



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**EFEITOS SUBLETAIS DO INSETICIDA BIOLÓGICO XENTARI®, SOBRE A
TOXICIDADE RENAL E HEPÁTICA EM RATAS**

CLOVIS JOSÉ CAVALCANTI LAPA NETO

**RECIFE
2016**

CLOVIS JOSÉ CAVALCANTI LAPA NETO

Efeitos subletais do inseticida biológico Xentari®, sobre a toxicidade renal e hepática em ratas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de Concentração em Morfofisiologia Animal

Orientadora:

Profª. Drª. Valéria Wanderley Teixeira

Co-orientadores:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Profª. Drª. Ana Janaina Jeanine Martins de Lemos

**RECIFE
2016**

CLOVIS JOSE CAVALCANTI LAPA NETO

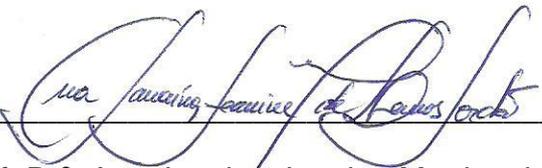
“EFEITOS SUBLETAIS DO INSETICIDA BIOLÓGICO XENTARI®, SOBRE A TOXICIDADE RENAL E HEPÁTICA EM RATAS.”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como um dos pré-requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia Animal.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira (Orientadora) – UFRPE

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE



Prof. Dr^a. Ana Janaina Jeanine Martins de Lemos – UFCG

Prof. Dr. Lécio Leone de Almeida - URCA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria possível, a Ele nossas vidas pertencem.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela estrutura e oportunidade fornecida para realização deste trabalho, e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, tornando possível a obtenção do título de Mestre em Biociência Animal. A FACEPE pelo respaldo financeiro durante o decorrer do trabalho.

Aos meus orientadores Prof^a. Dr^a Valéria Wanderley Teixeira e Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, por terem me guiado durante este trabalho e também na minha vida profissional, para que cada dia possa evoluir dentro da minha profissão, e um dia quem sabe, poder chegar perto da qualidade de professores e pesquisadores que são. Minha co-orientadora Ana Janaina Jeanine Martins de Lemos Jordão, que sempre se colocou a minha disposição, mesmo estando em outro estado, nunca me deixou na mão. Meu grande amigo e parceiro de trabalho Lécio Almeida, que durante toda parte de análise laboratorial, ficou praticamente o dia todo, durante pelo menos um mês me ajudando e me ensinando diversas técnicas.

Agradeço também aos amigos funcionários do biotério, Marcos André e Renata Carneiro, sem eles, não apenas a minha pesquisa, como a de muitos outros não iriam para frente, devido ao cuidado e atenção dado aos animais.

A todos os amigos (as) / irmãos (ãs) do laboratório de Histologia da UFRPE. Hilda Michelly que além de ser quase uma “orientadora”, também se tornou minha “comadre”. As meninas companheiras de sala e de laboratório, Rosimere Silva, Carina Helena, Carolline Guimarães, Cintia Giselle, sou grato a todas. Ismaela Melo, Solange Bezerra, Ilka Dayane, Cristiane Talita, Laíse Souza, Aline Mariano, Mariana Carvalho, minha “quase estagiária”. Aos meus grandes amigos Franklin Magliano, Tiago Alves, e Gyl Souza.

Também a todos do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Natalia Vaz, Cinthya Pacheco, Elaine Cristina, Rafaela Almeida, entre outros “LFVanos”, que são meus companheiros, mesmo trabalhando em áreas completamente diferentes.

Minha querida esposa Cibele Alves, você que me aturou por todo esse tempo, sempre me guiando, me dando broncas, resolvendo problemas de estatística e

gráficos, mas que no final sempre dava certo. Agradeço sempre a Deus pelo nosso casamento e por ter você ao meu lado.

Por último aos meus pais (Tânia Lapa e Ismael Lapa), pessoas escolhidas por Deus para serem meus guias, por todo apoio durante esta caminhada, tanto afetivo, moral, até mesmo financeiro, pelos sacrifícios de tantos anos de criação para que um dia eu pudesse chegar onde estou. Fica aqui meu eterno obrigado.

RESUMO

No Brasil o número de trabalhadores rurais expostos a inseticidas é bastante expressivo, estando sujeitos a intoxicações agudas, doenças crônicas, problemas reprodutivos, danos ambientais entre outros. Assim, testou-se a hipótese se a exposição do inseticida biológico Xentari® WG (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*), em concentrações subletais, pode interferir na função hepática e renal em ratas. Utilizaram-se 40 ratas albinas, *Rattus norvegicus albinus*, distribuídas em quatro grupos: I Ratas que receberam placebo (Controle); II, III e IV, que receberam 1,0; 10 e 20 mg de Xentari®/100g, respectivamente. Foram dosados os níveis de séricos de ALT, AST, HDL, LDL, VLDL, creatinina, albumina e ureia. A análise histopatológica foi realizada em cortes corados pela H.E. Para histoquímica do fígado utilizou-se P.A.S., No estudo morfométrico do fígado foi mensurado o parênquima lobular e não lobular e nos rins o diâmetro e volume do glomérulo e da cápsula de Bowman. A eutanásia dos animais ocorreu logo após o término da administração do inseticida, que durou o período de 20 ou 30 dias, período de tempo considerado agudo e subagudo respectivamente. Os resultados mostraram que o Xentari® WG, promoveu alterações nos níveis de triglicérides (20 dias), colesterol total (30 dias), HDL, LDL e VLDL (20 dias). Já a ALT foi alterada com 20 e 30 dias, enquanto que o AST apenas aos 20 dias. Nos rins houve alterações nos níveis de ureia e albumina (30 dias). A histopatologia do fígado mostrou tumefação e vacuolização celular e baixa reação ao P.A.S. Enquanto nos rins foi visualizada tumefação, vacuolização e presença de núcleos picnóticos. A análise morfométrica demonstrou um aumento do percentual do parênquima lobular em relação ao parênquima não lobular para ambos os períodos analisados. Nos rins a análise morfométrica demonstrou uma diminuição do volume e diâmetro glomerular, caracterizando atrofia glomerular e glomérulonefrite membranosa para ambos os períodos analisados. Conclui-se que o Xentari® em doses subletais, interfere na função hepática e renal de ratas, sendo mais expressivo no período de aplicação agudo (20 dias). Isso sugere que mais pesquisas podem ser realizadas sobre os efeitos crônicos da exposição a este inseticida biológico

Palavras-chave: Toxicologia, histopatologia; *Bacillus thuringiensis*, ratos, fígado, rins, morfometria

ABSTRACT

In Brazil the number of rural workers exposed to pesticides is very significant and are subject to acute poisoning, chronic diseases, reproductive problems, environmental damage and others. Thus, we tested the hypothesis that the biological pesticide exposure Xentari® WG (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*), at sublethal concentrations may interfere with the hepatic and renal function in rats. They were used 40 albino rats, *Rattus norvegicus* albinos, divided into four groups: I rats who received placebo (control); II, III and IV, which received 1.0; 10 and 20 mg of Xentari® / 100g, respectively. They measured the serum ALT, AST, HDL, LDL, VLDL, creatinine, albumin and urea. Histopathological analysis was performed on sections stained with H.E. For immunohistochemistry liver was used P.A.S., The morphometric study of the liver was measured lobular and lobular not parenchyma and kidney diameter and volume of the glomerulus and Bowman's capsule. Euthanasia of animals took place shortly after the pesticide administration, which lasted a period of 20 or 30 days, considered acute period and subacute respectively. The results showed that the Xentari® WG promoted changes in triglyceride levels (20 days), total cholesterol (30 days), HDL, LDL and VLDL (20 days). Since the ALT was changed to 20 and 30 days, while AST only after 20 days. Kidney were no changes in levels of urea and albumin (30 days). Histopathology of the liver showed swelling and cell vacuolation and low reaction to P.A.S. While the kidney was viewed swelling, vacuolization and presence of pyknotic nuclei. The morphometric analysis showed an increased percentage of lobular parenchyma in relation to non lobular parenchyma for both periods analyzed. Kidney morphometric analysis showed a decrease in volume and glomerular diameter, featuring glomerular atrophy and membranous glomerulonephritis for both periods analyzed. It follows that the Xentari® at sublethal doses, interfere with hepatic and renal function of rats, and stronger in the Acute application period (20 days). This suggests that more research can be conducted on the chronic effects of exposure to this biological insecticide.

Key Words: Toxicology, histopathology; *Bacillus thuringiensis*, rats, liver, kidneys, morphometry

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela I. Média \pm desvio padrão do peso das ratas dos grupos experimentais.....37

Tabela II. Média \pm desvio padrão do percentual das células do parênquima lobular e não lobular do fígado de ratas dos grupos experimentais.....42

Tabela III. Média \pm desvio padrão do diâmetro do glomerular (DG), volume do glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins das ratas administradas com Xentari[®] durante 20 e 30 dias.....45

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 1: Valores dos níveis bioquímicos de função hepática. A - TGP (ALT) (U.F.R./mL) aos 20 dias; B - TGP (ALT) (U.F.R./mL) aos 30 dias; C – TGO (AST) (U.F.R./mL) aos 20 dias; D – TGO (AST) (U.F.R./mL) aos 30 dias; E - triglicerídeos (mg/dL) aos 20 dias; F – triglicerídeos (mg/dL) aos 30 dias. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....38

Figura 2: Valores dos níveis bioquímicos de função hepática. A - colesterol total (mg/dL) aos 20 dias; B - colesterol total (mg/dL) aos 30 dias; C – HDL (mg/dL) aos 20 dias; D – HDL (mg/dL) aos 30 dias; E – VLDL (mg/dL) aos 20 dias; F – VLDL (mg/dL) aos 30 dias; G – LDL (mg/dL) aos 20 dias; H – LDL aos 30 dias. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....39

Figura 3: Fígado das ratas dos grupos experimentais. A) G I (Controle). Parênquima hepático bem preservado. Observar hepatócito (seta) e veia centro lobular (V). B) G II (1 mg de Xentari[®]/g), C) G III (10 mg de Xentari[®]/g) e D) G IV (20 mg de Xentari[®]/g), notar tumefação celular (seta) e vacuolização (ponta de seta). Coloração H.E.....40

Figura 4: Fígado das ratas dos grupos experimentais. Coloração P.A.S. A) G I (Controle). Observar reação intensa nos hepatócitos. B) G II (1 mg de Xentari[®]/g), C) G III (10 mg de Xentari[®]/g), e D) G IV (20 mg de Xentari[®]/g). Observar fraca reação nos hepatócitos. E) Quantificação do glicogênio pela coloração do P.A.S expresso em pixels. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....41

Figura 5: Valores dos níveis bioquímicos de função renal. A) ureia (mg/dL) aos 20 dias; B) ureia (mg/dL) aos 30 dias; C) creatinina (mg/dL) aos 20 dias; D) creatinina (mg/dL) aos 30 dias; E) albumina (mg/dL) aos 20 dias; F) albumina (mg/dL) aos 30 dias. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....43

Figura 6: Rim das ratas dos grupos experimentais. A e B) GI (Controle). Regiões cortical e medular, respectivamente bem preservadas. Observar: Túbulo contorcido proximal (TCP), glomérulo (G), ducto coletor (DC), células do ducto coletor (seta). Em C (GII1 mg/100), E (GIII 10 mg/100) e G (GIV 20 mg/100) notar tumefação na célula do túbulo contorcido proximal (seta) na região cortical. Em D (GII1 mg/100), F (GIII 10 mg/100) e H (GIV 20 mg/100) evidenciar núcleo picnótico (seta longa) e vacuolização celular (ponta de seta) na região medular. Coloração H.E.....44

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	4
2.1 Os agrotóxicos e seu uso.....	4
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bt</i>).....	8
2.3 Efeitos do <i>Bt</i> em organismos não alvo.....	12
3. Referências	15

CAPÍTULO II

Efeitos subletais do inseticida biológico Xentari [®] , sobre a toxicidade hepática em ratas.....	20
Resumo.....	21
1. Introdução.....	22
2. Material e métodos.....	24
3. Resultados.....	27
4. Discussão.....	29
5. Referências.....	34

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos podem ser definidos como: “Produtos e componentes de processos físicos, químicos ou biológicos cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento” (BRASIL, 1989).

O seu uso, no Brasil, teve início a partir dos programas de saúde pública, agindo no controle de vetores e de parasitas e, a partir da década de 60 passaram a ser utilizados mais intensivamente na agricultura, surgindo como solução científica no controle das pragas que atingiam lavouras e rebanhos (SILVA, 2005). O consumo nacional de agrotóxicos é superior a três milhões de toneladas por ano (PELAEZ et al., 2010). Desde 2008 o Brasil ocupa o 1º lugar no ranking mundial dos países consumidores de agrotóxicos, ao dividir a quantidade de substâncias tóxicas usada pelo número de habitantes temos uma razão de 5,2 kg por pessoa (ANVISA, 2011).

Os inseticidas são classificados em sintéticos e biológicos. Os inseticidas sintéticos são divididos em organoclorados, piretróides, organofosforados e carbamatos, sendo estes dois últimos os que são responsáveis por maior número de intoxicações no meio rural, atuando na inibição da enzima acetilcolinesterase (MEYER et al., 1999; CANTARUTTI, 2005). De modo geral, os inseticidas sintéticos são capazes de provocar alterações no sistema endócrino e pode conduzir a efeitos como por exemplo aumento da incidência de câncer de mama e próstata, isto ocorre em virtude de sua capacidade de mimetizar hormônios, devido à semelhança entre suas estruturas moleculares (SCHNORR et al., 2001). Moreira (2002) afirma que distúrbios no sistema nervoso em trabalhadores rurais podem estar associados às exposições a estes inseticidas. Em entrevista com 44 mulheres que trabalhavam na agricultura, no município de Petrolina (PE), Branco e Vainsencher (2001) puderam constatar relatos da consequência do contato direto com os inseticidas. Os efeitos

mais comuns foram: Dores de cabeça, cegueira ou ardência nos olhos, tonturas, desmaios, náuseas e vômitos.

