

**Validação de testes de
biopesticidas em mamíferos:
princípios e identificação de
fatores componentes da
incerteza**

Documentos 72

Validação de testes de biopesticidas em mamíferos: princípios e identificação de fatores componentes da incerteza

Vera Lúcia S. S. de Castro

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP 340 - km 127,5 - Tanquinho Velho
Caixa Postal 69 13820-000, Jaguariúna, SP
Fone: (19) 3867-8750 Fax: (19) 3867-8740
sac@cnpma.embrapa.br
www.cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicação da Unidade

Presidente: *Ariovaldo Luchiari Júnior*

Secretária-Executivo: *Luiz Antônio S. Melo*

Secretário: *Sandro Freitas Nunes*

Bibliotecária: *Maria Amélia de Toledo Leme*

Membros: *Ladislau Araújo Skorupa, Heloisa Ferreira Filizola, Adriana M. M. Pires, Emília Hamada e Cláudio M. Jonsson*

Normalização Bibliográfica: *Maria Amélia de Toledo Leme*

Editoração Eletrônica: *Edislene Aparecida Bueno Ruza*

1ª edição eletrônica
(2008)

Todos os direitos reservados.

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

Castro, Vera Lúcia S. S. de

Validação de testes de biopesticidas em mamíferos: princípios e identificação de fatores componentes da incerteza / Vera Lúcia S. S. de Castro – Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.
28 p. : il. — (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, ; 72)

1. Controle microbiano. 2. Análise de risco. I. Castro, Vera Lúcia S. S. de. II. Título. III. Série.

CDD 632.96

© Embrapa 2008

Autores

Vera Lúcia S. S. de Castro

Veterinária, PhD

Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP
340 - Km 127,5 - 13.820-000, Jaguariúna, SP.

E-mail: castro@cnpma.embrapa.br

Apresentação

O interesse no uso de alternativas mais viáveis economicamente e menos agressivas ao meio ambiente tem crescido consideravelmente, refletindo o crescente interesse na conservação dos recursos biológicos e seu uso sustentável. Nesse sentido, o uso de agentes microbianos para controle fitossanitário tem sido uma prática efetiva e apropriada para esses propósitos.

Os protocolos sobre os testes com biopesticidas fornecem subsídios e dados a serem utilizados no processo de registro de agentes microbianos, visando avaliar a segurança desses produtos. Tais testes são realizados em roedores para estabelecer possíveis efeitos tóxicos, patológicos e em seres humanos e animais domésticos de infectividade com a quantificação do agente microbiano em tecidos, órgãos e fluidos corporais.

Dado o crescente interesse, em particular com a finalidade de acreditação de laboratórios, esse documento foca a identificação de fatores para a estimativa da incerteza no contexto da validação desses testes com mamíferos, uma vez que a abordagem desenvolvida para as análises químicas não é diretamente aplicável aos ensaios biológicos. Para tanto, é proposto um procedimento e discutida a viabilidade de sua adoção para a validação do protocolo do teste de biopesticidas em roedores.

Usando o modelo descrito aqui, a execução do teste com biopesticidas em mamíferos pode ser mais facilmente avaliada. Em conseqüência, a validação do método ajudará a comparação dos dados obtidos das análises da toxicidade/ patogenicidade/ infectividade de biopesticidas em mamíferos realizada em diferentes laboratórios.

Cláudio Aparecido Spadotto
Chefe-Geral
Embrapa Meio Ambiente

Sumário

Introdução	07
1. Biopesticidas e protocolos experimentais	08
2. Controle de qualidade interno (intra-laboratorial)	10
3. Validação de métodos analíticos	12
3.1 Validação e fatores componentes da incerteza	13
3.2 Estimativa da incerteza	15
4. Exemplo da estimativa da incerteza	17
5. Considerações Finais	24
Referências	26

Validação de testes de biopesticidas em mamíferos: princípios e identificação de fatores componentes da incerteza

Vera Lúcia S. S. de Castro

Introdução

O interesse no uso de alternativas mais viáveis economicamente e menos agressivas tem crescido consideravelmente, refletindo o interesse crescente na conservação dos recursos biológicos e seu uso sustentável. Neste sentido, o uso de agentes microbianos de controle fitossanitário tem sido uma prática efetiva e apropriada para estes propósitos.

No início da década de 90, foi observado no Brasil, um aumento significativo no número de produtos para controle biológico. Este aumento pode ser creditado ao uso de diretrizes e a leis específicas brasileiras, compatíveis com o regulamento internacional. Desde os anos 90, a Embrapa Meio Ambiente vem trabalhando com essas questões, estabelecendo uma abordagem do potencial de risco ambiental envolvido com a prática do uso desses agentes em ações da área de pesquisa e de políticas públicas (CASTRO et al., 1999, 2000, 2001).

Os possíveis efeitos adversos produzidos pela introdução de um microrganismo utilizado como biopesticida podem ser resumidos em danos diretos e indiretos em organismos não-alvo da comunidade local, inclusive a flora e representantes de fauna de importância econômica, ecológica e ou social. A possibilidade de sobrevivência, multiplicação, persistência, disseminação e estabelecimento de patogenicidade e toxicidade estão envolvidas no risco que um microrganismo pode apresentar para o ambiente.

A fim de proteger o consumidor é realizada a análise de risco com a condução de vários testes. Assim, a análise de risco do uso desses agentes envolve a obtenção de medidas em laboratório antes de sua liberação, por exemplo, sobre a saúde, sobrevivência e reprodução dos organismos não-alvo. Para tanto, o impacto de um determinado efeito de fator de risco pode ser determinado utilizando conceito de máximo risco com uma dose-desafio na primeira fase de avaliação. Este conceito considera a exposição do organismo não-alvo a uma alta concentração do biopesticida a fim de avaliar a pior situação possível de risco ambiental. Embora os biopesticidas tenham geralmente um baixo risco à saúde ambiental, é importante a avaliação de alguns efeitos adversos.

A alergenicidade provocada pelo fungo *Metarhizium anisopliae* usado no controle de baratas (INSTANES et al., 2006) e por outros fungos de usos variados (BRIMNER; BOLAND, 2003) pode ser citada como um efeito adverso da exposição a um biopesticida. Outros agentes microbianos podem ocasionar efeitos prejudiciais à saúde em seres humanos na dependência das condições de exposição (STRASSER; KIRCHMAIR, 2006).

