

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE DE PRAGAS*

Elizabeth A. Baptista De Nardo
EMBRAPA - CNPMA
Jaguariúna - São Paulo



INTRODUÇÃO

A concessão de registro comercial de produtos fitossanitários contendo agentes microbianos de controle de pragas (AMCs), os biopesticidas, pelos órgãos federais registrantes está sujeita à prévia apresentação de dados que indiquem conclusivamente que o produto, quando usado de acordo com as prescrições, não causará efeitos significativamente adversos a seres humanos ou ao ambiente. Esta avaliação dos riscos potenciais de um AMC é parte importante tanto no processo de desenvolvimento do produto como na sua regulamentação (registro comercial). Esse processo é necessário para assegurar que o agente microbiano a ser utilizado ofereça riscos mínimos ao ambiente e aos organismos não-visados.

No Brasil, os documentos básicos relativos ao registro de produtos fitossanitários contendo AMCs são regulamentações do Ministério da Agricultura - MA, Lei n.7.802, de 11/7/89 e Decreto n. 98.816, de 11/1/90 (Brasil, 1995) e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (Portaria 131 de 3/11/97) (Brasil, 1997), esta última específica para o registro de biopesticidas para uso em florestas e ecossistemas hídricos. No âmbito da região do Cone Sul também existe uma regulamentação harmonizada entre Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, a ser implementada na região a partir de janeiro de 1998 (COSAVE, 1997), bastante semelhante àquela aprovada pelo IBAMA, uma vez que a proposta aprovada no Cone Sul foi a apresentada pelo Brasil.

Como forma de defesa do ambiente e dos consumidores, compete aos órgãos públicos estabelecer os critérios para a avaliação de risco, dentro de normas específicas, compatíveis com os padrões internacionais que regulamentam o mesmo assunto. Estas normas devem levar em consideração as característi-

cas específicas dos produtos biológicos quanto a composição, forma de ação e comportamento no ambiente. Os testes de seguran-

ça geralmente exigidos incluem uma avaliação toxicológica em mamíferos e uma ecotoxicológica sobre organismos benéficos não-visados do ambiente, além de uma identificação completa do microrganismo e seu processamento e componentes da formulação.

Esse documento abordará apenas o processo de avaliação ecotoxicológica de biopesticidas sobre organismos benéficos não-visados.

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA SOBRE ORGANISMOS BENÉFICOS NÃO-VISADOS

O objetivo dessa avaliação é identificar os efeitos adversos potenciais ou riscos do AMC sobre organismos indicadores que representem os principais grupos de organismos não-visados do ambiente aquático e terrestre, com potencial de estarem expostos ao AMC.

Informações sobre o efeito dos AMCs em organismos não visados, devem ser obtidas independentemente do local de aplicação do pesticida biológico e do potencial aparente de exposição. Estes dados são necessários pois quando um microrganismo é aplicado como um pesticida, grandes quantidades deste não atingem o organismo alvo, espalhando-se para áreas adjacentes, devido à deriva ou pela disseminação natural. Desta forma, o número de organismos não visados expostos, o número de diferentes espécies expostas e o grau de exposição destes (nú-

*É co-autora deste trabalho Deise M.F. Capalbo

mero de microrganismos por organismo não visado) pode ser grande.

Patogenicidade e toxicidade são os maiores efeitos a serem avaliados com relação à exposição de organismos não visados a pesticidas microbianos. Estes testes ecotoxicológicos, no Brasil, estão esquematizados em protocolos de metodologias baseados em documentos similares elaborados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos da América, pela Organização dos países em Desenvolvimento (OECD, 1996), e pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 1996). De forma particular destacou-se o documento da EPA denominado "Subdivision M" (PESTICIDE, 1989) como base na elaboração dos Protocolos. O modelo utilizado considera o risco como uma função de dano e exposição. O dano refere-se às características intrínsecas do produto analisado quanto ao potencial de afetar organismos não-visados, enquanto que a exposição se refere à disponibilidade do produto no ambiente, após a aplicação, em uma forma capaz de afetar organismos não-visados.

