associated rats. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 48, p. 410-418, 2006.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in biotechnological processes**, v. 3, p. 315-343, 1984.

ZHOU, G.; LIU, H.; HE, J.; YUAN, Y.; YUAN, Z. The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 195-200, 2008a.

ZHOU, G.; YAN, J.; DASHENG, Z.; ZHOU, X.; YUAN, Z. The residual occurrence of *Bacillus thuringiensis* in food and beverages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, p. 68-72, 2008b.