Devido ao atual crescente interesse nas análises de agentes de controle microbianos, principalmente no que se refere aos laudos técnicos exigidos em sistemas de qualidade; o presente trabalho foca alguns aspectos necessários à validação da metodologia e a identificação dos fatores para a estimativa da incerteza nos testes toxicopatológicos com mamíferos.

1. Biopesticidas e protocolos experimentais

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 mais apropriadamente caracterizados quanto à saúde e segurança ambiental por testes que levem estas suas características em conta. Deste modo, os protocolos de teste são especificamente projetados para descobrir quaisquer destas 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 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. 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. Caso seja encontrado um efeito significativo na fase I, então se procede aos testes da fase II e assim sucessivamente. Se houver evidência de patogenicidade e/ou toxicidade, procede-se aos testes da fase seguinte até um máximo de três fases para testes referentes à saúde humana em roedores e quatro fases para organismos aquáticos e outros não-alvo (aves, abelhas).

No caso dos estudos em mamíferos, na fase II é avaliada uma situação particular quando se observa toxicidade ou infectividade na fase I, porém não há evidência de patogenicidade. Já a fase III contém testes para avaliar a patogenicidade detectada na fase I, e detecção de efeitos de parasitas intracelulares de células de mamíferos. Esta última fase inclui testes específicos - reprodução e fertilidade, oncogenicidade, imunodeficiência e patogenicidade/infectividade em primatas (USEPA, 1996; CASTRO et al., 2000).

A fim de avaliar a infectividade e eliminação do organismo, o agente deve ser quantificado em tecidos, órgãos, e fluidos corporais de animais de ambos os sexos, sacrificados em diferentes intervalos após a exposição. O número de períodos de sacrifício exigidos dependerá da natureza do microrganismo de teste, e deve ser suficiente para estabelecer um padrão de liberação adequa-

do. Os organismos não-alvo devem ser expostos a três tratamentos: agente microbiano ativo, agente microbiano inativo e controle (sem o agente microbiano). A inativação deve ser feita através de um meio que permite a manutenção razoável da integridade estrutural do agente microbiano (CASTRO et al., 1999).

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 melhores definidas no contexto de dados que são obtidos na bateria de estudos, segundo o tipo de microrganismo e a via de exposição. Os dados são interpretados levando em conta as curvas de declínio gerado, e também considerando qualquer evidência que o agente microbiano se reproduz no animal teste.

2. Controle de qualidade interno (intra-laboratorial)

O controle do desvio, seja erro ou incerteza, é imprescindível em laboratório. Para tanto, é importante assegurar que a variabilidade se mantenha controlada para cada metodologia através de medidas de controle intra-laboratorial. O principal objetivo é assegurar a consistência dos resultados obtidos.

Assim, devem ser periodicamente verificados o treinamento do pessoal, a manutenção e calibração dos equipamentos, o preparo dos diluentes e do meio de cultura, o preparo das amostras, o método de plaqueamento e de contagem e identificação de colônias para cada um dos biopesticidas avaliados. Nesse sentido, caso não seja de domínio do laboratório ou seja encontrado algum problema; o procedimento de homogeneização e plaqueamento do agente microbiano em diferentes diluições em meio de cultura seguido da contagem pode ser realizado *in vitro* (contaminação artificial do órgão) em diferentes concentrações iniciais da suspensão do agente microbiano próximas às utilizadas no teste.

O intervalo entre as verificações de controle de qualidade para monitorar o desempenho dos ensaios será influenciado pelo número dos ensaios reais, de acordo com a atividade do laboratório. A seguir serão ressaltados alguns cuidados gerais com o ambiente laboratorial para o controle de qualidade relativo aos testes com biopesticidas.

O fluxo de trabalho deve ser conduzido de forma a minimizar riscos significativos para o tipo de ensaio realizado. Assim, o trabalho deve ser seqüencial para evitar possíveis contaminações de amostras e as atividades devem ser separadas por tempo e espaço, evitando-se o transporte freqüente dos materiais de uma área para outra. Todo o material necessário deve ser organizado antes do início do teste. É necessário limpar todos os objetos antes de introduzi-los na cabine, organizar os materiais de modo que os itens limpos e contaminados não se misturem e colocar os recipientes para descarte de material no fundo ou lateralmente da área de trabalho. As suspensões do agente microbiano a serem descartadas ao final do teste devem ser diluídas em um volume duas vezes maior de hipoclorito dentro dos frascos e em seguida desprezados dentro de vasilhame a fim de evitar contaminação do laboratório.

No caso dos ensaios com biopesticidas devem-se observar cuidados quanto ao ambiente de criação dos animais e do laboratório onde é realizado o teste. Os animais devem ser criados em condições padronizadas ambientais e estarem saudáveis.

A monitoração ambiental deve ser realizada através de contagens ambientais periódicas a fim de avaliar as medidas de limpeza e descontaminação empregadas (SALO et al., 2000). Esta monitoração pode ser realizada com a utilização de *swabs* de superfície nos ambientes utilizados nos ensaios. Uma outra forma é a exposição de placas preferencialmente sempre no mesmo local para construir um histórico de dados da contaminação do laboratório. As placas devem conter meios de cultura indicativos do crescimento geral de microorganismos. Caso seja constatada a presença do microrganismo teste ou contaminantes, os procedimentos de descontaminação adotados devem ser reavaliados.

Um programa de monitoração de contaminação dos equipamentos e materiais utilizados nos ensaios também deve ser realizado cada vez que houver algum ajuste no método de descontaminação ou problemas com o equipamento utilizado. O material cirúrgico, homogeneizador, câmara de fluxo laminar, vidraria e o exterior das cânulas poderão ser testados com o uso de *swabs* de superfícies e posterior plaqueamento e identificação de colônias. A limpeza do homogeneizador é fator importante para o sucesso do ensaio e deve ser realizada também durante o teste entre uma amostra e outra com solução de hipoclorito seguida de água destilada. As cânulas (contaminação interna) e as pipetas serão lavadas com um pouco de água estéril, que será colocada em meio de cultura e incubada, seguida de plaqueamento e identificação de colônias em meio de cultura apropriado. A descontaminação do material pode ser feita com hipoclorito, glutaraldeído ou álcool etílico 70% de acordo com cada um.

