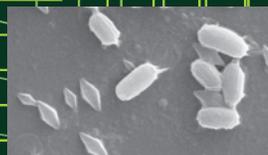
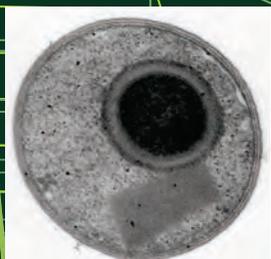
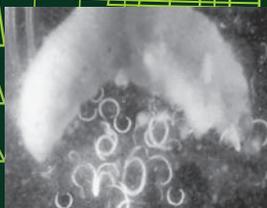


Fundamentos para a Regulação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas



Editores Técnicos

Eduardo Cyrino Oliveira-Filho

Rose Gomes Monnerat

Fundamentos para a Regulação de
Semioquímicos, Inimigos Naturais e
Agentes Microbiológicos de
Controle de Pragas



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Fundamentos para a Regulação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas

Eduardo Cyrino Oliveira-Filho
Rose Gomes Monnerat
Editores Técnicos

Embrapa Cerrados
Planaltina, DF
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rodovia Brasília/Fortaleza
Caixa Postal 08223
CEP 73310-970 – Planaltina, DF
Telefone (61) 3388-9898 – Fax (61) 3388-9879
www.cpac.embrapa.br
sac@cpac.embrapa.br

Supervisão editorial

Maria Helena Gonçalves Teixeira

Revisão de texto

Maria Helena Gonçalves Teixeira

Normalização bibliográfica

Rosângela Lacerda de Castro

Projeto Gráfico e editoração eletrônica

Wellington Cavalcanti

Capa

Wellington Cavalcanti

Fotos da capa

Cláudia de Melo Dolinski, Flavio Moscardi,
José Maurício Simões Bento, Maria Elita Batista de Castro,
Roberto Teixeira Alves, Rose Gomes Monnerat e Sergio Vicentini

Tratamento de imagens

Wellington Cavalcanti

Impressão e acabamento

Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2006)
200 exemplares

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP **Embrapa Cerrados**

F 981 Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas / editores técnicos Eduardo Cyrino Oliveira-Filho, Rose Gomes Monnerat. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2006.
352 p. : il. color.

ISBN 978-85-7075-034-1

1. Praga - controle. 2. Controle biológico. 3. Regulamentação. 4. Agrotóxico.
I. Oliveira-Filho, Eduardo Cyrino. II. Monnerat, Rose Gomes.

632.9 - CDD 21

Adriano Elias Pereira

Engenheiro Agrônomo,
Mestrando da Universidade Federal de Viçosa, UFV,
Departamento de Biologia Animal, Entomologia
Avenida P. H. Rolfs s/n - Campus - UFV, Viçosa, MG, Brasil,
CEP 36571-000
aelias374@yahoo.com.br

Carlos Marcelo Silveira Soares

Engenheiro Agrônomo, Ph.D. Entomology
Diretor Técnico da Bthek Biotecnologia Ltda
SAAN, Quadra 03, Lote 204 - Galpão, Brasília, DF, Brasil,
CEP 70632-300
marcelo@bthek.com.br

Charles Martins de Oliveira

Engenheiro Agrônomo, Dr. Entomologia
Pesquisador da Embrapa Cerrados
BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223 Planaltina, DF, Brasil,
CEP 73310-970
charles@cpac.embrapa.br

Claudia de Melo Dolinski

Engenheira Agrônoma, Ph.D. Plant Pathology
Professora Associada da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro,
Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias
Av. Alberto Lamego, 2000 Pq. Califórnia Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil,
CEP 28015-620
claudia.dolinski@censanet.com.br

Deise Maria Fontana Capalbo

Engenheira de Alimentos, Dra. Engenharia de Alimentos
Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP 340, Km 127,5, Caixa Postal 69
Tanquinho Velho, Jaguariúna, SP, Brasil,
CEP 13820-000
deise@cnpma.embrapa.br

Eduardo Cyrino Oliveira-Filho

Biólogo, Dr. Toxicologia
Pesquisador da Embrapa Cerrados
BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223
Planaltina, DF – Brasil, CEP 73310-970
cyrino@cpac.embrapa.br

Evaldo Ferreira Vilela

Engenheiro Agrônomo, Ph.D. Chemical Ecology
Professor Titular da Universidade Federal de Viçosa, UFV,
Departamento de Biologia Animal, Entomologia
Avenida P. H. Rolfs s/n - Campus - UFV Viçosa, MG, Brasil,
CEP 36571-000
evilela@ufv.br

Flavio Moscardi

Engenheiro Agrônomo, Ph.D. Entomology
Pesquisador da Embrapa Soja
Rua João Sampaio 233, Jardim Campo Belo
Caixa Postal 23 - Londrina, PR, Brasil,
CEP 86001-970
moscardi@cnpso.embrapa.br

Francisco Alexandre Shammass de Mancilha

Engenheiro de Alimentos e Segurança Técnico da Gerência Geral de Saneantes
Agência Nacional de Vigilância Sanitária
SEPN 515, Bloco B, Ed. Ômega - Brasília, DF, Brasil,
CEP 70770-502
saneantes@anvisa.gov.br

José Maurício Simões Bento

Engenheiro Agrônomo, Dr. Entomologia

Professor Doutor da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ),
Universidade de São Paulo - USP, Departamento de Entomologia,

Av. Pádua Dias 11, Caixa Postal 09 - Piracicaba, SP, Brasil,

CEP 13418-900

jmsbento@esalq.usp.br

José Roberto Postali Parra

Engenheiro Agrônomo, Dr. Entomologia

Professor Titular da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ),
Universidade de São Paulo - USP, Departamento de Entomologia,

Av. Pádua Dias 11, Caixa Postal 09 - Piracicaba, SP, Brasil,

CEP 13418-900

jparra@esalq.usp.br

Lilian Botelho Praça

Engenheira Agrônoma, M.Sc. Ciências Agrárias

Técnica de Nível Superior da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal 02372 Brasília, DF, Brasil,

CEP 70770-900

lilian@cenargen.embrapa.br

Luiz Eduardo Pacifici Rangel

Engenheiro Agrônomo, M.Sc. Ciências Agrárias

Fiscal Federal Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Secretaria de Defesa Agropecuária.

Esplanada dos Ministérios, Bloco D, Anexo A, sala 344 - Brasília, DF, Brasil,

CEP 70043-900

luisrangel@agricultura.gov.br

Luiz Cláudio Meirelles

Engenheiro Agrônomo, M.Sc. Ciências da Engenharia de Produção

Gerente Geral de Toxicologia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SEPN 511, Bloco A, Ed. Bittar II, 2º Andar - Brasília, DF, Brasil,

CEP 70750-541

toxicologia@anvisa.gov.br

Marco Antonio Abla

Químico, M.Sc. Química

Técnico da Bioagri Laboratórios LTDA

Rodovia Rio Claro/Piracicaba SP 127, Km 24, Caixa Postal 573 - Piracicaba, SP, Brasil

CEP 13142-000

m.abla@bioagri.com.br

Maria Elita Batista de Castro

Bióloga, Dra. Virologia Molecular

Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal 02372 - Brasília, DF, Brasil,

CEP 70770-900

elita@cenargen.embrapa.br

Maria Ionária de Oliveira Santos

Farmacêutica

Direção Técnica da IASTOX-SH

Centro Clínico Life Center, Setor Terminal Norte, Bloco O, Sala 240,

Final da W3 Norte, Brasília, DF, Brasil

CEP 70770-100

ionaria01@yahoo.com

Marlinda Lobo de Souza

Bióloga, Ph.D. Microbiology

Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica, PqEB Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal 02372 - Brasília, DF, Brasil,

CEP 70770-900

marlinda@cenargen.embrapa.br

Maria Luiza Marcico Publio de Castro

Bióloga, M.Sc. Entomologia

Diretora Técnica da CESIS - Soluções em Regulamentação e Registro de Produtos

SCLN 111, Bloco D, sala 105 Brasília, DF,

CEP 74750-540

marialuiza@cesis.bio.br

Myrian Silvana Tigano

Engenheira Agrônoma, Ph.D. Entomology
Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Parque Estação Biológica, PqEBAv. W5 Norte (final)
Caixa Postal 02372 - Brasília, DF, Brasil,
CEP 70770-900
myrian@cenargen.embrapa.br

Roberto Teixeira Alves

Engenheiro Agrônomo, Ph.D. Entomology
Pesquisador da Embrapa Cerrados
BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223 Planaltina, DF, Brasil,
CEP 73310-970
ralves@cpac.embrapa.br

Rose Gomes Monnerat

Bióloga, Ph.D. Agronomie
Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Parque Estação Biológica – PqEB, Av. W5 Norte (final),
Caixa Postal 02372, Brasília, DF – Brasil,
CEP 70770-900
rose@cenargen.embrapa.br

Silvana Vieira de Paula Moraes

Engenheira Agrônoma, M.Sc. Entomologia
Pesquisadora da Embrapa Cerrados
BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223 Planaltina, DF, Brasil,
CEP 73310-970
silvana@cpac.embrapa.br

Sueli Corrêa Marques de Mello

Engenheira Agrônoma, Dra. Fitopatologia
Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final)
Caixa Postal 02372 - Brasília, DF, Brasil,
CEP 70770-900
smello@cenargen.embrapa.br



Apresentação

Este livro resulta do esforço de um grupo de pesquisadores consciente da necessidade de divulgar amplamente os conhecimentos e os resultados das pesquisas ligadas aos fundamentos para regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas, visando disseminar informações acerca desses fundamentos e gerar subsídios técnicos que facilitem e aprimorem as ações para registro e utilização de produtos biológicos gerados com tecnologia nacional.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, por meio de duas Unidades situadas em Brasília (DF), a Embrapa Cerrados e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, promoveu o *Workshop* realizado em setembro/outubro de 2005 do qual originou este livro. O evento obteve grande sucesso graças ao envolvimento e à participação de palestrantes de reconhecida competência e de renome nacional e internacional em suas respectivas especialidades e também graças ao valioso apoio de parceiros públicos e privados que contribuíram para que o evento e o livro se tornassem realidade.

Desejamos que eventos como esse se repitam, de forma cada vez mais aperfeiçoada, para que todos nós consigamos contribuir para a permanente prática de uma agropecuária em que se utilizem menos agrotóxicos e se

produzam alimentos mais seguros, com maior sustentabilidade ambiental e menor ocorrência de problemas de saúde nos trabalhadores rurais e suas famílias.

Entre o público-alvo para esta publicação, além de pesquisadores, professores e estudantes, encontram-se os técnicos que trabalham nos órgãos registradores de produtos biológicos (ANVISA, IBAMA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) que precisam estar conscientes de que o País precisa do trabalho deles para priorizar a análise e a liberação desses produtos em escala comercial, contribuindo, também, para que o Brasil tenha posição de destaque entre os países que efetivamente utilizam o controle biológico de pragas.

Roberto Teixeira Alves

Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

José Manuel Cabral de Sousa Dias

Chefe-Geral da Embrapa Recursos

Genéticos e Biotecnologia

A regulação de produtos de quaisquer naturezas não é matéria simples cujos conhecimentos podem ser adquiridos na universidade. Cada produto comercialmente disponível tem uma finalidade de uso e um respectivo público-alvo, sendo específico para determinada atividade.

Os produtos chamados naturais ou biológicos não são totalmente inócuos ou seguros, pois se sabe que diversas substâncias químicas naturais têm considerável toxicidade aguda, assim como vários microrganismos presentes no ambiente podem ser patogênicos ou apresentar toxinas perigosas.

Nesse contexto, percebe-se que a regulação de produtos biológicos seja para fins terapêuticos ou mesmo para controle de pragas requer necessariamente conhecimentos de toxicologia, biologia, química e áreas afins, já que ela tem como objetivos principais a segurança do ambiente e do respectivo usuário dos produtos.

Entende-se também que, para o controle biológico de pragas, é de vital importância o conhecimento básico da disciplina controle biológico de pragas ou manejo integrado de pragas, pois como aplicar ou utilizar a toxicologia reguladora sem uma fundamentação teórica sobre o objeto de estudo? Esse desafio está

sendo lançado junto com as normas propostas para registro de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas. No escopo dessa avaliação, entende-se que são necessários conhecimentos de regulação toxicológica clássica e de técnicas de controle biológico, aliados ao bom senso inerente do técnico regulador.

A formação acadêmica em engenharia agrônoma é uma das poucas que oferece a noção de manejo integrado e de controle biológico de pragas, enquanto, no âmbito das ciências da saúde, como farmácia ou bioquímica a toxicologia já vem de longa data sendo oferecida como disciplina. De modo geral, percebe-se que em cursos amplos como medicina, medicina-veterinária, biologia e química, entre outros, não há nenhum dos dois tópicos em suas grades curriculares, ou seja, essas disciplinas poderão ser vistas somente na pós-graduação, dependendo da opção dos formandos. Esse fato mostra nitidamente a dificuldade de se obter profissionais com capacitação técnica para integrar as duas disciplinas em questão, apresentando assim condições para questionar e avaliar os riscos e os benefícios dos produtos naturais ou biológicos.

É claro que existem modelos utilizados internacionalmente para avaliação desse tipo de produto, contudo, é importante que o profissional tenha acima de tudo critério próprio para, eventualmente, conseguir resolver situações diversificadas que os modelos podem encaminhar à igualdade.

Alguns autores sugerem que a utilização de microrganismos como inseticidas representa um paradigma para a toxicologia, pois se trata de grande desafio à questão do entendimento dos mecanismos de seletividade ao alvo, sua ocorrência e mobilidade ambiental, assim como sua capacidade para competir com espécies locais. Sabe-se que as evidências hoje disponíveis, não sugerem que existam efeitos adversos à saúde associados com agentes microbiológicos de controle, porém, a possibilidade de infecções e de respostas imunológicas deve ser, necessariamente, considerada no contexto da exposição de seres humanos.

A segurança e o impacto ambiental de inseticidas microbiológicos devem ser avaliados em função do risco para organismos não-alvo e para a saúde humana, sempre em comparação com outros tipos de intervenção e com os possíveis efeitos decorrentes da inexistência de qualquer tipo de tratamento. A avaliação do risco/benefício sempre deve ser levada em conta. A ocorrência natural de inimigos é fator de grande importância no controle da população de insetos e isso é fundamental na questão do manejo, uma vez que agrotóxicos convencionais tendem a eliminar também os inimigos naturais. A inexistência de seletividade de agrotóxicos convencionais é um dos fatores diferenciais que devem ser levados em conta quando da comparação com um produto biológico.

Diferentemente da regulação dos agrotóxicos químicos convencionais, os agentes biológicos têm sido avaliados em vários países pelo sistema de fases. Essa inovadora forma de avaliação reduz o número de estudos necessários e tende a resultar em um processo mais rápido para o registro, todavia, tal avaliação requer conhecimento e habilidade mínima do regulador, na medida em que, sobre os resultados obtidos, ele deve ser capaz de avaliar a necessidade ou não de outros estudos ou fases.

Dentre os principais objetivos dos órgãos reguladores, destaca-se o incentivo à liberdade de concorrência como a forma mais eficiente de prestação de serviços públicos postos à disposição dos cidadãos por empresas privadas. Essa regulação deve prever entre outras coisas a fiscalização do cumprimento da legislação, assim como a proteção dos direitos dos usuários dos produtos regulados e a manutenção da qualidade e a universalidade dos serviços.

Desse modo, espera-se que as informações disponibilizadas neste livro possam oferecer facilidades aos organismos reguladores para avaliar e julgar o mérito de produtos dessa natureza, pois, brevemente, este será um dos grandes mercados da economia nacional e mundial.

Eduardo Cyrino Oliveira-Filho

Rose Gomes Monnerat

Os editores

Introdução e Princípios

Capítulo 1

Por que Regular Produtos Biológicos?	27
Introdução	27
Referências	30

Capítulo 2

Princípios de Controle: Estratégias e Táticas Empregadas no Manejo Integrado de Pragas - MIP	31
Introdução	31
O Controle de Pragas Através dos Tempos	31
Constatações Iniciais e Usos do Controle Biológico	32
A Evolução do Uso do Controle Químico	34
Impacto do Controle Químico de Pragas	35
Controle Químico, Controle Biológico e Outras Formas de Controle de Pragas	37
Filosofias de Controle de Pragas	38
Filosofia Tradicional de Controle de Pragas	39
Filosofia do Sistema Orgânico de Produção	40
Filosofia do Manejo Integrado de Pragas	40
Conceito de Praga no MIP	41
Componentes de um Programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP)	44
Considerações Finais	46
Referências	47

Agentes de Controle Comportamental

Capítulo 3

Feromônios e outros Semioquímicos: Pesquisa, Síntese e Uso em Armadilhas para Monitoramento, Coleta Massal e Confusão Sexual	51
Introdução	51
Definições	53
A Pesquisa no Brasil	58
Síntese de Feromônios	59
Identificação de Feromônios	59
Estudo do Comportamento dos Insetos	60
Tecnologias de Aplicação	61
Importância do Conhecimento da Área para o País	62
Exemplos de Interesse para o País	63
Comercialização de Feromônios no Brasil	63
Emprego de Feromônios em Barreiras Sanitárias	65
Legislação para Registro de Feromônios e Outros Semioquímicos no Brasil	66
Considerações Finais	67
Referências	68

Agentes de Controle Biológico

Capítulo 4

Nematóides como Agentes do Controle Biológico de Insetos	73
Introdução	73
Nematóides Entomofílicos	75
Phaenopsitylenchidae (Tylenchida: Secernentea)	76
Mermitidae (Stichosomida: Adenophorea)	80
Nematóides Entomopatogênicos	83
Biologia da Família Steinernematidae	84
Biologia da Família Heterorhabditidae	85
Biogeografia	86
Sintomatologia e Sinais de Infecção	89
Mobilidade	89

Organismos Antagonistas	90
Legislação e Regulamentação	91
Considerações Finais	97
Referências	98

Capítulo 5

Parasitóides e Predadores no Controle Biológico de Insetos-praga	103
Introdução	103
Tipos de Controle Biológico	105
Predadores e Parasitóides	106
Especificidade e Eficiência	107
Liberação de Inimigos Naturais	109
Produção de Inimigos Naturais	109
Situação no Mundo	113
Situação no Brasil	114
Considerações Finais	115
Referências	115

Capítulo 6

<i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Bacillus sphaericus</i>	121
Introdução	121
Isolamento	123
Caracterização	124
Caracterização Morfológica	124
Caracterização Sorológica	125
Caracterização das Toxinas	128
Caracterização dos Genes	128
Caracterização Entomopatogênica	135
Conservação e Armazenamento das Estirpes	135
Em Tubos de Ensaio com Meio Inclinado (Slants)	135
Liofilizados	136
Em Tiras de Papel-Filtro	136
Toxinas Produzidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	137
δ -Endotoxinas	137
α -exotoxina	143

β-exotoxinas	144
Vip3A	144
Mecanismo de Ação das Proteínas Cry	145
Solubilização	145
Processamento	146
União ao Receptor	146
Inserção na Membrana	148
Agregação	149
Formação do Poro e Citólise	149
Referências	150

Capítulo 7

Fungos Agentes de Controle Biológico 157

Introdução	157
Noções Básicas Sobre os Fungos	158
Os Fungos Como Agentes de Controle Biológico de Pragas Agrícolas ...	159
Fungos Entomopatogênicos	160
Fungos Agentes de Controle de Fitopatógenos	163
Considerações Finais	169
Referências	170

Capítulo 8

Baculovírus: Agentes de Controle Biológico 175

Introdução	175
Agentes Seguros de Controle Biológico	176
Vetores de Expressão Gênica	178
Ecologia e Biologia	179
Modo de Ação e Replicação Viral	180
Parasitas Intracelulares Obrigatórios	180
Ciclo de Vida	181
Produção em Sistemas <i>In Vivo</i> e <i>In Vitro</i>	184
Fenótipos Virais	185
Purificação de Partículas Virais	186
Classificação Taxonômica	187
Nomenclatura dos Baculovírus	188
Considerações Finais	189
Referências	190

Produção, Formulação, Aplicação e Comercialização de Produtos à Base de Agentes Biológicos

Capítulo 9

Tecnologia de Produção e Formulação de Nematóides Entomopatogênicos	197
Introdução	197
Nematóides Entomopatogênicos	198
Produção de Nematóides Entomopatogênicos	200
Formulação dos Nematóides Entomopatogênicos	207
Considerações Finais	212
Referências	213

Capítulo 10

Produção, Formulação e Aplicação de Bactérias	219
Introdução	219
Produção de Bactérias Entomopatogênicas	220
Etapas da Produção de Bactérias Entomopatogênicas	221
Formulação de Bactérias Entomopatogênicas	226
Utilização de Bactérias Entomopatogênicas	228
Na Saúde Pública	228
Na Agricultura	234
Considerações Finais	235
Referências	235

Capítulo 11

Produção, Formulação e Aplicação de Fungos para o Controle de Pragas	239
Introdução	239
Produção de Fungos	239
Produção em Substratos Sólidos	240
Produção com Fermentação Líquida	240
Fermentação Líquido-sólida	241

Formulação de Fungos	242
Tipos de Formulação	243
Pulverizadas	243
Seca	244
Outros Tipos	244
Resultados de Sucesso	244
Técnicas de Aplicação de MicoInseticidas	247
Mistura	247
Atomização	247
Transporte	248
Coleta	248
Formação de Depósito e Migração	248
Interação com o Inseto-praga	248
Ação Biológica	248
Aplicação de Gotas Controladas (CDA)	249
Referências	250

Capítulo 12

Produção, Formulação e Aplicação de Vírus

Entomopatogênicos	255
Introdução	255
Produção e Formulação de Baculovírus	257
Aplicação de Baculovírus para o Controle de Pragas	264
Breve Histórico	264
Programas de Uso de Baculovírus no Controle de Insetos	265
Controle da Lagarta-da-soja, <i>Anticarsia gemmatilis</i> : um Caso de	
Sucesso de Uso de um Baculovírus como Inseticida Biológico ...	265
Potencial de Uso de Vírus de Insetos no Brasil	273
Considerações Finais	274
Referências	275

Capítulo 13

Comercialização de Agentes Microbiológicos para Controle de Pragas. Experiências de Países da América Latina.....

Introdução	279
Microrganismos no Controle Biológico de Insetos-praga	281

Produção de bactérias na América Latina	283
Reflexão e Considerações finais	287
Referências	290

Avaliação e Regulação

Capítulo 14

Histórico da Avaliação de Segurança de Microrganismos para Controle de Pragas: Agentes Químicos X Agentes Biológicos	295
Introdução	295
Toxicidade X Patogenicidade	303
Considerações Finais	304
Referências	305

Capítulo 15

Registro de Saneantes Categorizados como Desinfestantes Contendo Princípios Ativos Biológicos	307
Introdução	307
Considerações Gerais	307
Produtos, Formas Físicas e Respectivas Concentrações Permitidas	308
Monografia B01 - <i>Bacillus thuringiensis</i>	308
Monografia B31 - <i>Bacillus sphaericus</i>	309
Inseticidas para Empresas Especializadas	310
Produtos para Jardinagem Amadora	311
Considerações Finais	311
Referências	312

Capítulo 16

Eficiência e Praticabilidade de Produtos Biológicos	313
Introdução	313
Evolução do Registro de Agrotóxicos	314
Sustentabilidade	316
Definições de Produtos Biológicos	317
Avaliação da Eficiência Agrônoma em Produtos Biológicos	319

Considerações Finais	321
Referências	322

Capítulo 17

Regulamentação e Avaliação Toxicológica de Produtos de Baixa Toxicidade 325

Introdução	325
Importância da Avaliação Toxicológica e do Controle dos Agrotóxicos ...	326
Marco Regulador de Agrotóxicos e dos Produtos de Baixa Toxicidade ..	328
Procedimentos para Avaliação Toxicológica de Produtos Agrotóxicos e Afins	331
Considerações Finais	340
Referências	340

Capítulo 18

Avaliação Ambiental de Produtos Biológicos 343

Introdução	343
Dados Físico-Químicos	344
Dados Biológicos	346
Considerações Finais	350
Referências	351



Introdução e Princípios

Por que Regular Produtos Biológicos?

