



AValiação Toxicopatológica de Biopesticidas - Fungos E Bactérias em Roedores por Via Oral

PRISCILA **BERNARDO**¹; CAMILA D. **SOARES**²; VERONICA J. DE **PAULA**³;
MARJORIE **GUIMARÃES**⁴; VERA L.S.S. **CASTRO**⁵.

Nº 12419

RESUMO

Fatores como infectividade, persistência e patogenicidade de biopesticidas em relação a organismos não alvo exigem estudos mais aprofundados e o estabelecimento de parâmetros para a análise de risco. Vários fungos e bactérias vêm sendo utilizados no controle de pragas agrícolas de diversas culturas. Os estudos toxicopatológicos a respeito do risco de um biopesticida são conduzidos com uma dose desafio que é maior do que aquela usada a campo. O trabalho tem como objetivo apresentar os resultados dos testes realizados no laboratório para os organismos avaliados. As linhagens testadas foram administradas em ratos, em suspensões de 10^8 esporos/ml pela via oral em 1,0 ml de suspensão. Foram utilizados três tratamentos para cada via: agente ativo, agente inativado e o veículo de administração do agente, como controle. Os animais foram observados diariamente, não havendo alterações clínicas ou quaisquer lesões em órgãos internos. Os animais foram também submetidos à necrópsia em intervalos sequenciais após a exposição na dependência do agente, com a retirada de fígado, rim, pulmão e fezes para verificar a presença do fungo nestes tecidos. Os órgãos, depois de pesados, foram homogeneizados, diluídos e plaqueados em meio BDA ou Nutrient Agar (NA). O protocolo utilizado se mostrou adequado para analisar a segurança de uso deste produto em relação a mamíferos.

¹Bolsista Embrapa: Graduação em Engenharia Ambiental, FAJ, Jaguariúna-SP. priscila.brdo@gmail.com

²Bolsista Embrapa: Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária, PUCC, Campinas-SP. camila.damiane@hotmail.com

³Bolsista Treinamento Técnico 3 Fapesp: Graduação em Ciências Biomédicas, Veris Metrocamp IBTA, Campinas-SP.

⁴Bolsista Embrapa: Graduação em Ciências Biomédicas, Veris Metrocamp IBTA, Campinas-SP.

⁵Orientadora: Pesquisadora, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP. castro@cnpma.embrapa.br



ABSTRACT

Factors such as infectivity, persistence and pathogenicity of biopesticides in relation to non-target organisms require further study and the establishment of parameters for risk analysis. Fungi and bacteria have been used to control agricultural pests in several crops. Toxicopathological risk studies of a biopesticide are driven by a challenge dose, which is higher than that used in the field. The paper aims to present the results of laboratory tests for the organisms evaluated. The strains tested were administered to rats, in suspensions of 10^8 spores/ml for oral administration in 1.0 ml of suspension. Three treatments were used for each via: the active agent, the inactivated agent and the vehicle of the agent administration as a control. The animals were daily observed, with no clinical changes and any injuries to internal organs. The animals were subjected to autopsy in sequential intervals after the exposure in dependence upon the agent, removing the liver, kidney, lung and faeces to verify the fungus presence in these tissues. The organs, after weighed, were homogenized, diluted and plated on BDA or Nutrient Agar (NA). The used protocol was adequate to analyze the safety use of this product relative to mammals.

INTRODUÇÃO

As áreas de exploração com agricultura e a pecuária têm apresentado diminuição da sustentabilidade dos recursos naturais.

Sustentabilidade na agricultura é uma direção a ser seguida, a política agrícola deve envolver ações que contribuam para isso. O interesse pelo uso de alternativas economicamente viáveis, e menos agressivas ao ambiente tem crescido consideravelmente de modo a favorecer a conservação e o uso sustentável dos recursos biológicos. Nesse sentido, o uso de microrganismos tem se mostrado uma prática efetiva e adequada tanto em relação ao controle de pragas (biopesticidas) como na conservação dos recursos biológicos e na recuperação de áreas poluídas e degradadas (biorremediação).

Além de sua eficácia, vários fatores atuam na demanda por esses produtos, tais como: a regulamentação de seu uso, a relação custo-benefício e o manejo adotado pelo agricultor com menor risco de toxicidade (Uri, 1999). Durante a década de 1990, ocorreu significativo incremento em relação ao número de produtos



biológicos avaliados no Brasil quanto à segurança ambiental visando ao registro para fins comerciais.

A grande maioria dos agentes microbianos usados como biopesticidas, uma vez que ocorrem naturalmente e geralmente são específicos (para a espécie-alvo), são supostamente seguros. Apesar disso, a avaliação de risco destes agentes tem crescido de importância.

Estes agentes biopesticidas, diferentemente dos químicos, podem sobreviver e reproduzir no ambiente, e infectar ou ocasionar doença em outros organismos vivos. Os agentes biológicos são caracterizados com relação aos riscos à saúde e segurança ambiental. Deste modo, os protocolos de teste são especificamente projetados para descobrir quaisquer características dos agentes biológicos.