Os testes ecotoxicológicos são divididos em quatro fases hierárquicas. Os testes da Fase I refletem a máxima chance de dano. Resultados negativos indicam um alto grau de confiança de que efeitos adversos não desejáveis não deverão ocorrer com o uso do AMC. Se efeitos adversos inaceitáveis forem identificados na Fase I, então os testes da Fase II serão realizados para quantificar níveis do AMC aos quais as espécies não visadas suscetíveis possam ser expostas. Nesta fase se trabalha com o AMC isoladamente, tentando verificar a sobrevivência, persistência e multiplicação no ambiente terrestre. Testes da Fase II podem também ser exigidos de acordo com a avaliação caso-a-caso para certos AMCs que representam preocupações especiais. Por outro lado, dados conclusivos da Fase II mostrando que o AMC não sobrevive, replica ou persiste no ambiente em que é utilizado, podem ser submetidos para se solicitar isenção de alguns ou todos os testes requisitados da Fase I.

Se for determinado pelos testes da Fase II, que o AMC persiste ou sobrevive no ambiente a níveis significativos, estudos da Fase III devem ser conduzidos para mostrar efeitos de exposição crônica em organismos terrestres ou aquáticos. Se os dados ob-

tidos naquela Fase ainda indicarem a ocorrência de problemas, então estudos da Fase IV (testes simulados ou reais de campo) seriam solicitados para verificar a existência de problemas sob condições reais de uso (Quadro 1).

Com os resultados obtidos nos testes das diferentes Fases descritas a seguir, é possível detectar se ocorrerá ou não algum risco sobre organismos benéficos não-visados e qual organismo poderá ser afetado pelo uso do biopesticida a ser registrado.

A ESCOLHA DE ORGANISMOS INDICADORES

Os organismos utilizados como indicadores de efeitos adversos para AMCs são geralmente os mesmos utilizados para os testes ecotoxicológicos com pesticidas químicos.

Organismos-indicadores, quando possível, devem ser espécies representativas da região geográfica ou ecossistema onde o AMC será aplicado, principalmente espécies que mais provavelmente irão estar expostas ou se alimentar dos organismos visados quando esses estiverem infectados ou mortos.

Para fins práticos, entretanto, muitas vezes a escolha de indicadores biológicos é baseada na facilidade de criação, reprodução artificial, manutenção e manipulação em condições de laboratório.

Os organismos-indicadores representantes do ambiente terrestre utilizados para avaliação do AMC incluem artrópodes benéficos, plantas e aves, e do ambiente aquático incluem peixes, invertebrados e algas.

A necessidade de realizar testes com os diferentes organismos pode variar com o tipo de AMC a ser registrado, sua forma de uso e modo de ação. Aos órgãos de registro cabe definir os testes necessários, caso-a-caso.

AMBIENTE TERRESTRE

Aves

A codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) tem sido utilizada como espécie indicadora em protocolos internacionais e tem demonstrado sensibilidade a efeitos produzidos por produtos químicos,

Quadro 1 - Testes toxicopatológicos com organismos benéficos não-visados e comportamento ambiental do agente microbiano de controle de pragas.
Testes da Fase I. Patogenicidade/Toxicidade
Oral para aves Inalação para aves Dieta para peixes de água doce Dieta para invertebrados de água doce Animais de estuários e marinhos Plantas não visadas Artrópodes não visados (predadores/parasitóides) Abelhas
Testes da Fase II
(somente exigida se forem detectados efeitos adversos significativos na Fase I)
Comportamento do AMC no ambiente terrestre Comportamento do AMC em água doce ou de estuário/mar
Testes da Fase III
(somente exigida se for detectada a sobrevivência ou a multiplicação do AMC na Fase II)
Patogenicidade crônica e reprodução em aves Especificidade a invertebrados aquáticos Estudos do ciclo biológico de peixes e perturbação do ecossistema aquático Plantas não-visadas Insetos benéficos
Testes da Fase IV
(somente exigida se forem detectados efeitos adversos significativos na Fase III ou após registro, como um monitoramento)
Testes de campo simulado ou real para: aves organismos aquáticos insetos benéficos

além de ser uma boa espécie para laboratório, com a qual já se tem reunido um grande número de dados básicos (LYNCH, 1995). Também a galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) tem sido utilizada, apresentando as mesmas propriedades descritas para a codorna.