Eduardo Cyrino Oliveira-Filho
Maria Luiza Marcico Publio de Castro

Introdução

Por mais paradoxal que seja, os produtos biológicos, utilizados no controle de pragas agrícolas, são regulados, no Brasil, pela Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 (BRASIL, 1989), – a Lei de Agrotóxicos e Afins –. Nessa lei, os agrotóxicos e afins são definidos como

os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

Nesse contexto, como citado anteriormente, enquadram-se tanto os agentes de controle biológico (entomopatógenos, parasitóides, predadores e nematóides) quanto os agentes de controle comportamental (semioquímicos) utilizados na agricultura com a finalidade de controlar outros organismos considerados nocivos.

Os produtos biológicos devem ser orientados pelas regras estabelecidas na regulamentação dessa lei, baixada pelo Decreto nº 4.074, de 8 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2002), assim como pelos instrumentos jurídicos normativos específicos existentes para cada um desses agentes. Deve-se ressaltar que não é a origem dos produtos que os classifica nesse contexto, mas sim a finalidade para a qual eles se destinam, ou seja, controlar seres vivos considerados nocivos.

O Decreto 4.074/02 estabelece o registro como condição para produção, manipulação, importação, exportação, comercialização e utilização dos agrotóxicos, seus componentes e afins em todo o território nacional, ou seja, o registro é a maneira legal de um produto agrotóxico ser comercializado no Brasil seja por intermédio de formulação/fabricação dos seus componentes, seja pela importação deles. O objetivo do registro, entre outras coisas, é garantir a segurança da população e do meio ambiente, além de assegurar padrões de qualidade e eficiência para os produtos a serem comercializados.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) são os órgãos federais responsáveis pela Avaliação e o Registro de Agrotóxicos e Afins.

Segundo o Decreto Nº 4.074/02, aqueles que solicitam o registro devem submeter a cada um dos órgãos citados informações e dados específicos para que sejam propriamente avaliados. Excepcionalmente, os produtos a serem utilizados no ambiente domiciliar (domissanitários) e em campanhas de saúde pública, são regidos pela Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976 (BRASIL, 1976) e por esse motivo são avaliados e tem seu registro concedido única e exclusivamente pela Gerência Geral de Saneantes da ANVISA. De modo geral, as principais preocupações dos órgãos reguladores estão relacionadas à similaridade no modo de ação existente entre os produtos biológicos e os

produtos químicos convencionais, ou seja, os possíveis impactos da utilização desses produtos sobre o meio ambiente e sobre a saúde da população exposta. As exigências fazem sentido, pois, mesmo se tratando de um produto natural, o principal questionamento é: **Quais conseqüências poderiam ser advindas da utilização desses produtos em quantidades não naturais?** A partir desse ponto surge a relevância de informações tais como: a toxicidade de potenciais toxinas, dados de irritabilidade, alergenicidade e patogenicidade. Assim sendo, justificam-se a avaliação prévia e os testes de segurança requeridos de forma a se obter dados de identificação do perigo oferecido pelo agente no contexto de um processo de avaliação de risco que irá nortear o gerenciamento das preocupações existentes.

Mundialmente, o interesse pela utilização de produtos considerados eficazes e menos poluentes (naturais) vem crescendo e, nesse ponto, o aumento da comercialização de produtos à base de microrganismos entomopatogênicos (microbiológicos) e de feromônios (semioquímicos) de insetos deve-se, sobretudo, ao incremento das pesquisas nesse setor.

Todavia, até bem pouco tempo, todo o processo de avaliação e registro de produtos era voltado exclusivamente para a avaliação de substâncias químicas (agrotóxicos convencionais), e os produtos biológicos, totalmente distintos, vinham sendo enquadrados nesses protocolos.

Com o aumento da demanda por alimentos “mais limpos” e por produtos considerados pela legislação vigente como de “baixa toxicidade e periculosidade”, torna-se premente que os órgãos reguladores brasileiros se adaptem a esse novo tipo de “agrotóxico” e, nesse contexto, promovam avaliação diferenciada para esse tipo de produto, o que será fator imperativo, entre outras coisas, para a viabilização e o desenvolvimento da pesquisa em biotecnologia no País.

Referências

BRASIL. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 set. 1976. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L6360>. Acesso em: 14 dez. 2005.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 jul. 1989. Seção 1, p. 11459-11460.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 8 jan. 2002. Seção 1, p. 1-12.

Princípios de Controle: Estratégias e Táticas Empregadas no Manejo Integrado de Pragas - MIP

Silvana Vieira de Paula-Moraes
Charles Martins de Oliveira

Introdução

O Controle de Pragas Através dos Tempos

A partir do momento em que a agricultura se torna uma atividade humana viabilizadora da sobrevivência do homem, surgem, também, os problemas de ocorrência de organismos, entre eles insetos e ácaros, concorrendo com a exploração dos cultivos. A introdução, em grandes áreas, de uma única espécie vegetal de interesse econômico resulta em um ambiente ecologicamente simplificado, favorecendo as altas taxas de reprodução e sobrevivência de algumas espécies que se tornam pragas na agricultura (RISCH, 1981).

Até a década de 1940, as práticas utilizadas no controle de pragas baseavam-se no emprego de organismos para controle de pragas, denominado controle biológico. Um método de controle densidade-dependente, no qual uma espécie de inimigo natural atua na diminuição populacional de outra espécie, considerada praga, pelos mecanismos de predação, parasitismo, patogenicidade ou competição. Outra forma de controle de pragas, o denominado controle químico, era feito pela utilização das propriedades tóxicas de muitas plantas, a partir de seus extratos e outras substâncias químicas. Essas substâncias, quando pulverizadas sobre os cultivos ou armazenadas junto aos produtos agrícolas,

apesar da eficiência bastante variável, contribuíam para a eliminação de pragas. No Brasil, a partir da Lei 7.802/89, a denominação estabelecida para essas substâncias químicas é agrotóxico.

Constatações Iniciais e Usos do Controle Biológico

A prática do controle biológico foi desenvolvida há séculos a partir da observação de produtores da ação de controle, principalmente, de predadores em insetos-praga, de fácil visualização e compreensão de seus ciclos de vida e de suas interações. A ação de agentes de controle biológico, ocorrendo de forma natural nos cultivos, é denominada controle biológico natural. Como exemplo, tem-se o uso de colônias de formigas na China e Yemen para controle de pragas em Citrus e *Phoenix*. Na Europa, o primeiro registro de uso de insetos predadores data de 1752, no qual se afirmava que “todo inseto tem seu predador que o caça e o destrói”. No início do século 19, era sugerido que predadores, como moscas da família Syrphidae e besouros da família Coccinellidae fossem usados para o controle de pulgões em casa de vegetação e cultivos de campo. No caso de insetos parasitóides, a observação de emergência de vespas da família Ichneumonidae em lagartas de mariposas, como resultado da postura de ovos desse parasitóide no interior do corpo do hospedeiro, representa um dos primeiros registros de parasitismo, sendo um evento de maior dificuldade de observação e de entendimento da relação entre parasitóide e hospedeiro (COLSON, 1992).

No século 19, houve grande aumento de pesquisas abrangendo aspectos de taxonomia, biologia e ecologia de insetos parasitóides e predadores (DEBACH; ROSEN, 1991). Nesse cenário, ocorreram as ações de importação de parasitóides e outros grupos de inimigos naturais de várias regiões do mundo, sendo que uma das primeiras introduções foi realizada em 1855, com a importação de um parasitóide da Europa para os EUA. Esse tipo de controle biológico, a partir da importação de agentes de controle, é denominado controle biológico clássico, no qual são feitas introduções inoculativas, com posterior aumento da densidade populacional e estabelecimento na área.

Com o avanço de pesquisas que permitiram a manipulação dos inimigos naturais, alcançou-se a terceira dimensão do controle biológico (VAN DEN BOSCH; MESSENGER; GUTIERREZ, 1982). Esses avanços possibilitaram a criação massal desses agentes de controle biológico, com base em técnicas de criação em hospedeiros naturais ou no uso de dietas artificiais, além do entendimento das suas bases ecológicas de forma a otimizar sua utilização. O conhecimento de requisitos nutricionais de predadores e parasitóides, bem como aspectos relacionados à manipulação de colônias em laboratório, permitiu sua utilização a partir de liberações periódicas em campo, com o denominado controle biológico aplicado.

No caso dos entomopatógenos (fungos, bactérias, vírus, nematóides) o desenvolvimento do conhecimento desses agentes foi impulsionado pelos danos causados por fungos em criações do bicho-da-seda *Bombyx mori*, comprovado, cientificamente, em 1835, tratar-se de infecção de *Beauveria bassiana*. No ano seguinte, houve a primeira proposta de utilização de líquidos de cadáveres de lagartas misturados em água para pulverização em plantas, como forma de controle de pragas. Entretanto, testes em campo só foram realizados na Rússia, em 1884, quando foi desenvolvida a produção em massa de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* para controle de larvas de *Cleonus punctiventris* (COLSON, 1992).

Dentro do controle biológico, existe ainda a possibilidade de utilização de artrópodes para controle de plantas daninhas e de agentes para controle de patógenos. No caso do uso de artrópodes para controle de plantas daninhas, o exemplo clássico é o da utilização da cochonilha *Dactylopius* no controle do cactus do gênero *Opuntia*, em meados do século 19 (GOEDEN, 1983). O emprego de agentes de controle biológico para controle de patógenos foi primeiramente constatado, com base nas evidências de competição entre fungos saprófitas e fungos patogênicos (SANFORD, 1926).

A Evolução do Uso do Controle Químico

O marco do descobrimento de novas moléculas inseticidas e sua utilização em grande escala data da década de 1940, entretanto, muitos registros de controle de pragas com o emprego de substâncias químicas, os agrotóxicos, em especial, para controle de insetos, são anteriores a essa época. Registro de cerca de 2500 a.C. indica o uso de substâncias químicas pelos sumerianos. Da mesma forma, egípcios e chineses utilizavam ervas e óleos principalmente para proteção de sementes. Em 1101, os chineses descobriram as propriedades inseticidas do sabão, sendo que, no final do século 15, a utilização de infusões de fumo e de outras ervas, além da utilização de arsênico, tornou-se comum para controle de pragas agrícolas. No final do século 19 e início do século 20, surgiram os equipamentos de aplicação de inseticidas, ocorrendo as primeiras aplicações aéreas, para o combate ao bicudo do algodoeiro dentro de um programa nacional de controle, ocorrido nos EUA em 1922. No período compreendido entre as décadas de 1920 e 1930, os agrotóxicos apresentavam baixa eficiência, elevado custo e causavam efeitos fitotóxicos às plantas cultivadas, além do destaque de uso do controle biológico no combate às pragas agrícolas.

A partir da década de 1940, durante a Segunda Guerra Mundial, ocorreu a descoberta das propriedades inseticidas do DDT. Inicialmente utilizado no combate ao mosquito *Anopheles* spp., transmissor da malária e de *Rickettsia prowazekii*, transmissor do tifo, essa molécula ganhou destaque, posteriormente, no combate a pragas agrícolas. Desde então, iniciaram-se as pesquisas para busca de novas moléculas com propriedades inseticidas à base de, principalmente, derivados do petróleo, com grande participação das companhias desse setor. Diante desse cenário, com a promessa oferecida de controle eficiente de pragas por meio dos agrotóxicos, as pesquisas foram priorizadas para essa utilização e, mesmo o controle biológico, passou a ter papel secundário e, em alguns casos, foi considerado desnecessário (CROCOMO, 1990).

A ilusão do aspecto infalível dos agrotóxicos para o controle de pragas, contudo, foi gradualmente eliminada quando os efeitos deletérios ao meio ambiente e à saúde humana começaram a ser constatados poucos anos depois. Um marco dessa constatação foi a publicação do livro de Raquel Carson, *Primavera Silenciosa*, em 1962, no qual foram feitas acusações contra o uso de inseticidas e seu impacto no meio ambiente. Essas acusações foram baseadas em estudos sobre a redução da população de aves no período da primavera. Pesquisas científicas detectaram que os inseticidas do grupo Clorado, entre eles o DDT, comprometiam a deposição de cálcio na casca do ovo, o que gerava ovos de casca com resistência reduzida, com grande ocorrência de ovos quebrados no momento da postura, que era inviabilizada. Esse livro causou a reação de vários segmentos da sociedade americana, culminando com a elaboração de um relatório recomendando a adoção de práticas no controle de pragas que favorecessem a qualidade ambiental.

Impacto do Controle Químico de Pragas

Os estudos e o entendimento do impacto dos agrotóxicos avançaram e foram além, quando demonstraram que o uso inadequado do controle químico gera problemas ao meio ambiente, à saúde humana e pode comprometer a sustentabilidade da exploração agrícola.

A presença de agrotóxicos no meio ambiente ocorre a partir das suas formas de aplicação que podem ser direta ou indireta. A aplicação intencional ou direta ocorre quando direcionada, principalmente, para plantas cultivadas, animais, solos, mananciais (para controle de ervas aquáticas e larvas de moscas), além do uso domissanitário. Outra forma de introdução de agrotóxicos é a contaminação não intencional ou indireta, pelo lixo industrial de fábricas de agrotóxicos, com descargas em cursos de águas ou lençóis freáticos, além de deriva, chuva, limpeza de tanques de pulverizadores, entre outras formas. Movimentos de correntes de ar são uma fonte potencial de contaminação de agrotóxicos, mas que ainda não está bem compreendida. A erosão causada por

movimentação de águas superficiais pode contribuir para o transporte de agrotóxicos de uma área tratada para áreas não tratadas como lagoas, represas e cursos de água superficiais ou de subsuperfície. No entanto, considerando as várias formas que podem ocorrer a contaminação e a ocorrência de resíduos de agrotóxicos na atmosfera e nos ecossistemas aquáticos e terrestres, a maior concentração desses resíduos é verificada nos ecossistemas aquáticos, sendo que quase toda a introdução de agrotóxicos no meio ambiente é feita pela aplicação direta nas lavouras (BAPTISTA, 1996).

O impacto dos agrotóxicos na saúde humana ocorre, sobretudo, pela exposição do homem, no momento do preparo da calda, na aplicação da cultura e durante a colheita. Outra forma de impacto na saúde humana é via consumo de produtos agrícolas, principalmente *in natura*, quando as quantidades de resíduos de agrotóxicos excedem o limite máximo tolerável. Essa contaminação varia em função do grupo químico, dosagem, respeito ao período de carência e registro do agrotóxico para a cultura. A questão de resíduos de agrotóxicos nos alimentos tem recebido cada vez mais atenção por parte do mercado interno brasileiro, com consumidores mais informados e exigentes. Exigência esta já presente no mercado internacional, no qual os produtos com selo de qualidade, definidores de menor impacto à saúde humana podem ter maior aceitação comercial (BEZERRA; NOGUEIRA; PAULA, 1999) ou mesmo serem rejeitados com base nas normas dos acordos internacionais que estabelecem monitoramento dos níveis toleráveis de resíduos.

O impacto que os agrotóxicos pode gerar na exploração agrícola, comprometendo sua sustentabilidade, está relacionado a problemas de seleção de população resistente, ressurgência, aparecimento de novas pragas, erupção de pragas até então de ocorrência esporádica na cultura, denominadas pragas secundárias, e morte de insetos benéficos, como os polinizadores e os inimigos naturais além da elevação dos custos de produção.

A resistência de organismos-praga aos agrotóxicos representa grave problema que pode ser desencadeado pelo uso inadequado de agrotóxicos. Na

população de pragas, já existem indivíduos com características genéticas que conferem resistência à determinada molécula de agrotóxico ou mesmo grupo químico, e a exposição continuada a determinado agrotóxico leva à seleção de população resistente já que, ao longo das gerações da praga, essa pressão de seleção tende a reduzir ou mesmo eliminar indivíduos suscetíveis ao agrotóxico, restando apenas indivíduos resistentes. A ressurgência de pragas, o aparecimento de novas pragas e a erupção de pragas secundárias ocorrem em função do favorecimento de determinada praga pela aplicação de agrotóxicos, principalmente, pela eliminação de seus inimigos naturais (GALLO et al., 2002).

Controle Químico, Controle Biológico e Outras Formas de Controle de pragas

Além dos controles químico e biológico existem outras formas de controle que são usadas desde os tempos mais remotos, valendo ressaltar que nem todo controle que não é químico é biológico. O mais comum deles era é o controle cultural que, por meio de práticas como eliminação dos restos culturais, bom preparo do solo, eliminação de plantas daninhas, estabelecimento de época de plantio ou época de colheita representa, até os dias atuais, medidas que podem exercer controle de pragas. Da mesma forma que o controle mecânico, por exemplo, realizado mediante destruição manual de lagartas desfolhadoras e o controle físico, pelo uso do fogo, armadilhas luminosas, entre outras medidas (GALLO et al., 2002).

A resistência de plantas, em menor número de casos, também apresenta registro de sua utilização. Exemplo é o do final do século 19, da importação de plantas de uva dos EUA para a Europa para serem empregadas como porta-enxertos e dessa forma desfavorecer o ataque da praga filoxera às raízes das plantas. O emprego dessas plantas resistentes evitou que a indústria de vinho na França fosse inviabilizada pela falta de matéria-prima (LARA, 1991).

Ao longo do tempo, outros avanços foram obtidos pela pesquisa que disponibilizou novas formas de controle de pragas. O controle comportamental



surge do entendimento do aproveitamento de odores para comunicação entre os insetos, os semioquímicos. Com os avanços na identificação desses compostos a partir da década de 1950, o interesse por esse tipo de comunicação olfativa intensificou-se e atualmente o emprego do controle comportamental de pragas, utilizando-se principalmente de feromônios, tem-se apresentado como promissora (VILELA; DELLA LÚCIA, 1987). Os feromônios podem ser usados para a detecção da chegada da praga na cultura, para o monitoramento da população de pragas e também para redução dessa população, por meio de armadilhas utilizadas tanto para a coleta massal como para a interrupção da comunicação entre machos e fêmeas da espécie, por meio do confundimento, causando nas duas situações, a diminuição da população da praga.

Os avanços tecnológicos na área de cultura de tecidos e biologia molecular tornaram possível a transferência de genes exógenos para plantas cultivadas, com base em novas técnicas de engenharia genética, sendo essa tecnologia a última geração de medidas no controle de pragas. No caso de resistência de plantas a insetos, o emprego de genes que expressam proteínas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) são as mais utilizadas até o momento e causam a morte do inseto pela inativação das células do intestino, sendo usadas em muitos países para controle de pragas da Ordem Lepidoptera (mariposas e borboletas) e Ordem Coleoptera (besouros) (GALLO et al., 2002).

Filosofias de Controle de Pragas

Várias são as correntes que sistematizam o controle de insetos e ácaros ao longo da história. Pedigo (1999) divide o uso de métodos para controle de pragas em três momentos distintos. A era pré-inseticida, a era inseticida e a era do surgimento do conceito de manejo de pragas. Já Salgado e Conceição (1999) caracterizam o uso de agrotóxicos em três fases: (1) conceito estético comercial que envolve a concepção de qualidade dos produtos agrícolas relacionados apenas com a aparência do produto, desconsiderando a presença de resíduos;

(2) conceito ecológico que propõe a redução do controle químico como forma de favorecer o controle biológico e; (3) conceito ecotoxicológico, com ênfase na busca de maior número de recursos viáveis e necessários para reduzir o controle químico, sendo a praga caracterizada pela presença de uma população.

Atualmente, no Brasil, um país com exploração econômica de culturas que varia desde grandes áreas com produção de *comodities* agrícolas até a exploração de áreas menores, como é o segmento da agricultura familiar, podem-se definir três filosofias distintas de controle de pragas que ocorrem concomitantemente e estão presentes nos diferentes segmentos do setor produtivo agrícola: (1) filosofia tradicional de controle de pragas; (2) filosofia do sistema orgânico de produção e; (3) filosofia do manejo integrado de pragas.

Filosofia Tradicional de Controle de Pragmas

Conforme apresentado anteriormente, a partir do histórico do uso de métodos de controle de pragmas, o desenvolvimento e a disponibilização de moléculas de agrotóxicos, essa filosofia baseia-se na prevalência do controle químico diante da presença ou da suspeita de indivíduos de espécie-praga na cultura. Sua utilização pode ser justificada, em um primeiro momento, pela falta de informação para alguns cultivos, pela ocorrência efetiva de inimigos naturais pelo real impacto na produção causado pelas espécies de herbívoros. Entretanto, não se podem desprezar o risco envolvido no investimento agrícola e a simplicidade de adoção do controle químico, considerada não só por parte dos produtores, como também de técnicos (NORTON, 1993).

Basicamente, nessa filosofia de controle, o conceito de praga diz respeito a insetos que praticam herbivoria em uma cultura e que devem ser eliminados como forma de não representar risco à exploração econômica. As expressões “inseto bom é inseto morto” e “método calendário” caracterizam a forma como é feita a tomada de decisão para o controle de pragmas.

Filosofia do Sistema Orgânico de Produção

Diante das constatações do impacto do controle químico de pragas no ambiente e na saúde humana e, mais recentemente, da demanda crescente de alguns nichos de mercado por produtos livres de substâncias químicas, surgiram diversas correntes que adotam a filosofia de controle de pragas dentro do sistema orgânico, baseada no emprego de métodos culturais, biológicos e mecânicos em contraposição ao uso de material sintético, como são os agrotóxicos. De acordo com a Lei 10.831/2003, considera-se sistema orgânico de produção agropecuária no Brasil todo aquele sistema no qual se adotam técnicas específicas, com destaque para a proposta de minimização da dependência de energia não renovável, além da otimização do uso dos recursos naturais e sustentabilidade econômica e ecológica. O conceito de sistema de produção orgânico abrange todas as correntes propostas atualmente no Brasil, tais como sistema ecológico, natural, regenerativo, permacultura, biológico, entre outros. Nesse sistema, é estabelecida a eliminação de organismos geneticamente modificados e das radiações ionizantes, bem como a diversificação, o consórcio e a rotação de culturas, o uso de caldas tradicionais como bordalesa, viçosa e sulfocálcica, o emprego de métodos mecânicos e físicos, a utilização de germoplasmas adequados a cada região e a cada realidade ecológica. Segundo Darolt (2002), os Estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Espírito Santo concentram cerca de 70% da produção nacional de alimentos orgânicos, sendo que o Brasil ocupa o trigésimo quarto lugar entre os países exportadores de produtos orgânicos.

Filosofia do Manejo Integrado de Pragas

A origem do conceito de Manejo Integrado de Pragas (MIP) surge inicialmente dentro das bases teóricas do controle biológico de pragas, quando se tentou resgatar uma alternativa ao controle químico, devido ao impacto causado, principalmente, pelos inseticidas do grupo dos clorados (DENT, 1993). Entretanto, considerando a demanda de controle de determinadas pragas que o controle

biológico não atinge, bem como a eficiência nos parâmetros estabelecidos dentro da exploração agrícola comercial, foi proposto o conceito de controle integrado, enfatizando o uso de seletividade dos agrotóxicos como forma de favorecer a ação dos inimigos naturais e minimizar a demanda de aplicações de agrotóxicos (STERN et al., 1959; SMITH; VAN DEN BOSH, 1967). O termo manejo integrado de pragas e sua sigla MIP surgiram com a evolução e proposta de reunir ou mesmo integrar outras práticas de controle e envolvem os princípios de não erradicar insetos e sim reduzir o *status* da praga, em níveis toleráveis, de forma a favorecer a manutenção da qualidade ambiental do cultivo, dos ecossistemas naturais e da saúde humana (PEDIGO, 1999).

A filosofia do manejo integrado de pragas envolve primeiramente a proposta de estabelecimento de metas que visam eliminar ou minimizar os danos causados pelas pragas denominadas estratégicas. Já as medidas empregadas para a adoção de estratégias estabelecidas no manejo integrado de pragas são definidas como táticas (CHANT, 1964) e são os métodos de controle disponíveis e viáveis de serem empregados no controle das pragas de forma que as metas estratégicas sejam atingidas.

Conceito de Praga no MIP

Primeiramente, abordou-se a definição de praga agrícola tendo como base sua densidade populacional e injúria causada no tecido vegetal. Organismos presentes na cultura, praticando herbivoria, vão ser classificados como pragas de acordo com o impacto que podem gerar na exploração agrícola a partir da injúria que venha a se repercutir em dano econômico, considerando aqui não só o parâmetro de presença da espécie do organismo, mas a sua população. Exceção a essa classificação são os insetos transmissores de doenças os quais, na chegada à cultura e na picada de prova, já estão disseminando, por exemplo, viroses, desencadeando dano econômico, mesmo se tratando de baixa densidade populacional.