A autoclave será testada periodicamente através da colocação de amostras previamente contaminadas ou indicadores biológicos, que deverão ser incubados para verificação do crescimento ou não de colônias. Para tanto será verificada a temperatura para um ciclo de operação e cada configuração de carga usada na prática. Este processo deve ser repetido quando indicado pelos resultados de verificações ou após o reparo do equipamento ou periodicamente na dependência da quantidade de testes realizados pelo laboratório. Para maior segurança, recomenda-se a estocagem dos pacotes autoclavados em armários fechados ou caixas plásticas com tampa para maior proteção.

A fim de interpretar os dados obtidos no monitoramento da contaminação laboratorial devem ser estabelecidos critérios de análise e aceitação dos mesmos. Uma forma de esquematizar os dados e obter uma série histórica da qualidade ambiental laboratorial é a utilização de uma carta de controle que permita perceber quando os procedimentos efetuados não foram eficientes. Nesse sentido, a carta de controle de Shewhart, por exemplo, serve para detectar pequenas mudanças na média do processo. Elas são construídas com base nos valores da média e da amplitude obtidos em cada ocasião, num gráfico delimitado por linhas horizontais, denominadas "limites de controle". Podem ser usados um, dois ou três pares de linhas horizontais nas cartas da média e amplitude. Essas linhas são posicionadas a 1, 2 (zona de aviso) e 3 (zona de ação) desvios padrão em torno da média. Uma vez que a carta guia deve ser considerada como uma orientação para a discussão da qualidade dos resultados do programa estabelecido de descontaminação, os responsáveis pelo controle da qualidade do laboratório devem estabelecer procedimentos claros para quando ocorrerem pontos fora dos limites de ação. Esses procedimentos devem ser passados aos analistas, para que estes possam tomar as providências necessárias como também identificar ações preventivas em casos de pontos além da zona de aviso (HIRATA, 2002).

3. Validação de métodos analíticos

A validação de procedimentos analíticos é um aspecto vital para subsidiar a confecção de laudos emitidos pelos laboratórios, quer para testes de substâncias químicas quer para produtos biológicos, perante os órgãos oficiais. Apesar de que nem sempre os mesmos protocolos podem ser adotados para todas as análises microbiológicas e suas respectivas matrizes, os conceitos e técnicas para a estimativa da incerteza são aplicáveis a outras áreas uma vez

que as técnicas microbiológicas contemplam conceitos básicos em comum (CORRY et al., 2007). A harmonização da validação dos protocolos é desejável para a validação dos procedimentos analíticos a serem credenciados através de normas e legislação. Contudo, devido à variedade de métodos microbiológicos, é aceito que a validação reflita as reais condições de teste.

Para cada método de ensaio podem-se ter diferentes fontes de incerteza da medição, dependendo do próprio método, equipamentos e instalações utilizadas. Contudo, não existe nenhuma descrição destas para biopesticidas e as abordagens desenvolvidas para análises químicas, em relação à estimativa de incerteza e validação de método, não são diretamente aplicáveis à microbiologia.

Nesse contexto, os laboratórios de microbiologia, assim como a comunidade analítica em geral, estão cada vez mais se preocupando com a estimativa da incerteza de medida dos resultados produzidos. A principal razão para esta tendência é o credenciamento de laboratórios na ISO 17025 que exigem dos laboratórios a estimativa da incerteza associada aos seus resultados. Caso o cálculo válido de incerteza não seja possível, os componentes de incerteza devem ser identificados e razoavelmente estimados. Porém, é grande a variabilidade associada com muitos métodos para a quantificação de colônias em microbiologia (LOMBARD, 2006).

Em análises microbiológicas, o processo de quantificação de colônias é complexo e inclui vários passos, sendo os mais importantes: amostragem da porção de teste, preparação da suspensão inicial e das diluições decimais consecutivas, isolamento, incubação e contagem das colônias. Alguns componentes (por exemplo, pipetagem, pesagem e diluição) podem ser medidos e avaliados. Outros componentes como, por exemplo, estabilidade da solução e preparo de amostra deve ter a sua importância considerada para a variabilidade de resultados. Desta forma, pode se tornar difícil estabelecer com precisão a contribuição de cada passo individual do processo analítico desde que o analito é um microrganismo vivo, cujo estado fisiológico pode ser largamente variável.

3.1. Validação e fatores componentes da incerteza

A incerteza pode ser definida como um parâmetro associado ao resultado de uma medida, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos ao measurando. A fim de obter a incerteza da medição de um ensaio é necessário o levantamento das fontes de incertezas no processo de ensaio a fim de estimar a possível variação no resultado expresso.

A fim de estimar a incerteza geral, é necessário tratar separadamente cada fonte de incerteza para obter a contribuição total. É importante reconhecer que nem todos os componentes farão uma contribuição significativa para a incerteza combinada, e que na prática é provável que só o faça um pequeno número (ELLISON et al., 2000). Os componentes individuais de incerteza devem ser identificados e demonstrados estar sob controle, bem como, terem a sua contribuição avaliada para a variabilidade de resultados. Na estimativa da incerteza total, deve ser considerada a incerteza de cada um dos componentes que contribuem para a mesma sendo que a maioria das incertezas em microbiologia pode ser considerada independente. Então, quando o resultado do teste é fruto de componentes com incertezas estimadas ou conhecidas, como, por exemplo, do volume do inóculo e do método de leitura do resultado, obtém-se a incerteza combinada que é expressa como a raiz quadrada positiva da soma dos quadrados das incertezas individuais (NIEMI; NIEMELÄ, 2001). A unidade da incerteza obtida será então expressa em unidades utilizadas em microbiologia como número de colônias/g ou número de colônias /ml.

Uma interpretação adequada dos resultados pelo analista considera tanto os erros aleatórios quanto os erros sistemáticos do procedimento analítico. Os vieses que levam a incerteza podem ser introduzidos, por exemplo, na coleta do material, na escolha do método, no transporte e armazenamento da amostra, diluições seriadas, temperatura de incubação, etc.; os quais nem sempre podem ser controlados pelo analista.

As várias etapas do processo analítico devem ficar sob controle do analista a fim de evitar fontes de erro e incerteza. Alguns aspectos a serem considerados, mesmo que tratem de cuidados gerais em laboratório, são: a) treinamento adequado da equipe de analistas nas técnicas utilizadas no laboratório; b) manutenção e calibração de equipamentos; c) cuidados com o material utilizado incluindo preparo, esterilização e uso correto; d) realização adequada do procedimento analítico como quantificação de colônias, identificação de microrganismos, etc e e) acompanhamento da qualidade das análises por um controle de qualidade e testes intra e interlaboratoriais.