Artrópodes

No geral, devem ser testadas três espécies de artrópodes benéficos, representando pelo menos dois dos seguintes grupos: dípteros parasitas, hemípteros predadores, coleópteros predadores, ácaros predadores, neurópteros predadores e himenópteros parasitas. Também devem ser conduzidos testes com abelhas (*Apis mellifera*) e, se possível, com as nativas do Brasil, sem ferrão. A escolha das espécies testadas deverá ser justificada pelo solicitante.

Plantas

No caso das plantas não-visadas, a realização dos testes dependerá principalmente da relação que o AMC tenha com fitopatógenos. Aqueles que são semelhantes ou tenham relação com patógenos de plantas, com uma gama de hospedeiros restritos, deverão ser testados apenas com plantas desse mesmo grupo de hospedeiros. No caso do AMC ter uma ampla gama de hospedeiros pode haver necessidade de testes mais extensivos com um número maior de plantas. Outros fatores que contribuem na escolha das plantas testadas são: forma de ação do agente microbiano, disseminação e persistência no ambiente. No caso de AMCs para uso como herbicida, os testes exigidos envolvem um grande número de espécies de plantas de importância econômica, ecológica e social (NARDO *et al.*, 1997).

AMBIENTE AQUÁTICO

Para AMC's de uso terrestre, onde a exposição aquática direta não é antecipada, uma espécie de peixe de água doce e uma espécie de invertebrado de água doce devem ser testados para avaliar a toxicidade e a patogenicidade. Para aqueles produtos aplicados diretamente em água doce, marinha ou de estuário, uma espécie adicional de peixe e outra de invertebrado devem ser testados na Fase I (JONSSON *et al.*, 1997).

No Brasil, os órgãos de regulamentação têm recomendado, para avaliação toxicológica de produtos químicos, as espécies de peixes autóctones pertencentes à família Characidae. Opcionalmente, podem ser utilizadas *Pimephales promelas* ou *Brachydanio perio* (família Cyprinidae) e *Poecilia reticulata* (família Poeciliidae).

No caso de invertebrados aquáticos, deve-se selecionar para teste, um organismo que seja filogeneticamente mais relacionado à praga-alvo. Portanto, quando se avaliar um AMC cuja praga-alvo seja um inseto, será mais apropriado a escolha de um inseto aquático como invertebrado aquático a ser testado.

O uso de *Daphnia*, um Cladocera, tem como vantagem o grande volume de informação já disponível, facilitando a análise dos resultados.

CONDIÇÕES GERAIS PARA A REALIZAÇÃO DOS TESTES

Principais Aspectos

I - Dose de Risco Máximo: diferentemente dos pesticidas químicos, cuja concentração geralmente decresce após a aplicação, os AMC's e toxinas associadas podem, pelo menos temporariamente, ter aumentada sua concentração no campo. Desta forma, a dose de risco máximo a ser utilizada na Fase I será baseada em um fator de segurança multiplicado pela quantidade máxima de ingrediente ativo (AMC ou sua toxina) que se espera estar disponível a organismos não-visados do ambiente. No geral utiliza-se de 10 a 100 vezes a dose recomendada na embalagem.

II - Determinação de um DL_{50} ou DI_{50} : o ponto final do estudo deve ser escolhido de forma a refletir

a atividade do AMC em teste. Assim, se for esperado que um AMC produza uma toxina, e apresente pouca ou nenhuma infectividade, o ponto final apropriado deve ser a morte do organismo teste. Se contudo, o principal mecanismo for patogenicidade, um ponto final mais apropriado deve ser o aparecimento de sintomas associados aos AMC's.