Toda espécie apresenta um ponto de equilíbrio que é sua densidade populacional média, ao longo do tempo. Espécies que, ao se alimentarem da cultura, não desencadeiam dano econômico, ou seja, perdas econômicas na produção, são definidas como organismos não-praga. Entretanto, quando perdas econômicas ocorrem na produção, atingindo o que é definido como nível de dano, causado pelo ataque de uma espécie de herbívoro em determinada densidade populacional, tem-se aí a definição de praga agrícola conforme a filosofia do MIP (ROSSET, 1991). A densidade populacional que pode desencadear dano econômico, atingindo o nível de dano, varia em função da praga e da injúria que é causada no tecido vegetal, existindo pragas que atacam a parte da planta de interesse comercial, as pragas diretas, e àquelas que ocorrem em outras partes da planta, as pragas indiretas.

Dentro do grupo das pragas agrícolas, existem as pragas-chave e as pragas secundárias. As pragas-chave podem ser separadas em pragas-chave severas, nas quais o ponto de equilíbrio de densidade populacional está sempre acima do nível de dano e em pragas-chave freqüentes em que constantemente ocorre aumento da densidade populacional acima do nível de dano. As pragas secundárias, conforme apresentado anteriormente, são aquelas que, devido à ação dos agentes de controle natural, entre eles os agentes de controle biológico, apresentam surtos mais esporádicos e atingem com menor freqüência o nível de dano.

A tomada de decisão para adoção dessas medidas de controle baseia-se no nível de controle. Esse nível é estabelecido conforme a densidade populacional da praga; medidas de controle devem ser adotadas de forma a evitar que essa densidade populacional atinja o nível de dano e desencadeie perdas econômicas na cultura (ROSSET, 1991; PAULA, 1997). Na Figura 1, pode-se observar uma representação gráfica dos conceitos de organismo não-praga, praga secundária e praga-chave em função da flutuação da densidade populacional de espécies de pragas hipotéticas e nível de dano e a tomada de decisão para adoção de medidas de controle, tendo como base o nível de controle.

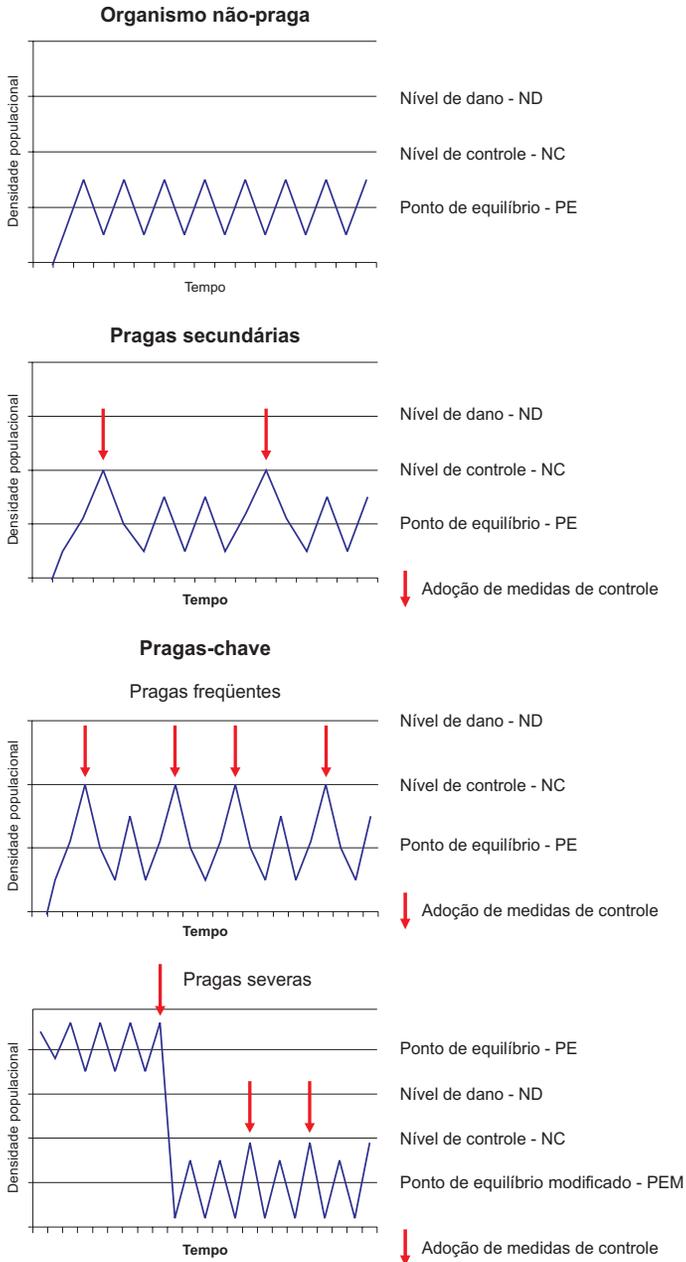


Figura 1. Organismo não-praga, praga secundária e praga-chave de acordo com as densidades populacionais de espécies hipotéticas.

Componentes de um Programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP)

Na execução de um Programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP), devem-se levar em consideração componentes que podem ser adotados como forma de contemplar os pressupostos estabelecidos pela filosofia do MIP. Sendo eles a avaliação do agroecossistema, a tomada de decisão e a escolha dos métodos de controle.

A avaliação do agroecossistema envolve, a partir de técnicas de amostragem e monitoramento, o acompanhamento de vários parâmetros da cultura. A verificação da densidade populacional de pragas e de inimigos naturais, conforme discutido anteriormente, permite conhecer os valores de densidade populacional da praga em que é necessária a tomada de decisão para adoção de medidas de controle de pragas. A avaliação da densidade populacional de inimigos naturais, particularmente para espécies que exercem controle biológico efetivo de pragas no agroecossistema, é uma informação também usada na tomada de decisão, já que a ação desses agentes de controle natural pode funcionar como força reguladora que mantém a densidade populacional das pragas abaixo do nível de controle. A avaliação do estágio fenológico da cultura fornece subsídios para se estimar resposta da planta diante da injúria no tecido vegetal, causado pela praga, sendo que o estágio de desenvolvimento da planta pode influenciar o grau de susceptibilidade e dano econômico causado pela praga e, finalmente, a avaliação das condições climáticas, já que os fatores de clima influenciam a densidade populacional de pragas, de inimigos naturais e o grau de suscetibilidade das culturas. Essa influência ocorre, ainda, na utilização e na eficiência de métodos de controle a serem adotados para controle de pragas, o que, em última análise, determina a relevância do acompanhamento na cultura dos dados de temperatura, umidade, precipitação, entre outros.

A tomada de decisão para adoção de medidas de controle de pragas, quando necessário, envolve a análise de todas as informações obtidas da

avaliação do agroecossistema e a escolha dos métodos de controle viáveis de serem utilizados. Essa tomada de decisão deve ser norteada pela estratégia estabelecida dentro de um Programa de Manejo Integrado de Pragas, proposto anteriormente ao estabelecimento da cultura.

Em um Programa de MIP, vários tipos de estratégias de controle de pragas podem ser propostas e podem variar da estratégia de não-adoção de nenhuma medida de controle até a combinação de adoção de mais de uma estratégia (PEDIGO, 1999). Nos casos em que as densidades populacionais de pragas estão abaixo do nível dano econômico, a estratégia da não-adoção de medidas de controle significa que mesmo não se lançando mão de medidas para supressão dessa população, um cuidadoso acompanhamento da cultura deve ser realizado por meio do monitoramento da praga.

A redução de populações de pragas, como uma estratégia do MIP a partir de uma abordagem terapêutica, é adotada nos casos em que a densidade da população da praga ou mesmo histórico de problemas com determinada espécie de praga demandam a redução do seu ataque que pode ser obtida pela diminuição de aspectos favoráveis para sua ocorrência, como, por exemplo, rotação de culturas, preparo do solo, eliminação de abrigos de pragas próximos à área de cultivo. A redução da ocorrência de pragas pode também ser feita com a aplicação de inseticidas, não sendo, entretanto, a única opção já que outras táticas podem ser adotadas, tais como: liberação ou aplicação de inimigos naturais além de plantio de cultivares resistentes. Outra estratégia refere-se à redução da suscetibilidade da cultura à injúria causada pela praga. Exemplos de táticas para alcançar essa estratégia proposta, diz respeito às aplicações de adubação para aumentar o vigor da cultura ou estabelecimento de datas de plantio, como forma de evitar a sincronia de ocorrência da praga e época de estágio fenológico da cultura mais susceptível ao seu ataque.

A estratégia a ser estabelecida em um Programa de Manejo Integrado de Pragas varia em função das características do agroecossistema em questão, e

seu grau de complexidade está em função do *status* da praga ou complexo de pragas, presente em determinada cultura. De modo geral, pragas secundárias de ocorrência esporádica na cultura terão como opção de manejo o controle terapêutico, mediante constatação de seu impacto, por meio do nível de controle. Já em relação às pragas-chave, em um programa de manejo, as estratégias e táticas adotadas deverão contemplar ações de redução de fatores que favoreçam sua ocorrência e a adoção de controle terapêutico em menor escala, baseado no nível de controle.

Considerações Finais

Além do impacto ao meio ambiente e na saúde humana, o uso inadequado de agrotóxicos pode comprometer a própria sustentabilidade da exploração agrícola. A filosofia do Manejo Integrado de Pragas (MIP), mesmo não eliminando o controle químico como alternativa de controle de praga, é estruturada dentro de uma abordagem holística que envolve a adoção de outras formas de controle de forma a atingir com eficiência o controle de pragas e minimizar o impacto dos agrotóxicos. Nesse contexto, métodos de controle de comprovada eficiência, como o controle biológico clássico e aplicado, controle cultural, controle comportamental, resistência de plantas, entre outros métodos, devem ser adotados, em função da disponibilidade da tecnologia para cada cultura. Esses métodos de controle, na maioria dos casos, desempenham, ainda, papel compatível e favorável ao controle biológico natural que é um dos pilares da filosofia do MIP por impedir que, dos milhares de espécies de herbívoros que ocorrem na natureza, apenas pequeno número delas venha a adquirir o *status* de praga.

Considerando o caso particular dos métodos de controle biológico clássico e aplicado e o controle comportamental, a pesquisa tem avançado com contribuições na para seu emprego em diferentes culturas. Os feromônios para o uso em monitoramento da população de pragas e suporte para tomada de

decisão para adoção de controle, bem como para o controle de pragas via coleta massal e confundimento e o controle biológico para controle de pragas introduzidas no Brasil, até então quarentenárias ou exóticas, e também para pragas nativas de ocorrência empataste em diversas culturas.

Questões relacionadas aos aspectos quarentenários de importação de agentes de controle biológico, análise do risco dos possíveis impactos após sua introdução, eficiência de controle da praga-alvo pelo agente de controle biológico, além dos aspectos relacionados ao controle de qualidade das formulações comerciais de entomopatógenos e colônias de predadores e parasitóides, a serem comercializados e liberados em campo, são aspectos-chave que devem receber atenção na elaboração de políticas públicas de uso desses métodos de controle formalizado pela legislação. Tal abordagem deve representar, não a imposição de barreiras para a pesquisa e utilização dessas ferramentas de destacada relevância no controle de pragas, mas contribuir de maneira decisiva para o sucesso do seu uso.

Referências

- BAPTISTA, G. C. de. **[Curso de] proteção de plantas: toxicologia, meio ambiente e legislação específica**. Brasília: ABEAS, 1996. 17 p. (Curso de Especialização por Tutoria a Distância).
- BEZERRA, A. R.; NOGUEIRA, N. D.; PAULA, S. V. Agrotóxicos: legislação e fiscalização em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 197, p. 97-104, mar./abr. 1999.
- CHANT, D. A. Strategy and tactics of insect control. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 96, p. 182-201, 1964.
- COLSON, J. R. Documentation of classical biological control introductions. **Crop Protection**, Surrey, v. 11, p. 195-205, 1992.
- CROCOMO, W. B. **Manejo integrado de pragas**. Botucatu: UNESP, 1990. 358 p.
- DAROLT, M. R. **Agricultura orgânica: inventando futuro**. Londrina: IAPAR, 2002. 250 p.
- DEBACH, P.; ROSEN, D. **Biological control by natural enemies**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 321 p.

- DENT, D. **Insect pest management**. Wallington: CAB International, 1993. 604 p.
- GALLO, D.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E. B.; PARRA, J. A. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 10).
- GOEDEN, R. D. Critique and revision of Harris's scoring system for selection of insect agents in biological control of weeds. **Protection Ecology**, Amsterdam, v. 5, p. 287-301, 1983.
- LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 336 p.
- NORTON, G. A. Philosophy, concepts and techniques. In: NORTON, G. A.; MUMFORD, J. D. (Ed.). **Decision tools for pest management**. Wallingford: CAB International, 1993. p.1-21.
- PAULA, S. V. **Incidência de pragas e reflexos na produção do tomateiro em função da adoção de nível de controle e de faixas circundantes**. 1997. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1997.
- PEDIGO, L. **Entomology and pest management**. 3th ed. New York: Prentice Hall, 1999. 691 p.
- RISCH, S. J. Insect herbivore abundance in tropical monocultures and polycultures: an experimental test of two hypotheses. **Ecology**, Durham, v. 62, p. 1325-1340, 1981.
- ROSSET, P. Umbrales econômicos: problemas y perspectivas. **Manejo Integrado de Plagas**, Turrialba, v. 19, n. 1, p. 26-29, 1991.
- SALGADO, L. O.; CONCEIÇÃO, M. Z. **[Curso de] proteção de plantas: manejo integrado de pragas e receituário agrônomo**. Brasília: ABEAS, 1999. 40 p. (Curso de Especialização por Tutoria a Distância).
- SANFORD, G. B. Some factors affecting pathogenicity of *Actinomyces sacabies*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 16, p. 525-547, 1926.
- SMITH, R. F.; VAN DEN BOSH, R. Integrated control. In: KILGORE, W. W.; DOUT, R. L. (Ed.). **Pest control: biological, physical, and selected chemical methods**. New York: Academic Press, 1967. p. 295-340.
- STERN, V. M.; SMITH, R. F.; VAN DEN BOSCH, R.; HAGEN, K. S. The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid. Part 1 - The integration control concept. **Hilgardia**, Berkeley, v. 29, p. 81-101, 1959.
- VAN DEN BOSCH, R.; MESSENGER, P. S.; GUTIERREZ, A. P. **An introduction to biological control**. New York: Plenum Press, 1982. 247 p.
- VILELA, E. F.; DELLA LÚCIA, T. M. C. **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Viçosa: UFV, 1987. 155 p.



Agentes de Controle Comportamental

Feromônios e outros Semioquímicos: Pesquisa, Síntese e Uso em Armadilhas para Monitoramento, Coleta Massal e Confusão Sexual

Evaldo F. Vilela
Adriano Elias Pereira

Introdução

Para que o Brasil possa continuar colhendo os bons resultados econômicos nas atividades do agronegócio, é fundamental perseguir e acompanhar a geração de novos conhecimentos e tecnologias, com sua conseqüente incorporação aos processos produtivos, tanto para aumento da produção e da produtividade quanto, principalmente, da qualidade do que é produzido. As metas previstas para o setor no Plano Plurianual Federal (2004 - 2007) são estratégicas para atender às necessidades internas e de exportação do País, não só em termos de alimentos e fibras como também em biocombustíveis e necessitam do aporte de inovações capazes de impulsionar as práticas agrícolas de qualidade, com respeito ao meio ambiente. Os avanços requeridos não podem, no entanto, advir da importação de conhecimentos e de tecnologias que tanto onera a balança de pagamentos. É preciso gerá-las no País, garantindo o grau necessário de soberania.

Nesse contexto, os problemas fitossanitários, que têm implicações diretas na sustentabilidade do agronegócio brasileiro, requerem soluções inovadoras para o combate aos prejuízos causados pelos insetos-praga nas lavouras e nos produtos armazenados. Mais recentemente, vêm sendo requeridas soluções que não apenas controlem as pragas, mas também não acarretem outros problemas,

como resíduos tóxicos em alimentos e no meio ambiente e a elevação dos custos de produção, como acontece com as aplicações intensivas de agrotóxicos que não geram soluções duradouras. É necessário grande esforço nacional em prol do efetivo desenvolvimento científico e tecnológico na área, visando dar ao País condições de consolidar-se como grande produtor e exportador de alimentos.

A sustentabilidade da atividade agrícola somente será alcançada com a implementação de programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), mas, para isto, é preciso desenvolver os diferentes métodos que o compõe para cada cultura. Não se pratica o MIP com dependência exclusiva dos agrotóxicos e sem a valorização do controle biológico natural e aplicado, além do desenvolvimento de ferramentas apropriadas para o acompanhamento permanente da população do inseto-praga, denominado monitoramento e que é um dos fundamentos para a tomada de decisão do agricultor praticante do MIP. O monitoramento sistemático da população da praga pode ocorrer de diferentes maneiras ou por amostragem de partes da planta atacada ou pela coleta dos insetos que estão sobre as plantas, ou, ainda, utilizando armadilhas com atraentes como: feromônios sexuais sintéticos da praga, paraferomônios ou outros semioquímicos, como no caso da atração da mosca-das-frutas e broca-do-café.

Por serem práticas eficientes e relativamente baratas, as armadilhas com feromônio crescem em utilização em todo o mundo, contribuindo para tornar realidade o MIP, uma prática ainda longe de ser rotineira na agricultura brasileira ou de países como os EUA. Elas permitem constatar a chegada ou a presença da praga nas lavouras, bem como estimar a população dela ao longo do ciclo da cultura. A simples presença de insetos, muitas vezes, não implica a necessidade de medidas de controle. O importante é o nível de sua população, sendo que, se não estiver causando danos econômicos à cultura, não há necessidade de se recorrer a medidas de controle (DICKE et al., 1990; PEDIGO, 1988). Esse nível pode ser determinado tecnicamente com o uso de armadilhas de feromônio, tornando a intervenção de controle responsável e evitando a aplicação de

agrotóxicos em função da simples presença da praga ou em obediência a calendários preestabelecidos que ignoram a evolução da população da praga.

Para transformar essa realidade de dependência crítica dos agrotóxicos, é preciso inovar o controle de pragas no Brasil, adotando-se tecnologias que empreguem feromônios, agentes de controle biológico, resistência de plantas e outras, o que exige a estreita cooperação entre a pesquisa, agricultores, técnicos da extensão rural e órgãos do governo, com vistas na necessária sustentabilidade dos nossos agroecossistemas.

Definições

Feromônios são substâncias químicas formadas por cadeias de 10 a 21 átomos de carbono que promovem a comunicação entre indivíduos da mesma espécie, ou seja, intra-específica (YAMAMOTO; OGAWA, 1989). Fazem parte de um grupo mais amplo de substâncias utilizadas na comunicação entre seres vivos, denominadas de **semioquímicos** que serão discutidos mais adiante. O primeiro feromônio evidenciado cientificamente foi o sexual, denominado de *Bombicol*, produzido por fêmeas da mariposa do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (BUTENANDT; BECKMANN; HECKER, 1961; BUTENANDT et al., 1959).

Os **feromônios de insetos** são, portanto, **odores/perfumes** produzidos pelas glândulas exócrinas, normalmente, nas **fêmeas, para atrair os machos da própria espécie para o acasalamento** (Figura 1). O uso de feromônio sintético não constitui fator de risco para espécies não-alvo, dada a sua especificidade. Colocados em pequenas quantidades em liberadores apropriados, os feromônios sexuais permanecem no campo por várias semanas atraindo indivíduos do sexo oposto para armadilhas. Estes, devidamente quantificados, permitem estimar a população da praga e, com isto, reduzir as aplicações de agrotóxicos e, conseqüentemente, o custo direto e indireto dessas aplicações tanto para o produtor como para o meio ambiente.

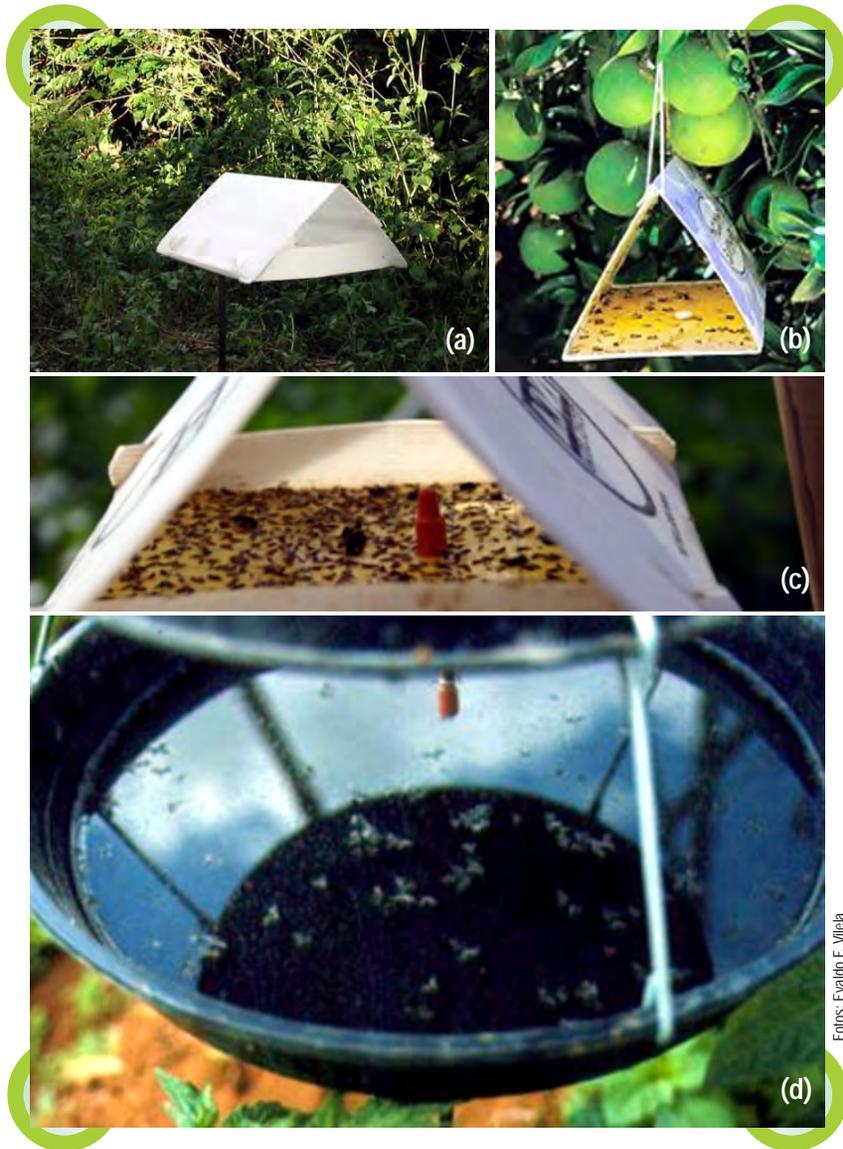


Figura 1. Detalhe da glândula de feromônio no final do abdômen de uma mariposa.

No entanto, os feromônios não são, por si só, solução para problemas com as pragas, mas uma ferramenta a ser integrada a outras em programas de MIP que podem incluir a própria utilização seletiva de agrotóxicos. As armadilhas com feromônio podem também ser úteis na detecção de insetos exóticos em fronteiras e aeroportos (BURKHOLDER, 1990).

Para a técnica do **monitoramento**, certo número de armadilhas, contendo feromônio ou outro semioquímico, é colocado na lavoura em diferentes pontos. Os insetos atraídos e retidos nas armadilhas, dia após dia, indicam a quantidade de insetos na lavoura, informando ao agricultor se a população da praga está crescendo e em que velocidade, preparando-o para intervir com métodos mais adequados (CARDÉ; ELKINTON, 1984; HOWSE; STEVENS; JONES, 1998). Essas armadilhas podem ser delta-adesivas, de água ou sem saída (Figura 2).

Armadilhas com feromônio, se empregadas em maior número por área e no momento correto, possibilitam a **coleta massal** da praga-alvo, retirando das plantações, em momentos críticos, a maioria dos machos ou das fêmeas e, conseqüentemente, evitando o crescimento populacional da praga e a pressão dela sobre a plantação (HOWSE; STEVENS; JONES, 1998).



Fotos: Evandro F. Vilela

Figura 2. (a) (b) e (c) Armadilhas para monitoramento e coleta massal tipo delta com placa adesiva; (d) tipo prato com água.