Nesse cenário, uma alternativa ao uso de inseticidas sintéticos é a utilização de inseticidas biológicos, que são produzidos à base de bactérias, vírus e fungos (ALVES, 1997), podendo ser cultivados em laboratório ou em escala industrial, já havendo disponibilidade de algumas formulações comerciais (BARRETO, 2005). Entre os microrganismos utilizados no controle biológico, a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*), torna-se promissora na busca de proteínas inseticidas e, conseqüentemente, na obtenção dos genes codificantes para essas proteínas (BOBROWSKI et al., 2003; HIGH et al., 2004; CRICKMORE, 2006). Atualmente existem nove produtos formulados à base de *Bt*, dentre estes podemos mencionar as formulações comerciais Dipel® WG (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*) e Xentari® WG (*B. thuringiensis*, subsp. *Aizawai*) (AGROFIT, 2013).

Domingo (2000) e Janer et al. (2008) consideram que os testes realizados para liberação dos produtos *Bt* são insatisfatórios e que os protocolos de desenvolvimento de toxicidade são muito superficiais, por isso não se sabem os reais efeitos do *Bt* no organismo, Lemos et al. (2012) quando analisaram os efeitos do inseticida *Bt* sobre a histologia em órgãos de ratas prenhes, observaram nos rins dos animais tratados, uma deposição de hemosiderina, necrose, e degeneração vacuolar tanto dos ductos contorcidos como nos ductos coletores, necrose coagulativa com intensa reação das células de Kupffer e aumento dos espaços sinusóides no fígado devido à congestão. Efeito este que sugere uma ação inflamatória devido à aplicação do inseticida. Efeito parecido deste inseticida foi observado por Kiliç e Akay (2008) onde ocorreram alterações nos rins de ratos alimentados durante 90 dias com um milho geneticamente modificado expressando a proteína tóxica do *Bt*, onde foi possível observar redução no volume glomerular e do espaço de Bowman, como também degenerações tubulares, porém essas pesquisas demonstram os efeitos histopatológicos sobre estes órgãos, mas não demonstram efeitos na sua fisiologia, como por exemplo a falha de algum sistema fisiológico.

Dessa forma, diante da necessidade da realização de pesquisas que elucidem os efeitos do inseticida em doses subletais foi desenvolvido o presente trabalho com o objetivo de estudar os efeitos de doses subletais do inseticida biológico Xentari® WG sobre a toxicidade na função renal e hepática em ratas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os agrotóxicos e seu uso

Os agrotóxicos, de acordo com a Lei Federal n.º 7 802 de 11/07/89, podem ser definidos como: "Produtos e componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento" (BRASIL, 1989).

Essas substâncias também são utilizadas na construção de estradas, tratamento de madeira, armazenamento de grãos e sementes, produção de flores, combate às endemias e epidemias, dentre outras formas de uso. Mostrando que o uso de agrotóxicos está além do que se conhece normalmente (SILVA et al., 2005). Segundo CENEP/FNS (1998), os agrotóxicos são nomeados pesticidas e classificados em grupos principais denominados: herbicidas, fungicidas, inseticidas, rodenticidas e fumigantes.

De acordo com WHO/UNEP (1990), o consumo de agrotóxicos no meio rural decresce na seguinte ordem: herbicidas > inseticidas > fungicidas. Apesar dos herbicidas serem os mais utilizados, geralmente, a toxicidade deste grupo é menor que a dos inseticidas. Dados mais recentes da Anvisa (2012) mostram que os fungicidas obtiveram um acréscimo em sua procura no mercado. Se a concentração dos agrotóxicos for expressa em percentagem, os herbicidas representam 45% do total, enquanto que os fungicidas e inseticidas representam 12% e 14%, respectivamente, e as demais categorias 29%.

Os agrotóxicos são divididos em classes toxicológicas medidas a partir da sua DL50 (dose que mata 50% dos indivíduos expostos ao produto) onde a classe I são os produtos extremamente tóxicos representados pela faixa vermelha; a classe II são os produtos altamente tóxicos representados pela faixa amarela; a classe III

são os produtos medianamente tóxicos representados pela faixa azul; e a classe IV são os produtos pouco tóxicos representados pela faixa verde (OPAS/OMS, 1996).

O principal desafio da classificação toxicológica é que ela reflete basicamente intoxicações agudas, não levando em consideração os efeitos crônicos, como por exemplo, câncer, neuropatias, hepatopatias, problemas respiratórios, etc. (LARINI, 1999). Nesse contexto, uma classificação toxicológica mais precisa é de fundamental importância, pois é o principal meio de informação que os agricultores dispõem.

Segundo a portaria normativa 131, de 03/11/1997, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), refere-se aos procedimentos, para efeito de registro e avaliação ambiental de agentes biológicos empregados no controle de uma população ou de atividades biológicas de um organismo vivo considerado nocivo, visando à defesa fitossanitária. No seu anexo III, faz referência aos testes obrigatórios para a avaliação tóxico-patológica, cujo objetivo é avaliar efeitos adversos do agente microbiano de controle sobre mamíferos. Os principais aspectos a serem considerados são:

- Patogenicidade do agente de controle e de contaminantes microbianos;
- Infectividade/persistência do agente de controle e de contaminantes microbianos;
- Toxicidade do agente de controle, de contaminantes microbianos e de seus subprodutos.

A avaliação tóxico-patológica é feita através de uma série de testes, dividida em três fases distintas.

- A Fase I: consiste em uma bateria de testes de curta duração, onde o organismo teste (mamífero) recebe uma dose máxima única do agente de controle com o objetivo de se obter a máxima chance do agente de controle causar toxicidade, infectividade e patogenicidade. Se nenhum efeito adverso for observado na Fase I, não há necessidade de se realizar nenhum dos testes da Fase II e Fase III.
- A Fase II foi elaborada para avaliar uma situação particular, quando se observa toxicidade ou infectividade na Fase I, sem evidências de patogenicidade. Na Fase II estudos de toxicidade aguda são normalmente exigidos com o componente tóxico da preparação do agente de controle usado. Nas Fases II e III, estudos adicionais para avaliar efeito de toxicidade de preparações do agente biológico de controle deverão ser realizados de

acordo com protocolos apropriados. Estudos subcrônicos de toxicidade/patogenicidade também constam da Fase II.

- A Fase III contém testes para identificar efeitos adversos particulares de parasitos de células de mamíferos, e só serão exigidos quando efeitos adversos forem observados na Fase II.

Apesar do aumento das pesquisas com relação ao impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana, o que se sabe ainda não é suficiente para se conhecer a extensão da carga química de exposição direta nem a dimensão dos danos à saúde. Isso ocorre devido à falta de informação sobre o consumo e manuseio dos agrotóxicos e a falta de dados sobre intoxicações causadas por estes produtos (IBAMA, 1997).

Os inseticidas são pesticidas destinados ao controle de insetos de diversas culturas, podendo ser divididos em dois grandes grupos: os inseticidas biológicos e sintéticos. Dentre os inseticidas sintéticos destacam-se os: organofosforados, carbamatos, organoclorados e piretróides, que são compostos lipofílicos amplamente utilizados no controle de pragas agrícolas e de interesse médico-veterinário (CANTARUTTI, 2005).

Os compostos organofosforados podem ser absorvidos por via dérmica, respiratória e digestiva, sendo a via dérmica a principal. Após penetrar no organismo, não se acumulam, podendo ser degradados e excretados na urina. Sua ação aguda age de modo a inibir a enzima colinesterase, provocando um acúmulo da acetilcolina nas terminações nervosas.

Os carbamatos por sua vez, podem ter como porta de entrada, as vias oral, respiratória e dérmica, também é um inibidor da colinesterase, porém é menos estável e sua ação geralmente é reversível.

Os organoclorados por serem altamente lipossolúveis, tem como principal via de absorção a pele, podendo também ser absorvidos pela via oral e respiratória, estes apresentam efeitos cancerígeno, mutagênico e neurotóxico e, em casos agudos, atuam no sistema nervoso central. Sua eliminação se dá através da urina ou também pelo leite materno.

Os piretróides passam facilmente pelas membranas celulares, devido ao seu caráter lipofílico, sendo absorvido por via dérmica, respiratória e oral, seu modo de ação interfere principalmente no sistema nervoso central e periférico, quando em

doses muito elevadas, estimulam a despolarização completa da membrana da célula nervosa bloqueando sua excitabilidade (LARINI, 1999).

Os inseticidas biológicos podem ser à base de bactérias, vírus e fungos (ALVES, 1997), podendo ser cultivados em laboratório ou em escala industrial, já havendo disponibilidade de algumas formulações comerciais (BARRETO, 2005). Entre os microrganismos utilizados no controle biológico, a bactéria *B. thuringiensis* (*Bt*), torna-se promissora na busca de proteínas inseticidas. (BOBROWSKI et al., 2003; HIGH et al., 2004; CRICKMORE, 2006).

No que diz respeito ao contato direto das pessoas com os inseticidas, pode-se afirmar que a forma de contaminação mais comum é durante a fabricação e na aplicação dos mesmos, podendo ocorrer riscos de intoxicação que, dependendo do produto e dos cuidados seguidos, podem, muitas vezes, serem fatais. A extrema persistência de alguns inseticidas os transformam em contaminantes encontrados em ambientes terrestres e aquáticos por muitos anos (ANDRADE, 1995). Essa permanência no ambiente culmina em uma intoxicação crônica que por sua vez gera um quadro clínico praticamente irreversível. Nesse caso, pouco se conhece sobre os efeitos de longos períodos de exposição a estes compostos (SOARES et al., 2003)

Nos alimentos, esses compostos podem vir de uma aplicação direta em uma das fases da produção, do transporte ou do armazenamento. Schnorr et al. (2001) afirmam que uma vez no organismo, tais compostos são capazes de alterar a fisiologia do sistema endócrino a partir de múltiplos mecanismos, em especial pela capacidade de mimetização de hormônios, devido a semelhanças entre as suas estruturas moleculares.

Segundo Moreira et al. (2002), a contaminação pode ocorrer indiretamente devido algum efeito ambiental resultante do seu uso, e de modo direto através do simples contato com o agrotóxico, o contato direto pode ocorrer por três vias distintas, a via ocupacional, que ocorre nos trabalhadores que manipulam o produto; a via ambiental, que se caracteriza pela dispersão do agrotóxico pelo ambiente, acredita-se que esta via de contaminação é a mais abrangente, porém seu impacto resultante é menor, diferente da via ocupacional, que por sua vez, é responsável por mais de 80% dos casos de intoxicação, devido a intensidade e a frequência do contato dessas pessoas com o agrotóxico; e a via alimentar, onde a contaminação ocorre pela ingestão dos alimentos contaminados, esta via pode ser considerada de

baixo risco para a saúde, pois existe a possibilidade de eliminação dos contaminantes pelos processos de preparo dos alimentos (lavagem, cozimento, fritura, etc.).

2.2 *Bacillus thuringiensis (Bt)*

Em 1902, no Japão, o pesquisador Ishiwata já havia isolado uma bactéria a partir de *Bombyx mori* L., que posteriormente se soube ser também uma subespécie de *B. thuringiensis*. Essa bactéria foi descrita pela primeira vez em 1911 por Berliner na Alemanha, isolado a partir de traça de farinha (*Anagasta kuehniella* Zeller) e apenas em 1915 foi denominada de *B. thuringiensis*. O primeiro produto comercializado à base de *Bt* foi vendido na França em 1938, com o nome de “Sporeine”. Produto que possuía baixa seletividade de espécies e com diversas restrições, como por exemplo, sua alta taxa de degradação pelos raios ultravioleta (CAPALBO; VILAS-BÔAS; ARANTES, 2004; BRAR et al., 2006). Apenas a partir de 1961, nos Estados Unidos, foi criada a primeira marca registrada com uma formulação a base de *Bt* (FEDERICI, 2005; OECD, 2007).

Com a identificação de novas cepas mais seletivas às pragas agrícolas, houve, na década de 90, um grande avanço na economia mundial (PIGOTT; ELLAR, 2007), a partir desses avanços os produtos a base de *Bt* se tornaram uma alternativa viável e eficiente, pois ao contrário de outros inseticidas, são considerados não contaminantes ao meio ambiente e não causam efeitos para a saúde humana (BRAVO et al., 2005). Porém, existem relatos de casos sobre efeitos alergênicos, além de asma, náuseas e dores abdominais nos aplicadores e moradores das proximidades das áreas de cultivo após a aplicação aérea de inseticida biológico a base das subespécies *B. thuringiensis kurstaki* (*Btk*) e *israelensis* (*Bti*) (TAYABALI; SELIGY, 2000).

B. thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva caracterizada pela produção de um cristal paraesporal na célula-mãe (durante sua esporulação) o qual contém δ -endotoxinas nocivas às diversas ordens de insetos (HÖFTE; WHITELEY, 1989; SCHNEPF et al., 1998). Devido à variedade de cepas e especificidade, há possibilidade de controle de diferentes pragas. Seu uso como bioinseticidas têm várias vantagens, como a de mesclar cepas com δ -endotoxinas que reconhecem

receptores diferentes, e desta forma, diminuir a probabilidade de seleção de populações resistentes em curto prazo (SILVASUPRAMANIAN et al., 2000).

Os cristais produzidos por *B. thuringiensis* são formados por diferentes proteínas Cry, que por sua vez são sintetizadas pelos genes cry presentes nos isolados, os quais determinam o aspecto inseticida dos mesmos (HÖFTE-WHITHELEY, 1989; CRICKMORE et al., 1998; SCHENPF et al., 1998;). O modo de ação desse microrganismo está relacionado à solubilização das proteínas Cry no intestino dos insetos suscetíveis. Esse processo resulta na liberação de fragmentos tóxicos que se ligam a receptores específicos na membrana do epitélio intestinal, levando à formação de poros e ao desequilíbrio osmótico da célula entre o meio intra e extracelular, causando em seguida a lise das células e a morte da larva (ARONSON; SHAI, 2001; BRAVO et al., 2002; FIUZA, 2004).