Seria muito difícil estabelecer-se valores específicos para CL_{50} , ED_{50} ou DL_{50} e intervalos de confiança de 95% para a maior parte dos AMC's cujo mecanismo de ação é a patogenicidade, tendo em vista que os resultados dos testes provavelmente não exibirão um padrão de resposta do tipo log-probit característico dos pesticidas químicos. Os dados dos testes devem mostrar que a DL_{50} oral definida como a dose necessária para matar 50% dos organismos testes, ou a DI_{50} , definida como a dose necessária para causar sintomatologia evidente em 50% dos organismos teste, é maior que a dose de máximo risco. Se a DL_{50} ou a DI_{50} é menor que a dose de máximo risco, a DL_{50} ou a DI_{50} definitiva e com limites de confiança precisa ser estabelecida; em muitos casos testes conduzidos com a dose de risco máximo são suficientes para avaliar os efeitos destes AMC's.

Os AMC's que produzem toxinas são os que mais provavelmente produzem um padrão de resposta log-probit. Assim, nestes casos várias doses serão necessárias para quantificar o risco destes organismos. Se nenhum efeito for demonstrado à dose de máximo risco, testes em doses mais baixas não serão necessários.

III- Vias de administração de máximo risco: as vias de administração são selecionadas e devem refletir as vias naturais de exposição e também as vias de penetração dos AMC's nos organismos. Estas vias: oral (gavage) ou respiratória para pássaros, exposições em alimentos e contato para artrópodes e peixes, podem simular o risco para organismos não visados no ambiente terrestre e aquático.

Para aves a administração via parenteral, como injeções intravenosa e intraperitoneal e para insetos a injeção na hemocele, forneceriam um alto grau de confiabilidade ao indicar que um AMC particular não causaria efeitos adversos quando os resultados dos testes forem negativos. Esta via, embora ambientalmente não realista, propicia uma possibilidade de máximo risco ao ultrapassar os mecanismos de defesa primária dos animais. Se esta via for utili-

zada, uma única administração é aceitável em lugar de múltiplas administrações orais. Por outro lado, considerando a complexidade e os componentes indefinidos das preparações de pesticidas microbianos (proteínas exógenas, subproduto metabólico e outros), e a natureza não realista da via de administração, os resultados positivos nem sempre indicam os efeitos reais sobre a espécie testada em condições de campo.

A combinação de vias de administração em um único teste pode ser possível. Isto seria recomendável e compatível com a filosofia de risco máximo, reduziria o período de teste e o custo. Entretanto, exposições combinadas podem traumatizar muito os animais testados, causando sua mortalidade, ou de alguma forma causando resultados não necessariamente relacionados com efeito do AMC.

IV. Idade dos animais teste: diferenças imunológicas e fisiológicas existem entre animais imaturos e maduros, sugerindo que animais imaturos são potencialmente mais susceptíveis à infecção, e possivelmente aos efeitos de qualquer toxina produzida pelo AMC. Desta forma, em cada teste da Fase I é indicada a idade dos animais a serem testados, sendo sempre recomendado o uso de animais imaturos.

V. Métodos para detecção dos AMCs: diferentemente dos testes de toxicidade, em que a mortalidade pode ser usualmente determinada por observação, os testes de infectividade freqüentemente requerem métodos sofisticados de avaliação para se detectar efeitos patogênicos subletais. Estes métodos podem incluir tecnologia sorológica e de ácido nucléico, porém normalmente o que se usa é a necropsia e no caso de aparecimento de sintomas, isolamento, plaqueamento e identificação do AMC são solicitados.

VI. Duração dos testes: a duração de cada teste da Fase I é de cerca de 30 dias. Este período é geralmente suficiente para permitir a incubação, infecção e manifestação de efeitos do AMC nos organismos-indicadores. No caso de espécies de difícil criação, a duração dos testes deverá ser ajustada adequadamente.

vel aos órgãos de regulamentação realizarem o processo da análise de risco do biopesticida.

A análise de risco é o processo final quando se faz um balanço entre os riscos e benefícios esperados pelo uso do produto. O objetivo de se considerar riscos na legislação é poder balancear o grau de risco a ser permitido, contra o custo de se reduzir o risco. Devem ser considerados os riscos de outros produtos alternativos e de outros métodos de controle disponíveis e até mesmo o risco de não se utilizar nenhum tipo de controle para a praga em questão. Os benefícios e riscos devem também ser analisados em termos de valores econômicos/sociais e ecológicos (SOLOMON, 1996). O fato de alguns riscos ecológicos serem aceitos se deve ao custo elevado para eliminar todos os riscos associados.