Além do monitoramento e da coleta massal, os feromônios sexuais sintéticos podem, ainda, ser liberados na atmosfera para a **interrupção dos**

acasalamentos (confundimento) por meio de artefatos especiais impregnados com o feromônio (Figura 3).

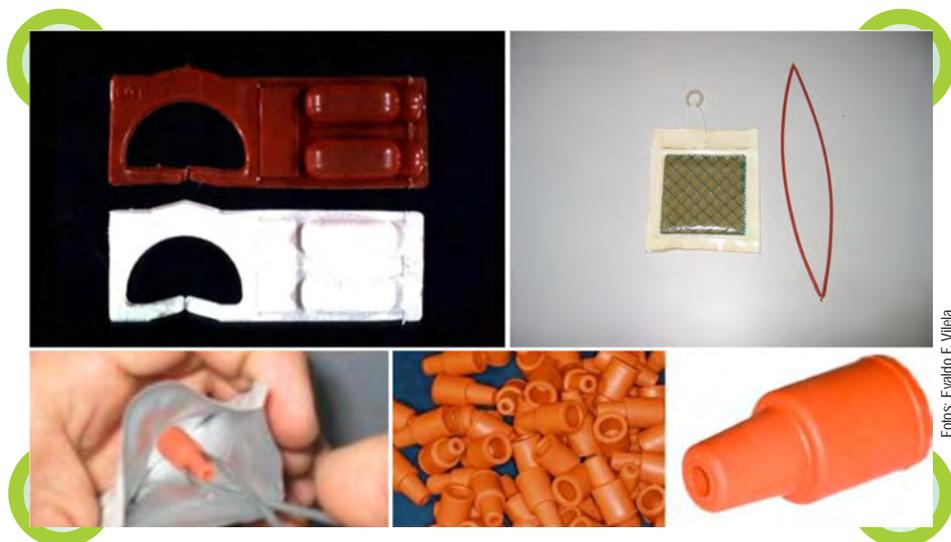


Figura 3. Liberadores de feromônio usados na técnica do confundimento.

Nesse caso, o feromônio liberado em grande quantidade na lavoura desorienta os machos que, assim, não conseguem encontrar os rastros normais do feromônio natural emitido pelos parceiros para o acasalamento. Essa técnica inibe a procriação, evitando a ocorrência de altos níveis populacionais da praga. Sua aplicação, no entanto, exige planejamento e vontade de inovar por parte do sistema, podendo resultar em excelentes resultados (CAMPION; CRITCHKEY; MACVEIGH, 1989). (Figura 4).

Outra tecnologia à base de feromônios é o **Atrai & Mata** que emprega um inseticida anexo à isca atrativa de feromônio. Os insetos são atraídos para uma armadilha, mas não são presos e semi-enfraquecidos ou injuriados pelos vapores do inseticida colocado ao lado do atraente. Trata-se de uma espécie de “atraticida” que não implica a necessidade de capturas. Essa tecnologia tem sido empregada para o controle populacional de pragas importantes, como o bicudo-

do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e das palmáceas (*Rhynchophorus palmarum*), com o inconveniente de ainda depender do uso de inseticidas (JAFFÉ et al., 1993; MOURA et al., 1997).



Desenhos fornecidos por: Evaldo F. Vilela

Figura 4. Ilustrações mostrando os liberadores no campo e a desorientação da mariposa diante das múltiplas plumas do feromônio.

Os **semioquímicos** liberados por plantas ou partes delas estimulam respostas dos insetos, como agregação, acasalamento, alimentação ou oviposição, sendo esse o caso da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), considerada a mais importante praga dos cafezais em todo mundo (BAKER, 1999). Dos frutos do café, emanam voláteis, como álcoois, aldeídos e cetonas os quais atraem fêmeas da referida espécie que, assim, localizam os frutos e os perfuram, vindo a ovipositar no interior das sementes (GIORDANENGO; BRUN; FREROT, 1993; ORTIZ et al., 2004). Pesquisadores como Lima et al., 2004; Mathieu et al., 1999; Mendoza, 1991 demonstraram, em recentes trabalhos, a eficiência da captura da broca-do-café por armadilhas contendo misturas de semioquímicos (Figura 5), como etanol e metanol, na proporção de 1:1 ou 1:3

com a adição de aldeídos (como benzaldeído) ou pinenos. No entanto, muito ainda tem de ser estudado em relação ao melhor formato das armadilhas, bem como o custo/benefício e a melhor mistura dos semioquímicos. Pesquisas nessa área encontram-se em andamento no México, França e Brasil - Universidade Federal de Viçosa (UFV), Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF).



Fotos: Evaldo F. Vilela

Figura 5. Armadilha de funil múltiplo comercial e armadilha tipo IAPAR, modificada, confeccionada com garrafa “Pet” de refrigerante (2 L), contendo semioquímicos, usadas na captura e no monitoramento da broca-do-café.

Não há nada mais simples do que usar um agrotóxico em curto prazo, mas, por não acarretar solução duradoura, deve ser substituído pelo MIP, mesmo que isso possa significar, inicialmente, uma novidade a ser equacionada pelo agricultor. Os resultados certamente transformarão a agricultura imediatista em agricultura de custo-benefício medido e planejado, com alimentos sem contaminação por resíduos tóxicos, aceitos pelos consumidores.

A Pesquisa no Brasil

Estudos e pesquisas vêm sendo desenvolvidos no Brasil, visando identificar, sintetizar e aplicar feromônios e outros semioquímicos de insetos. Trata-se de uma área verdadeiramente multidisciplinar, acolhida dentro da ecologia química

de insetos e suportada pela biologia de insetos (criação massal de insetos), conforme visto a seguir.

Síntese de Feromônios

Existe, no País, um número razoavelmente grande de pesquisadores em síntese orgânica, entretanto, apenas alguns se dedicam à síntese de feromônios de insetos. Destacam-se as equipes da UNICAMP e das Universidades Federais de Alagoas e São Carlos.

Na Figura 6, pode-se observar exemplo de síntese de feromônio.

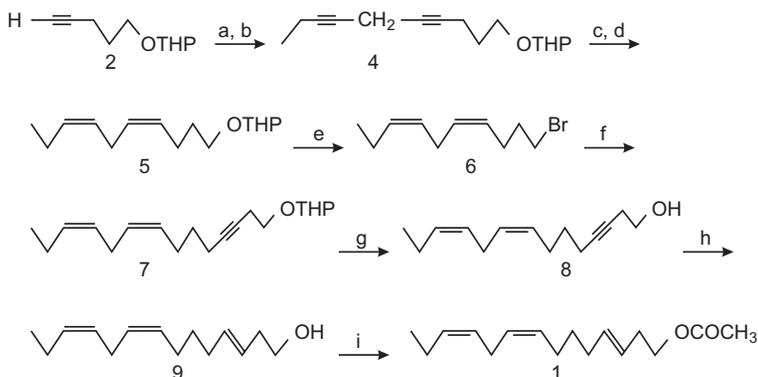


Figura 6. Etapas da síntese do feromônio sexual da traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta*, da família Gelechiidae. (a) EtMgBr/THF; (b) $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{C} \equiv \text{C} - \text{CH}_2 - \text{OTs}$ (3) / Cu (I) Br - Me_2S , $-20^\circ\text{C} - 0^\circ\text{C}$; (c) Cy_2BH (4,4 equiv); (d) $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$; (e) PPh_3/Br_2 (1,5 equiv), CH_2Cl_2 ; (f) $\text{Li} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{OTHP}$, DMPU/THF 0°C ; (g) Dowex/MeOH; (h) $\text{LiAlH}_4/\text{diglyme}$, $120-140^\circ\text{C}$; (i) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{pyridine}$.

Fonte: Michereff Filho et al. (2000).

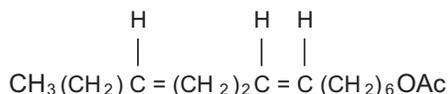
Identificação de Feromônios

Os trabalhos pioneiros no Brasil, de identificação de feromônios foram conduzidos na Universidade Federal de Viçosa (UFV), com a identificação de feromônios de importantes pragas da agricultura brasileira, como a

traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (em colaboração com pesquisadores da Universidade de Cornell, EUA) e do besouro-da-cana-de-açúcar, *Migdolus fryanus* (em colaboração com o National Institute of Sericultural and Entomological Sciences, do Japão) (BENTO et al., 1992; LEAL et al., 1994; MICHEREFF FILHO et al., 2000).

Por se tratar de área do conhecimento fundamentalmente multidisciplinar, novos acordos de cooperação vêm sendo estabelecidos entre a UFV, a Universidade Federal do Paraná, Embrapa Uva e Vinho e Universidade Sueca de Ciências Agrícolas, para estudo e aplicação de feromônios das pragas da maçã no sul do País. Também, a equipe do Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia tem identificado feromônios de percevejos-praga e predadores (LEAL; PANIZZI; NIVA, 1994), assim como, mais recentemente, a ESALQ/USP, com os trabalhos com o feromônio sexual do bicho-furão e o minador dos citros.

Exemplo da estrutura química do feromônio Acetato de (Z)-7-(E)-11-Tetradecadienila é mostrado a seguir (feromônio sexual da traça-dos-cereais *Sitotroga cerealella*):



Estudo do Comportamento dos Insetos

Os estudos relacionados à ecologia, à biologia e ao comportamento de insetos-praga, fundamentais para o início das investigações relativas aos feromônios e suas aplicações têm sido feitos no Laboratório de Feromônios de Insetos, do Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa. Nessa instituição, existe uma equipe apta a desenvolver esses estudos, reconhecida internacionalmente, e que conta com infra-estrutura e outras facilidades mínimas.

São elaborados etogramas e estudos em olfatometria e túnel-de-vento, além de bioensaios para a comprovação do papel biológico dos extratos de glândulas e substâncias sintéticas passíveis de tornarem-se feromônio ou outro semioquímico.

Outros grupos estudam feromônios e outros semioquímicos, como os do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), descobrindo o papel de substâncias químicas no comportamento de pernilongos (Díptero).

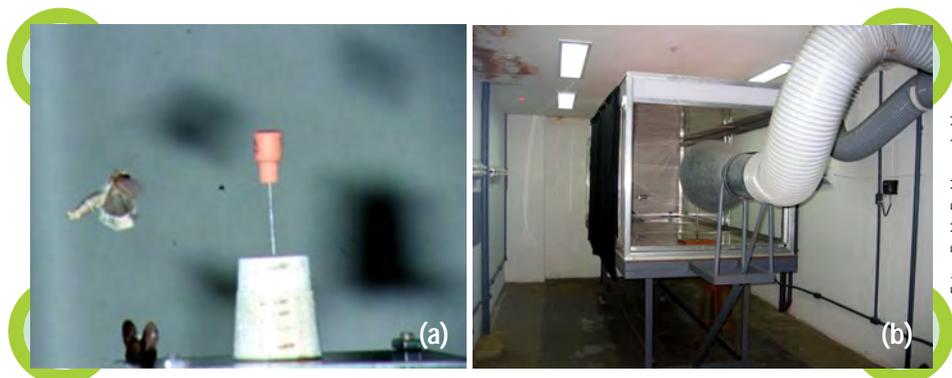
Ainda, semioquímicos que participam das teias alimentares envolvendo ácaros têm sido estudados do ponto de vista ecológico na UFV (PALLINI; JANSSEN; SABELIS, 1997).

Tecnologias de Aplicação

A introdução e a adaptação de feromônios de importantes pragas mundiais e que também ocorrem no Brasil foram feitas com excelentes resultados, como para o bicho-do-fumo (*Lasioderma serricornis*) e a mariposa-oriental-das-fruteiras (*Grapholita molesta*). Além dessas, aplicações de feromônios são feitas para o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e bicudo-das-palmáceas (*Rhynchophorus palmarum*), além de outras pragas, devendo, ainda, ser o uso de feromônios expandido para outros casos como resultado de trabalhos em andamento. Merecem destaque os trabalhos experimentais na área que vem sendo desenvolvido na Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) e na UNESP.

Para insetos de ocorrência no território nacional e em outras regiões da América Latina, trabalhos pioneiros foram desenvolvidos, com sucesso, para o besouro da cana-de-açúcar (*Migdolus fryanus*) e também para a traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) por pesquisadores da UFV e ESALQ/USP. A equipe de pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa conta com grande

experiência e facilidades para o desenvolvimento dos projetos tanto em laboratório (Figura 7) quanto no campo, tendo sido firmadas importantes parcerias com o setor produtivo para a realização de experimentos em áreas de produção comercial de várias culturas.



Fotos: Eraído Rodrigues de Lima

Figura 7. (a) Adulto de *Spodoptera frugiperda* voando para septo impregnado com feromônio sintético em túnel de vento; (b) túnel de vento do Laboratório de Feromônios e Comportamento de Insetos, na UFV.

Importância do Conhecimento da Área para o País

O potencial de inovação do controle de pragas com o emprego de feromônios e outros semioquímicos é, como foi demonstrado, muito grande, abrindo, ainda, campo para outras inovações, particularmente, a combinação com métodos de controle biológico de pragas, com uso de parasitóides, predadores e microrganismos. Entretanto, para isto, a pesquisa no Brasil deve responder também a outro desafio: o de encontrar a melhor mistura de componentes do feromônio para diferentes populações (raças) de uma mesma espécie de praga que teve seu feromônio identificado de populações alienígenas, pois poderá seu feromônio ser diferente. Vale mencionar o caso de uma importante praga norte-americana, *Ostrinia nubilalis*, que ocorre no Estado de Iowa e utiliza duas substâncias como componentes de seu feromônio natural na

proporção de 96:4 respectivamente. Já no Estado de New York, a referida espécie utiliza essas mesmas substâncias em seu feromônio, porém, a proporção entre elas é invertida: 4:96. Portanto, insetos da população de Iowa não respondem ao feromônio dos insetos de New York e vice-versa, o que constitui sério problema para a simples transposição de tecnologia entre regiões geográficas diferentes (VILELA; DELLA LÚCIA, 2001).

Exemplos de Interesse para o País

O bicho-furão-dos-citros (*Gyandrosoma aurantianum*) despontou como uma séria praga nas plantações de citros do Estado de São Paulo, comprometendo as exportações de citros *in natura* uma vez que as frutas atacadas caem prematuramente das plantas. Para que esse estudo fosse possível, o inseto foi criado por métodos artificial e massal pela equipe da ESALQ/USP; a caracterização e a síntese do feromônio efetuadas em estreita colaboração entre pesquisadores da UFV; a determinação estrutural pela técnica de espectrometria de massa acoplada à cromatografia gasosa capilar, em colaboração com a Universidade da Califórnia-Davis e a Companhia Fuji Flavor, do Japão, com financiamento do FUNDECITRUS e CNPq. O feromônio está sendo comercializado pela COPERCITRUS para fins de monitoramento da praga (BENTO et al., 2001).

Comercialização de Feromônios no Brasil

A utilização de feromônios no campo, por envolver tecnologia nova e desconhecida da grande maioria dos agricultores brasileiros, está sendo adotada aos poucos pela Biocontrole Ltda., São Paulo, em colaboração com empresas agrícolas, produtores interessados e pesquisadores da área.

As companhias de tabaco utilizam, há quase 20 anos, o feromônio Serricornin para o monitoramento de infestação do bicho-do-fumo (*Lasioderma serricorne*) em armazéns e locais de processamento de folhas de fumo.

A Iharabras S/A Indústrias Químicas comercializa, no Brasil, tecnologia à base de feromônio sexual para a lagarta-rosada-do-algodoeiro (*Pectinophora gossypiella*), e o uso dos feromônios deverá tornar-se mais corriqueiro, como acontece na Europa que também emprega feromônio não só em armadilhas, mas também em técnicas de confusão sexual (*mating disruption*), sobretudo, para a produção de frutas *in natura* e sucos, nos quais não se toleram mais resíduos de agrotóxicos.

Os países europeus os EUA, o Egito, Israel e a Alemanha são os que mais empregam feromônios, mas em volumes ainda pequenos, quando comparados ao emprego de inseticidas convencionais. As multinacionais interessaram-se inicialmente pela inovação, porém, como os feromônios são bastante específicos (para cada praga um feromônio diferente), a exploração comercial deles foi considerada incompatível com a maneira como atuam. Essa especificidade de uso, por sua vez, é a grande vantagem ecológica dos feromônios e demais semioquímicos, uma vez que a aplicação de um feromônio somente irá interferir na população da praga-alvo, nunca nos demais organismos, maléficos ou benéficos, presentes na área. A comercialização de produtos à base de feromônios tem sido feita por pequenas empresas que vendem também serviços (aplicação e acompanhamento de feromônios e agentes de controle biológico), tendo-se tornado um campo de oportunidades, sobretudo, para novos agrônomos, biólogos e químicos.

Alguns feromônios atualmente disponíveis para uso em armadilhas no Brasil:

- Besouro-da-cana-de-açúcar: *Migdolus fryanus*
- Besouro-do-fumo: *Lasioderma serricorne*
- Bicudo-das-palmáceas: *Rhynchophorus palmarum*
- Bicudo-do-algodoeiro: *Anthonomus grandis*

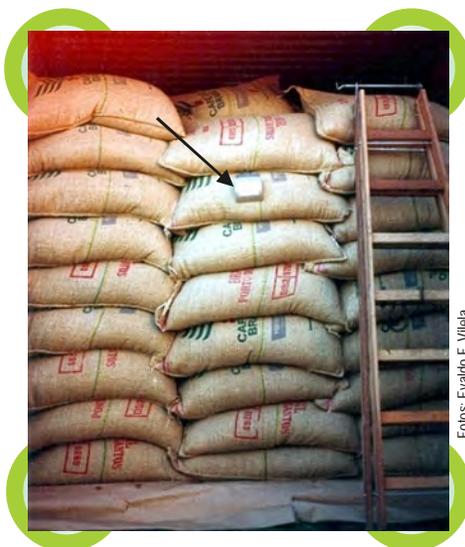
- Lagarta-rosada-do-algodoeiro: *Pectinophora gossypiella*
- Lagarta-enroladeira-da-maçã: *Bonagota cranaodes*
- Traça-da-maçã: *Cydia pomonella*
- Moleque-da-bananeira: *Cosmopolites sordidus*
- Gorgulho-do-milho: *Sitophilus zeamais*
- Lagarta-do-cartucho-do-milho: *Spodoptera frugiperda*
- Mariposa-oriental-das-frutas: *Grapholita molesta*
- Lagarta-rosca: *Agrotis ipsilon*
- Traça-do-tomateiro: *Tuta absoluta*
- Traça-das-crucíferas: *Plutella xylostella*

Em breve, outros feromônios estarão disponíveis, como o do bicho-mineiro do café, *Leucoptera coffeella* que já foi identificado como sendo 5,9-Dimetilpentadecano (LIMA, 2001; MICHEREFF et al., 2004).

Emprego de Feromônios em Barreiras Sanitárias

O território brasileiro está sendo constantemente invadido por insetos que, ao se instalarem, podem causar consideráveis prejuízos. O bicudo-do-algodoeiro é um dos exemplos nefastos dessa invasão. Mais recentemente, a larva-minadora-dos-citros (*Phyllocnistis citrella*), praga originária da Ásia, que apareceu na Flórida em 1993 e no Brasil no início de 1996, vem ameaçando a citricultura brasileira.

A instalação de barreiras sanitárias em portos, aeroportos e postos de fronteiras com armadilhas contendo feromônios de insetos-praga indesejáveis para o País vem sendo feita e deverá ser ampliada (Figura 8).



Fotos: Evaldo F. Vilela

Figura 8. Inspeção de carga de grãos por meio de armadilhas com feromônio (seta).

Legislação para Registro de Feromônios e Outros Semioquímicos no Brasil

Um entrave à comercialização e ao uso de feromônios em nosso país tem sido, até o momento, a Lei dos Agrotóxicos e Afins que considera, para registro e uso no País, os feromônios, bem como agentes de controle biológico, como agrotóxicos. Ações estão sendo feitas pela Sociedade Entomológica do Brasil (SEB) para alterar favoravelmente esse quadro, contando sempre com a compreensão dos técnicos dos órgãos governamentais envolvidos Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA). Esperam-se, para breve, Instruções Normativas específicas que deverão facilitar o uso desses produtos no País. A Environmental Protection Agency (EPA), dos Estados Unidos, não faz exigências para o registro de feromônios para uso em armadilhas, o que serve de indicativo da inexistência de periculosidade dessas substâncias.

Em vários países da Europa, a lei também é favorável ao uso dos feromônios, principalmente, no que diz respeito ao monitoramento. Para coleta massal e confundimento, algumas regras se aplicam, assim como para os agentes de controle químico, em função da maior concentração do feromônio usada no campo (VILELA; DELLA LÚCIA, 2001). Na Tabela 1, compara-se a toxicidade aguda de alguns feromônios com pesticidas químicos convencionais.

Tabela 1. Comparação entre a toxicidade aguda de alguns feromônios e de pesticidas químicos convencionais.

Feromônio	DL ₅₀ oral aguda(rato)	DL ₅₀ dermal aguda
Lagarta-rosada	15000 mg/kg	-
Mariposa-cigana	34600 mg/kg	2025 mg/kg
Bicudo-do-algodoeiro	>600 mg/kg	>500 mg/kg (rato)
Besouro japonês	3980 mg/kg	1220 mg/kg (coelho)
Mariposa-da-alcachofra	>5000 mg/kg	>2000 mg/kg (coelho)
Larva-alfinete	>5000 mg/kg	>2000 mg/kg (coelho)
Inseticida		
Paration	13 mg/kg (macho) 3,6 mg/kg (fêmea)	6,8 mg/kg (rato)
Malation	1000 mg/kg	4100 mg/kg
Clorpirifós	97-276 mg/kg	>2000 mg/kg (coelho)
Permetrin	>4000	>4000 mg/kg (rato)
Carbaril	500 mg/kg	-
Aldicarb	0,9 mg/kg	>5 mg/kg (coelho)

Considerações Finais

O Brasil, como o País com o maior crescimento agrícola do mundo, tem de se prevenir contra a entrada de novas pragas que possam diminuir o volume e a qualidade da produção. Para tal, novos profissionais estão sendo preparados e requisitados em órgãos de fiscalização em portos e aeroportos, para que possam

inspecionar com a mais alta precisão a entrada de mercadorias no País. Esses profissionais necessitam de ferramentas, como armadilhas com feromônio, para detectar a presença de insetos-praga de grãos armazenados nos contêineres que chegam nos portos e aeroportos.

Em relação às pragas já existentes no Brasil, muitas não tiveram, ainda, seus feromônios elucidados, no entanto, estudos se encontram em andamento e vários feromônios já estão disponíveis no mercado para o monitoramento e controle de várias pragas. Uma série de dificuldades, como estudo de comportamento de machos e fêmeas, desconhecimento pelo produtor da existência da técnica do uso dos feromônios, faz com que seja necessário grande esforço na área. Por sua vez, também avanços na legislação nacional são essenciais para favorecer cada vez mais o emprego dos feromônios em substituição ou complemento ao uso dos inseticidas no MIP.

Referências

ATTYGALLE, A. B.; JHAM, G. N.; SVATOS, A.; FRIGHETTO, R. T. S.; MEINWALD, J.; VILELA, E. F.; FERRARA, F. A. A.; UCHÔA-FERNANDES, M. A. (3E,8Z)-3,8,11-Tetradecatrienyl acetate, major component of the tomato pest *Scrobipalpus absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 4, p. 305-314, 1996.

BAKER, P. S. **The coffee berry borer in Colombia**. Chinchiná: DFID-Cenicafé, 1999. 148 p. Final report of DFID-Cenicafé-CABI-Bioscience IPM for coffee project.

BENTO, J. M. S.; ALBINO, F. E.; DELLA LÚCIA, T. M. C.; VILELA, E. F. Field trapping of *Migdolus fryanus* Westwood (Coleoptera: Cerambycidae) using natural sex pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 18, p. 245-251, 1992.

BENTO, J. M. S.; VILELA, E. V.; PARRA, J. R. P.; LEAL, W. S. Monitoramento do bicho-furão-dos-citros com feromônio sexual: bases comportamentais para utilização desta nova estratégia. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, p. 351-366, 2001.

BURKHOLDER, W. E. Practical use of pheromones and other attractants for stored-product insects. In: RIDGEWAY, R. L.; SILVERSTEIN, R. M.; INSCOE, M. N. (Ed.). **Behavior-modifying chemicals for insect management**: applications of pheromones and other attractants. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 498-511.