Um segundo método de ação é chamado de “transdução de sinal”, de acordo com este modelo ocorre um aumento na concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, além da ativação da proteína quinase A. Isto acontece devido a ligação da proteína Cry a receptores específicos, induzindo uma série de reações intracelulares envolvendo a proteína G e a adenilato ciclase, o que facilita a entrada das proteínas Cry no interior da célula (BRAVO; SOBERÓN, 2008). Independentemente do método a ser seguido, ocorrerá no inseto alvo uma paralisia do canal alimentar, causando morte por inanição, também uma paralisia geral dos músculos e septicemia (HABIB; ANDRADE, 1986; BRAVO; GILLB; SOBERÓN, 2007; BRAVO; SOBERÓN, 2008; VALLETE-GELY; LEMAITRE; BOCCARD, 2008).

Dos produtos formulados à base de *Bt.*, as formulações comerciais Dipel® WG (*B. thuringiensis*, var. *kurstaki*) e XenTari® WG (*B. thuringiensis*, subsp. *Aizawai*) são mais empregadas no Brasil (AGROFIT, 2013). Esses bacilos têm a vantagem de serem seguros contra organismos não-alvo e não serem cumulativos na cadeia alimentar (KUMAR et al., 2000).

Outra maneira de utilização do *B. thuringiensis* é a fusão dos genes responsáveis pela produção da toxina com plantas, criando organismos geneticamente modificados (OGM) que acabam por adquirir resistência às pragas, doenças e herbicidas. Esse tipo de produção aumenta cerca de 10% a cada ano e estima-se que aumentará ainda mais nas próximas décadas. (O'CALLAGHAN et al., 2005). A expressão gênica das toxinas pode ser controlada de modo a ser encontrada em todas as partes da planta, ou apenas em alguma região específica

(OECD, 2007). Essa introdução de plantas-Bt acabou por gerar certa desconfiança associada às questões de biossegurança, principalmente sobre seus efeitos em organismos não-alvo. Além do mais, a grande disponibilidade dessas toxinas no ambiente acarretou no aparecimento de insetos resistentes (O'CALLAGHAN et al., 2005).

Dados na literatura a respeito da produção industrial de inseticidas ainda são escassos, visto que muitas informações são mantidas em sigilo. No geral, os produtos à base de Bt são formados por uma mistura de cristais, esporos, poucas células vegetativas e componentes inertes (CAPALBO; VILAS-BÔAS; ARANTES, 2004). As principais etapas são: seleção da linhagem, estocagem, processo fermentativo, recuperação do princípio ativo (esporos e cristais), formulação do produto e análise da qualidade (COUCH, 2000; MORAES et al., 2001).

Os principais critérios para seleção de uma subespécie bacteriana para produção de bioinseticidas são: modo de ação, potência por unidade de volume da cultura, requerimentos nutricionais, facilidade de produção, estabilidade genética e facilidade de estocagem. No caso de *B. thuringiensis*, as trocas de plasmídeos ocorrem com certa frequência e há relatos de perda de toxicidade após sucessivas fermentações, sendo essencial a constante busca por novas linhagens e o monitoramento durante o processo de fermentação (COUCH, 2000; BIZARRI et al., 2008).

A forma mais comum de produção de Bt é por fermentação submersa (líquida) descontínua, também conhecida como processo em batelada. Nesta fermentação, um recipiente contendo meio de cultura líquido é inoculado com o microrganismo, não havendo acréscimo ou retirada significativa do meio fermentado. Portanto, ocorre todo o desenvolvimento da cultura, sendo retirado o produto apenas no final do processo. Em geral, as proteínas Cry de *B. thuringiensis* são formadas no fim da fermentação, quando as condições do meio se tornam desfavoráveis. (MORAES et al., 2001).

Alguns pesquisadores têm estudado as fermentações sólida, contínua e em batelada alimentada, porém até o momento, o mais viável para produção de proteínas Cry ainda é o processo em batelada submersa (MORAES et al., 2001; ADAMS et al., 2002; CHEN et al., 2003).

Na produção industrial do inseticida os passos a serem seguidos são: pré-inóculo, geralmente feito em frascos pequenos, pré-fermentador, comumente com

1/5 do volume da fermentação, e o fermentador final. Durante todas as etapas deve-se analisar a cultura quanto à contaminação, características morfológicas e potencial entomopatogênico. Em geral, os reatores utilizados permitem o controle das condições principais de cultivo, as quais são: temperatura, pH, aeração e agitação. É importante limitar o número de passos no processo de produção a fim de evitar contaminações e mudanças indesejáveis no comportamento da bactéria (COUCH, 2000; MORAES et al, 2001).

Ao final da fermentação, a cultura de *B. thuringiensis* apresenta em média 6 a 8% de sólidos, sendo que os esporos e cristais podem corresponder até a metade deste total. Há vários métodos que podem ser utilizados para a recuperação destes cristais e esporos, sendo a centrifugação e a microfiltração os mais comuns. É importante ressaltar que tais processos permitem a recuperação principalmente das proteínas Cry. Muitas outras toxinas que podem contribuir para a toxicidade final do produto são perdidas. Atualmente novas técnicas de recuperação e/ou concentração do produto estão sendo desenvolvidas para complementar as mais utilizadas, destacando-se: A liofilização e a flotação (COUCH et al., 2000; BRAR et al., 2006).

Após a recuperação dos metabólitos de interesse, os produtos são formulados. No caso dos bioinseticidas, a formulação tem três objetivos principais: Conferir estabilidade ao produto durante a estocagem e aplicação, facilitar a aplicação do produto, e proteger o microrganismo e os cristais das condições adversas do ambiente (COUCH, 2000; BRAR et al., 2006). Embora sejam segredos industriais, os produtos formulados geralmente contam com uma combinação de aditivos reconhecidos pela USA/FDA (Food and Drug Administration) ou pelo órgão competente do país. É comum o uso de dispersantes, protetores e surfactantes (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; BRAR et al., 2006).

Antes de ser comercializado, o produto formulado deve passar por testes de análise de qualidade que atestem principalmente sua potência tóxica. Para *B. thuringiensis*, a toxicidade é geralmente analisada por meio de bioensaio com o inseto-alvo (COUCH, 2000). No Brasil, essa licença é expedida pela ANVISA, a qual também exige testes padrões para liberação da comercialização do produto. A utilização de inseticidas microbianos, como alternativa ao controle de insetos-pragas vem sendo ampliada, devido à baixa persistência no ambiente e a segurança aos

organismos não alvos, como mamíferos, pássaros, anfíbios e répteis (SCHNEPF et al, 1998).

2.3 Efeitos do *Bt* em organismos não alvo

B. thuringiensis é um entomopatógeno que possui elevada especificidade para com seus organismos alvos, porém para uma utilização segura, são necessários diversos estudos toxicológicos para garantir que o mesmo não provoque efeitos negativos nos organismos não alvos. Entretanto, diversos autores relatam diferentes resultados sobre a toxicidade do *Bt* para organismos não alvos, como por exemplo, Norton et al. (2001) que em sua pesquisa com aves da espécie *Dendragapus canadensis*, observaram que os pintos que se alimentavam de larvas expostas às toxinas do *B. thuringiensis* tiveram uma redução no seu ganho de peso de cerca de 30%. Porém Sopuck et al. (2002) ao utilizar formulação comercial de *B. thuringiensis* chamada Foray 48B, para o controle da praga *Lymantria dispar*, foi visto que os pássaros que se alimentavam desses animais não apresentaram efeitos adversos.

Yamashita et al. (2000) demonstraram um efeito citocida em células de leucemia em ensaios *in vitro*. Outros dados revelaram que não ocorreram alterações nos pesos ponderais dos animais tratados, como visto por Siegel (2001), onde ratos foram tratados com 10^9 esporos por dia durante 730 dias e mesmo assim não demonstraram diferenças significativas no seu peso corporal.

Berlitz et al. (2006) observaram em seu trabalho, que quando os animais tratados por via oral com uma suspensão de 10^9 esporos provenientes de formulação comercial Xentari® WG em ratos, as proteínas do *Bt* foram degradadas no estômago e que não afetam o animal. Essa conclusão foi tirada após a análise do conteúdo estomacal e das fezes, além disso, o estômago foi analisado em estereomicroscópio e não foi observada nenhuma modificação aparente. Porém Mezzomo (2010) afirma que após uma única administração oral dos esporos-cristais em ratos em concentrações de 10^9 esporos, foram verificadas alterações hematológicas, sugerindo que os mesmos não foram completamente degradados no estômago e que continuaram a interagir com o organismo.

Em outra pesquisa, Berlitz (2006) avaliou os efeitos de dois novos isolados bacterianos, sendo eles do *B. thuringiensis aizawai* e do *B. thuringiensis thuringiensis*, em camundongos, aplicados por via oral e intraperitoneal na

dosagem de 1000mg/kg. O autor observou que os animais que receberam a toxina oralmente não apresentaram mortalidade, diferentemente dos que recebem por via intraperitoneal, onde estes morreram 6 h após a aplicação.

Lemos et al. (2011) testaram doses subletais (185 mg/kg, 1850 mg/kg e 3700 mg/kg) da formulação comercial Xentari[®], administrados pelo método de gavagem em ratas durante o período gestacional para observar as interações blastocisto-endometriais. Os autores constataram que nos animais submetidos à maior dosagem houve alterações na quantidade de sítios de implantação, como também na histologia dos mesmos, onde ocorreu a presença de células trofoblásticas vacuolizadas, raros citotrofoblastos, aumento dos vasos sanguíneos com presença de infiltração de leucócitos e também presença de sangue no lúmen do útero, o que comprometeram o processo de implantação do conceito.

Mezzomo (2010) afirma que esporos-cristais de *Bt* possuem hematoxicidade de acordo com a via de administração (oral ou intraperitoneal), sendo a via intraperitoneal mais agressiva, enquanto que a via oral pode ser considerada inócua, para vertebrados.

Domingo (2000) e Janer et al. (2008) consideram que os testes realizados para liberação dos produtos *Bt* são insatisfatórios e que os protocolos de desenvolvimento de toxicidade são muito superficiais, além de não serem realizados estudos distintos entre fêmeas prenhes e não prenhes, tendo em vista que no Brasil o número de trabalhadores rurais que estão potencialmente expostos aos inseticidas é bastante expressivo, e que destes, a mão de obra feminina constitui, aproximadamente, 60% do total, o que contribui para o aumento da contaminação pelo inseticida (GARCIA; ALMEIDA 1991; BRANCO; VAINSENER 2001).

Schmucker (1990) e Malatesta et al. (2002) utilizaram em suas pesquisas animais alimentados com uma dieta contendo *Bt*, e verificaram alterações nas células hepáticas, como, por exemplo, núcleos dos hepatócitos irregulares e também aumento de poros nucleares. Lemos et al. (2012) analisando o efeito do inseticida *Bt* sobre a histologia de órgãos de ratas prenhes, observaram nos rins dos animais tratados, uma deposição de hemossiderina, necrose, e degeneração vacuolar tanto dos ductos contorcidos com nos ductos coletores, e um aumento do espaço sinusóides no fígado devido à congestão, e necrose coagulativa com intensa reação das células de Kupffer

Kiliç e Akay (2008) observaram alterações nos rins de ratos alimentados durante 90 dias com um milho *Bt*, onde foi possível observar redução no volume glomerular e da capsula de Bowman, como também degenerações tubulares, já os fígados dos animais também apresentaram degenerações granulares e congestão dos sinusóides. Porém pesquisas que mostrem os efeitos do inseticida biológico Xentari® sobre a função fisiológica dos órgãos são escassas.

Dentre os vários riscos ocupacionais, destacam-se os inseticidas que são relacionados a intoxicações agudas, doenças crônicas, problemas reprodutivos e danos ambientais (FARIA et al., 2007). Assim, se faz necessário a realização de pesquisas que elucidem os efeitos do inseticida em doses subletais sobre a toxicidade na função renal e hepática em ratas, principalmente em fêmeas, já que a maior parte dos trabalhos estudam os efeitos em machos.

3. REFERÊNCIAS

- ADAMS, T. T.; EITENAN, M. A.; HANEL, B. M. Solid state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents. **Bioresource Technology**, v.82, n.1, p.33-41, 2002.
- AGROFIT, SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação geral de Agrotóxicos e Afins. DFIA/DAS. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em 10/12/ 2015.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. v. 2, Piracicaba, FEALQ, 1163p, 1997.
- ANDRADE, M. J. F. V. **Economia do meio ambiente e regulamentação: análise da legislação brasileira sobre agrotóxicos** [dissertação]. Rio de Janeiro: Escola de Economia da Fundação Getúlio Vargas, 1995.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatórios das empresas de agrotóxicos de produção, importação, comercialização e exportação, de janeiro a dezembro de 2009**. Brasília - DF, 2011.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **2º Seminário Mercado de Agrotóxicos e Regulação**. Brasília - DF, 2012.
- ARONSON, A. I.; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**. v.195, p.1-8, 2001.
- BARRETO, M. R. **Prospecção e caracterização de genes de *Bacillus thuringiensis* com potencial para o controle de insetos-praga da cultura da soja**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- BERLITZ, D. L. **Toxicologia de *Bacillus thuringiensis* e *Melia azedarach* em organismos associados a orizicultura**. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos. 83p. 2006.
- BERLITZ, D. L.; GIOVENARDI, M.; FIUZA, L. M. Toxicology effects of δ -endotoxins and δ -exotoxins of *Bacillus thuringiensis* in *Wistar* rats. **Neotropical Biology and Conservation**. v.1, n.1, p.35-38, 2006.
- BIZARRI, M. F.; BISHOP, A. H.; DINSDALE, A.; LOGAN, N. A. Changes in the properties of *Bacillus thuringiensis* after prolonged culture in a rich medium. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, n.1, p.60-69, 2008.
- BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**. v.33, n.5, p.843-850, 2003.
- BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**. v.41, n.2, p.323-342, 2006.

BRASIL. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm>. Acesso em: 10/12/2015.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**. v.49, n 4, p.423-435, 2007.

