

## JOCIMAR DE SOUZA

### AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO PROBIÓTICO *Lactobacillus rhamnosus* GG CONTRA OS EFEITOS TÓXICOS *IN VITRO* E *IN VIVO* CAUSADOS PELO CLORPIRIFÓS

#### RESUMO

Estima-se que até 2050 a população mundial chegará a nove bilhões de pessoas e que as mudanças climáticas causarão escassez de água e diminuição no rendimento das culturas mais importantes, impactando a produção, principalmente em países emergentes. O aumento da produção de alimentos demanda no aumento de uso de fertilizantes e pesticidas. Esses últimos causam vários distúrbios sobre a vida em geral, afetando a fauna e flora. Além do impacto ambiental, os pesticidas também são encontrados nos alimentos e águas, aumentando as vias de exposição e acumulação nos organismos vivos. Tem-se postulado o uso de microrganismos, como os lactobacilos, para desintoxicar ambientes contaminados com pesticidas. Neste trabalho avaliou-se a eficácia do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG, obtido comercialmente, contra os efeitos tóxicos *in vitro* e *in vivo* causados pela exposição aguda e crônica ao pesticida organofosforado clorpirifós (P) em ratos. O desenho do estudo classifica-se em experimental *in vitro* e, *in vivo* com animais, aprovado pelo CEUA (Protocolo 174/2020). *In vitro*: realizou-se a extração do composto ativo do produto comercial Pyrinex® 480 EC e comparou-se com o padrão Sigma através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), seguidos de aferição da capacidade inibitória *in vitro* da colinesterase plasmática; realizaram-se ensaios de viabilidade com o probiótico para posterior estudo de mutagenicidade da mistura (probiótico + praguicida), através do teste de Ames em cepas de *Salmonella* Typhimurium TA97a, TA98, TA100 e TA102, com ativação metabólica. *In vivo*: estudo piloto de exposição aguda com administrações orais em ratos via gavagem de 5,4 mg/kg/peso corporal (pc) e 15 mg/kg/pc de P dissolvido em azeite de milho, seguido de coleta de sangue em animais eutanasiados após 3 h (n=3) e após 24 h (n=3) para posterior dosagem de colinesterase; estudo de exposição crônica da concentração eleita de P (15 mg/kg/pc) durante 90 dias e tratados com probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG em salina, igualmente via gavagem, comparativamente aos grupos controles (salina, probiótico e pesticida). Findo o período, os animais foram eutanasiados para a coleta das amostras biológicas e análises clínicas. Os resultados *in vitro* mostraram que o procedimento adotado para a extração de P de produto comercial foi eficiente, comparado ao padrão Sigma, e que ambos inibem a enzima colinesterase quando adicionados intencionalmente em amostras de soro,

com diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle. O procedimento de viabilidade foi efetivo e confirmou a presença da bactéria nas cápsulas. A toxicidade descendente de 20 mg/placa de P foi detectada nas cepas TA102, TA100 e TA97a e não na TA98. Quando incubado com probiótico, o pesticida foi mutagênico. Encontrou-se pela primeira vez a mutagenicidade *in vitro* do P, por mecanismos não esclarecidos. O probiótico mostrou-se atuante em modelo animal de forma sistêmica diminuindo a toxicidade do clorpirifós e causando a proteção na performance neuromotora (com diminuição de 5,46% e 34,79% nos grupos teste e praguicida, respectivamente), mas não sobre a colinesterase plasmática (com atividades enzimáticas de 328 U/L e 123 U/L nos grupos teste e praguicida, respectivamente), possivelmente pelas localizações e diferenças entre a acetilcolinesterase e colinesterase. Com esses dados o uso de bactérias probióticas para a redução dos níveis de organofosforados em alimentos é promissora, pois em modelo animal reduz sinais clínicos de intoxicação por este praguicida.

**Palavras-chave:** Acetilcolinesterase. Colinesterase. Organofosforado. Probiótico. *Salmonella/microssoma*.

## **ABSTRACT**

It is estimated that by 2050, the world population will reach nine billion people and that climate change will cause water scarcity and decrease in the yield of the most important crops, affecting production, especially in emerging countries. The increase in food production demands an increase in the use of fertilizers and pesticides. The latter cause various disturbances on life in general, affecting the fauna and flora. In addition to the environmental impact, pesticides are also found in food and water, increasing exposure pathways and accumulation in living organisms. It has been postulated the use of microorganisms, as lactobacilli, to detoxify environments contaminated with pesticides. In this work, the efficacy of the commercially obtained probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG against the *in vitro* and *in vivo* toxic effects caused by acute and chronic exposure to the organophosphate pesticide chlorpyrifos (P) in rats was evaluated. The study design is classified as experimental *in vitro* and *in vivo* with animals, approved by CEUA (Protocol 174/2020). *In vitro*: the active compound was extracted from the commercial product Pyrinex® 480 EC and compared with the Sigma standard using Thin Layer Chromatography (TLC), followed by measurement of the *in vitro* inhibitory capacity of plasma cholinesterase; viability assays were performed with the probiotic for further study of the mutagenicity of the mixture (probiotic + pesticide), through the Ames test

on *Salmonella* Typhimurium strains TA97a, TA98, TA100 and TA102, with metabolic activation. *In vivo*: pilot study of acute exposure with oral administration in rats via gavage of 5.4 mg/kg/body weight (bw) and 15 mg/kg/bw of P dissolved in corn oil, followed by blood collection in animals euthanized after 3 h (n=3) and after 24 h (n=3) for further cholinesterase measurement; chronic exposure study of the chosen concentration of P (15 mg/kg/pc) for 90 days and treated with the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in saline equally via gavage, compared to the control groups (saline, probiotic and pesticide). At the end of the period, the animals were euthanized for the collection of biological samples and clinical analyses. The *in vitro* results showed that the procedure adopted for the extraction of P from commercial products was efficient, compared to the Sigma standard, and that both inhibit the cholinesterase enzyme when intentionally added to serum samples, with a statistically significant difference compared to the control. The viability procedure was effective and confirmed the presence of the bacteria in the capsules. Downward toxicity of 20 mg/plate of P was detected in strains TA102, TA100 and TA97a and not in TA98. When incubated with probiotic, the pesticide was mutagenic. It was found, for the first time the *in vitro* mutagenicity of P, through unclear mechanisms. The probiotic was shown to be active in an animal model in a systemic way, decreasing the toxicity of chlorpyrifos and causing protection in neuromotor performance (with a decrease of 5.46% and 34.79% in the test and pesticide groups, respectively), but not on plasma cholinesterase (with enzymatic activities of 328 U/L and 123 U/L in the test and pesticide groups, respectively), possibly due to the locations and differences between acetylcholinesterase and cholinesterase. With these data, the use of probiotic bacteria to reduce the levels of organophosphates in foods is promising, as in an animal model it reduces clinical signs of intoxication for this pesticide.

**Keywords:** Acetylcholinesterase. Cholinesterase. Organophosphate. Probiotic. *Salmonella*/microsome.