BUTENANDT, A.; BECKMANN, R.; HECKER, E. On the sexattractant of silk-moths. I. The biological test and the isolation of the pure sex-attractant bombykol. *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie*, Berlin, v. 30, p. 71-83, 1961.

BUTENANDT, A.; GROSCHEL, U.; KARLSON, P.; ZILLIG, W. N-acetyl tyramine, its isolation from *Bombyx* cocoons & its chemical & biological properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, v. 83, n. 1, p. 76-83, 1959.

CAMPION, D. G.; CRITCHKEY, B. R.; MACVEIGH, L. J. Mating disruption. In: JUTSUM, A. R.; GORDON, R. F. S. (Ed.). **Insect pheromone in plant protection**. New York: John Wiley, 1989. p. 89-119.

CARDÉ, R. T.; BELL, W. **Chemical ecology of insects**. New York: Chapman & Hall, 1994. v. 2, 433 p.

CARDÉ, R. T.; ELKINTON, J. S. Field trapping with attractants: methods and interpretation. In: HUMMEL, H. E.; MILLER, T. A. (Ed.). **Techniques in pheromone research**. New York: Springer-Verlag, 1984. p. 111-129.

DICKE, M.; SABELIS, M. W.; TAKABAYASHI, J.; BRUIN, J.; POSTHUMUS, M. A. Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v. 16, p. 3091-3118, 1990.

GIORDANENGO, P.; BRUN, L. O.; FREROT, B. Evidence for allelochemical attraction of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, by coffee berries. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v. 19, n. 4, p. 763-769, 1993.

JAFFÉ, K.; SANCHES, P.; CERDA, H.; HERNANDEZ, J. V.; JAFFÉ, R.; URDANETA, N.; GUERRA, G.; MARTINEZ, R.; MIRAS, B. Chemical ecology of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): attraction to host plants and to a male-produced aggregation pheromone. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v. 19, p. 1703-1720, 1993.

HOWSE, P.; STEVENS, I.; JONES, O. **Insect pheromones and their use in pest management**. London: Chapman & Hall, 1998. 369 p.

LEAL, W. S.; BENTO, J. M. S.; VILELA, E. F.; DELLA LÚCIA, T. M. C. Female sex pheromone of the longhorn beetle *Migdolus fryanus* Westwood: N-(2'S)-methylbutanoyls 2-methylbutylamine. *Experientia*, Basel, v. 50, p. 853-856, 1994.

LEAL, W. S.; PANIZZI, A. R.; NIVA, C. C. Alarm pheromone system of leaf-footed bug *Leptoglossus zonatus* (Heteroptera: Coreidae). *Journal of Chemical Ecology*, New York, v. 20, p. 1209-1216, 1994.

LIMA, E. R. **Feromônio sexual do bicho-mineiro do café, *Leucoptera coffeella* Guérin-Méneville: avaliação para uso em programas de manejo integrado**. 2001. 71f. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

LIMA, J. O. G.; PEREIRA, J. C.; MIRANDA, P. C. M. L.; VIANA-BAILEZ, A. M. M.; VILLACORTA, A. Identificação e atratividade de novos voláteis do café cerejea e desenvolvimento de armadilha para a coleta massal da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferr.). In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE O MANEJO DA BROCA DO CAFÉ, 2004, Londrina. **Anais...** Londrina: [s.n.], 2004. p. 8.

MATHIEU, F.; BRUN, L. O.; FRÉROT, B.; SUCKLING, D.; FRAMPTOM, C. Progression in field infestation is linked with trapping of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Col., Scolytidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 123, p. 535-540, 1999.

MENDOZA, M. J. R. **Resposta da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) a estímulos visuais e semioquímicos**. 1991. 44 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1991.

MICHEREFF, M. F. F.; VILELA, E. F.; MICHEREFF FILHO, M.; NERY, D. M. S.; THIÉBAUT, J. T. Effects of delayed mating and male mating history on the reproductive potential of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Agricultural and Forest Entomology**, v. 6, p. 241-247, 2004.

MICHEREFF FILHO, M.; VILELA, E. F.; JHAM, G. N.; ATTYGALLE, A.; SVATOS, A.; MEINWALD, J. Initial studies of mating disruption of the tomato moth, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) using synthetic sex pheromone. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 6, p. 621-628, 2000.

MOURA, J. I. L.; BENTO, J. M. S.; SOUZA, J.; VILELA, E. F. Captura de *Rhynchophorus palmarum* (L.) pelo uso de feromônio de agregação associado a árvore-armadilha e inseticida. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 26, p. 69-73, 1997.

ORTIZ, A.; ORTIZ, A.; VEGA, F. E.; POSADA, F. Volatile composition of coffee berries at different stages of ripeness and their possible attraction to the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 5914-5918, 2004.

PALLINI, A.; JANSSEN, A.; SABELIS, M. W. Odour-mediated responses of phytophagous mites to conspecific and heterospecific competitors. **Oecologia**, Berlin, v. 110, p. 179-185, 1997.

PEDIGO, L. P. **Entomology and pest management**. New York: Macmillan, 1988. 646 p.

VILELA, E. F.; DELLA LÚCIA, T. M. C. **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. 2. ed. São Paulo: Holos, 2001. 375 p.

YAMAMOTO, A.; OGAWA, K. Chemistry and commercial production of pheromones and other behavior-modifying chemicals. In: JUTSUM, A. R.; GORDON, R. F. S. (Ed.). **Insect pheromone in plant protection**. New York: John Wiley & Sons, 1989. p. 123-148.

Agentes de Controle Biológico



Nematóides como Agentes do Controle Biológico de Insetos

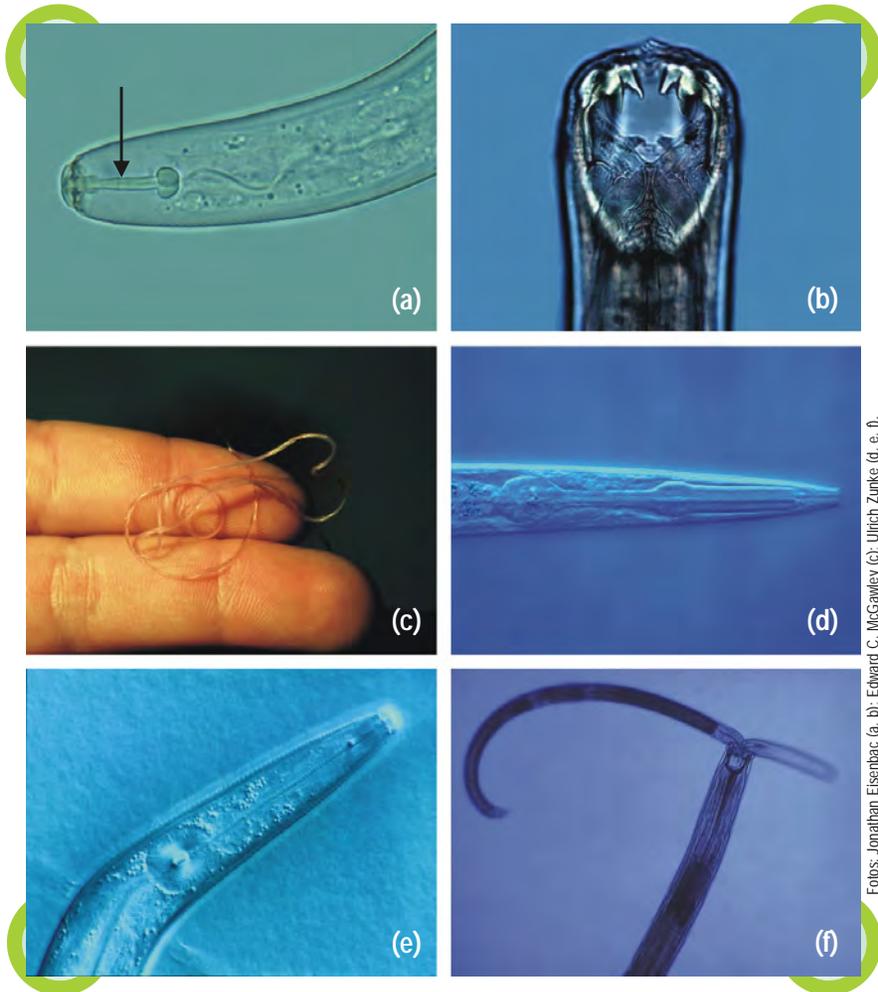
Claudia Dolinski

Introdução

A palavra NEMATÓIDE é derivada do grego NEMA, que quer dizer agulha e da palavra OID, que significa semelhante, ou seja, semelhante a uma agulha. Relatos sobre nematóides vêm sendo feitos desde longa data. No Egito antigo, já havia relatos em papiros de “vermes enormes”, provavelmente, *Ascaris lumbricoides* (lombriga) e *Dracunculus medinensis* (verme da Guinéa) (CHITWOOD, 1950). A Bíblia Sagrada relata que Moisés (cerca de 1250 a.C.) supostamente se referiu a este último nematóide como “serpente de fogo” durante a travessia do povo de Israel no deserto (Números 21: 6-9).

Nematóides ou vermes arredondados não segmentados pertencem ao Filo Nematoda e estão entre os organismos mais numerosos do planeta, ficando em segundo lugar após o Filo Artrópoda (BRUSCA; BRUSCA, 1990). Às vezes, passam despercebidos, pois muitas espécies possuem tamanho ínfimo sendo visíveis, apenas, ao microscópio óptico. Contudo, nem todas as espécies de nematóides são pequenas e seu tamanho pode variar de 100 μm a metros de comprimento. Nematóides já foram encontrados em desertos áridos, no fundo de rios e mares, em regiões polares, florestas e em fontes de águas quentes (POINAR JR., 1990). Possuem diferentes associações com plantas (fitoparasitas), animais vertebrados

e invertebrados, mas podem também ser encontrados no solo como vida livre. Estes últimos se alimentam de bactérias, protozoários, algas, fungos existentes no solo e também de outros nematóides (predadores) (Figura 1a-1f).



Fotos: Jonathan Eisenbac (a, b); Edward C. McGawley (c); Ulrich Zunke (d, e, f).

Figura 1. (a) Fitoparasita (*Pratylenchus* sp.). Seta mostra o estilete; (b) parasita de vertebrado (*Ancylostoma caninum*); (c) parasita de invertebrado (*Mermis* sp.); (d) bacteriófago (*Rhabditis* sp.); (e) micófago (*Aphelenchoides hamatus*); (f) predador (*Mononchus* sp.).

Fonte: Nemapix (1997).

Nematóides fitoparasitas são, em geral, encontrados no solo e se alimentam do conteúdo celular das raízes, bulbos, tubérculos e rizomas. Seu efeito na planta é direto (pelas lesões provocadas nos tecidos vegetais) e indireto (pela alteração do desenvolvimento das raízes e drenagem de nutrientes). A presença de galhas nas raízes de várias plantas é um exemplo da deformação motivada por esses nematóides. Por causar danos mecânicos aos órgãos vegetais, abrem portas ao ataque de fungos e bactérias (infecções secundárias). Para perfurar as células das raízes, os fitoparasitas são dotados de uma estrutura forte e pontiaguda chamada **estilete** que os diferencia dos demais nematóides (Figura 1a).

O estudo dos nematóides associados a insetos é bem mais recente (década de 1930), mas vem-se aprofundando cada vez mais devido ao crescente interesse de pesquisadores em todo o mundo e à crescente necessidade de buscar novos agentes do controle biológico. Reconhecidamente, esses nematóides possuem grande potencial para o controle biológico de pragas residenciais, agrícolas e dos vetores de doenças humanas e de vertebrados. Atualmente, existem cerca de 30 famílias de nematóides em diferentes associações com insetos (NICKLE, 1984; KAYA; STOCK, 1997).

Neste capítulo, são mostradas a diversidade no filo Nematoda e a utilização de alguns membros desse filo no controle biológico de insetos.

Nematóides Entomofílicos

A palavra ENTOMOFÍLICO deriva do grego ENTOS, que significa insetos, e PHILOS, que quer dizer gostar, ou seja, nematóides que gostam ou que interagem com insetos. Essa interação ou associação pode ser de diversas formas.

Forésia interna, quando o inseto apenas transporta o nematóide em seu interior sem dano ou benefício a nenhum dos dois; **forésia externa**, quando o transporte é feito externamente ao corpo do inseto; **vetor**, quando o inseto

transporta o nematóide, ocorrendo mudanças neste e/ou no inseto; **parasitismo obrigatório**, quando o nematóide precisa de um hospedeiro para se desenvolver e multiplicar, depauperando o hospedeiro, mas nem sempre causando sua morte; **parasitismo facultativo**, o nematóide pode completar vários ciclos como vida-livre, contudo, ao encontrar o hospedeiro, torna-se parasita (MAGGENTI, 1981; FERRAZ, 1988; KAISER, 1991).

Existem duas famílias de nematóides entomofílicos com grande potencial para a utilização como agente do controle biológico de pragas e vetores: Phaenopsitylenchidae e Mermitidae.

Phaenopsitylenchidae (Tylenchida: Secernentea)

Nematóides dessa família apresentam parasitismo facultativo, ou seja, alternam gerações como parasitas de insetos com gerações micófagas alimentando-se em hifas de fungo (Figura 2a e 2b). A espécie *Beddingia siridicola*, que controla a vespa-da-madeira (*Sirex noctilio*) no sul do Brasil, pode ser apontada como um exemplo de caso de sucesso no controle biológico de pragas com nematóides.

Essa vespa foi introduzida nos plantios de *Pinus* spp. no sul do País em 1988. Estima-se que cause dano de 6 milhões de dólares ao ano, sendo que 350 mil hectares dos 2,2 milhões encontram-se com essa praga no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Em 1989, foi criado o Programa Nacional de Controle à Vespa-da-madeira (PNCVM) e, concomitantemente, para dar-lhe sustentação, o Fundo Nacional de Controle à Vespa-da-madeira (FUNCEMA), numa parceria entre órgãos governamentais e a iniciativa privada. Esse programa visava desenvolver atividades de prevenção, monitoramento e controle da vespa. Em 1989/1990 e também em 1994, a Embrapa Florestas (Colombo, PR) importou o nematóide *B. siridicola* da Austrália para que ele fosse utilizado no controle biológico da vespa (IEDE; PENTEADO; REIS FILHO, 2003).

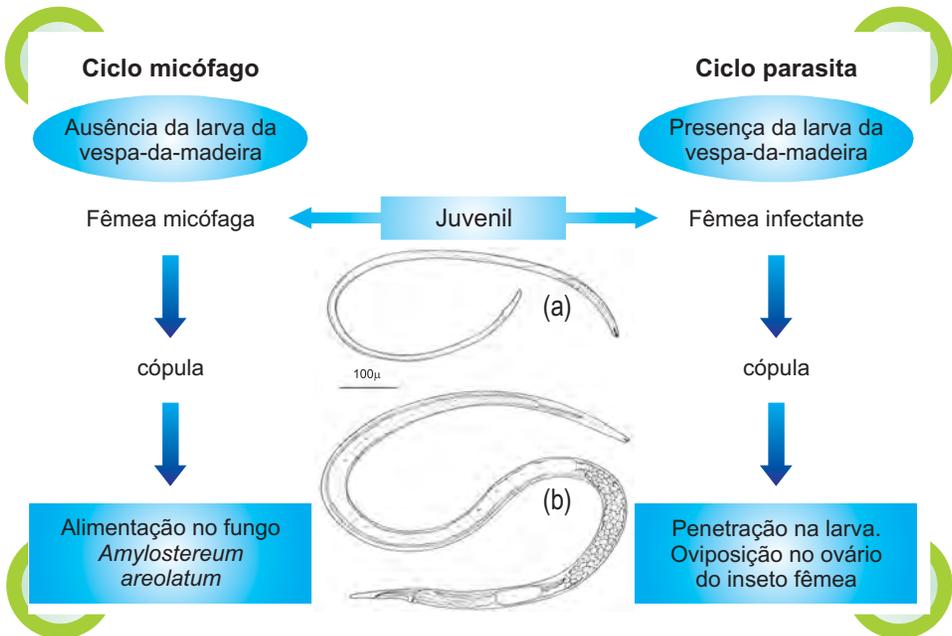


Figura 2. Ciclo facultativo do nematóide *Beddingia siricidicola*. (a) Fêmea infectante (notar presença de um forte estilete); (b) fêmea micófaga (estilete fraco).

Fonte: Desenhos retirados de Bedding (1968).

Ciclo da Vespa

Os adultos da vespa emergem de outubro a abril (principalmente novembro e dezembro) deixando orifícios de emergência no tronco (Figuras 3a e 3b). As fêmeas ovipositam no tronco, injetando um muco fitotóxico e esporos do fungo *Amylostereum areolatum* no momento da oviposição (Figuras 3c). Esse fungo causa o principal dano à plantação de pinus, a chamada seca-dos-pinus, pois as acículas tornam-se amareladas, depois a planta seca totalmente e morre. As larvas eclodem, formam galerias no tronco e se alimentam do fungo (Figuras 3d e 3f) (MAGGENTI, 1981). O muco fitotóxico provoca uma reação de hipersensibilidade no tronco e em cada local de oviposição ocorre vazamento de resina (Figura 3e). Isso é fator importante na identificação das árvores com larvas no seu interior para a aplicação dos nematóides (IEDE; PENTEADO; REIS FILHO, 2003).

Ciclo do Nematóide

O nematóide *B. siricidicula* pode permanecer alimentando-se no fungo *A. areolatum* por várias gerações sendo que, na fase micófaga, a morfologia é totalmente diferente da fase parasita (Figura 3a e 3b) (BEDDING, 1968). Somente na fase micófaga juvenil, os nematóides conseguem perceber a presença da larva da vespa para se transformar em parasitas. Os fatores que induzem a mudança para a fase parasita são: alto CO₂ e baixo pH. Depois de algumas ecdises, tornam-se fêmeas e machos pré-parasitas e copulam. A fêmea já fecundada (infectante) penetra na larva da vespa utilizando seu estilete para perfurar a cutícula. Em geral, cerca de 5 a 20 fêmeas infectantes penetram em cada larva de vespa. Dentro do inseto, a alimentação do nematóide é transcuticular (através da cutícula) e seu aparelho digestivo se atrofia (NICKLE, 1984). Durante a pupação da vespa, os nematóides migram para as gônadas e depositam seus ovos nos ovários das fêmeas da vespa, esterilizando-os. Cerca de 100 a 200 juvenis de nematóides eclodem por ovo de vespa colocado. Dessa forma, as vespas auxiliam na dispersão dos nematóides (IEDE; PENTEADO; REIS FILHO, 2003).

Controle

A aplicação de nematóides é feita entre março e julho, logo após o período de oviposição da vespa. Árvores com a copa amarelada, respingos de resina no tronco e ausência de orifícios de emergência ou aquelas que apresentam pelo menos um desses sintomas são marcadas, e cerca de 20% delas recebem a aplicação de nematóide. Antes da aplicação, as árvores são derrubadas e perfurações de 1 cm de profundidade são feitas com um martelo de ponta a cada 30 cm.

Como possui fase micófaga, o nematóide é criado em laboratório alimentando-se de hifas do fungo. Os nematóides são separados do fungo por lavagens e misturados à gelatina 10%. Cada tronco de árvore recebe 20 mL de gelatina com nematóides, o que corresponde a cerca de 1 milhão de nematóides¹.

¹ Comunicação pessoal de Edson T. Iede à autora em 2004.



Fotos: Paula Klasmer (a, d, e, f); Dennis Haugen (b). Fonte: Insect ... (2005).
Foto: Cortesia de Canadian Food Inspection Agency (c). Fonte: Weston (2005).

Figura 3. Diferentes fases no ciclo da vespa da madeira (*Sirex noctilio*). (a) adulto emergindo do tronco; (b) orifícios deixados após a emergência dos adultos; (c) Fêmea adulta da vespa da madeira; (d) larvas da vespa nas galerias. (e) Fêmea ovipositando no tronco (seta mostra resina escorrendo no tronco após a oviposição); (f) detalhe da larva da vespa.

A eficiência desse agente de controle biológico pôde ser atestada por avaliações realizadas na temporada de 2000/2001 em nove locais de Santa Catarina. Em um desses locais, o índice de parasitismo foi de 65%, em outros dois, 77% e 80,5%, enquanto nos restantes seis, os níveis de parasitismo foram acima de 91% (IEDE; PENTEADO; REIS FILHO, 2003).

Mermitidae (Stichosomida: Adenophorea)

Existem cerca de 60 gêneros e 400 espécies nessa família. A identificação das espécies é feita com base em caracteres morfométricos dos juvenis e adultos. Esses nematóides são considerados como verdadeiros parasitas obrigatórios, pois são apenas cultiváveis no próprio hospedeiro. Eles já foram encontrados em inúmeros artrópodes como insetos (15 ordens), aracnídeos, crustáceos, carrapatos, lesmas, entre outros. Como características marcantes dessa família, têm-se: comprimento diferenciado (40 a 400 μ m), prolificidade (até 1 milhão de ovos/fêmea), alimentação transcuticular, formação de trofossoma e esticócitos, em vez de possuírem esôfago e intestino, e degeneração da abertura oral e do ânus (KAISER, 1991).

Apenas por uma questão didática, essa família foi dividida em mermitídeos terrestres e aquáticos.

Mermitídeos Terrestres

Esses nematóides parasitam insetos terrestres principalmente das ordens Ortóptera e Coleóptera. Os insetos são parasitados pela ingestão dos ovos que possuem juvenis formados em seu interior (Figura 4a). Esses ovos são colocados sobre as folhas e ingeridos pelos insetos como alimento (Figura 4b). Logo após a ingestão, os ovos se rompem, liberando os juvenis que migram para hemolinfa do inseto. Na hemolinfa, os nematóides promovem severa competição por nutrientes, resultando em atrofia do tórax e do abdômen, comprometimento de órgãos

(músculos, asas, ovários, ovos sem vitelo), alterações nos padrões de desenvolvimento de insetos sociais (formigas) e no comportamento para descarga dos nematóides (insetos mudam trajeto). O hospedeiro, em geral, não morre por ter os nematóides, mas sim quando eles precisam deixá-lo para se reproduzir no meio ambiente. Os juvenis, no quarto estágio, já, adultos, deixam o hospedeiro, para copular e ovipositar nas folhas (Figura 4b).

Possuem ciclo de vida longo (1 a 4 anos), mas somente a fase juvenil é encontrada no hospedeiro. Para sobreviver, os adultos migram para locais protegidos e úmidos. Sob condições ótimas, ocorrem: a reativação das fêmeas, migração para parte superior das gramíneas e a postura dos ovos que são relativamente resistentes à dessecação e à incidência da ultravioleta. Citam-se como exemplos: *Mermis nigrescens* e *Agamermis decaudata* (KAISER, 1991).