BRAVO, A.; MIRANDA, R.; GÓMEZ, I.; SOBERÓN, M. Pore formation activity of Cry 1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. **Biochemistry et Biophysical Acta**. v.1562, p.63-69, 2002.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. **Comprehensive Molecular Insect Science**. GILBERT, L. I.; KOSTAS, I.; GILL, S. S.; (eds), Elsevier, v.6, p.175-206, 2005

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to *Bt* toxins? **Trends in Biotechnology**. v.26, n.10, p.573-579, 2008.

BRANCO, A. M.; VAINSENER S. A. Imprescindíveis e Discriminadas: As Trabalhadoras Rurais na Fruticultura do Vale do São Francisco. **Fundação Joaquim Nabuco**, 2001 .

CANTARUTTI, T. F. P. **Risco tóxico de resíduos de pesticidas em alimentos e toxicidade reprodutiva em ratos wistar**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia e meio ambiente**. Viçosa: Folha de Viçosa, p.309-350, 2004.

CENEP/FNS. Guia de vigilância epidemiológica. **Fundação nacional de Saúde**, 1998.

CHEN, S; HONG, E. J.-Y.; WU, E. W-T. Fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* based on motile intensity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 677-681, 2003.

COUCH, T. L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F. (Org.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications. New York: **Kluwer Academic Publishes**, p.297-316, 2000.

CRICKMORE, N. Beyond the spore – past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. **Journal of Applied Microbiology**. v.101, p.616-619, 2006.

DOMINGO, J. L. Health risks of GM foods: Many options but few data. **Science**. v.288, p.1748-1749, 2000.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. C. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p.25-38, 2007.

FEDERICI, B. A. Insecticidal bactéria: An overwhelming success for invertebrate pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.89, p. 30-38, 2005

FIUZA, L. M. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos. **Biотecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.32, p.84-89, 2004.

GARCIA G. E.; ALMEIDA, W. Exposição dos trabalhadores rurais aos agrotóxicos no Brasil / Rural workers exposure to pesticides in Brazil. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v.19, n.72, p.7-11, 1991.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis* biology, ecology and safety. **Chichester: John Wiley & Sons**, p.350, 2000.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Manole, p.130-140, 1998.

HIGH, S. M.; COHEN, M. B.; SHU, Q. Y.; ALTOSAAR, I. Achieving successful deployment of Bt rice. **Trends in Plant Science**. v.9, n.6, p.286-292, 2004.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Inseticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews**. v.53, p.242-255, 1989.

IBAMA, Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente E Dos Recursos Naturais Renováveis. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=2630>> Acesso em: 10/12/2015.

JANER, G.; SLOB, W.; HAKKERT, B. C.; VERMEIRE, T.; PIERSMA, A. H. A retrospective analysis of developmental toxicity studies in rat and rabbit: What is the added value of the rabbit as an additional test species? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v.50, p.206-217, 2008.,

KILIÇ, A.; AKAY, M. T. A three generation study with genetically modified Bt corn in rats: Biochemical and histopathological investigation. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.1164-1170, 2008.

KUMAR, A.; SRA, K; SANGODKAR, U. M. X.; SHARMA, V. P. Advances in the bio-control of mosquito vectors utilizing *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* var. *israelensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences India**. v.70, p.1-20, 2000.

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

LEMOS, A. J. J. M.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; SILVA, F. C. A.; OLIVEIRA, J. V.; SIQUEIRA, H. A. A. Response of blastocyst–endometrium interactions in albino rats to sublethal doses of biological and synthetic insecticides. **Food and Chemical Toxicology**. v.49, p.2541-2547, 2011.

LEMOS, A. J. J. M.; SIQUEIRA, H. A. A.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; MAIA, F. C. L.; TEIXEIRA, A. A. C.; SILVA, E. J.; OLIVEIRA, J. V. Effect of sub-lethal doses of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai* and deltamethrin with regard to fertility and organ toxicity in pregnant albino rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.65, n.5, p.489-495, 2012

MALATESTA, M., CAPORALONI, C., GAVAUDAN, S., ROCCHI, M.B., SERAFINI, S., TIBER, C., GAZZANELLI, G. Ultrastructural morphometrical and immunocytochemical analysis of hepatocyte nuclei from mice fed on genetically modified soybean. **Cell Structure Function**, v.27, p. 173-180, 2002.

MEZZOMO, B. P.; **Avaliação da hematotoxicidade e da genotoxicidade de diferentes esporos-cristais do *Bacillus thuringiensis* em camundongo Swiss**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; MOREIRA, J. C. Estarão alguns populacionais brasileiros sujeitos a ação de desruptores endócrinos? **Caderno de Saúde Pública**. v.14, p.845-850, 1999.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; ARRUDA, R. O. M. Produção de bioinseticidas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. Porto Alegre: **Edgar Blücher**, v.3, p.245-265, 2001.

MOREIRA, J. C. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo. **Ciência Saúde Coletiva**. v.7, n.2, p.229-311, 2002.

NORTON, M. L.; BENDELL, J. F.; BENDELL-YOUNG, L. I.; LEBLANC, C. W. Secondary effects on the pesticide *Bacillus thuringiensis kurstaki* on chicks os spruce grouse (*Dendragapus canadensis*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.41, p.369-373, 2001.

O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T. R.; BURGUESS, E. P. J.; MALONE, L. A. Effects of Plants Genetically Modified for insect resistace on Nontarget Organism. **Annual Review of Entomology**, v.50, p.271-292, 2005.

OECD. Consensus Documento and Safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* – derived insect control proteins. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), p.1-109, 2007.

OPAS/OMS. **Manual de vigilância de saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, 1996. Disponível em <<http://www.opas.org.br/publicmo.cfm?codigo=19>>. Acessado em: 10/12/2015.

PELAEZ, V.; MELO, M.; HOFMANN, R.; HAMERSCHMIDT, P.; MEDEIROS, G.; MATSUSHITA, A.; TEODOROVICZ, T.; MOREIRA, F.; WELINSKI, J.; HERMIDA, C. **Monitoramento do mercado de agrotóxicos**. Departamento de Economia, Universidade Federal do Paraná, 2010.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.71, n.2, p. 255-281, 2007

SCHMUCKER, D.L. Hepatocyte fine structure during maturation and senescence. **Journal of Electron Microscopy Technique**, v.14, p. 106–125, 1990.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J.; LERECULUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.; DEAN, D. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.775-806, 1998.

SCHNORR, T. M.; LAWSON, C. C.; WHELAN, E. A. Spontaneous abortion, sex ratio and paternal occupational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Environ Health Perspect**, v.109, n.11, p.1127-32, 2001.

SIEGEL, J. P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.77, p.13-21, 2001.

SILVA, D. C. **Efeitos tóxicos e genéticos ocasionados por agrotóxicos**. Monografia (Especialização em Gestão de Recursos Naturais) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, p.53. 2005.

SILVA, J. M.; NOVATO-SILVA, E.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M. M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saúde Coletiva**. v.10, n.4, p.13, 2005.

SIVASUPRAMANIAM, S.; KABUYE, V. T.; MALVAR, T.; GILMER, A. J. B.; PETERS, A.; COYLE D.; MOHAN K. S.; DEEBA F. Y.; RAVI, K. C. Hybrid *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin provide enhanced spectrun of activity on Lepidopteran pest of cotton. In: DUGGER P, RICHTER D. Beltwide Cotton Conference Proceedings, Memphis: **National Cotton Council**. p.837-840, 2000.

SOARES, W.; ALMEIDA, R. M. V. R.; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública** v.19, n.4, p. 1117-1127, 2003.

SOPUCK, L.; OVASKA, K.; WHITTINGTON, B. Responses of songbirds to aerial spraying of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Foray 48B). **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.21, n.8, p.1664-1672, 2002.

TAYABALI, A. F.; SELIGY, V. L. Human cell exposure assays of *Bacillus thuringiensis* commercial insecticides: production of *Bacillus cereus*-like cytolytic effects from outgrowth of spores. **Environmental Health Perspective**, v.108, n.10, p.919–930., 2000.

VALLETE-GELLY, I.; LEMAITRE, B.; BOCCARD, F. Bacterial strategies to overcome insect defenses. **Nature Reviews: Microbiology** v.6, n.4, p.302-313, 2008.

YAMASHITA, S.; AKAO, T.; MIZUKI, E.; SAITOH, H.; HIGUCHI, K.; KIM, H.; OHBA, M. Characterization of the anti-cancer-cell parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate. **Canadian journal of microbiology**. v.46, n.10, p.913-919, 2000.

WHO/UNEP (World Health Organization/United Nations Environment Programme). **Public health impact of pesticides used in agriculture**. Geneva, 1990.

CAPÍTULO II

Efeitos subletais do inseticida biológico Xentari[®], sobre a toxicidade hepática e renal em
ratas

Clovis José Cavalcanti Lapa Neto¹; Valéria Wanderley-Teixeira¹; Lécio Leone de Almeida³;
Ana Janaina Jeanine Martins de Lemos-Jordão²; Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹

1 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil.

2 Unidade Acadêmica de Ciências Médicas, Universidade Federal de Campina Grande. R. Aprígio Veloso, 882 - Universitário, Campina Grande - PB, Brasil.

3 Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Regional do Cariri. R. Cel. Antônio Luiz, 1161 - Pimenta, Crato - CE, Brasil.

E-mail: valeria.wanderley@ufrpe.br

Resumo: No Brasil o número de trabalhadores rurais expostos a inseticidas é bastante expressivo, o que concorre para intoxicações agudas e doenças crônicas. Assim, testou-se a hipótese se a administração do inseticida biológico Xentari® WG (*B. thuringiensis* subsp. Aizawai), em concentrações subletais, pode interferir na função hepática e renal em ratas. Utilizaram-se 40 ratas albinas, *Rattus norvegicus albinus*, distribuídas em quatro grupos constituídos por cinco animais: I: Ratas que receberam placebo (Controle); II, III e IV, que receberam 1,0; 10 e 20 mg de Xentari®/100g, respectivamente. Os animais foram pesados aos 20 e 30 dias de administração do inseticida. Foram realizadas dosagens bioquímicas de ALT, AST, HDL, LDL, VLDL, albumina, creatinina e uréia. Para as análises histopatológicas e histoquímica utilizou-se a técnica H.E e P.A.S., respectivamente. Na morfometria do fígado mensurou-se os hepatócitos, capilares sinusoides, ducto bilífero, espaço porta-hepático, veia hepática e veia centro-lobular e no rim mensurou-se diâmetro e volume do glomérulo e da cápsula de Bowman. A eutanásia dos animais ocorreu logo após o término da administração do inseticida, que durou o período de 20 ou 30 dias após aplicação do inseticida. Os resultados mostraram que o Xentari® WG, promoveu uma redução no peso dos animais, além de uma alteração nos níveis de triglicerídeos aos 20 dias, colesterol total aos 30 dias, HDL, LDL e VLDL aos 20 dias. Já a ALT foi alterada com 20 e 30 dias, enquanto que o AST apenas aos 20 dias, também promoveu alterações nos níveis de ureia e albumina aos 30 dias de tratamento. A histopatologia do fígado e do rim mostrou tumefação e vacuolização celular e baixa reação ao P.A.S no fígado, a análise morfométrica do fígado demonstrou um aumento dos hepatócitos e capilares sinusoides em relação ao espaço porta-hepático, veia hepática e centro-lobular, e uma diminuição do volume e diâmetro glomerular, caracterizando atrofia glomerular e glomérulonefrite membranosa no rim para ambos os períodos analisados. Conclui-se que o Xentari® em doses subletais, interfere na função hepática e renal de ratas, sendo mais expressivo no período de aplicação agudo (20 dias). Assim, sugere-se que sejam realizadas mais pesquisas que revelem os efeitos crônicos da exposição a este inseticida biológico.

Palavras-chave: Toxicologia, histopatologia; *Bacillus thuringiensis*, ratos, fígado, morfometria.

1. Introdução

Bacillus thuringiensis (Berliner) é uma bactéria Gram-positiva caracterizada pela produção de um cristal paraesporal na célula-mãe (durante sua esporulação) o qual contém δ -endotoxinas nocivas a diversas ordens de insetos (HÖFTE; WHITELEY, 1989; SCHNEPF et al., 1998). Os cristais produzidos por *B. thuringiensis* (*Bt*) são formados por diferentes proteínas Cry, que por sua vez são sintetizadas pelos genes cry presentes nos isolados, os quais determinam o aspecto inseticida dos mesmos (HÖFTE; WHITELEY, 1989; SCHNEPF et al., 1998; CRICKMORE et al., 2006). O modo de ação desse microrganismo está relacionado à solubilização das proteínas Cry no intestino dos insetos suscetíveis (AROSON; SHAI, 2001; BRAVO et al., 2002; FIUZA, 2004).

A principal forma de contaminação por agrotóxicos é a ocupacional, que se caracteriza pela contaminação dos trabalhadores que manipulam essas substâncias. Esta contaminação é observada tanto no processo de formulação (mistura e/ou diluição dos agrotóxicos para uso), quanto no processo de utilização (pulverização, auxílio na condução das mangueiras dos pulverizadores e descarte de resíduos e embalagens contaminadas (MOREIRA et al. 2002). No Brasil o número de trabalhadores rurais que estão potencialmente expostos aos inseticidas sintéticos e biológicos é bastante expressivo (GARCIA; ALMEIDA 1991). Destes, a maioria pode se contaminar diretamente com alimentos contendo resíduos desses inseticidas. Além disso, pode haver intoxicações agudas e crônicas, através de contaminação de abastecimentos de água potável para consumo humano e animal, de rios, lagos e açudes, do leite materno e de vaca, de frutas, legumes e grãos (ARÃO, 2009), devido a isto, o uso de inseticidas com base biológica tem se mostrado promissor no combate à pragas agrícolas.