Tais preocupações são também aplicáveis aos testes com biopesticidas em mamíferos (roedores), já que são processos complexos de análise e incluem vários passos desde a amostragem dos tecidos dos animais expostos, preparo da solução inicial, condições de isolamento e métodos de quantificação de colônias, entre outros.

Uma estratégia de amostragem e análise microbiológica, por exemplo, de alimento, significa um procedimento planejado para selecionar amostras de uma população e para conduzir a amostragem para obter as informações necessárias. Este plano determina como os resultados podem ser interpretados e se as informações de sistemas diferentes são comparáveis ou não. Em alimentos, isto pode ser alcançado naturalmente usando produtos contaminados ou amostras de produtos com níveis predeterminados de contaminação. Apesar da contaminação de uma matriz só imitar de modo superficial a presença de contaminantes naturais, é freqüentemente a melhor solução disponível. Contudo, em um estudo com biopesticidas os vários órgãos e tecidos do animal podem compor diferentes matrizes e a dose de exposição é fixa. Ao contrário da análise microbiológica em alimento, não existe escolha sobre amostragem em análise de biopesticidas. Se cada órgão for considerado como uma matriz, cada um exigiria uma estimativa de incerteza separada, aumentando o trabalho e os custos das análises.

Desde que habitualmente não existe prova de proficiência inter-laboratorial, o laboratório que realiza testes de biopesticidas pode usar a reprodutibilidade do método intra-laboratorial para estimar a sua própria incerteza. Neste caso, o método usado habitualmente pelo laboratório tem que ser submetido para estudo de validação. No contexto de biopesticidas, o resultado aceitável deve ser considerado cuidadosamente em uma avaliação caso-a-caso.

3.2. Estimativa da incerteza

Devido à necessidade de obtenção de documentos de referência harmonizados está sendo então proposta aqui uma abordagem geral baseada no desvio padrão de reprodutibilidade do resultado de final do processo de medida.

Assim, para a estimativa da incerteza, o protocolo utilizado deve ser repetido em diferentes amostras para uma dada combinação de fatores. Neste caso, dois analistas diferentes A e B realizam o mesmo teste e na mesma dose (10^8 unidades.mL⁻¹) separadamente em pelo menos duas condições de laboratório diferentes (1 e 2) como meio de cultura e reagentes, equipamentos, tempo de análise, etc. (Fig. 1). As suspensões iniciais são preparadas independentemente. Cada condição experimental deve ser feita em duas repetições (1 e 2), resultando nas análises A 1.1; A 1.2; A 2.1; A 2.2 para o analista A e B 1.1; B 1.2; B 2.1; B 2.2 para o analista B. O objetivo é refletir o limite provável de resultados individuais a ser obtido no mesmo laboratório.

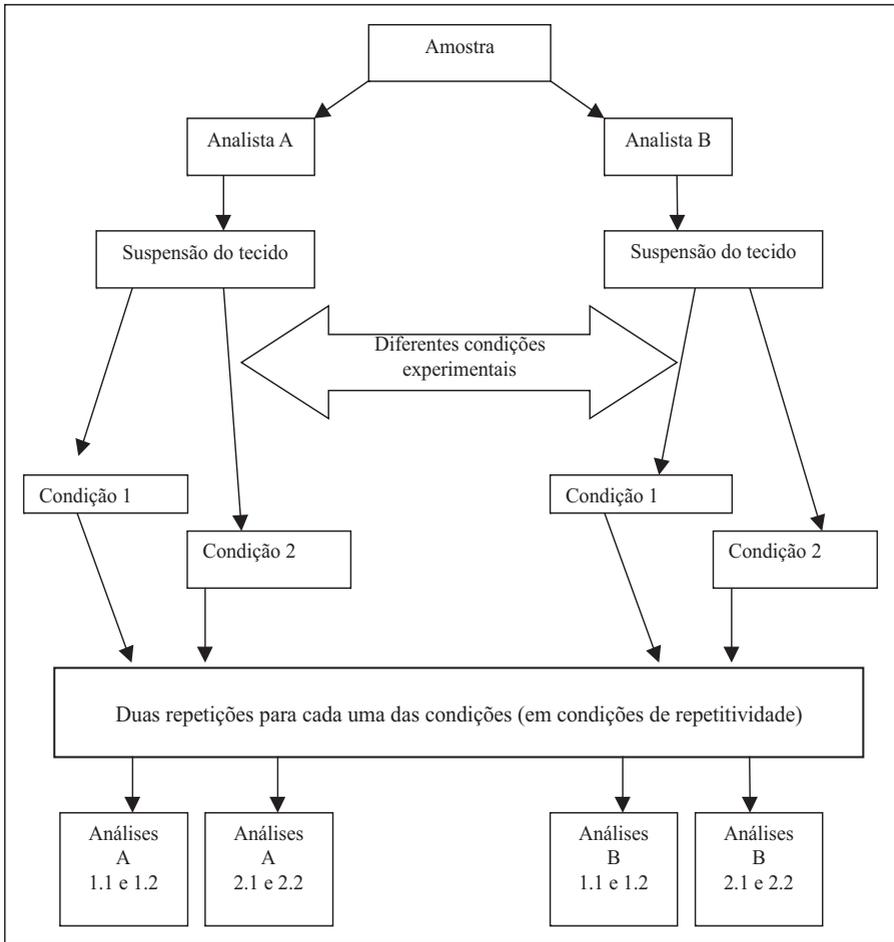


Fig.1. Análises a serem realizadas por amostra na proposta apresentada para a validação e estimativa da incerteza em um teste toxicopatológico e de infectividade de um biopesticida em mamíferos (baseada na ISO 19036:2006). As suspensões iniciais são preparadas independentemente. Dois analistas diferentes A e B realizam o mesmo teste separadamente em pelo menos duas condições de laboratório diferentes (1 e 2) como meio de cultura e reagentes, equipamentos, tempo de análise, etc.. Cada condição experimental deve ser feita em duas repetições (1 e 2), resultando nas análises A 1.1; A 1.2; A 2.1; A 2.2 para o analista A e B 1.1; B 1.2; B 2.1; B 2.2 para o analista B.