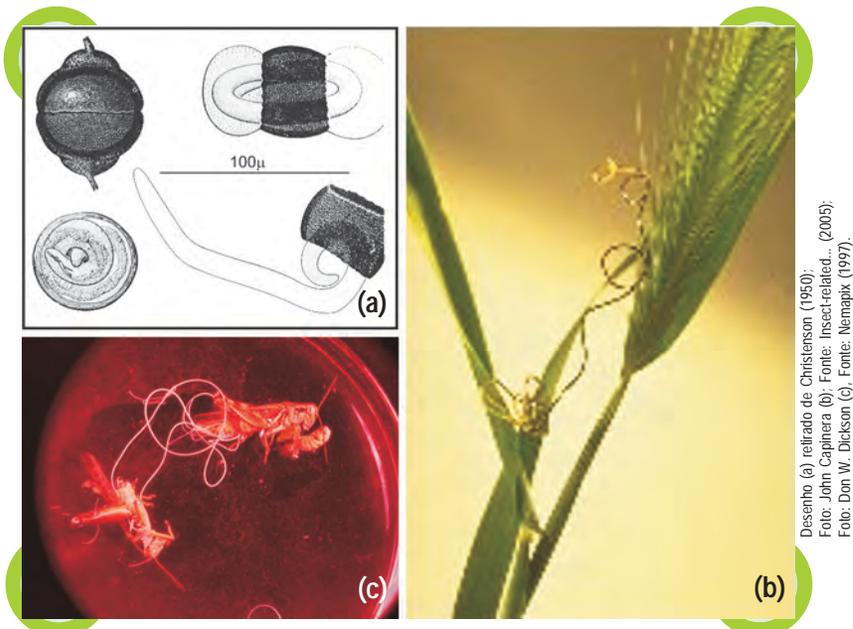
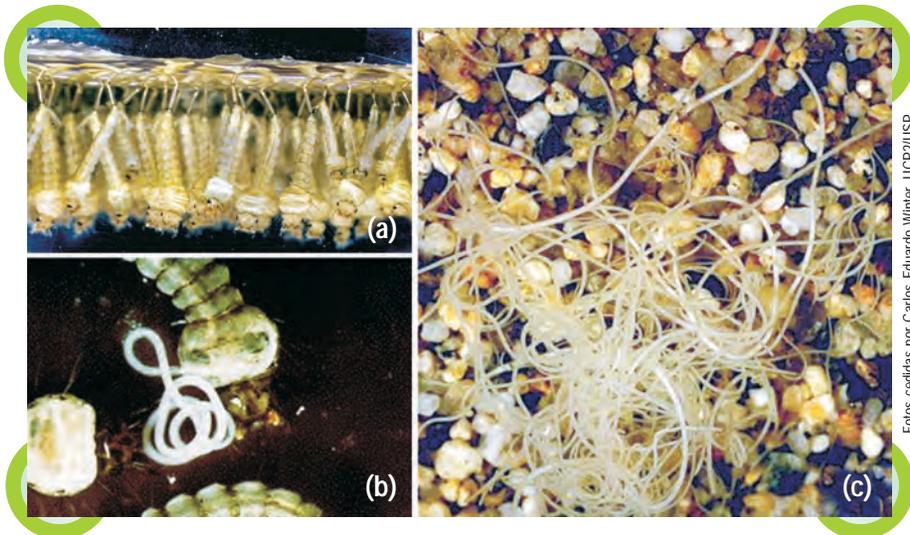


Figura 4. (a) Ovos de um mermitídeo mostrando juvenil no segundo estágio em seu interior; (b) fêmea migrando para a parte superior da gramínea para ovipositar; (c) juvenis no quarto estágio saindo dos gafanhotos.

Mermitídeos Aquáticos

Esses nematóides parasitam preferencialmente larvas de mosquitos que são encontradas em águas limpas e paradas. Por isso, podem ser considerados como potenciais agentes de controle biológico para o controle de vetores de doenças humanas, como dengue, febre amarela e outras.

Os juvenis pré-adultos (quarto estágio) emergem do hospedeiro, fazem ecdise, transformam-se em adultos (Figura 5a e 5b), copulam e ovipositam na água (Figura 5c). Cada fêmea pode colocar cerca de 1300 a 4500 ovos. Desses ovos, emergem juvenis no segundo estágio que buscam novos hospedeiros penetrando-os ativamente através da cutícula. Nematóides nesse estágio são providos de pequeno estilete que os auxilia na penetração. Dentro do mosquito, eles se localizam no tórax do inseto e, quando atingem o quarto estágio, emergem do hospedeiro, causando-lhe a morte (Figura 5b) (KAISER, 1991).



Fotos cedidas por Carlos Eduardo Winter, UCP2/USP.

Figura 5. Ciclo de vida de um mermitídeo aquático. (a) larvas de mosquitos parasitadas pelo nematóide *Romanomermis culicivorax*; (b) nematóide no quarto estágio deixando a larva do mosquito; (c) adultos de *R. culicivorax* na água.

O ciclo de vida dos mermitídeos aquáticos não é tão longo quanto o dos terrestres e dura, no máximo, seis meses. Os ovos só eclodem quando há estímulo, ou seja, quando existem hospedeiros presentes; assim sendo, os ovos podem permanecer no fundo da poça ou lagoa por até seis meses e são considerados como estruturas de resistência. Os nematóides no segundo estágio podem ficar nadando à procura do hospedeiro por três ou quatro dias (MAGGENTI, 1981).

Nematóides Entomopatogênicos

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) pertencem à ordem Rhabditida (Nematoda: Secernentea) da qual fazem parte as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. A Steinernematidae possui dois gêneros: *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinerinema* Nguyen e Smart (1994), enquanto Heterorhabditidae possui o gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976. Atualmente, existem descritas e validadas cerca de 43 espécies do gênero *Steinernema*, uma do gênero *Neosteinerinema* e nove do gênero *Heterorhabditis*, sendo que mais de 70% delas foram descritas nos últimos 20 anos (NGUYEN, 2005).

Os NEPs são assim conhecidos por que causam doença e morte a diferentes espécies de insetos com grande rapidez (24 a 72 horas) (DOWDS; PETERS, 2002). Esses nematóides apresentam como particularidade a associação simbiote com bactérias entomopatogênicas dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* (associação com espécies dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* respectivamente). Essas bactérias são as principais responsáveis pela rápida morte do hospedeiro por septicemia. Os juvenis infectantes desses nematóides infectam e matam insetos em dezenas de famílias e ordens, e muitas espécies já fazem parte do Manejo Integrado de Pragas (MIP) de várias culturas (WOUTS, 1991). O MIP objetiva a utilização de métodos mais adequados à produtividade agrícola, mas leva em conta fatores importantes, como a preservação dos inimigos naturais e a prevenção do surgimento de resistência a pragas e doenças.

O espectro de hospedeiros para cada espécie de nematóide é pequeno e até bem específico, não causando, portanto, mortalidade indiscriminada. Um pequeno espectro de hospedeiros significa que se precisa escolher o NEP mais adequado ao controle de uma dada praga.

Biologia da Família Steinernematidae

O ciclo de vida desses nematóides inclui três fases de desenvolvimento: ovo, juvenil e adulto (fêmeas e machos). A fase juvenil é composta de quatro estádios (J1, J2, J3 ou Juvenil Infectante e J4). O juvenil infectante (JI) é o estágio do nematóide encontrado no solo. Esses juvenis buscam o hospedeiro, localizando-os pelos produtos de excreção, níveis de CO₂ e gradientes de temperatura. A infecção é iniciada com a penetração dos nematóides pelas aberturas naturais (boca, ânus ou espiráculos); dentro do inseto migram para a hemolinfa e liberam suas bactérias simbiotas do gênero *Xenorhabdus*. Essas bactérias produzem toxinas e matam o hospedeiro por septicemia em 24 a 48 horas. Depois começam a se multiplicar, e, posteriormente, os JIs se alimentam delas e dos tecidos por elas decompostos, passando então para o estágio J4. Desse estágio, sairão fêmeas e machos (fase adulta) da primeira geração; essas fêmeas colocam ovos que darão origem à segunda geração (FORST; CLARKE, 2002) (Figura 6).

Os nematóides podem ter duas ou três gerações dentro do hospedeiro dependendo da disponibilidade de alimento no cadáver. Quando o alimento se exaure, juvenis no terceiro estágio retêm células da bactéria em seu interior e abandonam o cadáver como JIs. Os JIs permanecem no solo à procura de novo inseto hospedeiro por meses, dependendo da temperatura, da umidade do solo e da espécie de nematóide envolvida (PATEL; STOLINSKI; WRIGHT, 1997).

O ciclo do *Neosteinerinema* é similar ao do *Steinerinema*, com a diferença de que em *Neosteinerinema* só há uma geração no hospedeiro (NGUYEN; SMART, 1994).

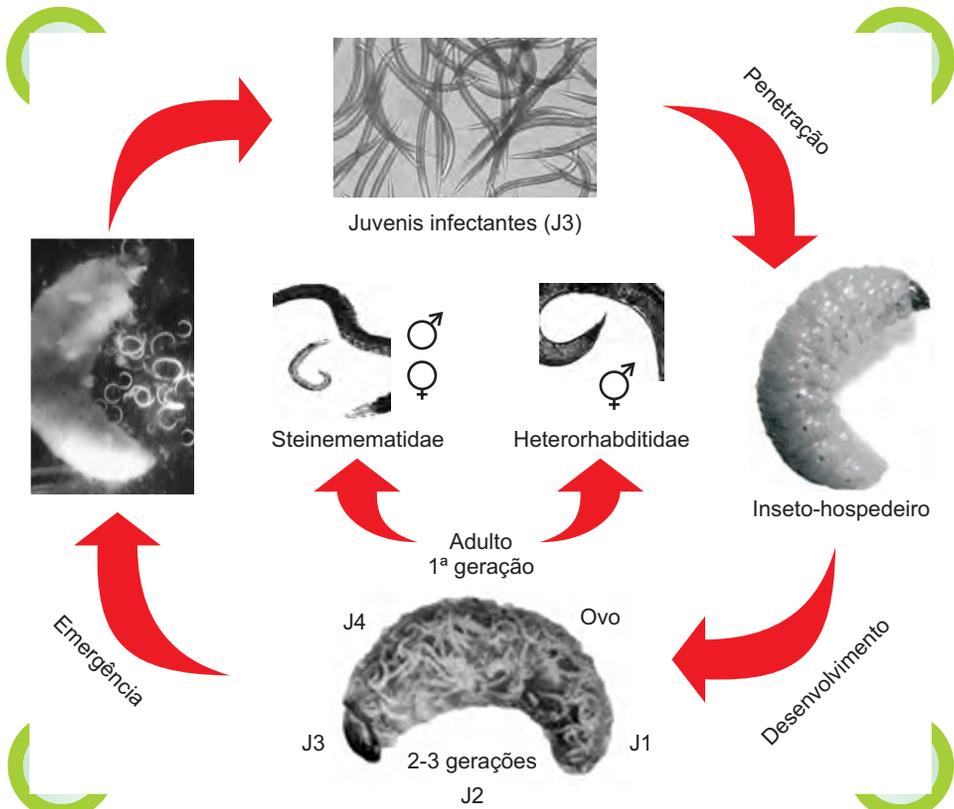


Figura 6. Ciclo de vida dos nematóides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*.

Fonte: Dolinski e Moino Júnior (2006).

Biologia da Família Heterorhabditidae

O ciclo dos heterorhabditídeos é muito semelhante aos dos steinernatídeos, com algumas ressalvas. Os J1s dessa família, além de penetrar pelas aberturas naturais, podem também penetrar através da cutícula do inseto hospedeiro por meio de um dente quitinoso localizado frontalmente em sua extremidade anterior. Estes chegam à hemolinfa e liberam bactérias do gênero *Photorhabdus*. Na primeira geração dentro do inseto, ao invés de aparecerem fêmeas e machos, ocorre apenas adultos hermafroditas que produzem os demais

estádios (ovos, J1, J2, J3 e J4). Na segunda geração, os adultos se diferenciam em machos e fêmeas (POINAR JR., 1990) (Figura 6).

Biogeografia

As espécies dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são encontradas em grande diversidade de áreas geográficas, solos e ambientes adaptados co-evolutivamente a um grande número de insetos hospedeiros (WOODRING; KAYA, 1988).

Sobre distribuição geográfica e isolamento de nematóides no mundo, Hominick (2002) compilou uma lista com a localização de diferentes espécies de nematóides entomopatogênicos. Dentro do gênero *Steinernema*, essa localização é cosmopolita para algumas espécies, como no caso de *S. glaseri* e *S. carpocapsae*. Algumas são adaptadas a temperaturas mais amenas, como *S. feltiae*; em outras é mais restrita, como, por exemplo, *S. kushidai* apenas encontrada no Japão. O gênero *Heterorhabditis* encontra-se amplamente distribuído no mundo, como é o caso de *H. bacteriophora* que está geograficamente disseminada desde as Américas, Europa Meridional e Central, Austrália até a Ásia Oriental (China, Japão e Coréia). Outro heterorhabditídeo, *H. indica*, também possui ampla disseminação, mas apenas nas regiões tropicais e subtropicais, e zonas temperadas subtropicais e quentes do Japão. Em contraste, *H. zealandica* e *H. marelatus* parecem ser espécies geograficamente mais restritas, sendo encontradas em poucas áreas como Nova Zelândia e, nos Estados Unidos, nas regiões do Oregon e da Califórnia. *H. megidis* até hoje só foi encontrada no Hemisfério Norte. No Brasil, o isolamento de nematóides entomopatogênicos foi feito em Rondônia (MACHADO; DOLINSKI, 2005), Amazonas², Minas Gerais (ACEVEDO et al., 2005), Rio de Janeiro³ e São Paulo⁴ (FOWLER, 1988), sendo na sua maioria heterorhabditídeos.

² Comunicação pessoal de Alcides Moino Júnior, UFLA/MG à autora em março de 2006.

³ Comunicação pessoal de Cláudia Dolinski, UENF/ RJ à autora em março de 2006.

⁴ Comunicação pessoal de Luiz G. Leite, IB/SP à autora em março de 2006.

Como nematóides entomopatogênicos possuem potencial para serem encontrados em solos de diferentes lugares, recomenda-se que, antes de qualquer introdução, seja feita amostragem local ou de maior amplitude, visando obter maior variabilidade de nematóides possível para futura aplicação no campo.

Tabela 1. Espécies das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae.

Família Steinernematidae Chitwood e Chitwood, 1937

Gênero: *Steinernema* Travassos, 1927

Espécie tipo: *S. krausse* (Steiner, 1923) Travassos, 1927

- S. abbasi* Elawad, Ahmad & Reid, 1997
- S. aciari* Qui, Yan, Zhou, Nguyen & Pang, 2005
- S. affine* (Obvien, 1937) Wouts et al., 1982
- S. anatoliense* Hazir, Stock & Keskin, 2003
- S. arenarium* (Artyukhovsky, 1967) Wouts et al., 1982
- S. asiaticum* Anis, Shahina, Reid, 2004
- S. apuliae* Trigiani, Mráček & Reid, 2004
- S. bicornutum* Tallosi, Peters & Ehlers, 1995
- S. carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts et al. 1982
- S. caudatum* Xu, Wang & Li, 1991
- S. ceratophorum* Jian, Reid & Hunt, 1997
- S. cubanum* Mracek, Hernandez & Boemare, 1994
- S. diaprepesi* Nguyen & Duncan, 2002
- S. feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts et al., 1982
- S. glaseri* (Steiner, 1929) Wouts et al. 1982
- S. guangdongense* Qui, Fang, Zhou, Pang & Nguyen, 2004
- S. intermedium* (Poinar, 1985) Mamiya, 1988
- S. jollieti* Spiridonov, Krasomil-Osterfeld & Moens, 2004
- S. kari* Waturu, Hunt & Reid, 1997
- S. kushidai* Mamiya, 1988
- S. loci* Phan, Nguyen & Moens, 2001
- S. longicaudum* Shen & Wang, 1992
- S. monticolum* Stock, Choo & Kaya, 1997
- S. neocurtillae* Nguyen & Smart, 1992
- S. oregonense* Liu & Berry, 1996
- S. pakistanense* Shahina et al., 2001

continua ...

Tabela 1. Continuação.

Gênero: *Steinernema* Travassos, 1927
 Espécie tipo: *S. krausse* (Steiner, 1923) Travassos, 1927

S. puertoricense Román & Figueroa, 1994
S. rarum (De Doucet, 1986) Mamiya, 1988
S. riobrave (Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994)
S. ritteri Doucet & Doucet, 1990
S. robustipiculum Phan et al., 2005
S. sangi Ohan, Nguyen & Moens, 2001
S. scapterisci Nguyen & Smart, 1990
S. scarabei Stock & Koppenhofer, 2003
S. siamkayai Stock, Somsook & Reid, 1998
S. tami Van Luc, Nguyen, Reid & Spiridonov, 2000
S. thanhi Phan, Nguyen & Moens, 2001
S. thermophilum Gangula & Singh, 2000
S. websteri Cutler & Stock, 2003
S. weiseri Mráček, Sturhan & Reid, 2003

Família Steinernematidae Chitwood e Chitwood, 1937
 Gênero: *Neosteinerema*
N. longicurvicauda Nguyen & Smart, 1994

Família Heterorhabditidae Poinar, 1976
 Gênero: *Heterorhabditis* Poinar, 1976
 Espécie tipo: *H. bacteriophora* Poinar, 1976

H. baujardi Phan, Subbotin, Nguyen & Moens, 2003
H. brevicaudis Liu, 1994
H. dowesi Stock et al., 2002
H. hawaiiensis (Gardner et al., 1994)
H. indica Poinar et al., 1992
H. marelatus Liu, 1996
H. megidis Poinar et al., 1987
H. mexicana Nguyen et al., 2004
H. poinari Kakulia & Mikaia 1997
H. taysearae Shamseldean et al., 1996
H. zealandica Poinar, 1990

Fonte: Informação obtida de Adams e Nguyen, 2002 e atualizada por Adams et al., 2006.

Sintomatologia e Sinais de Infecção

Insetos infectados por NEPs exibem sintomas específicos causados principalmente pelas bactérias simbiotes associadas a eles, sendo estas específicas para cada espécie de nematóide. Como relatado anteriormente, as bactérias associadas a heterorhabditídeos pertencem ao gênero *Photorhabdus* e aquelas associadas aos steinernematídeos, ao gênero *Xenorhabdus* (BOEMARE, 2002). Bactérias de ambos os gêneros são móveis, Gram-negativas e pertencem à família Enterobacteriaceae. Essas bactérias produzem toxinas que causam a morte do inseto e antibióticos que impedem o crescimento de outros microrganismos oportunistas. Elas produzem, também, pigmentos que dão aos cadáveres hospedeiros cores características, por exemplo, cadáveres infectados pelo complexo *Heterorhabditis* – *Photorhabdus* adquirem cores avermelhadas ou alaranjadas e são bioluminescentes, enquanto, em cadáveres infectados pelo complexo *Steinernema* – *Xenorhabdus*, as cores variam do creme ao pardo-escuro, sem apresentar bioluminescência (BOEMARE, 2002).

Essas bactérias não sobrevivem no meio ambiente, por isso precisam dos nematóides como proteção e meio de transporte. Por sua vez, os nematóides beneficiam-se do alimento por elas provido (FORST; CLARKE, 2002). Nos heterorabditídeos, as bactérias localizam-se na parte anterior do intestino (CICHE; ENSIGN, 2003). Nos JIs do gênero *Steinernema*, as células bacterianas estão apreendidas em uma vesícula localizada no intestino (MARTENS; GOODRICH-BLAIR, 2005).

Mobilidade

Quanto à movimentação, nematóides entomopatogênicos podem ser classificados como *ambusher* ou *cruiser*. As espécies *ambusher* promovem uma movimentação própria chamada de **nictação** que consiste na suspensão do corpo ficando este apoiado apenas na ponta da cauda. A parte anterior do

nematóide fica livre aguardando a passagem de um hospedeiro para então saltar sobre ele. Exemplos de nematóides entomopatogênicos que fazem nictação: *S. carpocapsae* e *S. scapterisci* (Figuras 7a e 7b) (LEWIS; GAUGLER; HARRISON, 1993). Os nematóides *cruiser* não aguardam a passagem do hospedeiro, buscando-os ativamente no solo, respondendo positivamente a seus voláteis deslocando-se a certa distância até localizá-lo (resposta direcional), como é o caso de espécies como *H. bacteriophora* e *S. glaseri* (ISHIBASHI; KONDO, 1990). Ainda assim, existem espécies de NEPs que apresentam características tanto de *ambushers* como de *cruisers*, de acordo com a proximidade do hospedeiro, como é o caso de *S. feltiae* (GREWAL et al., 1994).

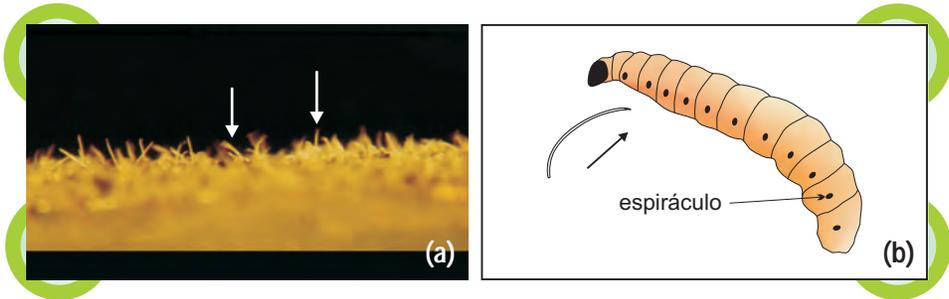


Figura 7. (a). *Steinernema carpocapsae* fazendo nictação a espera de um hospedeiro; (b) nematóides após a nictação pulando sobre o hospedeiro.

Foto cortesia do Dr. Edwin E. Lewis, Department of Nematology/ UC Davis, EUA.

Desenho adaptado de Dusenbery (1996).

Organismos Antagonistas

Organismos como fungos, bactérias e nematóides predadores podem ser algumas causas da mortalidade de NEPs no campo. Eles podem também se comportar como organismos antagonônicos. Essa mortalidade seria ainda maior se os NEPs não tivessem desenvolvido mecanismos de sobrevivência. Quando os JIs emergem de seu hospedeiro e se dirigem ao solo, conservam a cutícula da fase anterior (J2), garantindo sua viabilidade diante de condições ambientais adversas,

como falta d'água, presença de pesticidas e temperaturas elevadas (EPSKY; WALTER; CAPINEIRA, 1998; KAYA, 1990).

Legislação e Regulamentação

A grande demanda de nematóides entomopatogênicos nos Estados Unidos, na década de 1980, levou muitos grupos de pesquisadores, em vários países do mundo, a isolar novas espécies e linhagens. Essas amostragens e isolamentos expandiram enormemente o germoplasma de nematóides entomopatogênicos disponível para pesquisa e aumentaram o risco da introdução de nematóides exóticos em terras onde não eram nativos. Especificamente, para o controle de pragas, os nematóides *S. scapterisci* e *S. feltiae* foram introduzidos, multiplicados e comercializados sem nenhum critério⁵. Isso resultou em muitas críticas por parte de alguns pesquisadores, e Nickle et al. (1988) propuseram um guia para introdução de nematóides entomopatogênicos. Um pouco depois, uma legislação sobre a introdução de espécies exóticas foi elaborada (RIZVI; HENNESSEY; KNOTT, 1996).

Hoje todas as introduções de nematóides devem ser notificadas, e todos os nematóides são analisados, identificados e estudados quanto a diversos fatores. Esses fatores foram exaustivamente discutidos por Jansson (1993) antes de a legislação ser elaborada. Entre esses fatores, o autor destaca como de maior importância o impacto dos nematóides exóticos em organismos não-alvo e os efeitos desses nematóides no microcosmo local e sua capacidade de deslocar ou eliminar nematóides entomopatogênicos nativos.

Depois de tantas introduções aleatórias, os Estados Unidos comportam-se como exemplo, pois promovem levantamentos de microcosmos e testes de patogenicidade com invertebrados locais, antes de fazer qualquer introdução de nematóide entomopatogênico exótico. Exemplo que deveria ser seguido.

⁵ Comunicação pessoal de Ramom Georgis à autora em novembro de 2005.

Enquanto discussões estavam ocorrendo nos Estados Unidos, na Europa a situação foi um pouco diferente (EHLERS, 1996), um comitê foi estabelecido para analisar o caso dos nematóides entomopatogênicos prevendo problemas associados com a introdução de nematóides exóticos. Os membros concluíram que as evidências científicas suportavam a premissa de que os nematóides entomopatogênicos são inócuos e poucos riscos foram identificados, não havendo necessidade de registro, entretanto, a introdução de nematóides exóticos deveria ser regulada. Esse comitê concluiu, também, que nematóides entomopatogênicos são organismos benéficos que vêm sendo usados há muitos anos sem causar problemas, sendo mais específicos e causando menos ameaça ao ambiente do que os pesticidas (EHLERS; HOKKANEN, 1996; RICHARDSON, 1996).

O impacto produzido por NEPs após aplicação inundativa foi estabelecido por Barbecheck e Millar (2000). Segundo esses autores, NEPs teriam o potencial de infectar espécies e não-alvo suscetíveis com estádios no solo no momento da aplicação dos nematóides. Vale ressaltar que isso não ocorre com a maioria dos parasitoides ou predadores. Alguns testes com diferentes invertebrados são mostrados na Tabela 2. É importante ressaltar a não-suscetibilidade das minhocas a esses nematóides (AKHURST; SMITH, 2002).

Em relação aos vertebrados, inúmeros nematóides foram testados contra diversas espécies, desde peixes até macacos. Na Tabela 3, resumem-se esses testes. Somente os girinos se mostraram suscetíveis, quando nematóides foram adicionados à água onde estavam. Akhurst e Smith (2002) acreditam que as dosagens usadas nos girinos tenham sido absurdamente altas e que outras dosagens deveriam ser testadas.

Finalizando, as bactérias entomopatogênicas associadas aos NEPs não são consideradas perigosas ao meio ambiente, pois raramente são encontradas fora do nematóide ou do hospedeiro e também por que sua sobrevivência no solo é mínima, já que não possuem formas de sobrevivência (AKHURST; SMITH, 2002).