Devido a isto, os protocolos experimentais a fim de determinar o potencial de efeitos prejudiciais para seres humanos e animais domésticos causados por estes agentes foram desenvolvidos em três vértices relativos aos efeitos patogênicos e tóxicos além do potencial de infectividade:

- (1) Patogenicidade dos agentes microbianos e de seus contaminantes.
- (2) Persistência não usual e/ou infectividade dos agentes microbianos e de seus contaminantes.
- (3) Toxicidade dos agentes microbianos, de seus contaminantes, e de subprodutos de preparação.

O uso de microrganismos, seus produtos ou metabolitos para o controle de organismos indesejáveis na agricultura tem se tornado cada vez mais comum em diversos países. (Castro *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2000). Estes produtos, na forma pura ou formulada, são normalmente conhecidos como AMCs (agente microbiano de controle). A concessão de registro de AMCs pelos órgãos federais registrantes, no Brasil, esta sujeita a previa apresentação de dados de análise de risco e impacto ambiental que indiquem conclusivamente caso a caso que o produto, quando usado de acordo com as prescrições, não causara efeitos adversos aos seres humanos ou ao ambiente. Este procedimento se aplica a todos os microrganismos de ocorrência natural e aqueles que são estirpes obtidas através de seleção por métodos convencionais. (Castro *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2000).

O atual esquema brasileiro de avaliação dos agentes microbianos foi adaptado da legislação internacional, seguindo o esquema de fases. Neste sistema, os organismos teste são submetidos na fase I a uma dose desafio do agente em uma bateria de

testes de curta duração, que oferece a máxima oportunidade para os efeitos negativos se expressarem. (Usepa 1999 a e b)

Nesta fase é recomendado testar uma dose de pelo menos 10^8 unidades do agente microbiano por animal teste, em volumes diferentes de acordo com a via de exposição. (Usepa 1999 a e b)

Caso seja encontrado um efeito significativo na fase I, então se procede aos testes da fase II e assim sucessivamente. Se houver evidencia de patogenicidade e/ou toxicidade, procede-se aos testes da fase seguinte ate um máximo de três fases para testes referentes à saúde humana em roedores.

No presente trabalho foram avaliados os efeitos decorrentes da exposição a agentes microbianos em mamíferos como sistema teste para avaliação de risco da introdução desses agentes microbiológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação da patogenicidade, infectividade e toxicologia ao agente microbiano em mamíferos foram realizadas baseadas em Usepa (1999 a e b) Castro et al. (1999) e Castro et al. (2000).

Para tanto foram utilizados roedores como sistema-teste em uma série de procedimentos descritos a seguir:

a) animais - ratos Wistar mantidos em condições ambientais padronizadas e alojados em gaiolas de polipropileno com cama de maravalha. Água e ração foram fornecidas a vontade durante todo o período dos procedimentos.

b) doses e tratamentos – o delineamento experimental foi administrado em suspensões de 10^8 células mL^{-1} . Foram utilizados três tratamentos por via oral: agente microbiano ativo, inativado e controle. Os agentes microbianos testados são apresentados na Tabela 1

TABELA 1 – Agentes microbianos usados como biopesticidas testados em ratos.

Espécie	Isolado
<i>Bacillus thuringiensis</i> , variedade <i>kurstaki</i>	CCT 3186
<i>Bacillus thuringiensis</i> , variedade <i>tolworti</i>	BTT 090.



<i>Beauveria bassiana</i>	IBCB 66
<i>Lecanicillium lecanii</i>	IBCB 619
<i>Bacillus pumillus</i>	
<i>Isaria (paecilomyces) fumosoroseus</i>	IBCB 638
<i>Isaria (paecilomyces) lilacinum</i>	IBCB 236

A tabela apresenta a relação dos agentes microbianos usados como biopesticidas, o experimento foi realizado laboratório para os organismos avaliados.

c) observação de sinais e sintomas nos animais - foram observados diariamente quanto ao aparecimento de alterações clínicas (pele e pêlo, olhos e mucosas, aparelho respiratório e sistema circulatório, sistema nervoso periférico e central), padrão comportamental e tempo de morte.

d) observação de patologias na necropsia - os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e necropsiados com observação macroscópica dos órgãos em diferentes intervalos após a administração da bactéria. A fim de estudar a sua infectividade, foram semeadas amostras de fígado, rim, pulmão e fezes em placas de Petri contendo Nutrient Agar (NA) ou DBA; seguida de incubação e contagem das colônias. O numero destes eventos foi suficiente para o estabelecimento do padrão de eliminação quando o microrganismo testado foi detectado em pelo menos dois intervalos diferentes (ex. 1 e 3 horas da exposição) e a seguir não mais (ex. 6 horas). Contudo, se o microrganismo e eliminado rapidamente do organismo, pode se tornar difícil estabelecer estes eventos totalizando no máximo 14 dias.

e) quantificação das colônias do agente microbiano - o material analisado foi pesado e homogeneizado e submetido a diluições seriadas. O número de colônias obtidas por placa é expresso como média de repetições e apresentado como unidades formadoras de colônias (ufc.mL⁻¹).