Com a identificação de novas cepas de *Bt*, os produtos à base dessas bactérias se tornaram uma alternativa viável e eficiente, pois ao contrário de outros inseticidas são

considerados não contaminantes ao meio ambiente e não causam efeitos para a saúde humana (BRAVO et al., 2005). Entretanto, diversos autores relatam resultados controversos sobre a toxicidade do *Bt* para organismos não alvos, como por exemplo: Lemos et al. (2012) testando a toxicidade do inseticida *Bt* sobre órgãos de ratas prenhes em dosagens semelhantes ao do presente trabalho, observaram nos rins dos animais tratados, uma deposição de hemosiderina, necrose, e degeneração vacuolar tanto dos ductos contorcidos com nos ductos coletores, e um aumento dos espaços sinusóides no fígado devido à congestão, e necrose coagulativa com intensa reação das células de Kupffer. Efeito este que sugere uma ação inflamatória devido à aplicação do inseticida.

Kiliç; Akay (2008) observaram alterações nos rins de ratos alimentados durante 90 dias com um milho geneticamente modificado expressando a proteína tóxica do *Bt*, onde foi possível observar redução no volume glomerular e da capsula de Bowman, como também degenerações tubulares, e no fígado dos animais, apresentaram degenerações granulares e congestão dos sinusóides. Porém essas pesquisas não demonstram os efeitos do inseticida sobre a função fisiológica desses órgãos e também da atividade crônica do inseticida, fazendo-se necessário investigar os efeitos do inseticida em período de administração aguda e subaguda. Assim, diante do exposto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos do inseticida biológico Xentari[®], em dosagens subletais, sobre a toxicidade hepática e renal em ratas.

2. Material e métodos

2.1 Obtenção dos animais

Foram utilizadas 40 ratas albinas *Rattus norvegicus albinus* com 90 dias de idade, pesando 200 ± 30 g, da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, mantidos em gaiolas com alimentação e água “*ad libitum*” e divididos nos seguintes grupos:

Grupo I: ratas que receberam placebo para análise do fígado e rim durante 20 e 30 dias de aplicação (Controle);

Grupo II: ratas que receberam 1,0 mg de Xentari[®]/100 g para análise do fígado e rim durante 20 e 30 dias de aplicação;

Grupo III: ratas que receberam 10,0 mg de Xentari[®]/100 g para análise do fígado e rim durante 20 e 30 dias de aplicação;

Grupo IV: ratas que receberam 20,0 mg de Xentari[®]/100 g para análise do fígado e rim durante 20 e 30 dias de aplicação.

2.2 Aprovação pelo comitê de ética em experimentação animal

O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal sob a licença 045/2015 – CEUA, UFRPE

2.3 Administração do Inseticida e pesagem dos animais

A administração do inseticida Xentari[®] WG (Bta) formulado com toxinas Cry1C, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1D e Cry2B, foi realizada nas fêmeas, por via oral (gavagem), em doses diárias por 20 e 30 dias para avaliar a toxicidade aguda e subaguda, respectivamente, segundo metodologia descrita por Peng et al. (2007). As doses administradas foram as seguintes: 1,0; 10 e 20 mg/100 g de acordo com a metodologia modificada de Shaban et al. (2003). Como

placebo foram administrados 2 mL de água destilada. Os animais foram pesados no 20^o e 30^o dia de administração do inseticida. Todas as ratas foram eutanasiadas logo após completarem 20 ou 30 dias de dosagens ininterruptas.

2.4 Coleta de sangue, fígado e rim

Foi retirado 2 mL de sangue dos animais no 20^o e 30^o dia de aplicação por meio de contenção mecânica através da punção da veia caudal lateral com uso de cateter (24G) para obtenção do plasma e do soro em tubos separados, um contendo anticoagulante para o plasma, e outro sem anticoagulante para obtenção do soro, já que dependendo do kit de análise bioquímica utilizado ou soro ou plasma era necessário, após a coleta, foram acondicionado a -20 °C, até o momento das dosagens. Após a coleta do sangue, as fêmeas de todos os grupos foram anestesiadas com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular, e em seguida feita remoção do fígado e do rim. Em seguida as ratas foram eutanasiadas por meio do aprofundamento anestésico associado com Tiopental (100 mg/kg) por via intraperitoneal.

2.5 Análise das dosagens bioquímicas

As dosagens bioquímicas foram realizadas por meio de kit's da Doles (Doles, Goiás, Brasil), para análise de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicérideo total (TG), sendo determinados fotometricamente com uso de analisador automático. A análise de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL), foram determinadas pela equação de Friedewald $LDL - C = CT - HDL - C - TG/5$, onde C = colesterol e TG/5 representa o colesterol ligado à VLDL ou VLDL-colesterol (VLDL-C) (FRIEDEWALD et al., 1972; SHINDE et al., 2013), todas as análises foram realizadas em triplicatas.

As dosagens de creatinina, albumina e ureia foram realizadas utilizando o soro coletado e armazenado à -20 °C, que foi descongelado até a temperatura de 2 a 8 °C, e as análises foram feitas através de kit's comerciais específicos da marca Doles (Doles, Goiás, Brasil), seguindo os protocolos disponibilizados em cada kit, todas as dosagens foram realizadas em triplicata com uso de analisador automático, as análises foram realizadas em triplicatas.

2.6 Análise histoquímica, histopatológica e morfométrica

O fígado e rim foram fixados em formol tamponado à 10% por 24 horas e então preparados para inclusão em parafina, após a inclusão, cortes de 5 µm foram confeccionados para análise histopatológica, onde foram corados pela Hematoxilina-Eosina (H.E.), o fígado foi preparado pra análise histoquímica, onde foi corado com a técnica de P.A.S e a quantificação de pixels foi realizada com auxílio do software GIMP 2.8. O estudo morfométrico do fígado foi realizado segundo a metodologia descrita por Engelman et al. (2001), onde, com auxílio de uma gráticula acoplada à ocular do microscópio, foram contados 10 campos por lâmina, onde era contabilizado os hepatócitos, capilares sinusóides, ducto bilífero, espaço porta, veia hepática e veia centro lobular. Para análise morfométrica do rim, foram feitas fotos de 10 campos de cada lâmina, onde foram mensurados os seguintes parâmetros: Diâmetro do glomerular (DG), volume do glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman seguindo a metodologia de Akaoka; White; Raafat (1994).

2.7 Análise estatística

Os dados obtidos das dosagens bioquímicas e de peso foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 95% de significância com o software ASSISTAT versão 7.7 beta. Os valores obtidos das análises

morfométricas foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, e quando necessário comparado pelo teste de Mann-Whitney com 95% de significância.

3. Resultados

3.1 Peso ponderal dos animais

Os animais demonstraram uma redução significativa do seu peso em relação ao grupo controle de acordo com o aumento da dosagem em ambos os períodos analisados (20 e 30 dias), sendo os menores valores observados nos animais dos grupos que receberam 1 e 20 mg de Xentari[®]100/g (G II e IV, respectivamente), porém os animais que receberam 10 mg de Xentari[®]100 /g (G III) não demonstraram diferença entre os outros grupos que também foram expostos ao inseticida (Tabela 1).

3.2 Análise da função Hepática

A dosagem de TGP (ALT) e TGO (AST) demonstrou, no período de 20 dias, aumento dos níveis séricos nos animais dos grupos expostos a 1 mg e 20 mg de Xentari[®]100/g (G II e IV, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (Figuras 1A e 1C), embora nos animais expostos a 10 mg de Xentari[®]100 /g (G III) não foram verificadas diferenças significativas nos níveis de TGP e TGO quando comparados ao controle. No período de 30 dias foi visto um aumento nos níveis de TGP apenas nos animais do grupo que foram expostos a 10 mg de Xentari[®]/g (G III) (Figura 1B), enquanto que para os níveis de TGO não houve diferença significativa entre os animais que foram expostos ao inseticida (Figura 1D).

Os níveis séricos de triglicerídeos aumentaram significativamente em comparação aos animais do grupo controle no período de 20 dias, sendo mais expressivo nos animais que expostos a 20 mg de Xentari[®]/g (G IV) (Figura 1E), porém no período de 30 dias, não houve diferença significativa (Figura 1F).

Os níveis séricos de colesterol no período de 20 dias, não demonstraram diferenças significativas (Figura 2A). Porém, no período de 30 dias demonstraram redução nos animais expostos a 10 e 20 mg de Xentari[®]/g (G III e IV, respectivamente) (Figura 2B). Já os níveis séricos do HDL apresentou-se elevado nos animais expostos a 1 mg de Xentari[®]/g (G II) no período de 20 dias (Figura 2C) e reduziu nos animais expostos ao inseticida no período de 30 dias quando comparado ao grupo controle (Figura 2D). Os níveis séricos de VLDL aumentaram significativamente e de maneira proporcional às dosagens do Xentari[®] no período de 20 dias quando comparadas ao controle (Figura 2E), fato que não ocorreu aos 30 dias de exposição ao inseticida (Figura 2F).

Os níveis de LDL tiveram aumento em todos os animais no período de 20 dias de exposição ao inseticida quando comparadas ao controle (Figura 2G), porém, no período de 30 dias, demonstrou redução das dosagens séricas nos animais expostos a 20 mg de Xentari[®]/g (G IV) (Figura 2H).

A análise histopatológica do fígado de ratas dos grupos expostos ao inseticida Xentari[®] por 20 e 30 dias revelou vacuolização celular difusa e tumefação nas áreas ao redor dos vasos, indicando processo degenerativo (Figuras 3A à 3D). Além disso, a histoquímica revelou menor marcação pelo P.A.S. no fígado dos animais expostos ao inseticida (Figuras 4A – 4E). A análise morfométrica demonstrou que houve uma diminuição percentual da região do parênquima lobular em relação ao parênquima não lobular nos animais expostos ao inseticida em ambos os períodos analisados, demonstrando uma menor presença de capilares sinusóides (Tabela 2).

3.3 Análise da função renal

As dosagens séricas dos níveis de ureia não demonstraram alterações significativas no período de 20 dias (Figura 5A), porém no período de 30 dias apenas os animais dos grupos que foram expostos a 10 e 20 mg/100 g (G III e IV, respectivamente) demonstraram aumento em seus níveis séricos quando comparados ao grupo controle (Figura 5B). Além disso, os níveis de creatinina (Figuras 5C e 5D), albumina (Figura 5E) não demonstraram diferenças significativas entre os animais nos períodos estudados. Exceto no período de 30 dias, onde houve redução nos níveis séricos de albumina nos animais que foram expostos a 1 mg/100 g (G II) (Figura 5F).

A análise histopatológica dos rins de ratas dos grupos expostos ao inseticida revelou tumefação das células dos túbulos contorcidos proximais, além de vacuolização e núcleo picnótico nas células dos túbulos coletores nos animais dos grupos expostos ao Xentari[®] independente da dose (Figuras 6A à 6H). Em adição, a análise morfométrica, revelou uma redução do diâmetro e do volume glomerular nos grupos GII, GIII e GIV nos períodos de 20 e 30 dias de exposição (Tabela 2).

4. Discussão

Os níveis de TGP (ALT) e TGO (AST) são utilizados rotineiramente em estudos toxicológicos para avaliação funcional do fígado dentre outras alterações patológicas (EVANS, 1988). Portanto, o aumento dos níveis destas enzimas está normalmente relacionado com algum dano hepático. No presente estudo, foi observado aumento nos valores dessas enzimas num período de aplicação agudo (20 dias) do inseticida Xentari[®]. Assim, os danos evidenciados na análise histopatológica (células tumefeitas e vacuolizadas) podem indicar dano no tecido hepático (WANER et al., 1991). Já no período de aplicação subagudo (30 dias) apenas o TGP aumentou, sugerindo que as alterações causadas pela

exposição do inseticida são consideradas dose-independentes (PENG et al. 2007). Em um estudo realizado por Onose et al. (2008), com uma dieta com a proteína Cry1Ab durante um período subcrônico, demonstrou redução dos níveis de TGO, mas que não acarretou em alterações toxicológicas, seguido dos níveis de TGP, que não demonstraram diferença significativa em relação ao grupo controle

O aumento dos níveis de triglicerídeos evidenciados neste trabalho, corrobora com os resultados encontrados por Schrøder et al. (2007), onde após ser oferecido aos animais dieta composta por arroz geneticamente modificado para expressar a proteína Cry1Ab durante 90 dias, foi verificado aumento dos níveis dos triglicerídeos, porém no presente estudo foi evidenciado aumento de triglicerídeos já aos 20 dias de exposição ao inseticida. Esse resultado pode estar relacionado com os níveis elevados de VLDL de acordo com o aumento da dosagem do Xentari[®], devido ao fato do VLDL associar-se aos triglicerídeos na corrente sanguínea levando-os até os locais de armazenamento, assim, quanto maior os níveis de VLDL, maior também serão os níveis de triglicerídeos (SPOSITO et al, 2007).

A redução dos níveis séricos de colesterol aos 30 dias, período de exposição subaguda, pode estar relacionado com a diminuição do LDL e HDL para o mesmo período de exposição em conjunto com a não alteração dos níveis de VLDL nesse período.

Segundo Onose et al. (2008), o aumento ou diminuição evidenciado nos níveis de colesterol não parece ter relação com a dosagem ou o tipo da proteína utilizada. Mesmo ocorrendo diminuição nos níveis de LDL e HDL numa exposição subaguda ao inseticida, essas alterações são consideradas biologicamente dentro dos padrões normais para o animal, sendo assim, sem significância toxicológica, mesmo fato ocorre com a redução do peso dos animais, onde mesmo reduzidos não fugiram dos padrões de peso normal dos animais. (WANG et al., 2002).

Os achados histopatológicos corroboram com os achados morfométricos, pois devido ao aumento da área ocupada pelos hepatócitos decorrente da tumefação, foi visto uma redução significativa dos capilares sinusóides em todos os grupos que receberam o inseticida (GII, GIII e GIV) tanto com 20 como aos 30 dias de aplicação. O fígado sendo um órgão responsável por desintoxicação e transformação, essas alterações podem acarretar mudanças no processo metabólico, onde as células tumefeitas normalmente estão em estado de degeneração granular (KILIÇ; AKAY, 2008). Schmucker (1990), analisando os efeitos de uma dieta contendo Bt durante 90 dias, observou alterações no tamanho dos hepatócitos devido a uma degeneração granular, podendo levar à esteatose hepática.