Tabela 2. Exemplos de efeitos causados por nematóides entomopatogênicos em invertebrados.

Organismo não-alvo	Espécie de nematóide testada	Efeito
PARASITÓIDES		
Apanteles militares (Hym.: Braconidae)	Steinernema carpocapsae, Heterorhabdillus bacteriophora	Indireto em laboratório (hospedeiro morto)
Compsilura concinnata (Dip.: Tachinidae)	S. carpocapsae	Indireto em laboratório (hospedeiro morto)
Cephalcia avensis (Hym.: Ichneumonidae)	S. feltiae	Reduzida emergência no campo
INSETOS PREDADORES		
Harmonia axyridis (Col.: Coccinellidae)	S. carpocapsae	Em placa de Petri, algumas joaninhas ficaram temporariamente paralisadas e outras morreram.
Harpalus sp. e Pterostaticus sp. (Col.: Carabidae); Cicindela sp. e Tetracha sp. (Col.: Cicindelidae); Philonthus sp. (Col.: Staphylinidae); Labidura riparia (Derm.: Labiduridae)	S. carpocapsae, H. bacteriophora	Em laboratório, formas imaturas foram mortas, mas não adultos; não houve efeito nas populações no campo.
Bembidion proerans, Pterostichus cupreus (Col.: Carabidae)	S. carpocapsae	Em testes no laboratório, adultos mortos, larvas não; pequena redução nas populações no campo.

continua ...

Tabela 2. Continuação.

Organismo não-alvo	Espécie de nematóide testada	Efeito
OUTROS INVERTEBRADOS		
Onychiurus (Collembola)	<i>S. carpocapsae</i>	Redução de populações no campo
Scutigerella immaculata (Symphyla)	<i>S. carpocapsae</i>	Mortos em laboratório
Armadiílium vulgare; Porcellio scaber (Crustácea: Isopoda)	<i>S. carpocapsae</i> , <i>H. bacteriophora</i> , <i>S. glaseri</i>	Mortos em laboratório pelos dois primeiros, mas não por <i>S. glaseri</i>
<i>Alyia innocous</i> , <i>Macrobrachium acanthurus</i> (Crustácea: Caridae)	<i>S. carpocapsae</i>	Sem efeito no laboratório
Várias espécies de Arachnida	<i>H. bacteriophora</i>	Mortos no laboratório
Aporrectodea sp.	<i>S. carpocapsae</i>	Minhocas intactas não foram afetadas
Aporrectodea caliginosa	<i>Steinernema</i> sp.	Sem efeito nos casulos das minhocas em laboratório
Aporrectodea turgida, Aporrectodea tapezoides, Lumbricus terrestris e Eisenia sp.	<i>S. carpocapsae</i> , <i>S. glaseri</i>	Sem efeito no laboratório
<i>Macrobolus richtersi</i> (Tardigrada)	<i>S. carpocapsae</i>	Infecções no laboratório
<i>Dericeras agreste</i> , <i>D. reticulatum</i> (Gastropoda)	<i>S. carpocapsae</i>	Mortos no laboratório

Fonte: Baseado em Akhurst e Smith (2002).

Tabela 3. Testes dos efeitos de nematóides entomopatogênicos e suas bactérias simbiotes em vertebrados.

Animal testado	Espécie de nematóide	Aplicação	Efeito
Porquinho-da-india	Xenorhabdus bovienii	Oral, nasal, intradermal, subcutânea, intraperitoneal	Sem patologia
	Steinernema glaseri	Intraperitoneal	Sem patologia
	S. carpocapsae	Oral, intraperitoneal	Sem patologia ou efeito no ganho de peso
Rato	X. bovienii	Oral, intradermal, subcutânea, intraperitoneal	Sem patologia
	S. carpocapsae	Oral, subcutânea, intraperitoneal	Úlceras na pele quando administrado subcutaneamente
	S. felliae, S. glaseri, Heterorhabditis bacteriophora	Oral, subcutânea, intraperitoneal	Sem patologia
Camundongo	S. carpocapsae, H. bacteriophora	Oral	Sem patologia
	X. nematophila, Photorhabdus luminescens	Subcutânea	Sem patologia
	X. bovienii	Subcutânea, intracerebral	Sem patologia
Coelho	S. glaseri	Oral, nasal, intradermal, subcutânea, intraperitoneal	Sem patologia
	X. bovienii	Oral, abdominal, cavidade orbital conjuntiva	Sem patologia
	S. glaseri	Oral, abdominal, nasal	Sem patologia

continua ...

Tabela 3. Continuação.

Animal testado	Espécie de nematóide	Aplicação	Efeito
Galinha	<i>S. carpocapsae</i>	oral	Sem patologia
	<i>X. nematophila</i> , <i>P. luminescens</i>	subcutânea	Sem patologia
Sapo	<i>S. carpocapsae</i>	Na água	Girinos mortos
Rã	<i>S. carpocapsae</i> , <i>H. bacteriophora</i> , <i>S. anomali</i> , <i>S. felitiae</i> , <i>Heterorhabditis</i> sp.	Na água	Girinos mortos, adultos não afetados
Peixe	<i>S. carpocapsae</i>	Na água	Sem patologia
Salamandra	<i>S. carpocapsae</i> , <i>S. glaseri</i> , <i>S. anomali</i> , <i>S. felitiae</i> , <i>Heterorhabditis</i> sp.	oral	Sem patologia; presença de outras bactérias no fígado (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Chromobacterium</i>)

Fonte: baseado em Akhurst e Smith (2002).

Considerações Finais

Existe grande potencial para a utilização de nematóides entomopatogênicos e entomofílicos como agentes do controle biológico de pragas e vetores. Contudo, para que realmente tenha sucesso, a escolha do nematóide deve ser feita com critério.

Nematóides nativos devem ser devidamente identificados em nível de espécie e ter sua biologia definida antes de serem usados no campo. Em relação à biologia, existem diferentes aspectos que podem ser observados como, por exemplo, a progênie produzida em larvas de *G. mellonella*. Outra característica importante seria a temperatura ótima para migração e reprodução. Testes de virulência em laboratório devem ser feitos para que se conheça a espécie ou a linhagem que melhor controlaria uma dada praga ou vetor. Alguns nematóides possuem alta especificidade, mas outros não, por isso o ideal é buscar sempre os nematóides com menor espectro de hospedeiros.

A utilização dos nematóides nativos deve ter prioridade sobre os exóticos que devem ser aplicados em último caso. Os nativos já estão adaptados às condições climáticas como também à entomofauna local. Como não se conhece o impacto real que esses nematóides exóticos podem causar aos nativos, recomenda-se que pelo menos sejam feitos testes em laboratório contra os inimigos naturais encontrados na área a ser aplicada. Esses nematóides exóticos devem ser aplicados localmente e um cuidado extra deve ser tomado para não serem dispersados.

Estudos sobre nematóides como agentes do controle biológico no Brasil estão no início, mas existe grande potencial para que avancem e tornem os nematóides populares como controladores de pragas e de vetores.



Referências

- ACEVEDO, J. P. M.; MOINO JÚNIOR, A.; CAVALCANTI, R. S.; DOLINSKI, C. M. Amostragem e avaliação de técnicas para isolamento de nematóides entomopatogênicos nativos. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 1, p. 17-23, 2005.
- ADAMS, B. J.; FODOR, A.; KLEIN, M. G.; SMITH, H. L.; STACKEBRANDT, E.; STOCK, S. P. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. **Biological Control**, San Diego, v. 37, n. 1, p. 32-49, 2006.
- ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 1-34.
- AKHURST, R.; SMITH, K. Regulation and safety. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 311-332.
- BARBERCHECK, M. E.; MILLAR, L. C. Environmental impacts of entomopathogenic nematodes used for biological control in soil. In: FOLLETT, P. A.; DUAN, J. J. (Ed.). **Non target effects of biological control**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 287-308.
- BEDDING, R. A. *Deladenus wilsoni* n. sp. and *D. siricidicola* n. sp. (Neotylenchidae), entomophagous-mycetophagous nematodes parasitic in siricid woodasps. **Nematologica**, Leiden, v. 14, p. 515-525, 1968.
- BOEMARE, N. Biology, taxonomy and systematic of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 35-56.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. The metazoa: development, life history, and phylogeny. In: BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p. 322-387.
- CHITWOOD, B. G. Introduction. In: CHITWOOD, B. G.; CHITWOOD, M. B. (Ed.). **An introduction to nematology**. Baltimore: University Park Press, 1950. p. 1-7.
- CHRISTENSON, R. O. Nemic ova. In: CHITWOOD, B. G.; CHITWOOD, M. B. (Ed.). **An introduction to nematology**. Baltimore: University Park Press, 1950. p. 175-187.
- CICHE, T. A.; ENSIGN, J. C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 4, p. 1890-1897, 2003.

DOLINSKI, C. M.; MOINO JÚNIOR, A. Utilização de nematóides entomopatogênicos nativos ou exóticos: o perigo das introduções. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 30, 2006. No prelo.

DOWDS, B. C. A.; PETERS, A. Virulence mechanisms. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 79-98.

DUSENBERY, D. B. **Life at a small scale: the behavior of microbes**. New York: Scientific American Library, 1996. 214 p.

EHLERS, R. U. Current and future use of nematodes in biocontrol: practice and commercial aspects with regard to regulatory policy issues. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, p. 303-316, 1996.

EHLERS, R. U.; HOKKANEN, H. M. T. Insect control with non-endemic entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.): conclusions and recommendations of a combined OECD and COST workshop on scientific and regulatory policy issues. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, p. 295-302, 1996.

EPSKY, N. D.; WALTER, D. E.; CAPINEIRA, J. I. Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 8, n. 1, p. 821-825, 1998.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematóides entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1988. p. 541-569.

FORST, S.; CLARKE, D. Bacteria-nematode symbiosis. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 57-77.

FOWLER, H. G. Occurrence and infectivity of entomogenous nematodes in mole crickets in Brazil. **International Rice Research Newsletter**, Manila, v. 113, n. 3, p. 34-35, 1988.

GREWAL, P. S.; LEWIS, E.; GAUGLER, R.; CAMPBELL, J. F. Host finding behavior as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. **Parasitology**, London, v. 108, n. 2, p. 207-215, 1994.

HOMINICK, W. H. Biogeography. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New Jersey: Rutgers University, 2002. p. 115-143.

IEDE, E. T.; PENTEADO, S. R. C.; REIS FILHO, W. Uso do entomopatógeno, *Deladenus siricidicola*, em Pinus. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 24., 2003, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Sociedade Brasileira de Nematologia: Embrapa Semi-Árido, 2003. p. 47-49.



INSECT imagens: the source for entomology photos. Disponível em: <<http://www.insectimages.org>>. Acesso em: 16 nov. 2005.

INSECT-RELATED pathogens: *Mermis Nigrescens*, adult climbing grass. Disponível em: <<http://lamar.colostate.edu/~gec/67.jpg>>. Acesso em: 16 nov. 2005.

ISHIBASHI, N.; KONDO, E. Behaviour of infective juveniles. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 139-150.

JANSSON, R. K. Introduction of exotic entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) for biological control of insects: potential and problems. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 76, n. 1, p. 82-96, 1993.

KAISER, H. Terrestrial and semiterrestrial mermitidae. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 899-965.

KAYA, H. K. Soil ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 93-115.

KAYA, H. K.; STOCK, S. P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. A. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 281-324. (Biological Techniques Series).

LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; HARRISON, R. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 71, n. 4, p. 765-769, 1993.

MACHADO, I. R.; DOLINSKI, C. M. Identificação de um isolado de nematóide entomopatogênico proveniente da Floresta Amazônica em Monte Negro, RO: parte II. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2005, Campos de Goytacazes. **Anais**. Campos dos Goytacazes: [s.n.], 2005. p. 213.

MAGGENTI, A. Invertebrate parasitism and other associations. In: MAGGENTI, A. (Ed.). **General nematology**. New York: Springer-Verlag, 1981. p. 218-243.

MARTENS, E. C.; GOODRICH-BLAIR, H. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 12, p. 1723-1735, 2005.

NEMAPIX: a journal of nematological images. Blacksburg: Mactode Publications, v. 1, dez. 1997. 1 CD-ROM.

NGUYEN, K. B. **Nematode identification**. Disponível em: <<http://kbn.ifas.ufl.edu/gaster/identify.htm>>. Acesso em: 24 nov. 2005.

NGUYEN, K. B.; SMART, G. C. *Neosteinerinema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 26, p. 162-174, 1994.

NICKLE, W. R. History, development and importance of insect nematology. In: NICKEL, W. R. (Ed.). **Plant and insect nematodes**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 627-653.

NICKLE, W. R.; DREA, J. J.; COULSON, J. R. Guidelines for introducing beneficial insect-parasitic nematodes into the United States. **Annals Applied Nematology**, Lawrence, v. 2, p. 50-56, 1988.

PATEL, M. N.; STOLINSKI, M.; WRIGHT, D. J. Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. **Parasitology**, London, v. 114, p. 489-496, 1997.

POINAR JR., G. O. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 23-58.

RICHARDSON, P. N. British and European legislation regulating rhabditid nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, p. 449-463, 1996.

RIZVI, S. A.; HENNESSEY, R.; KNOTT, D. Legislation on the introduction of exotic nematodes in the US. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, p. 477-480, 1996.

WESTON, P. A. Woody ornamentals entomology. Ithaca: Cornell University. Disponível em: <http://www.entomology.cornell.edu/Extension/Woodys/EPP_Sirex.html>. Acesso em: 14 set. 2006.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. **Sternematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of techniques** Southern cooperative. Arkansas: Arkansas Agricultural Experimental Station Fayetteville, 1988. 88 p. (Bulletin, 331).

WOUTS, W. M. *Steinernema* and *Heterorhabditis* species. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 855-897.

Parasitóides e Predadores no Controle Biológico de Insetos-praga

José Roberto Postali Parra
José Maurício Simões Bento

Introdução

Parasitóides e predadores estão entre os agentes de mortalidade biótica que auxiliam na regulação de insetos-praga no ambiente e, por este motivo, são comumente chamados de inimigos naturais. A idéia de que eles podem reduzir populações de pragas é muito antiga. Os chineses foram os primeiros a usá-los como forma de controle biológico – a espécie de formiga carnívora *Oecophylla smaragdina* (Fabr.) – para controlar lepidópteros desfolhadores e coleobrocas de citros no século III a.C. (CLAUSEN, 1956; VAN DEN BOSCH; MESSENGER; GUTIERREZ, 1982). Contudo, o primeiro sucesso no controle biológico foi a introdução, na Califórnia-EUA, da joaninha *Rodolia cardinalis* (Mulsant), trazida da Austrália em 1888 para controlar o pulgão-branco, *Icerya purchasi* Maskell, e que em dois anos exerceu total controle da praga. A partir daí, houve grande avanço nessa área, totalizando, entre 1890 e 1975, 176 casos de programas de controle biológico com sucesso parcial ou total em diferentes países (STEHR, 1975; VAN DEN BOSCH; MESSENGER; GUTIERREZ, 1982). No Brasil, os principais casos de sucesso de controle biológico utilizando parasitóides e predadores foram reunidos por Parra et al. (2002), muitos dos quais não citados na relação de Van Den Bosch, Messenger e Gutierrez (1982) por serem, na maioria, posteriores àquela publicação.

Entre esses inimigos naturais, os mais utilizados são as da ordem Hymenoptera e, em menor grau, os da ordem Diptera. Das famílias de Hymenoptera, as mais freqüentemente empregadas são representantes de Braconidae e Ichneumonidae em Ichneumonoidea e Eulophidae, Pteromalidae, Encyrtidae e Aphelinidae em Chalcidoidea. Entre os dípteros, o grupo mais usado é o dos Tachinidae (GREATHEAD, 1986). Os representantes das ordens Strepsiptera, Coleoptera (Carabidae, Staphylinidae, Meloidae e Rhipiphoridae), Lepidoptera (Pyrilidae e Epipyropidae) e Neuroptera (Mantispidae) são de menor importância como parasitóides (GODFRAY, 1994).

Das diversas famílias de predadores de pragas, Anthocoridae, Pentatomidae, Reduviidae, Carabidae, Coccinellidae, Staphylinidae, Chrysopidae, Cecidomyiidae, Syrphidae e Formicidae são as mais comumente encontradas (HAGEN; BOMBOSCH; McMURTRY, 1976; BORROR; TRIPLEHORN; JOHNSON, 1989). Os ácaros fitoseídeos são importantes como agentes de controle biológico, bem como as aranhas, estas ainda pouco estudadas em nosso país. No total, são 22 ordens de predadores e cinco de parasitóides.

Atualmente, o controle biológico é cada vez mais importante em programas de manejo integrado de pragas (MIP), principalmente, quando se considera a produção integrada em benefício de uma agricultura sustentável. Nesse caso, o controle biológico constitui, ao lado da taxonomia, do nível de controle e da amostragem, um dos pilares de sustentação de qualquer programa de MIP. Além disso, é importante como medida de controle para manutenção das pragas abaixo do nível de dano econômico aliado a outros métodos, como o cultural, o físico, o de resistência de plantas a insetos e os comportamentais (feromônios) que podem ser harmoniosamente integrados com métodos químicos (sobretudo, produtos pouco agressivos, de última geração de agroquímicos) ou mesmo com plantas transgênicas.

Tipos de Controle Biológico

Controle biológico clássico – importação e colonização de parasitóides ou predadores, visando ao controle de pragas exóticas (eventualmente nativas). De maneira geral, as liberações são realizadas com pequeno número de insetos (liberações *inoculativas*) por uma ou mais vezes no mesmo local; por isso, o controle biológico, nesse caso, é visto como medida de controle em longo prazo, pois a população dos inimigos naturais tende a aumentar com o passar do tempo e, portanto, somente se aplica a culturas semiperenes ou perenes.

Controle biológico natural – refere-se à população de inimigos que ocorre naturalmente. Atendendo a um dos preceitos básicos de controle biológico, ou seja, *conservação*, tais parasitóides ou predadores devem ser preservados (e, se possível, aumentados) por manipulação de seu ambiente de forma favorável (uso de inseticidas seletivos em épocas corretas, redução de dosagens de produtos químicos, não-uso de práticas culturais inadequadas, preservação do *habitat* ou fontes de alimentação para inimigos naturais). Esses parasitóides são muito importantes em programas de manejo de pragas, pois são responsáveis pela mortalidade natural no agroecossistema e, conseqüentemente, pela manutenção do nível de equilíbrio das pragas.

Controle biológico aplicado (CBA) – trata-se de liberações inundativas de parasitóides ou predadores, depois da criação massal em laboratório, visando à redução rápida da população da praga para seu nível de equilíbrio. Esse tipo de controle biológico é bem-aceito pelo usuário, pois tem ação rápida, muito semelhante à de inseticidas convencionais. Como comentado anteriormente, quando apenas existia o controle biológico clássico, uma vez que as técnicas de criação de insetos eram incipientes, entre as desvantagens do controle biológico apontadas estavam sua ação lenta e sua aplicação exclusivamente em culturas perenes ou semiperenes. Com o desenvolvimento do controle biológico aplicado, tais desvantagens foram superadas. O CBA refere-se ao preceito básico de

controle biológico atualmente chamado de multiplicação (criações massais) que evoluiu muito com o desenvolvimento das dietas artificiais para insetos, sobretudo, a partir da década de 1970 (PARRA, 2001b). Esses inseticidas biológicos são mais utilizados para parasitóides ou predadores nativos, embora possam ser aplicados a inimigos naturais exóticos. Nesse tipo de controle, não se espera estabelecimento dos indivíduos liberados nas áreas visadas. Existem muitos casos de sucesso de CBA, sendo bastante freqüente, por exemplo, a liberação de *Trichogramma* spp., de forma inundativa, em diversos países do mundo.

Predadores e Parasitóides

Predador – É um organismo de vida livre que, durante todo o ciclo de vida, mata a presa; usualmente, é maior do que ela e requer a ajuda de outros indivíduos para completar o desenvolvimento.

Parasitóide – É um organismo muitas vezes do mesmo tamanho do hospedeiro, mata este e necessita de somente um indivíduo para completar o desenvolvimento; o adulto tem vida livre.

Os predadores, após um ataque bem-sucedido, subjugam rapidamente o hospedeiro ou presa. Como conseqüência, a presa é morta e consumida, resultando na interrupção do fluxo genético para a próxima geração. A inter-relação evolucionária existente entre os dois organismos ocorre durante a localização e o ataque da presa pelo predador e o comportamento furtivo (camuflagem ou abrigo), fuga ou defesa por parte da presa. Geralmente, certo número de presas deve ser consumido para que o predador possa crescer e se reproduzir, sem ocorrer interação fisiológica entre ambos.

Os parasitóides, depois de um ataque bem-sucedido, não matam imediatamente seu hospedeiro, mas podem permanecer como parasitos por

períodos variáveis. Entretanto, no final, o hospedeiro é morto ou, pelo menos, não ocorre a transferência de genes para a próxima geração. O hospedeiro pode ser considerado como um recipiente para o desenvolvimento do parasitóide e, como tal, impõe certas restrições a seu desenvolvimento. Além disso, a fisiologia e o comportamento do hospedeiro, enquanto ele vive, são em benefício do parasitóide que se desenvolve e, quando necessário, ele pode controlá-los. Como resultado, o parasitóide tem a oportunidade de regular a fisiologia do hospedeiro (VINSON; IWANTSCH, 1980).

Especificidade e Eficiência

Embora controverso, os predadores tendem a ser menos específicos do que os parasitóides na escolha de suas presas. Os predadores são móveis no estágio predatório e frequentemente são observados movendo-se de uma presa para outra. Já os parasitóides, especialmente, os cenobiontes (parasitóides que permitem que o hospedeiro continue a se alimentar e cresça em tamanho após o parasitismo) seriam mais específicos devido a sua maior dependência na fisiologia e no desenvolvimento de seus hospedeiros (ASKEW; SHAW, 1986). Em razão disso, a falta de estreita especificidade de um predador sugere que ele teria de competir, sem as vantagens que tal especialização conferiria, com o complexo de predadores nativos, o que poderia resultar em menor probabilidade de sucesso na introdução de um predador exótico. Portanto, a especificidade hospedeira seria fator importante a levar em conta em um programa de controle biológico clássico. Nesse tipo de controle, de acordo com DeBach e Rosen (1991), foram registradas 13 espécies de predadores introduzidas, com sucesso, em comparação com mais de 23 espécies de parasitóides. Todavia, segundo Berti-Filho e Ciociola (2002), mesmo com baixo número de relatos, os predadores tiveram grande sucesso no controle biológico, especialmente, no de pragas sésseis que não entram em diapausa, não são migratórias e estão associadas a

culturas perenes ou semiperenes, como as cochonilhas-de-carapaça (diaspidídeos), os piolhos farinhentos (pseudococcídeos) e ovos de cigarrinhas.

De acordo com Hagen, Bombosch e McMurtry (1976), faltam um ou mais atributos para maior efetividade de um predador, como por exemplo: (i) multivoltinismo (que não entram em diapausa); (ii) estreita especificidade hospedeira; (iii) adultos longevos e com alta capacidade de busca; (iv) limiar térmico inferior de atividade muito próximo ao da presa; e (v) maior número de gerações do que o da presa. Esses atributos ou qualidades são comuns aos parasitóides utilizados com sucesso no controle biológico.

Os predadores são mais efetivos nos locais onde as populações da presa são densas ou concentradas do que nos locais onde elas estão esparsas. Isso decorre do fato de os predadores imaturos serem incapazes de se locomover como os adultos (voando, por exemplo), estando, portanto, limitados à busca da presa seja em áreas mais restritas, seja naquelas mais confinadas. Já os parasitóides, em função de sua maior especificidade, desenvolveram mecanismos sofisticados de busca de seus hospedeiros, especialmente a química, mesmo em baixas populações.

Um fator difícil de se avaliar é o impacto dos predadores no controle biológico, uma vez que eles consomem suas presas não deixando sinais de seu ataque, principalmente, quando as consomem totalmente. Os parasitóides, por sua vez, podem ser observados em seus hospedeiros. De qualquer modo, os predadores possuem muitos atributos que lhe são favoráveis, como consumir grande número de presas durante seu desenvolvimento, restringir-se a determinados *habitats* e serem menos exigentes em termos de necessidades nutricionais de que os parasitóides. Neste sentido, é importante conhecer os detalhes da biologia das espécies presentes em cada ecossistema e o papel de cada uma (BERTI-FILHO; CIOCIOLA, 2002).