Embora seja considerada a dificuldade de construir um modelo completo do processo de estimativa de incerteza em análise microbiológica, é apresentado a seguir um exercício para avaliar os fatores que podem contribuir para a variabilidade de resultados na análise de biopesticidas baseado nesta proposta calcada na abordagem da avaliação da reprodutibilidade interna.

4. Exemplo da estimativa de incerteza

Para o exemplo apresentado, foram realizados testes com a bactéria *Pseudomonas*, que possui potencial para a degradação de grande variedade de xenobióticos e também é utilizada como biopesticida (CASTRO; MELO, 2007).

Para a realização da avaliação toxicopatológica e de infectividade deste agente microbiano em roedores de acordo com procedimentos referentes ao protocolo de exposição aos biopesticidas, é realizada uma série de procedimentos descritos a seguir:

a) animais - Os animais utilizados foram ratos Wistar, mantidos em condições padronizadas de luz, umidade e temperatura no Biotério do Laboratório de Ecotoxicologia da Embrapa Meio Ambiente, sendo as matrizes fornecidas pelo Biotério Central da UNICAMP (Universidade de Campinas). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno com cama de maravalha autoclavada. As gaiolas foram devidamente colocadas em salas com temperatura ambiente e umidade controladas ($22 \pm 2^\circ \text{C}$ e 65 a 70%, respectivamente) por meio de aparelhos de ar condicionado, ventilação e sistema de exaustão; iluminação artificial com um ciclo de luz claro – escuro 12h/12 horas, com início da fase clara às 7:00 horas. Água e comida (ração) foram fornecidas a vontade aos animais durante todo o período dos procedimentos experimentais. Após o sacrifício, os animais são congelados e incinerados.

b) características da colônia de *P. putida* e obtenção do isolado - a colônia é de cor amarelo esbranquiçada, gram-negativa, sensível à tetraciclina e canamicina, apresentando fluorescência. O isolado é inicialmente repicado, ficando armazenado em BOD até aguardar seu crescimento. Na fase exponencial 18 h após o semeio em placa, o isolado é centrifugado por 15 min em 5000 *g*, lavado em solução tampão fosfato (pH 7,0) e ressuspenso no tampão (CHOBCHUENCHOM et al., 1996).

c) doses e tratamentos - A linhagem testada é administrada a ratos, em suspensões de 10^8 células mL^{-1} . É preparada uma suspensão concentrada e são realizadas várias diluições com as células bacterianas que são colhidas do meio de cultura. A concentração da suspensão administrada é ajustada por diluições com auxílio de espectrofotômetro ($A_{600} = 0,3$ pela escala de McFarland) que corresponde a 10^8 ufc. mL^{-1} , segundo Lelliott e Stead (1987). São utilizados três tratamentos para cada via: bactéria ativa, bactéria inativada e o veículo de administração da bactéria, como controle.

d) observação de sinais e sintomas dos animais - Os animais são observados diariamente em relação ao aparecimento de alterações clínicas; sendo verificados os seguintes itens: pele e pêlo; olhos e mucosas; aparelho respiratório e sistema circulatório; sistema nervoso periférico e central (tremor, diarréias, convulsão, letargia e salivação); padrão comportamental e tempo de morte.

e) observação de patologias durante a necropsia - Os animais são sacrificados e necropsiados com observação macroscópica dos órgãos em diferentes intervalos após a administração da bactéria. A necropsia é realizada dentro de uma câmara de fluxo laminar para evitar contaminação das amostras que serão utilizadas na quantificação das colônias. A fim de estudar a infectividade da bactéria no organismo animal, são semeadas amostras de sangue, fígado, rim, mesentério e pulmão em placas de Petri contendo meio King B com propanil (GEELS; SCHIPPERS, 1983), seguida de incubação e contagem das colônias.

f) quantificação das colônias de *P. putida* - O material sob análise, devidamente pesado e homogeneizado em solução salina (NaCl 0,9%), é submetido a diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), em triplicatas para cada diluição. A quantificação de colônias é realizada sob luz ultravioleta uma vez que a bactéria emite fluorescência. O número de colônias obtidas por placa é anotado e o resultado expresso como média de repetições, transformado segundo cálculo de diluições, pesos e volumes e apresentado como unidades formadoras de colônias (ufc. mL^{-1}).

g) identificação das colônias de *P. putida* - A fim de confirmar a espécie das bactérias recuperadas dos órgãos necropsiados, realiza-se a extração de ácidos graxos da parede celular por meio da identificação dos isolados em cromatografia gasosa (SVEC et al., 2004; KAUR et al., 2005; BACON et al., 2006). As bactérias a serem identificadas são coletadas por meio

de uma alça de metal e colocadas em tubos específicos. Na seqüência, são executadas quatro etapas para extração dos ácidos graxos celulares, sendo elas: saponificação, metilação, extração, onde a fase aquosa (inferior) é descartada e posterior lavagem. Após agitação e centrifugação, cerca de 75% da fase orgânica são pipetados e repassados para um vial específico para o aparelho da Agilent 6580 e detector Flame Ionization Detector (FID), com injetor automático. A identificação comparativa é feita entre o cromatograma obtido e uma biblioteca interna ao aparelho, fornecida pelo software Sherlock (Microbial Identification System), que calcula o índice de similaridade obtido para o isolado. A bactéria é considerada como perfeitamente identificada quando é encontrado um índice de similaridade maior que 0,600 e a diferença entre a primeira identificação e a segunda é de até 0,100 no índice de similaridade.

A fim de construir um modelo do processo de estimativa de incerteza nos ensaios com a *P. putida* em ratos em condições laboratoriais deve ser, portanto examinada a lista de fontes de incerteza. Uma vez que os componentes da incerteza tendem a ser independentes em medidas microbiológicas (NIEMI; NIEMELÄ, 2001), a incerteza combinada é composta da soma das incertezas relativas identificadas com base na descrição acima.

A seguir é apresentado um resumo das ações cuja incerteza possa ser mensurável a fim de analisar a sua efetiva contribuição para a estimativa da incerteza final:

I - Para o preparo da suspensão: 1) preparo do meio de cultura e crescimento das colônias de bactéria, 2) pesagem de tubos contendo solução salina 0.9 % e inclusão neles de uma pequena quantidade de bactéria seguida de agitação, 3) tomada de um volume pequeno desta suspensão e realização de leitura no espectrofotômetro e 4) diluição da suspensão até 10^8 ufc.mL⁻¹.