Um dos principais métodos de avaliação da função renal é através de dosagens de creatinina e ureia, a albumina também é utilizada como fator de função renal (SODRÉ et al., 2007). O aumento nos valores dos níveis de ureia encontrados no presente estudo, corrobora com os encontrados por Schrøder et al. (2005), onde ratos alimentados durante 90 dias com uma dieta de arroz Bt, também apresentaram aumento nos níveis de ureia em cerca de 10% quando comparados ao grupo controle. Este resultado pode estar relacionado com uma diminuição da função renal, tornando-o incapaz de depurar o sangue corretamente. Os valores dos níveis de creatinina se mantiveram inalterados, demonstrando que essa função renal, se alterada, foi de maneira leve, assim como visto por Kiliç e Akay (2007), onde as alterações encontradas para este parâmetro foram consideradas dose-independentes e não foram suficientes para causar alterações na função renal dos animais.

Os níveis reduzidos de albumina nas ratas do GII aos 30 dias de exposição podem estar relacionados com algumas deficiências da função dos rins, como por exemplo, síndrome nefrótica ou glomerulonefrite crônica, corroborando com os achados histopatológicos evidenciados nesta pesquisa, onde a tumefação e vacuolização celular podem ter alterado a

função renal, causando deficiência na sua função de filtração pois assim, a albumina seria quase que completamente eliminada pela urina (SANTOS et al., 2004).

Séralini et al. (2006) testando dietas com milho Bt em ratos observaram inflamação focal nos glomérulos e nos túbulos coletores, além de uma redução da albumina sérica, resultados que se assemelham aos nossos. Porém, Onose et al. (2008), testando uma dieta contendo a proteína Cry1Ab do Bt, observaram que as alterações nos níveis de albumina não foram suficientes para causar efeitos tóxicos nos animais. Já Shimada et al. (2006) não observaram diferenças nos níveis de albumina em bovinos administrados com a toxina Cry1Ab do Bt e se compararmos com os inseticidas sintéticos, Zuhair e Sahhaf (2006), testando doses de um inseticida da classe dos organofosforados, perceberam pequenas alterações nos níveis de albumina, mas que mesmo assim não afetaram a fisiologia do animal. Essa diferença de resultados sugere que as alterações dos níveis de albumina são dose-independente.

Kiliç e Akay (2007) também evidenciaram alterações histopatológicas nos rins, mostrando degeneração tubular e aumento da camada parietal da capsula de Bowman, resultados que corroboram aos achados na presente pesquisa, onde a redução do volume glomerular evidenciado na análise morfométrica dos grupos expostos ao Xentari® em ambos os períodos estudados, reforça o quadro de atrofia glomerular e glomerulonefrite basal, que também foram evidenciados por esses autores. O fato de ter ocorrido uma atrofia glomerular, pode sinalizar uma provável redução na taxa de filtração glomerular, que pode acarretar em um aumento de pressão arterial (HAYASHI et al. 2006, LIU et al. 2011).

O fato de um inseticida biológico ter causado tais alterações preocupa bastante, pois por ser um inseticida que é relatado por não ocasionar danos nos organismos não-alvos, apresentaram efeitos, mesmo em doses subletais, que se comparam aos efeitos de inseticidas sintéticos, conhecidos por ter uma maior toxicidade. Lemos et al. (2012) comparando os

efeitos nocivos do inseticida biológico Xentari® com o inseticida sintético Decis® 25CE em ratos, perceberam que as alterações encontradas para ambos os inseticidas no que diz respeito a histopatologia nos rins, foram similares, como por exemplo a presença de depósitos de hemosiderina, degeneração vacuolar e necrose coagulativa. Isto sugere que mesmo sendo um inseticida biológico, não está totalmente livre de efeitos nocivos aos organismos-não alvo.

Assim pôde-se concluir que o inseticida biológico Xentari® mesmo em doses subletais promove toxicidade renal e hepática, sendo mais expressivo no período de aplicação agudo (20 dias) demonstrando efeitos até similares aos dos inseticidas sintéticos.

Tendo em vista que o Brasil ocupa o 1º lugar no ranking mundial de uso de agrotóxicos (ANVISA, 2012) e que do total de trabalhadores potencialmente expostos a este inseticida, 60% é constituído por mulheres (BRANCO; VAINSENER, 2001). Se faz necessária a realização de pesquisas que indiquem os efeitos deste tipo de inseticida sobre a função de outros órgãos, tanto em período agudo quanto crônico.

5. Referências

- AKAOKA, K.; WHITE, R.H.; RAAFAT, F. Human glomerular growth during childhood: a morphometric study. **Journal of Pathology**, v.173, p.261-268, 1994
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **2º Seminário Mercado de Agrotóxicos e Regulação**. Brasília - DF, 2012.
- ARÃO, I. R. Percepção por trabalhadores rurais dos municípios de rio verde e catalão de riscos ambientais e à saúde em relação a defensivos agrícolas. 2009. 156 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) Universidade Católica de Goiás(UCG) - Goiânia.
- AROSON, A. I.; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**. v.195, p.1-8, 2001.
- BRANCO, A. M.; VAINSENER S. A. Imprescindíveis e Discriminadas: As Trabalhadoras Rurais na Fruticultura do Vale do São Francisco. **Fundação Joaquim Nabuco**, 2001.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M.; GILBERT, L. I.; KOSTAS, I.; GILL, S. S. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. **Comprehensive Molecular Insect Science**, v.6, p.175-206, 2005.
- BRAVO, A.; MIRANDA, R.; GÓMEZ, I.; SOBERÓN, M. Pore formation activity of Cry 1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. **Biochemistry et Biophysical Acta**. v.1562, p.63-69, 2002.
- CRICKMORE, N. Beyond the spore -past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. **Journal of Applied Microbiology**. v.101, p.616-619, 2006.
- ENGELMAN, M.F.B.; NETO, J.G.; ANDRADE, C.H.V.; HERNANDEZ, R.; GOULART, L.B.N.T. Estudo morfológico do fígado de ratos submetidos a doses supra-fisiológica de tiroxina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n.2, 2001.
- EVANS, R. J. Hepatobiliary damage and dysfunction: A critical overview. In: Animal Clinical Biochemistry-the Future, Blackmore DJ, Eckersall PO, Evans GO, and Sommer H (eds). Cambridge: Cambridge University Press, p. 117-150, 1988.
- FIUZA, L. M. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos. **Biociência e Desenvolvimento**. v.32, p.84-89, 2004.
- FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p.499-502, 1972.
- GARCIA G. E.; ALMEIDA, W. Exposição dos trabalhadores rurais aos agrotóxicos no Brasil / Rural worker exposure to pesticides in Brazil. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v.19, n.72, p.7-11, 1991.
- HAYASHI, S. Y.; ROHANI, M.; LINDHOLM, B.; BRODIN, L. A.; LIND, B.; BARANY, P. Left ventricular function in patients with chronic kidney disease evaluated by colour tissue Doppler velocity imaging. **Nephrol Dial Transplant**. v. 21, p. 125-132, 2006
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews**. v.53, p.242-255, 1989.
- KILIÇ, A.; AKAY, M. T. A three generation study with genetically modified Bt corn in rats: Biochemical and histopathological investigation. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.1164-1170, 2008.

LEMOS, A. J. J. M.; SIQUEIRA, H. A. A.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; MAIA, F. C. L.; TEIXEIRA, A. A. C.; SILVA, E. J.; OLIVEIRA, J. V. Effect of sub-lethal doses of *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai and deltamethrin with regard to fertility and organ toxicity in pregnant albino rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.65, n.5, p.489-495, 2012.

LIU, Y. W.; SU, C. T.; HUANG, Y. Y.; YANG, C. S.; HUANG, J. W.; YANG, M. T. Left ventricular systolic strain in chronic kidney disease and hemodialysis patients. **Am J Nephrol**. v. 33, p. 84-90, 2011.

MOREIRA, J. C. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo. **CiênciaSaúdeColetiva**. v.7, n.2, p.229-311, 2002.

ONOSE, J.; IMAI, T.; HASUMURA, M.; UEDA, M.; OZEKI, Y.; HIROSE, M. Evaluation of subchronic toxicity of dietary administered Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* var. *Kurustaki* HD-1 in F344 male rats with chemically induced gastrointestinal impairment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 5, p. 2184-2189, 2008.

PENG, D.; CHEN, S.; RUAN, L.; LI, L.; YU, Z.; SUN, M. Safety assessment of transgenic *Bacillus thuringiensis* with VIP insecticidal protein gene by feeding study. **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, p. 1179-1185, 2007.

SANTOS, N. S.; DRAIBE, S. A.; KAMIMURA, M. A.; CUPPARI, L. Albumina séria como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **The Brazilian Journal of Nutrition.**, v. 13, n. 3, p. 339-349, 2004.

SCHMUCKER, D.L.Hepatocyte fine structure during maturation and senescence. **Journal of Electron Microscopy Technique**, v.14, p. 106–125, 1990.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J.; LERECULUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.; DEAN, D. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.775-806, 1998.

SCHRØDER, M.; POULSEN, M.; WILCKES, A.; KROGHSBO, S.; MILLER, A.; FRENZEL, T.; DANIER, J.; RYCHLIK, M.; EMAMI, K.; GATEHOUSE, A.; SHU, Q.; ENGEL, K. H.; ALTOSAAR, I.; KNUDSEN, I. A 90-day safety study of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein (*Bacillus thuringiensis* toxin) in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 339–349, 2007.

SÉRALINI, G. E.; CELLIER, D.; VENDEMOIS, J. S. New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 42, n. 4, p. 596-602, 2007

SHABAN, N. Z.; HELMY, M. H.; EL-KERSH, M. A. R.; MAHMOUD, B. F. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin on hepatic lipid peroxidation and free-radical scavengers in rats given alpha-tocopherol or acetylsalicylate. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 135, p. 405-414, 2003.

SHIMADA, N.; MIYAMOTO, K.; KANDA, K., MURATA, H. Binding of Cry1Ab toxin, a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin, to proteins of the bovine intestinal epithelial cell: An *in vitro* study. **Applied Entomology and zoology**. v. 41, n. 2, p. 295-301, 2006

SHINDE S, CHIVATE N, KULKARNI P, NAIKWADE N. Hypolipidemic activity of psidiumguajavalinn leaves extracts in hyperlipidemic rats. **InternationalJournalofPharmacyandPharmaceuticalSciences**, v. 5, p. 70-72, 2013.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função renal e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, V. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A. H.; BERTOLAMI, M. C. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose

da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 88, ed. 1, p. 2-19, 2007.

WANER T.; NYSKA A.; CHEN, R. Population distribution profiles of the activities of blood alanine and aspartate aminotransferase in the normal F344 inbred rat by age and sex. **Laboratory Animals**. v. 25, p. 263–271, 1991.

WANG, Z.; WANG, Y.; CUI, H.; XIA, Y.; ALTOSAAR, I.; SHU, Q. Toxicological evaluation of transgenic rice flour with a synthetic cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.82, p. 738–744, 2002.

ZUHAIR, Y.; SAHHAF, A.; Toxicity of sumithion in albino rats: hematological and biochemical studies. **Journal of Applied Sciences**. v. 6, n. 6, p. 2959-2962, 2006.

Tabela 1. Média \pm desvio padrão do peso das ratas dos grupos experimentais.

Grupos	I	II	III	IV
20 Dias				
Peso (g)	283,0 \pm 2,12 a	261,4 \pm 8,26 bc	270,8 \pm 6,76 b	257,2 \pm 6,90 c
30 Dias				
Peso (g)	283,2 \pm 2,04 a	264,0 \pm 5,65 bc	272,2 \pm 6,64 b	260,8 \pm 6,14 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

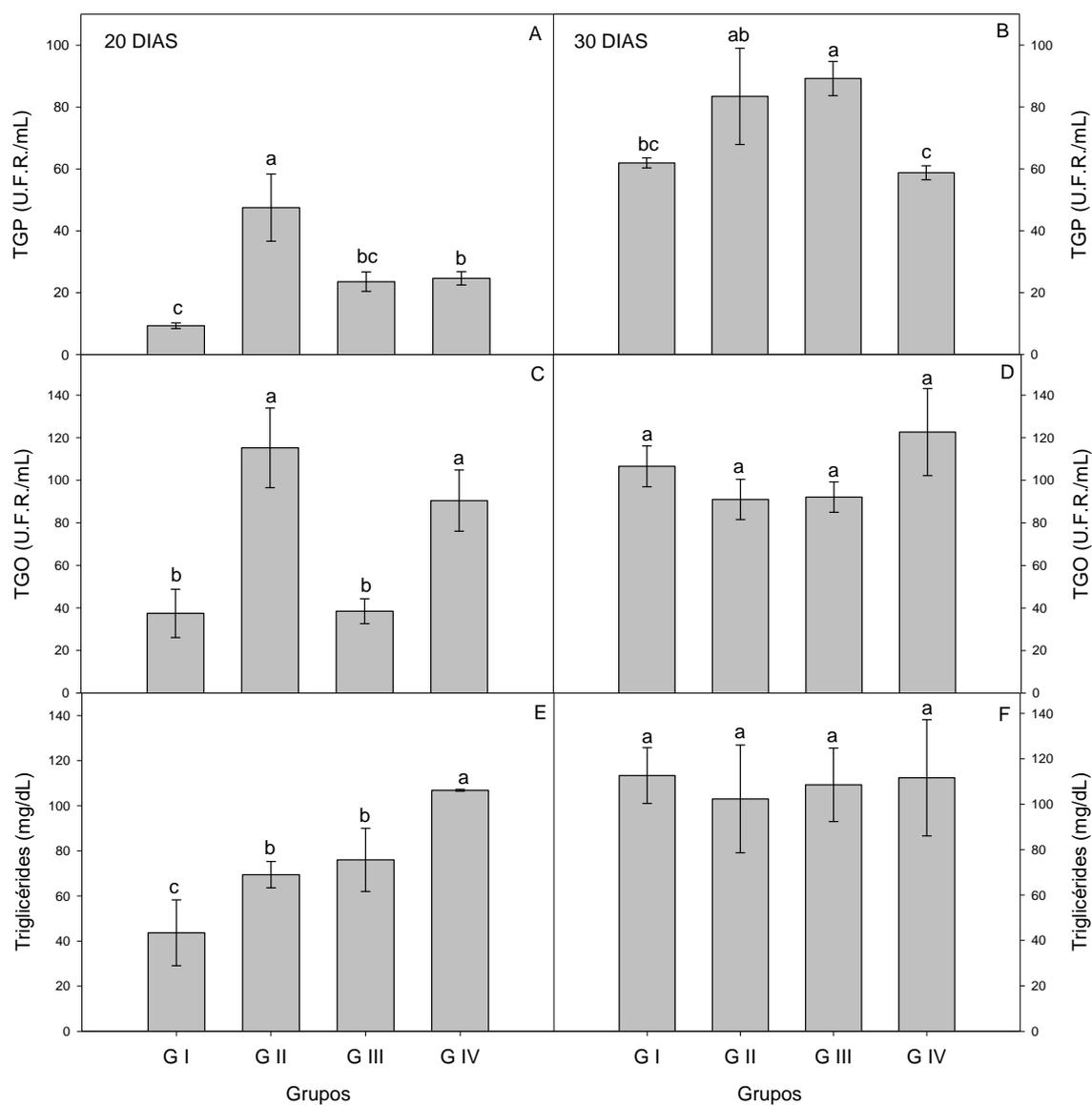


Figura 1: Valores dos níveis bioquímicos de função hepática. A - TGP (ALT) (U.F.R./mL) aos 20 dias; B - TGP (ALT) (U.F.R./mL) aos 30 dias; C – TGO (AST) (U.F.R./mL) aos 20dias; D – TGO (AST) (U.F.R./mL) aos 30 dias; E - triglicerídeos (mg/dL) aos 20 dias; F – triglicerídeos (mg/dL) aos 30 dias. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