Os tecidos e/ou fluidos removidos assepticamente foram coletados e colocados em tubos estéreis com 9,0 ml de solução salina (0,9%). Os tubos foram então pesados e homogeneizados para proceder à quantificação do agente.

A cada nova amostra, a haste do homogeneizador de tecidos e os materiais cirúrgicos utilizados foram limpos com solução salina, seguida de solução de



hipoclorito a 2% e solução salina, esterilizada, em frascos distintos. O material sob análise, devidamente homogeneizado, e submetido a diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) foi plaqueado em meio de cultura apropriado, em triplicatas para cada diluição. As amostras plaqueadas foram incubadas por tempo e temperaturas adequadas para o crescimento do microrganismo em estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais não apresentaram alterações clínicas durante os experimentos, nem a necropsia detectou alterações quando da administração pela via utilizada.

Quantificação do microrganismo nas amostras biológicas: os agentes microbianos não foram encontrados nos tecidos testados com exceção da *Isaria lilacinum*. As colônias de *Isaria (paecilomyces) lilacinum* IBCB 236 nos órgãos e excretas analisados foram encontradas nos seguintes períodos após a exposição: 3 horas – foram encontradas colônias nas fezes em um rato macho e em duas fêmeas na diluição 10^{-1} ; 24 horas - foram encontradas colônias nas fezes em três ratos machos e em duas fêmeas nas diluições testadas 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-4} ; 48 horas - foram encontradas colônias nos pulmões de uma fêmea nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} .

Com a metodologia utilizada para a avaliação da possível toxicidade, patogenicidade e/ou infectividade decorrente da exposição ao agente microbiano em roedores foi possível proceder à quantificação temporal do microrganismo nos vários tecidos animais bem como a sua infectividade pela quantificação do número de colônias identificadas nas placas semeadas com amostras dos órgãos retirados durante a necropsia. Uma vez que após 24 horas da administração, as colônias da bactéria não são mais encontradas, pode-se supor que em mamíferos ao agente microbiano é rapidamente eliminado do organismo e que, portanto não persista e consequentemente não infecte os tecidos. Novos testes em ratos serão realizados buscando evidências a favor dessa hipótese. Além disso, não foram encontradas evidências de patogenicidade durante a necropsia dos animais. Esses fatos concordam com a observação clínica dos animais, que não demonstraram sinais e/ou sintomas de prejuízos à sua saúde. O fato de ter-se encontrado células da bactéria nos pulmões possivelmente é decorrente de contaminação durante a exposição por cânula pela via oral apesar de todos os procedimentos de desinfecção adotados durante a realização dos testes.



O monitoramento dos agentes microbianos quando liberados em campo é de fundamental importância para a avaliação do impacto destes sobre os demais organismos presentes na área tratada e o seu estudo do impacto em termos de segurança ambiental.

CONCLUSÃO

Os dados são interpretados levando em conta o declínio no número de colônias observado nos tecidos, e também considerando qualquer evidência que o agente microbiano se reproduz no animal-teste.

Contudo, não existe critério específico para a determinação de um período mínimo de tempo para definir a infectividade ou persistência incomum de um agente em um animal teste. Acredita-se que estas condições são melhor definidas no contexto de dados que são obtidos na bateria de estudos, segundo o tipo de microrganismo e a via de exposição.

Com a execução e aprimoramento destes protocolos haverá maiores subsídios técnicos para gerenciar os possíveis riscos envolvidos na liberação e/ou uso de um determinado produto.

Os resultados obtidos, além de sua aplicação na identificação de efeitos prejudiciais à saúde ambiental, poderão subsidiar e orientar avaliações da exposição ao agente microbiano por agências reguladoras, quanto ao seu uso comercial.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Meio Ambiente pela oportunidade de estágio.

À orientadora Vera L.S.S. Castro pelo apoio.

À Fapesp pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

CASTRO, V., CAPALBO, D., CHAIM, A., LARANJEIRA, A., SOARES, C. **Métodos para avaliação de risco ambiental e ecotoxicológico de biopesticidas**. Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente, 10, 75-86, 2000.



CASTRO, V.; CAPALBO, D.; MORAES, G.; NARDO, E.; OLIVEIRA, M.; **Protocolos de avaliação de agentes microbianos de pragas para registro como biopesticidas v. II - Testes toxicopatológicos em mamíferos**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. (Embrapa Meio Ambiente, Documentos, 10)

CASTRO, V.; MELO I. S. DE; **Avaliação Toxicopatológica em Ratos Expostos à *Pseudomonas putida***. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 2, n. 1, 2007, 1-5

URI, N., 1999, **The implications of US Government policy on the development and use of biopesticides**. *Int. J. Environ. Poll.*, 11: 117-132.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Microbial Pesticide Test Guidelines - OPPTS 885.3050. Acute Oral Toxicity/Pathogenicity. 1996a.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Microbial Pesticide Test Guidelines - OPPTS 885.3000. Background—Mammalian Toxicity / Pathogenicity / Infectivity. 1999b.