II - Para a quantificação de agente microbiano em tecidos, órgãos, e fluidos corporais para determinar a infectividade e a eliminação: 1) pesagem do tecido, órgão ou fluido corporal, 2) homogeneização em solução salina 0.9%, 3) diluição decimal (10^{-3} , 10^{-2} e 10^{-1}), 4) plaqueamento em triplicata em meio de cultura específico, 5) incubação (tempo e temperatura) e 6) contagem das colônias nas placas.

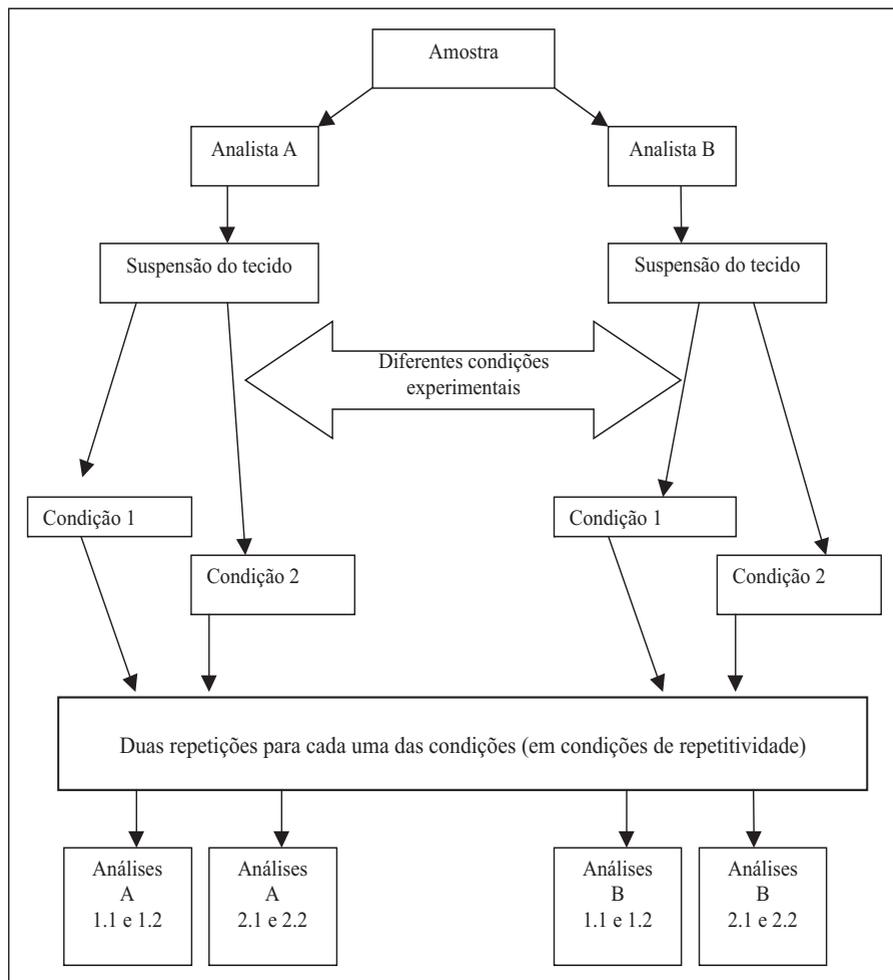
III – Para a identificação das colônias de *P. putida* - estes procedimentos não serão incluídos na estimativa da incerteza por se tratar em nosso caso de avaliação qualitativa em pequeno número de colônias. Contudo, se a identificação for realizada de forma quantitativa, com a verificação de falsos positivos e negativos, esta deverá ser relacionada entre os componentes da incerteza (CORY et al., 2007).

Baseada nesta lista, a incerteza combinada pode ser proposta como resultante do preparo da solução inicial com a leitura no espectrofotômetro, da diluição para o plaqueamento por pipetagem, da temperatura de incubação e da contagem de colônias do agente (Quadro 1). Desta forma, na seqüência, são feitas considerações a respeito de cada um destes fatores.

Para a confecção da solução inicial, uma alçada de *P. putida* cultivada em meio apropriado (King B) foi suspensa em solução salina e padronizada na Escala de McFarland (ITAL, 1995). A escala de McFarland é utilizada como padrão de turvação para determinar a intensidade da multiplicação bacteriana; ou seja, quanto maior o número de bactérias, maior será a opacidade do meio de cultura. As leituras de absorvância são confiáveis quando maiores que 0,05 e menores que 1,2. A concentração da solução inicial foi então ajustada por diluição de uma suspensão concentrada até o ajuste da turbidez desejada, a saber 0,3 em A_{600} , que corresponde a 10^8 ufc.ml⁻¹. Em geral, as incertezas sobre absorvância podem ser transformadas diretamente em incerteza sobre concentração da suspensão contendo o agente microbiano. A incerteza na determinação da concentração é estabelecida pelas incertezas nas medidas do espectro de transmissão através da lei de Beer-Lambert que mostra que a absorvância apresenta uma relação linear com a concentração (ROTHMAN et al., 1975; OLIVEIRA et al., 2004). Contudo, em nosso estudo não há como medir linearidade ou repetitividade da leitura enquanto componentes da incerteza, pois é feito um único ponto e não uma curva no espectrofotômetro.

A importância dos parâmetros relacionados à incubação parece ser considerada como não quantificáveis já que não está incluída entre os fatores de incerteza comumente avaliados em métodos de cultivo e são ligados a fatores biológicos (NIEMI; NIEMELA, 2001). Quanto ao tempo de incubação, a experiência sugere que desvios de horas do tempo especificado não afetam os resultados significativamente (CORY et al., 2007). Contudo, a importância deste parâmetro para a incerteza do método pode ser avaliada durante as repetições efetuadas para a validação do mesmo.

Quadro 1. Possíveis fontes de incerteza para a estimativa da incerteza da quantificação de colônias (n° colônias/g tecido) em cada intervalo da exposição de ratos ao biopesticida durante as análises toxicopatológicas e de infectividade.



As pipetas utilizadas para as diluições podem introduzir uma fonte significativa de erro, que aumenta com a quantidade de diluições (CORRY et al., 2007). A incerteza volumétrica é composta de fatores como a exatidão, a repetitividade e a dilatação devida à diferença entre temperaturas de calibração e ensaio. Já a incerteza da pesagem é composta por repetitividade, calibração, resolução e linearidade. A repetitividade deve ser

calculada no laboratório onde é realizado o ensaio do biopesticida.