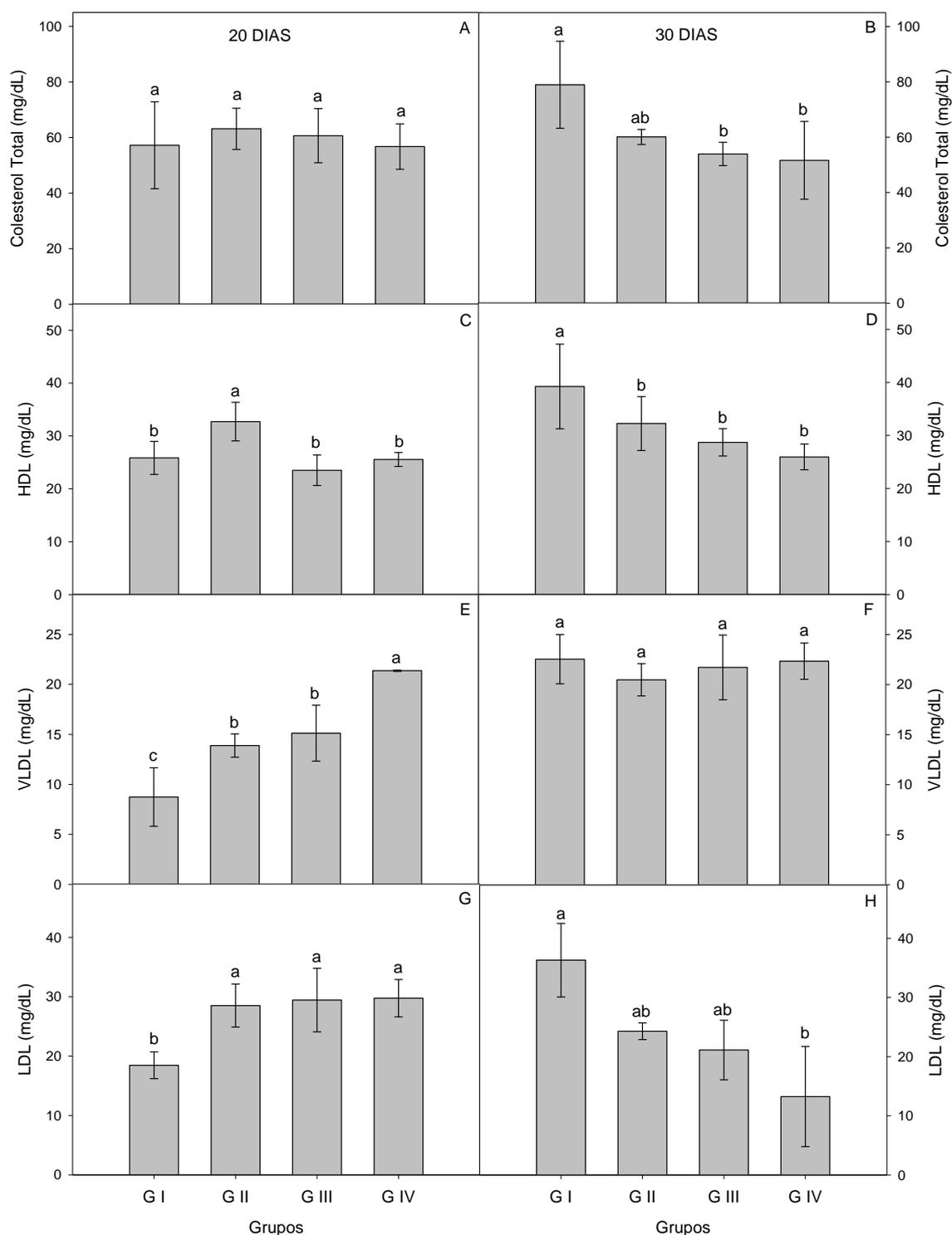


Figura 2: Valores dos níveis bioquímicos de função hepática. A - colesterol total (mg/dL) aos 20 dias; B - colesterol total (mg/dL) aos 30 dias; C – HDL (mg/dL) aos 20 dias; D – HDL (mg/dL) aos 30 dias; E – VLDL (mg/dL) aos 20 dias; F – VLDL (mg/dL) aos 30 dias; G – LDL (mg/dL) aos 20 dias; H – LDL aos 30 dias. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

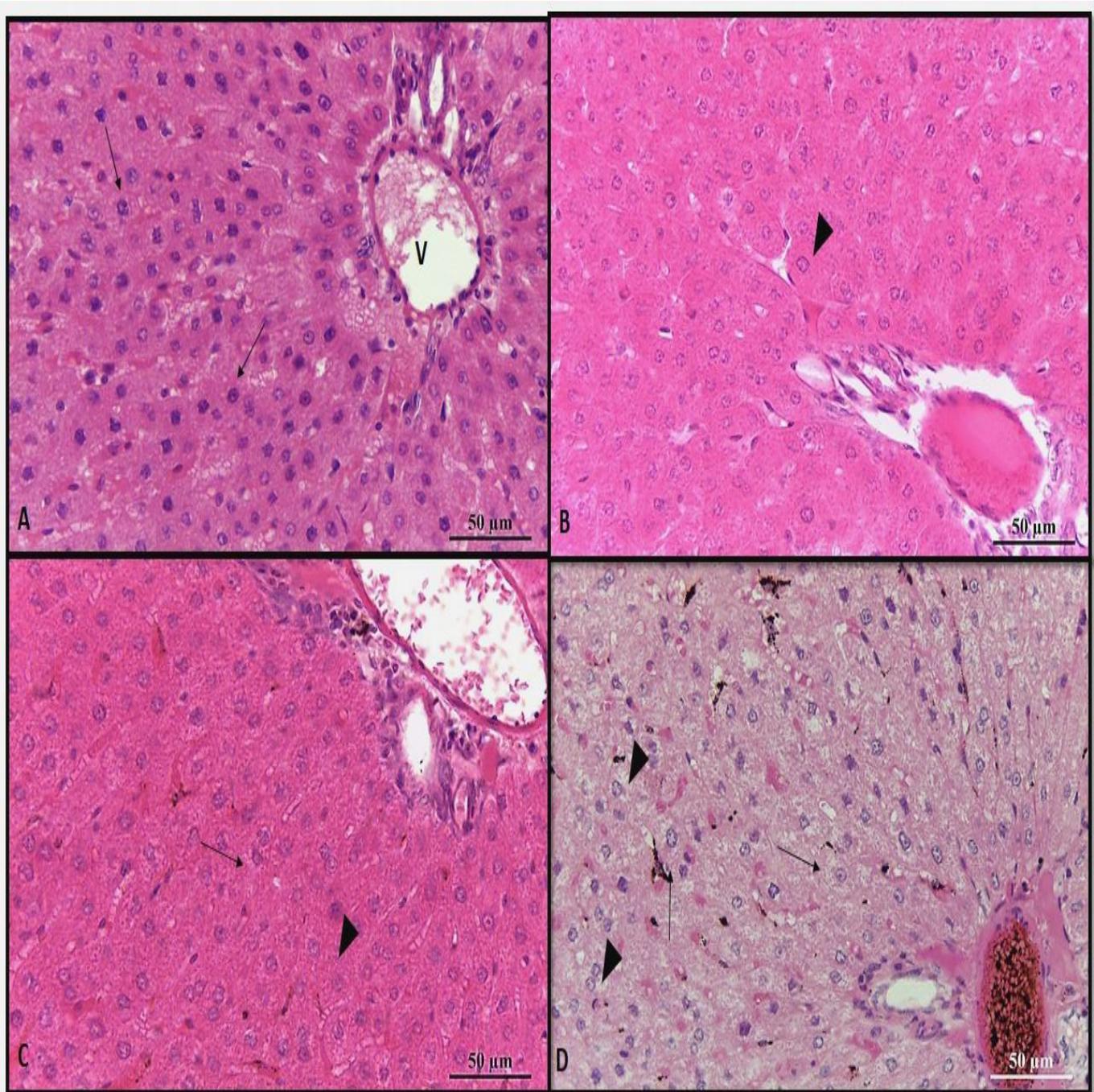


Figura 3: Fígado das ratas dos grupos experimentais. A) G I (Controle). Parênquima hepático bem preservado. Observar hepatócito (seta) e veia centro lobular (V). B) G II (1 mg de Xentari[®]/g), C) G III (10 mg de Xentari[®]/g) e D) G IV (20 mg de Xentari[®]/g), notar tumefação celular (seta) e vacuolização (ponta de seta). Coloração H.E.

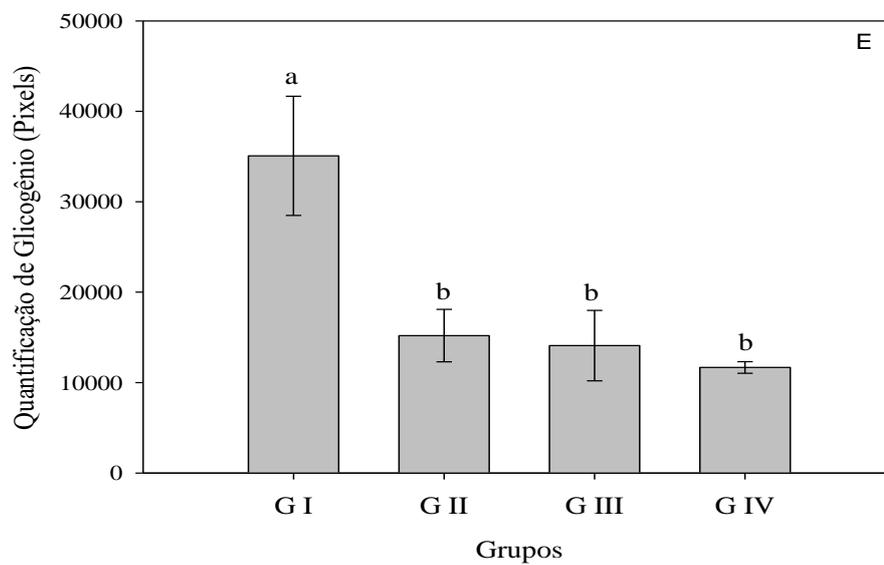
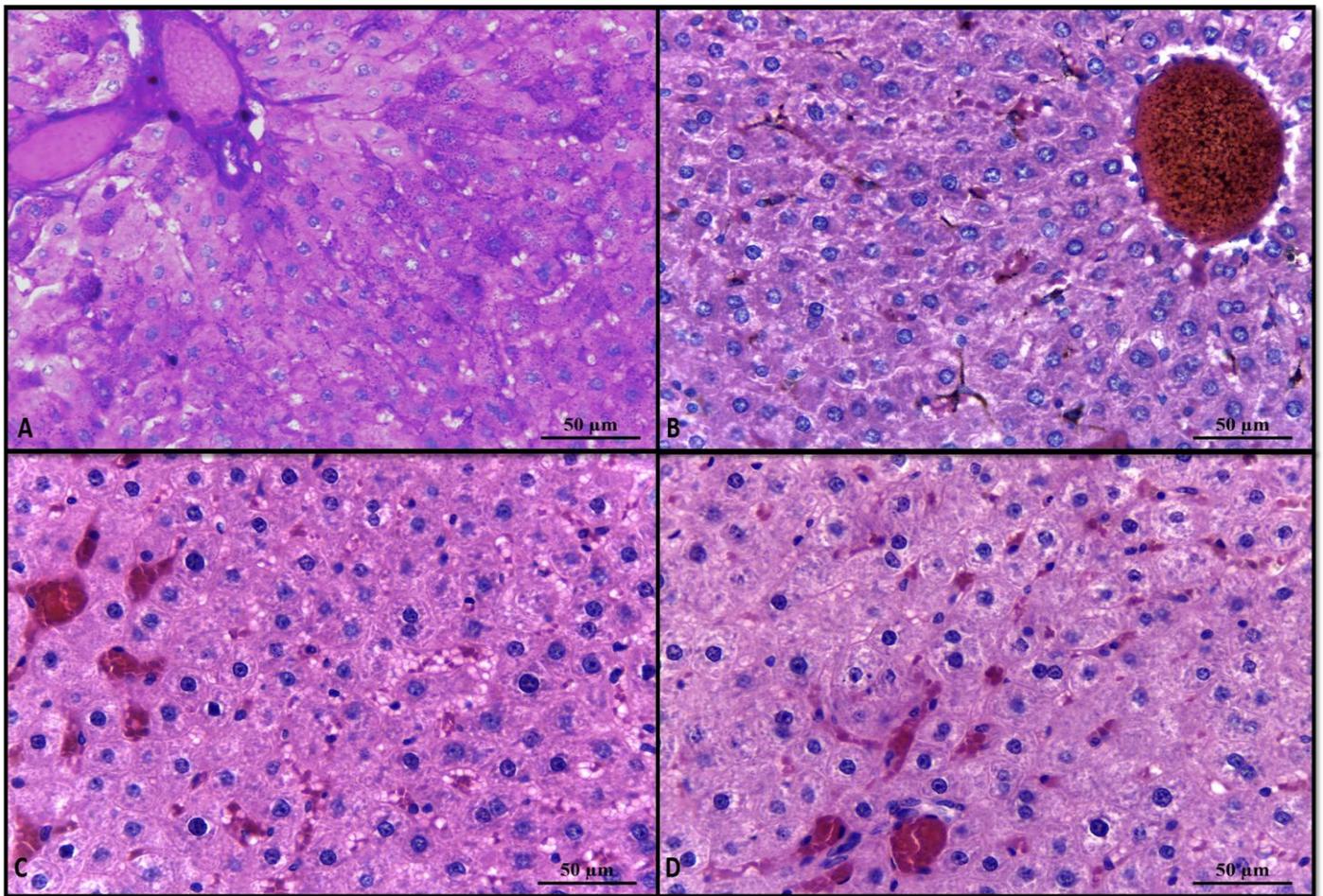


Figura 4: Fígado das ratas dos grupos experimentais. Coloração P.A.S. A) G I (Controle). Observar reação intensa nos hepatócitos. B) G II (1 mg de Xentari[®]/g), C) G III (10 mg de Xentari[®]/g), e D) G IV (20 mg de Xentari[®]/g). Observar fraca reação nos hepatócitos. E) Quantificação do glicogênio pela coloração do P.A.S expresso em pixels. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2. Média \pm desvio padrão do percentual das células do parênquima lobular e não lobular do fígado de ratas dos grupos experimentais.