Medidas mitigadoras são propostas no sentido de gerenciar e reduzir os riscos, envolvendo procedimentos técnicos ou legislativos para restringir o uso do AMC, de maneira que a exposição a ele seja reduzida. No caso de procedimentos técnicos existem várias opções para reduzir os riscos que podem incluir: modificação da forma de produção do AMC (meio de cultivo ou da formulação); época de aplicação; tecnologia de aplicação; uso de protetores individuais e outros. Os procedimentos legislativos podem incluir: restrição de uso e de aplicação do produto, até a proibição total de seu uso e produção, também considerado um procedimento de mitigação.

Infelizmente, os danos associados aos AMCs, freqüentemente não são adequadamente identificados ou avaliados e o resultado da análise risco/benefício não é precisa (MADDOX, 1992).

No Brasil, estudos análise de risco e de segurança de biopesticidas é um assunto novo, havendo necessidade de um conhecimento mais profundo e treinamento por parte de todos os setores envolvidos no registro de biopesticidas para que o processo final de avaliação seja o mais adequado possível e que os produtos tenham seu uso seguro para o homem e ambiente.

O PROCESSO DA ANÁLISE DE RISCO

Com os resultados da avaliação ecotoxicológica e da toxicológica realizada com mamíferos, mais aqueles obtidos na análise geral do produto, é possível

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa e Inspeção

- Vegetal. *Legislação federal de agrotóxicos e afins*. Brasil, 1995. 120p.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal. IBAMA. Portaria Normativa nº 131 de 03 de novembro de 1997. *Diário Oficial da União*, Seção I, p. 20271-20273, 22 nov. 1997.
- COMITÉ DE SANIDAD VEGETAL DEL CONE SUR.GTP.CB. Requisitos para el registro de agentes de control biológico microbiano, productos técnicos microbianos y productos microbianos formulados. [S.l.: s.n], 1997. paginação irregular.
- FAO, Roma. Report of expert consultation on guidelines for the introduction of biological control agents and draft code of conduct for the import and release of biological control agents. Rome: FAO, 1996. 21p.
- JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N.; NARDO, E.A.B De; MORAES, G.J. de; OLIVEIRA, M.C.; FERREIRA, C.J.A.; CAPALBO, D.M.F. Protocolos de avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para fins de registro: uma proposta para os órgãos federais registrantes, v. 3, Testes toxicopatológicos em organismos não visados do ambiente aquático. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1997. No prelo.
- LYNCH, M.R. Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicology of pesticides. Brussels: Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 1995, 54p.
- MADDOX, J. V. The effects of regulations on the use of insect pathogens as biological control agents. In: CHARUDATTAN, R.; BROWNIAND, H.W., ed. Regulations and guidelines: critical issues in biological control. Gainesville: University of Florida - Institute of Food and Agricultural Sciences, 1992. p. 73-81.
- NARDO, E.A.B. De; MORAES, G.J. de; OLIVEIRA, M.C.B. de; CAPALBO, D.M.F.; SÁ, L.A.N. de; LENCIONE, F.; MAIA, A.H.N.; WATANABE, M.A.; JONSSON, C.M. Protocolo de Avaliação de Agentes Microbianos de Controle de Pragas para Registro. Uma proposta para os órgãos federais registrantes, v.4. Testes toxicopatológicos em organismos não visados do ambiente terrestres: aves, artrópodos benéficos, organismo de solo e plantas. Embrapa-CNPMA, 1997. No prelo.
- OECD Environment Monograph. - Data requirements for registration of biopesticides in OECD member countries, survey results. Paris: OECD, 1996.
- PESTICIDE TESTING GUIDELINES, SUBDIVISION M. 1989. U.S. Dept. of Commerce, National Technical Information Service nº PB89-211-676. Springfield, VA.
- SOLOMON, K.R. Ecotoxicological risk assessment of pesticides. Guelph: University of Guelph - Centre for Toxicology, 1996. 42p.