Tradicionalmente, a estimativa da incerteza da contagem de colônias viáveis é feita através da distribuição de Poisson. Uma vez que a quantidade real nunca é conhecida, a contagem observada é uma estimativa da média e ao mesmo tempo da variância (NIEMELA, 2003). A incerteza relativa relacionada à contagem do número de colônias (μ_z) é geralmente pequena se é considerada somente a repetitividade da contagem feita por um analista. Contudo, a estimativa aumentará caso seja representada pela contagem de vários analistas (NIEMELA, 2003).

Quanto à diluição e contagem em um método microbiológico, a equação básica para computar os resultados de um teste pode ser descrita como $y = Fc$, onde: y = concentração estimada de partículas em uma amostra; F = fator de diluição e c = concentração estimada na solução de diluição final. A estimativa da concentração (c) final de colônias é baseada no número de colônias (z) observadas em uma porção teste (volume v) da suspensão final. Assim: $y = [(a_i + b_i)/a_i] \cdot z_i/v_i$, onde: a_i = volume transferido da primeira diluição; b_i = volume da diluição do branco; z = contagem de colônias na placa; v = volume da diluição final e $i = 1 \dots 3$ diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) (NIEMELA, 2003). Então a incerteza relativa μ referente à contagem final das colônias será a raiz quadrada da soma das incertezas referentes aos volumes (μ_v), às pesagens (μ_m) e às contagens (μ_z).

Por sua vez o procedimento utilizado para a determinação da massa dos tecidos envolveu duas etapas: a pesagem da placa de vidro vazia e posteriormente com o tecido. A incerteza sobre a pesagem é oriunda de quatro fontes: repetitividade, resolução, calibração e linearidade. Uma vez que a massa dos tecidos foi obtida através da diferença de pesagens, ou seja, através de duas medições independentes realizadas na mesma balança em um período curto de tempo; a contribuição da resolução à incerteza foi desprezada (BUCHMANN; SARKIS, 2002).

Existem alguns pontos adicionais para considerar em testes de biopesticidas em mamíferos. É reconhecidamente difícil estimar a incerteza de ensaios que utilizam organismos, como com espécies animais e vegetais. O comportamento dos organismos teste depende em parte das condições ambientais do laboratório, e apesar de nem sempre quantificáveis, não são desprezíveis por afetarem os resultados. As condições ambientais são grandezas que não são o mensurando, mas que afetam o resultado da medição deste (MOREL et al., 2006).

Desta forma, deve-se avaliar se as condições de instalações como temperatura e luminosidade do biotério podem afetar os resultados e contribuir para a incerteza. Nos testes com biopesticidas em mamíferos, parâmetros, como temperatura, devem estar dentro de intervalos predeterminados e a faixa de valores críticos que ocasionam desconforto ao animal é grande. A variação na temperatura ambiental, mantida em $22.0 \pm 2^\circ\text{C}$, faixa considerada de ótimo conforto térmico, aparentemente não é suficiente para afetar a resposta do organismo ao agente microbiano. O mesmo raciocínio é válido para a resposta do organismo-teste a um ciclo 12-h claro/escuro mantido de forma constante, ou seja, não há variação na intensidade e quantidade de luz recebida. Também, a influência do peso corporal dos animais deve ser verificada. Contudo, o protocolo recomenda que a variação de peso de animais adultos usados no teste não deva exceder $\pm 20\%$ do peso médio para cada sexo e que os animais a serem utilizados devam ser saudáveis. Nessas condições o peso do animal não influirá no resultado avaliado, a saber, infectividade, toxicidade e patogenicidade; e a sua influência, portanto pode ser considerada desprezível. Além disso, estas respostas pelo organismo-teste não são de fácil quantificação já que dependem também da resposta imunológica e da sensibilidade ao estresse ocasionado pela variação ambiental; que são fatores biológicos.

Assim, a incerteza total relativa pode ser calculada como:

$$\mu_T = \sqrt{(\mu_v^2 + \mu_m^2 + \mu_z^2)}$$

onde μ_v = incerteza do fator de diluição; μ_m = incerteza da pesagem da massa do tecido; μ_z = incerteza da contagem individual

Cada uma das incertezas componentes deve ser calculada como exemplificado a seguir para o fator de diluição:

$$\mu_V = \sqrt{(\mu_{\text{repetitividade}}^2 + \mu_{\text{exatidão}}^2 + \mu_{\text{resolução}}^2)}$$

5. Considerações Finais

Usando o modelo descrito neste estudo, a execução do teste com biopesticidas em mamíferos pode ser mais facilmente avaliada. Em consequência, a validação do método ajudará a comparação dos dados obtidos das análises da toxicidade/patogenicidade/infectividade de biopesticidas em mamíferos realizada em diferentes laboratórios.

Embora a estimativa da incerteza da quantificação microbiológica contribua para a identificação da fonte principal de erro no procedimento analítico, a incerteza adicional devido a variações quanto à estabilidade da preparação é um grande desafio para o microbiologista. Também é importante ressaltar que não é possível estimar a incerteza de um procedimento analítico sem o controle da qualidade das medidas realizadas pelo laboratório.

Conforme mencionado, a maioria dos componentes ligados à natureza biológica não são quantificáveis. Portanto, a melhor forma de avaliar a incerteza relacionada a esse teste é avaliar a reprodutibilidade interna, aplicando os conceitos desenvolvidos na ISO 19036. É recomendável ainda realizar a validação do processo de medição das condições ambientais para ensaios biológicos.

Em resumo, o estudo intra-laboratorial para validação pode ser feito por dois técnicos diferentes com a mesma dose (10^8 unidades.mL⁻¹) separadamente em pelo menos duas condições diferentes de laboratório como meio de cultura, equipamentos e condições de análise. Este procedimento deve ser feito para animais expostos ao agente microbiano, animais de grupo de controle e animais expostos ao agente microbiano inativado. Durante a avaliação, os tecidos, órgãos e fluidos corporais devem sofrer análise quantitativa das colônias e se cada um for interpretado como uma matriz diferente; propõe-se que a estimativa da incerteza seja feita em número limitado de matrizes tais como sangue, fígado, pulmão, baço e/ou rim. Outros tecidos ou órgãos como linfonodos representativos podem ser feitos na dependência do agente microbiano. Estes procedimentos devem ser feitos em três animais de um só sexo, sacrificados depois da exposição em um intervalo representativo de acordo com o agente microbiano estudado. A confirmação do agente microbiano também deverá entrar para o cálculo da incerteza final do procedimento caso for feita de forma quantitativa.