Grupos	I	II	III	IV
20 Dias				
Hepatócito	45,20 \pm 7,66 a	43,80 \pm 5,90 a	48,06 \pm 3,63 a	42,73 \pm 3,12 a
Sinusóide	16,80 \pm 6,87 a	7,00 \pm 1,5 b	5,53 \pm 0,75 b	5,06 \pm 0,61 b
Ducto Bilífero	0,00 \pm 0 a	0,00 \pm 0 a	0,00 \pm 0 a	0,00 \pm 0 a
Espaço Porta	0,00 \pm 0 a	0,00 \pm 0 a	0,00 \pm 0 a	0,00 \pm 0 a
Veia Hepática	0,20 \pm 0,34 a	0,53 \pm 0,50 a	0,33 \pm 0,57 a	0,00 \pm 0 a
Veia Centro Lobular	0,06 \pm 0,11 a	0,13 \pm 0,23 a	0,00 \pm 0 a	0,00 \pm 0 a
30 Dias				
Hepatócito	52,20 \pm 6,12 a	43,53 \pm 10,00 a	59,33 \pm 2,02 a	58,06 \pm 5,74 a
Sinusóide	3,80 \pm 0,34ab	4,60 \pm 0,34 a	3,66 \pm 0,11bc	2,86 \pm 0,5 c
Ducto Bilífero	0,06 \pm 0,11 a	0,06 \pm 0,11 a	0,13 \pm 0,11 a	0,00 \pm 0 a
Espaço Porta	0,26 \pm 0,46 a	0,00 \pm 0 a	1,80 \pm 0,87 a	0,86 \pm 1,5 a
Veia Hepática	0,00 \pm 0 a	0,00 \pm 0 a	1,13 \pm 1,02 a	2,06 \pm 0 a
Veia Centro Lobular	0,40 \pm 0,69 a	0,60 \pm 0,69 a	0,60 \pm 0,52 a	0,40 \pm 0,69 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

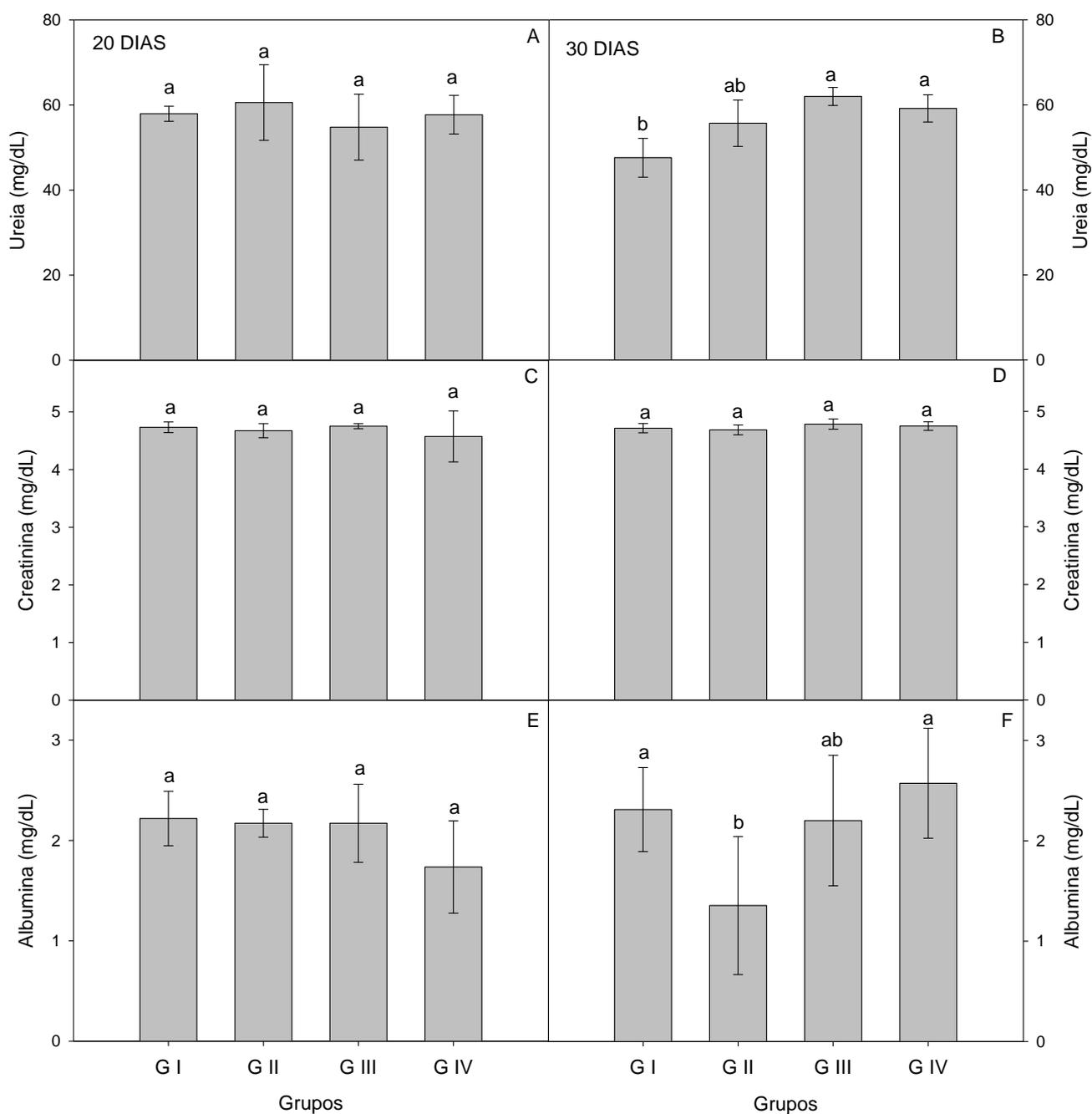


Figura 5: Valores dos níveis bioquímicos de função renal. A) ureia (mg/dL) aos 20 dias; B) ureia (mg/dL) aos 30 dias; C) creatinina (mg/dL) aos 20 dias; D) creatinina (mg/dL) aos 30 dias; E) albumina (mg/dL) aos 20 dias; F) albumina (mg/dL) aos 30 dias. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

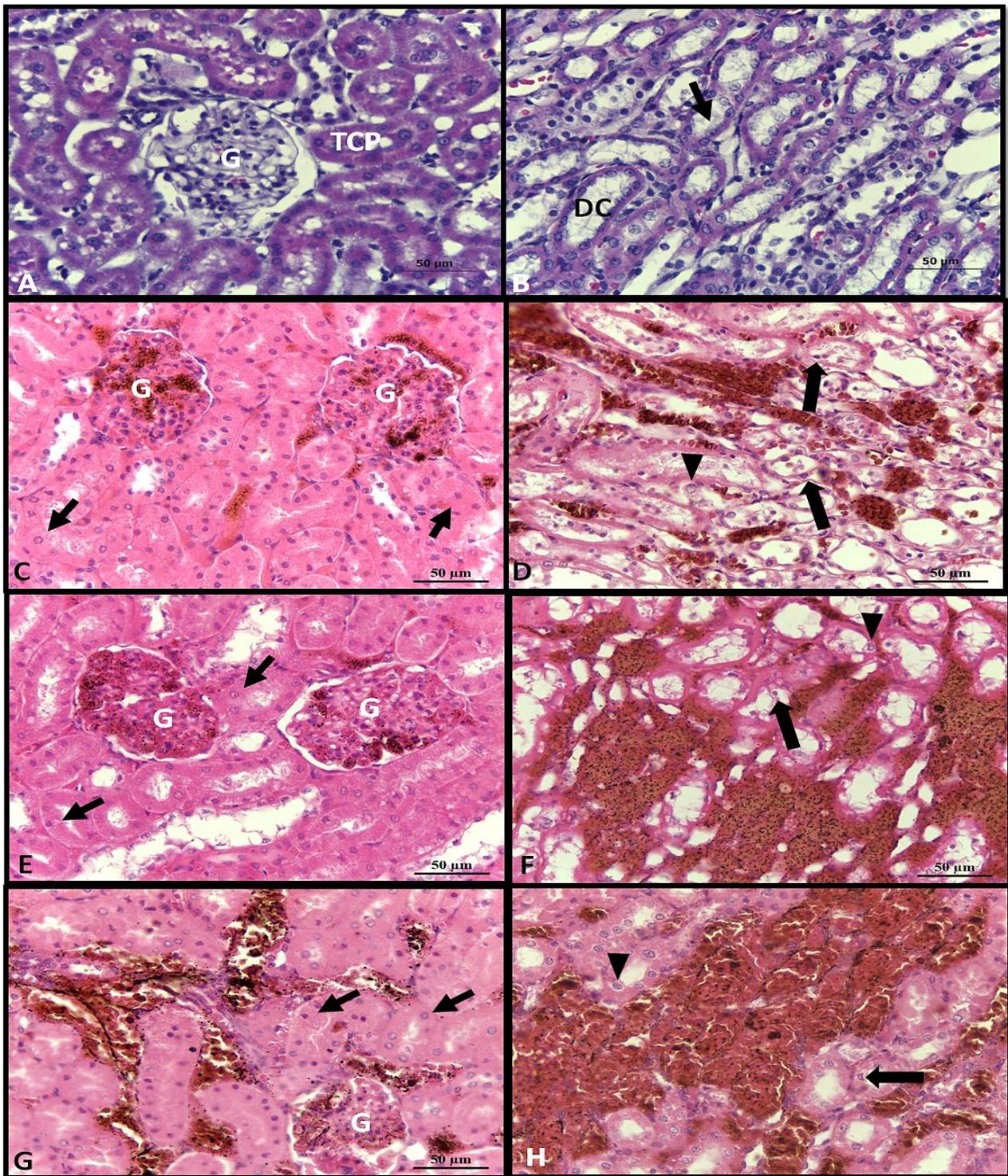


Figura 6: Rim das ratas dos grupos experimentais. A e B) GI (Controle). Regiões cortical e medular, respectivamente bem preservadas. Observar: Túbulo contorcido proximal (TCP), glomérulo (G), ducto coletor (DC), células do ducto coletor (seta). Em C (GII 1 mg/100), E (GIII 10 mg/100) e G (GIV 20 mg/100) notar tumefação na célula do túbulo contorcido proximal (seta) na região cortical. Em D (GII 1 mg/100), F (GIII 10 mg/100) e H (GIV 20 mg/100) evidenciar núcleo picnótico (seta longa) e vacuolização celular (ponta de seta) na região medular. Coloração H.E

Tabela 3. Média \pm desvio padrão do diâmetro do glomerular (DG), volume do glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins das ratas administradas com Xentari durante 20 e 30 dias.

Grupos	I	II	III	IV	P
20 Dias					
DG (μm)	167,19 \pm 11,34a	144,09 \pm 10,22b	139,51 \pm 14,34b	137,99 \pm 12,45b	0,0154
VG (μm^3)	1470127,34 \pm 150161a	1104799,88 \pm 100729b	1002150,00 \pm 1143535b	1040441,72 \pm 106956b	0,0435
DCB (μm)	169,19 \pm 12,11a	168,17 \pm 14,05a	168,49 \pm 12,96a	167,33 \pm 13,75a	0,7130
VCB (μm^3)	122410,46 \pm 21114a	142482,34 \pm 25712a	14565,82 \pm 24613a	116482,34 \pm 27745a	0,3017
30 Dias					
DG (μm)	160,47 \pm 10,17a	136,26 \pm 11,69b	129,37 \pm 14,08b	131,78 \pm 13,23b	0,0012
VG (μm^3)	17017,25 \pm 10236a	89332,05 \pm 1007b	8560,16 \pm 1133b	8754,79 \pm 1044b	0,0098
DCB (μm)	174,48 \pm 14,11a	171,30 \pm 11,74a	168,06 \pm 13,57a	178,47 \pm 10,60a	0,2217
VCB (μm^3)	17017,25 \pm 222641a	16714,59 \pm 44897a	17635,93 \pm 371348a	18122,46 \pm 387336a	0,5045

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).