Futuramente, com a execução e o aprimoramento destes protocolos, haverá maiores subsídios técnicos para gerenciar os possíveis riscos envolvidos na liberação e/ou uso de produtos de origem biológica. No caso dos biopesticidas, as informações garantirão o registro de produtos biológicos mais seguros, favorecendo a oferta desses agentes. Indiretamente, a cadeia produtiva agrícola será beneficiada desde a produção até os processos de exportação devido à menor contaminação do ambiente e dos produtos agrícolas bem como com a menor exposição dos trabalhadores.

Agradecimentos: *A autora deseja agradecer aos Drs. Pierre Morel e Paulo Afonso Lopes pelas sugestões.*

Referências

- BACON, C.W.; HINTON, D.M.; HINTON JR., A. Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* and other biocontrol *Bacillus* species. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.185-194, 2006.
- BRIMNER, T.A.; BOLAND, G.J. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.100, p.3-16, 2003.
- BUCHMANN, J.H.; SARKIS, J.E.S. O conceito de incerteza aplicado aos processos de medição associados à preparação de uma solução de referência para calibração. **Química Nova**, v.25, n.1, p.111-116, 2002.
- CASTRO, V.; MELO, I. Avaliação toxicopatológica em ratos expostos a *Pseudomonas putida*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.2, n.1, p.1-5, 2007.
- CASTRO, V.; CAPALBO, D.; MORAES, G.; NARDO, E.; OLIVEIRA, M. **Protocolos de avaliação de agentes microbianos de pragas para registro como biopesticidas: v. 2 - Testes toxicopatológicos em mamíferos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 10).
- CASTRO, V.; CAPALBO, D.; CHAIM, A.; LARANJEIRA, A.; SOARES, C. Métodos para avaliação de risco ambiental e ecotoxicológico de biopesticidas. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.10, p.75-86, 2000.
- CASTRO, V.; JONSSON, C.; MELO, I.; NUNES, F. Avaliação de risco ecotoxicológico de *trichoderma stromaticum* usado como biopesticida. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, v.4, n.1, p.18-24, 2001.
- CHOBCHUENCHOM, W.; MONGKOLSUK, S.; BHUMIRATANA, A. Biodegradation of 3-chlorobenzoate by *Pseudomonas putida* 10.2. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.12, p.607-614, 1996.
- CORRY, J.E.; JARVIS, B.; PASSMORE, S.; HEDGES, A. A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. **Food Microbiology**, v.24, n.3, p.230-253, 2007.

ELLISON, S.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. **EURACHEM/CITAC guide: Quantifying uncertainty in analytical measurement**. 2. ed. [S.I.]: EURACHEM/CITAC, QUAM:P1, 2000.

GEELS, F.; SCHIPPERS, B. Reduction of yield depression in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatment with antagonistic fluorescent, *Pseudomonas* spp. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.108, p.207-214, 1983.

HIRATA, Y. Gráficos de controle para laboratórios de ensaios. **O Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.183-185, 2002.

INSTANES, C.; WARD, M.D.W.; HETLAND, G. The fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae* has an adjuvant effect on the allergic response to ovalbumin in mice. **Toxicology Letters**, v.161, p.219-225, 2006.

ITAL. Instituto de Tecnologia de Alimentos. **Metodologia de análise microbiológica de alimentos**. Campinas, 1995. p.45. (ITAL. Manual técnico, n.14).

KAUR, A.; CHAUDHARY, A.; KAUR, A.; CHOUDHARY, R.; KAUSHIK, R. Phospholipid fatty acid - a bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. **Current Science**, v.89, p.1103-1112, 2005.

LELLIOTT, R.A.; STEAD, D.E. **Methods for the diagnosis of bacterial plant disease**. Oxford: Blackwell, 1987. 216p.

LOMBARD, B. Estimation of measurement uncertainty in food microbiology: The ISO approach. **Accreditation and Quality Assurance**, v.17, p.94-100, 2006.

MOREL, P.; ARRUDA, T.; BOHRER-MOREL, M.B. Calculation of uncertainties in influence quantities in biological essays. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, p.97-99, 2006.

NIEMELÄ, S. Measurement uncertainty of microbiological viable counts. **Accreditation and Quality Assurance**, v.8, p.559-563, 2003.

NIEMI, R.; NIEMELÄ, S. Measurement uncertainty in microbiological cultivation methods. **Accreditation and Quality Assurance**, v.6, p.372-375, 2001.

OLIVEIRA, F.C.C.; DE SOUZA, A.T.P.C.; DIAS, J.A.; DIAS, S.C.L.; RUBIM, J.C.; The choice of the spectral region in the use of spectroscopic and chemometric methods. **Química Nova**, v.27, n.2, p.218-225, 2004.

ROTHMAN, L.D.; CROUCH, S.R.; INGLE, J.D. Theoretical and experimental investigation of factors affecting precision in molecular absorption spectrophotometry. **Analytical Chemistry**, v.47, n.8, p.1226-1233, 1975.

SALO, S.; LAINE, A.; ALANKO, T.; SJOBER, A.; WIRTANEN, G. Validation of the microbiological methods Hygicult dipslide contact plate and swabbing in surface hygiene control: a Nordic collaborative study. **Journal of the AOAC International**, v.83, p.1357-1365, 2000.

STRASSER, H.; KIRCHMAIR, M. Potential health problems due to exposure in handling and using biological control agents. In: EILENBERG, J.; HOKKANEN, H.M. (Ed.). **An ecological and societal approach to biological control**. New York: Springer, 2006. p.275-293.

SVEC, P.; STEGNEROVA, H.; DURNOVA, E.; SEDLACEK, I. Characterization of esculin-positive *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from an underground brook. **Folia Microbiologica**, Praha, v.49, n.6, p.725-730, 2004.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Microbial Pesticide Test Guidelines - OPPTS 885.3000**. Background—Mammalian Toxicity / Pathogenicity / Infectivity. Washington, DC, 1996.