Liberação de Inimigos Naturais

Segundo Williams e Leppla (1992), existem três formas de liberação de inimigos naturais: inoculativa, inundativa e inoculativa estacional (ou sazonal) que são dependentes do sistema visado (alvo).

A inoculação é para sistemas abertos com baixa variabilidade temporal. Aplica-se a culturas perenes ou semiperenes e florestas. É, portanto, típica do controle biológico clássico. Já a liberação inundativa é para sistemas (culturas) com alta variabilidade temporal (culturas anuais).

A liberação inoculativa estacional é normalmente feita em casas de vegetação, no período de ocorrência da praga (cultivos de curta duração) (VAN LENTEREN, 2000). Esperam-se efeitos por várias gerações da praga. É uma mistura do método inundativo e inoculativo, pois é liberada grande quantidade de insetos para se obter um controle imediato e espera-se o crescimento das populações para controle das gerações tardias. Esse tipo de liberação é muito comum na Europa, por exemplo, para controle da mosca-branca, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), utilizando-se *Encarsia formosa* Gahan (VAN LENTEREN, 2000).

Em sistemas fechados com baixa variabilidade temporal, como armazéns de cereais, o controle de pragas pode ser feito com liberações inundativas ou inoculativas estacionais. O mesmo se aplica a casas de vegetação em que as liberações podem também ser inundativas. Existem exceções e, para *Lymantria dispar* (L.), praga de florestas, excelentes resultados são obtidos com liberações inundativas.

Produção de Inimigos Naturais

Existem, basicamente, três tipos de criação de insetos aplicáveis aos inimigos naturais: (i) criação em pequena escala; (ii) criação comercial; e (iii) criação massal.

Criação em pequena escala – são as chamadas criações de pesquisa que podem ser aumentadas para pesquisas aplicadas, especialmente, nos casos de controle biológico que demandem liberações inoculativas. Em julho de 1998, o Brasil importou o parasitóide *A. citricola* para controle de *P. citrella*. Nesse caso, estabeleceu-se uma criação de parasitóide que foi liberada em todo o Estado de São Paulo, mantendo-se tal criação com a atuação permanente de três técnicos de laboratório.

Criação comercial – muitas empresas dos EUA e de vários países do primeiro mundo comercializam inimigos naturais e na Europa é muito freqüente a comercialização para uso em casas de vegetação. Esse processo cultural foi iniciado nos EUA e na Europa na década de 1970 e no Brasil apenas agora começam a aparecer as primeiras empresas interessadas na comercialização de inimigos naturais (PARRA, 2004). Em nosso país, além do problema de desconhecimento dessa possibilidade, não há uma política de fiscalização eficaz para coibir ação de oportunistas nesse mercado, o que poderia reduzir a credibilidade no controle biológico (a chamada ética na produção por Hoy et al., 1991). A criação comercial pode, dependendo do mercado, ser de pequeno, médio ou grande porte.

Criação massal – geralmente envolve operações semelhantes às de uma fábrica para servir de suporte a um programa de controle biológico. As definições de criação massal são as mais variadas. Segundo Finney e Fisher (1964), é a “produção econômica de milhões de insetos benéficos, em uma linha de montagem, com o objetivo de produzir, com o mínimo de homens/hora e de espaço, o número máximo de fêmeas férteis no tempo mais curto possível e com um baixo custo”.

Existem outras definições, como a de Mackauer (1972) e a de Chambers (1977) que combinaram o aspecto econômico com o biológico. Segundo este último autor, criação massal é a “produção de insetos capaz de atingir objetivos

com uma aceitável relação custo/benefício e em números excedendo de 10 mil a 1 milhão de vezes a produtividade média da população de fêmeas nativas”.

Por sua vez, Leppla e Ashley (1989) definiram criação massal como “uma atividade sistemática, automatizada, em instalações integradas, com o objetivo de produzir um suprimento relativamente grande de insetos para distribuição”.

Em países mais desenvolvidos, existe criação massal de inimigos naturais que é comercializado como inseticidas biológicos. Um dos insetos mais produzidos no mundo hoje é o *Trichogramma*, e, especialmente em países socialistas, extensas áreas são tratadas com esse parasitóide. Na Rússia, há grande número de biofábricas produzindo milhões de insetos por dia (PARRA; ZUCCHI, 1986), chegando a uma produção anual de 50 bilhões de insetos; no México, a produção anual é de 28 bilhões e, em alguns países da América do Sul, como Colômbia, o número de insetos produzidos é bastante elevado.

Essa criação massal envolve produção diária de milhões de insetos e, na verdade, assemelha-se a uma linha de fabricação de um produto qualquer. Assim, no caso do controle de *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) por meio da técnica do inseto estéril nos EUA, eram produzidos e liberados de 50 a 200 milhões de moscas estéreis por semana. No final do programa, constatou-se que, para cada fêmea da natureza, foram liberadas 49 fêmeas estéreis, relação bem maior do que a prevista teoricamente para esse método, que é de 1:9. Essa fábrica empregava mais de trezentos funcionários. Nesse caso, além dos problemas biológicos de criação, surgem outros como: inventário, compra e armazenamento de material e manutenção das instalações e equipamentos. À medida que se aumenta o número de insetos produzidos, crescem os problemas relacionados a instalações, custos, microrganismos (contaminantes) e controle de qualidade dos insetos e torna-se necessário pensar em automatização (mecanização). Essa mecanização deve ser incentivada a partir de uma produção de 3 mil a 5 mil adultos por semana. Detalhes de criação massal podem ser vistos em Smith (1966); Ridgway

e Vinson (1977); Starler e Ridgway (1977); Morrison e King (1977); Leppla e Ashley (1978); King e Leppla (1984); Singh e Moore (1985); Van Lenteren e Woetz (1988); Parra (1990; 1992a,b, 1993, 1997); Parrela, Heinz e Nunney (1992); Van Driesche e Bellows Jr. (1996); Bellows e Fisher (1999); Etzel e Legner (1999); Bueno (2000); Van Lenteren (2000).

No Brasil, são poucos os laboratórios para criação massal. Assim, para o controle biológico de *D. saccharalis*, várias usinas ligadas, no passado, ao Planalsucar (atualmente UFSCar), à Copersucar e, nos últimos anos, às empresas privadas (PARRA et al., 2002) produzem milhões de *C. flavipes* para liberação inundativa; nesse caso, trata-se de criação massal. De forma análoga, a Embrapa Semi-Árido, em Petrolina, PE, produz milhões de *T. pretiosum*, espécie que foi muito utilizada para controlar a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick), na década de 1990 (HAJI et al., 2002). Um esquema de produção massal de *Anticarsia gemmatalis* Hübner para produção de *Baculovirus anticarsia* foi preconizado por Parra et al. (1993). Esse método, embora seja muito simples, necessita ainda de alguns ajustes para ser utilizado em larga escala. Esse método permite que, em uma prateleira metálica de laboratório, sejam produzidas lagartas para produção do vírus a ser pulverizado em 600 hectares de soja.

Assim, após o desenvolvimento do pacote tecnológico por universidades ou instituições de pesquisa, ele deverá ser transferido para empresas privadas, cooperativas ou equivalentes que passarão a multiplicar e a disponibilizar tais inimigos naturais (parasitóides ou predadores). No entanto, para o surgimento de tais organizações, há necessidade de um processo cultural, infelizmente ainda não totalmente arraigado entre nós, em relação às vantagens do uso do controle biológico. É fundamental, sobretudo, que a atividade de comercialização de inimigos naturais não seja encarada exclusivamente com fins comerciais, mas que tenha, sobretudo, respaldo técnico para que possa ter credibilidade junto ao produtor.

Situação no Mundo

Nos EUA, desde a década de 1960 ofereciam-se joaninhas (*Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville) e mantídeos para serem comercializados para liberações em jardins e viveiros (DEBACH; HAGEN, 1969). Entretanto, foi a partir da década de 1970 que houve grande avanço na área, incrementado especialmente a partir dos anos 80, embora Ridgway e Vinson (1977) já tivessem listado 95 empresas existentes nos EUA e no Canadá na década anterior. Em 1992, 24 espécies de ácaros predadores, 8 parasitóides de cochonilhas, 15 parasitóides de Lepidoptera, 12 predadores e parasitóides de moscas, 4 nematóides entomopatogênicos e 43 espécies de outros organismos benéficos estavam disponíveis para venda (HUNTER, 1997). Cranshaw, Sclar e Cooper (1996) listaram as principais espécies existentes para venda nos EUA com preços unitários, embora enfatizando que, para grandes quantidades, o preço poderia ser bastante reduzido.

Na Europa, segundo Van Lenteren e Woetz (1988), a comercialização de inimigos naturais teve início em 1968, com o uso de *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot para controlar tetraniquídeos. Nos países europeus, utiliza-se com frequência o controle biológico em casas de vegetação e, atualmente, são liberados inimigos naturais em cerca de 14.000 ha, comparados com os 200 ha cobertos em 1970 (VAN LENTEREN, 2000). De acordo com Van Lenteren, Roskam e Timmer (1997), cerca de 26 companhias produzem mais de 80 espécies de inimigos naturais, com predominância de 29 entre as mais procuradas. A disponibilidade de insetos para controle biológico aumentou acentuadamente na Europa e em todo o mundo. Os números apresentados por Van Lenteren, Roskam e Timmer (1997) estão subestimados, pois, na América do Sul, apenas na Colômbia, existem mais de 20 empresas comercializando inimigos naturais, em especial *Trichogramma* spp., no Vale do Cauca, entre elas, companhias já consolidadas, como a Productos Biológicos Perkins Ltda. Existem

empresas também na Venezuela e no Chile, nesse caso, associadas a pragas de florestas.

Nos EUA, uma das empresas pioneiras foi a Rincon-Vitova, na Califórnia, destacando-se também a Bio-Fac, no Texas. Na Europa, as mais conhecidas são a Koppert, na Holanda, e a Bunting, na Suíça. Uma lista de companhias que comercializam insetos benéficos pode ser encontrada nos *Suppliers of Beneficial Organisms in North América* (HUNTER, 1997).

Situação no Brasil

Apesar de não se destacar na comercialização de inimigos naturais, notadamente de parasitóides e predadores (PARRA, 2001a), o Brasil possui certa tradição na área de patógenos, pois desde a década de 1970 comercializa o fungo *Metarhizium anisopliae* para controle de cigarrinhas da cana-de-açúcar e de pastagens, *Baculovirus anticarsia* para controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner na soja e mesmo *Beauveria bassiana* para controle de *Cosmopolites sordidus* (Germar), o moleque-da-bananeira.

Há quinze ou vinte anos, as usinas de cana-de-açúcar, que criavam massalmente *Cotesia flavipes* (Cameron), revendiam o excedente da produção para locais que necessitavam do parasitóide e não possuíam criação massal. Na década de 1990, surgiu com a utilização de *Trichogramma pretiosum* Riley, uma empresa que comercializava tal parasitóide no Vale do São Francisco, em Pernambuco, para controle de *Tuta absoluta* (Meyrick), a traça-do-tomateiro. A Bug Agentes Biológicos, em Piracicaba, SP comercializa diversas espécies de *Trichogramma*. Outras empresas começam a despontar no mercado nacional, contribuindo para o aumento da utilização do Controle Biológico no País (PARRA, 2004).

Entretanto, a mais antiga companhia no País é a Biotech, em Maceió, AL que comercializa *M. anisopliae*, *C. flavipes* e *Trichogramma galloi* Zucchi. Em

Uberlândia, MG, a Biopred é uma empresa especializada na comercialização de *Trichogramma* spp. e, em Ribeirão Preto, SP, a Biocontrol tem, disponíveis para venda, *C. flavipes* e *M. anisopliae*.

Considerações Finais

O uso do controle biológico de pragas por meio de parasitóides e predadores seja pela introdução, seja pela produção massal desses organismos é uma realidade em todo o mundo e, dependendo da condição local, muito mais racional do que os agroquímicos. Nesse sentido, é imprescindível uma legislação na qual seja previsto o acompanhamento da qualidade dos insetos produzidos por universidades ou instituições de pesquisa. Mesmo nos EUA onde a tradição nessa área é grande surgem, freqüentemente, desvios na razão sexual dos insetos criados por empresas privadas. Assim, é preciso, sobretudo, prever uma forma adequada de transferência de tecnologia, mas que seja acompanhada de eficiência no processo, incluindo a(s) espécie(s) a ser(em) liberada(s), o número de pontos de liberação, o número de parasitóides liberados e a forma de liberação. Somente com tais cuidados na implementação de programas de controle biológico e de companhias especializadas na comercialização de inimigos naturais é que será possível fazer com que essa alternativa seja mais aceita no Brasil, País que, mesmo com problemas, adota programas de controle biológico clássico ou aplicado comparáveis aos melhores do mundo.

Referências

ASKEW, R. R.; SHAW, M. R. Parasitoid communities: their size, structure and development. In: WAAGE, J.; GREATHEAD, D. (Ed.). **Insect parasitoids**. London: Academic Press, 1986. p. 225-264.

BELLOWS, T. S.; FISHER, T. W. **Handbook of biological control**. San Diego: Academic Press, 1999. 1046 p.

BERTI-FILHO, E. O.; CIOCIOLA, A. I. Parasitóides ou predadores?: vantagens e desvantagens. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 29-41.

BORROR, D. J.; TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **An introduction to the study of insects**. 6th ed. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1989. 875 p.

BUENO, V. H. P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: UFLA, 2000. 196 p.

CHAMBERS, D. L. Quality control in mass rearing. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 22, p. 289-308, 1977.

CLAUSEN, C. P. **Biological control of insect pests in the continental United States**. Washington: USDA, 1956. 143 p. (Technical Bulletin, 1139).

COOK, F. R.; INSCOE, M. N.; RIDGWAY, R. L. Marketed natural enemies: regulatory issues. In: RIDGWAY, R. L.; HOFFMANN, M. P.; INSCOE, M. N.; GLENISTER, C. S. (Ed.). **Mass-reared natural enemies: application, regulation and needs**. Lanham: Tomas Say Publications In Entomology, 1998. p. 231-241.

CRANSHAW, W.; SCLAR, D. C.; COOPER, D. A review of 1994 pricing and marketing by suppliers of organisms for biological control of arthropods in the United States. **Biological Control**, San Diego, v. 6, p. 291-296, 1996.

DEBACH, P.; HAGEN, K. S. Manipulation of entomophagous species. In: DEBACH, P. (Ed.). **Biological control of insect pests and weeds**. London: Chapman & Hall, 1969. p. 429-458.

DEBACH, P.; ROSEN, D. **Biological control by natural enemies**. New York: Cambridge University Press, 1991. 386 p.

ETZEL, L. K.; LEGNER, E. F. Culture and colonization. In: BELLOWS, T. S.; FISHER, T. W. (Ed.). **Handbook of biological control**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 125-197.

FINNEY, G. L.; FISHER, T. W. Culture of entomophagous insects and their host. In: DEBACH, P.; SCHLINGER, E. I. (Ed.). **Biological control of insect pests and weeds**. London: Chapman & Hall, 1964. p. 328-355.

GODFRAY, H. C. J. **Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology**. Princeton: Princeton University Press, 1994. 473 p.

GREATHEAD, D. J. Parasitoids in classical biological control. In: WAAGE, J. K.; GREATHEAD, D. (Ed.). **Insect parasitoids**. New York: Academic Press, 1986. p. 290-318.

HAGEN, K. S.; BOMBOSCH, S.; McMURTRY, J. A. The biology and impact of predators. In: HUFFAKER, C. B.; MESSENGER, P. S. (Ed.). **Theory and practice of biological control**. New York: Academic Press, 1976. p. 93-142.

Haji, F. N. P.; PREZOTTI, L.; CARNEIRO, J. S.; ALENCAR, J. A. *Trichogramma pretiosum* para o controle de pragas no tomateiro industrial. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 477-494.

HOY, M. A.; NOWIERSKI, R. M.; JOHNSON, M. W.; FLEXNER, J. L. Issues and ethics in commercial releases of arthropod natural enemies. **American Entomologist**, Baltimore, v. 37, p. 74-75, 1991.

HUNTER, C. D. **Suppliers of beneficial organisms in North America**. Sacramento: California Environment Protection Agency, 1997. 32 p.

KING, E. G.; LEPPLA, N. C. (Ed.). **Advances and challenges in insect rearing**. Washington: USDA, 1984. 306 p.

LEPPLA, N. C.; ASHLEY, T. R. Quality control in insect mass production: a review and model. **Bulletin of the Entomological Society of America**, Baltimore, v. 35, p. 33-44, 1989.

LEPPLA, N. C.; ASHLEY, T. R. **Facilities for insect research and production**. Washington: USDA, 1978. 86 p. (Technical Bulletin, 1576).

MACKAUER, N. Genetic aspects of insect production. **Entomophaga**, Paris, v. 17, p. 27-48, 1972.

MORRISON, R. K.; KING, E. G. Mass production of natural enemies. In: RIDGWAY, R. L.; VINSON, S. B. (Ed.). **Biological control by augmentation of natural enemies**. New York: Plenum Press, 1977. p. 183-217.

PARRA, J. R. P. Técnicas de criação e produção massal de inimigos naturais. In: CRÓCOMO, W. B. (Org.). **Manejo integrado de pragas**. São Paulo: UNESP, 1990. p. 117-146.

PARRA, J. R. P. Criação massal de inimigos naturais. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS, 2., 1991, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1992a. p. 5-20

PARRA, J. R. P. Situação atual e perspectivas do controle biológico através de liberações inundativas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 271-279, 1992b.

PARRA, J. R. P. O controle biológico aplicado e o manejo integrado de pragas. In: SIMPÓSIO DE AGRICULTURA ECOLÓGICA, 1., 1993, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1993. p. 116-139.

PARRA, J. R. P. O controle biológico aplicado como um componente do manejo de pragas. In: ARAÚJO, M. C. P.; COELHO, G. C.; MEDEIROS, L. (Org.). **Interações ecológicas e biodiversidade**. Ijuí: UNIJUÍ, 1997. p. 179-197.

PARRA, J. R. P. Comercialização de parasitóides e predadores no Brasil: um desafio para todos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7., 2001, Poços de Caldas. **Livro de resumos...** Poços de Caldas: SICONBIOL, 2001a. p. 526-528.

PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 2001b. 134 p.

PARRA, J. R. P. Controlando pragas com inimigos naturais. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 210, p. 18-23, 2004.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; ALVES, S. B.; MAGRINI, E. A. **Controle biológico da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis***: projeto piloto para produção de *Baculovirus anticarsia*, visando ao seu controle. Piracicaba: ESALQ, 1993. 10 p. (Boletim Técnico, 3).

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. 609 p.

PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. Uso de *Trichogramma* no controle de pragas. In: NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (Org.). **Atualização sobre métodos de controle de pragas**. Piracicaba: ESALQ, 1986. p. 54-75.

PARRELLA, M. P.; HEINZ, K. M.; NUNNEY, L. Biological control through augmentative releases of natural enemies: a strategy whose time has come. **American Entomologist**, Baltimore, v. 38, p. 172-178, 1992.

RIDGWAY, R. L.; VINSON, S. B. **Biological control by augmentation of natural enemies**. New York: Plenum Press, 1977. 480 p.

SINGH, P.; MOORE, R. F. **Handbook of insect rearing**. Amsterdam: Elsevier, 1985. 2 v.

SMITH, C. N. **Insect colonization and mass production**. San Diego: Academic Press, 1966. 618 p.

STARLER, N. H.; RIDGWAY, R. L. Economic and social considerations for the utilization of augmentation of natural enemies. In: RIDGWAY, R. L.; VINSON, S. B. (Ed.). **Biological control by augmentation of natural enemies**. New York: Plenum Press, 1977. p. 413-453.

STEHR, F. W. Parasitoids and predators in pest management. In: METCALF, R. L.; LUCKMANN, W. H. (Ed.). **Introduction to insect pest management**. New York: Wiley Interscience, 1975. p. 147-183.

VAN DEN BOSCH, R.; MESSENGER, P. S.; GUTIERREZ, A. P. **An introduction to biological control**. New York: Plenum Press, 1982. 247 p.

VAN DRIESCHE, R. G.; BELLOWS JR., T. S. **Biological control**. London: Chapman & Hall, 1996. 539 p.

VAN LENTEREN, J. C. Success in biological control of arthropods by augmentation of natural enemies. In: GURR, G.; WRATTEN, S. (Ed.). **Biological control: measures of success**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 77-103.

VAN LENTEREN, J. C.; WOETZ, J. Biological and integrated control in greenhouses. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 33, p. 239-269, 1988.

VAN LENTEREN, J. C.; ROSKAM, M. M.; TIMMER, R. Commercial mass production and pricing of organisms for biological control of pests in Europe. **Biological Control**, New York, v. 10, p. 143-149, 1997.

VINSON, S. B.; IWANTSCH, G. F. Host suitability for insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 25, p. 397-419, 1980.

WILLIAMS, D. W.; LEPPLA, N. C. The future augmentation of beneficial arthropods. In: KAUFFMAN, W. C.; NECHOLS, J. R. (Ed.). **Selection criteria and ecological consequences of importing natural enemies**. Lanham: Entomological Society of America, 1992. p. 87-102.

Bacillus thuringiensis e *Bacillus sphaericus*

Rose Gomes Monnerat
Lilian Botelho Praça

Introdução

Bacillus thuringiensis (Bt) e *Bacillus sphaericus* (Bs) são bactérias Gram-positivas, da família *Bacillaceae* as quais apresentam duas fases principais durante seu ciclo de vida: uma de crescimento vegetativo na qual a bactéria se multiplica por bipartição; outra de esporulação que consiste na diferenciação da bactéria em esporo. Quando o esporo se encontra de novo em um meio que contém os nutrientes necessários, pode germinar e iniciar o crescimento vegetativo (SOBERON; BRAVO, 2001).

Essas bactérias são consideradas ubíquas por terem sido isoladas de todas as partes do mundo, de diversos ecossistemas e de diferentes substratos como solo, água, folhas, insetos mortos. Bt se diferencia de *B. cereus* e de *B. anthracis* por apresentar um corpo paraesporal ou cristal protéico. Bs está taxonomicamente mais distante desse grupo. Pouco se sabe sobre o *habitat* do Bt e do Bs, entretanto, seu requerimento nutricional vitamínico e de aminoácidos como o ácido glutâmico sugere que as formas vegetativas só se reproduzem no interior dos insetos hospedeiros (SOBERON; BRAVO, 2001).

O corpo paraesporal do Bt contém proteínas denominadas delta-endotoxinas que formam atualmente uma família de 300 membros, classificados

em 49 grupos. Elas são produzidas sob a forma de protoxinas que, no intestino do inseto, são transformadas em peptídeos tóxicos pela ação do pH alcalino intestinal e de proteases. A toxina ativada causa a lise das células epiteliais e a morte das larvas (ARONSON; BECKMAN; DUNN, 1986).

Uma das vantagens da utilização do Bt e do Bs é sua especificidade aos insetos sensíveis, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos mamíferos e vertebrados e ausência de toxicidade às plantas (WHITELEY; SCHNEPF, 1986; ORGANISATION MONDIAL DE LA SANTE, 1987). Produtos à base de Bt para o controle de pragas agrícolas são comercializados há mais de cinquenta anos, sendo o seu mercado anual estimado em 100 milhões de dólares. Prevê-se que essa utilização vá aumentar à medida que a legislação de proteção ambiental mais rigorosa for adotada e produtos mais eficientes e baratos forem lançados no mercado (DIAS, 1992).

A primeira menção a doenças em insetos causada por Bt data de 1902, quando Ishiwata no Japão descreveu uma bactéria esporulante responsável pela mortalidade do bicho-da-seda, *Bombix mori* e a chamou de *Bacillus sotto*. Em 1911, Berliner, na Alemanha, redescobriu a mesma bactéria isolada de lagartas-da-traça-da-farinha *Anagasta kuhniella* e, em 1915, chamou-a de *Bacillus thuringiensis*, em homenagem a região de onde as lagartas foram coletadas (WHITELEY; SCHNEPF, 1986; DIAS, 1992).

As possibilidades de utilização do Bt foram logo reconhecidas em controle biológico e, em 1938, uma formulação à base dessa bactéria, a Sporeína, foi produzida na França (WEISER, 1986). A partir dos anos 1950, diversos países como a Rússia, a Checoslováquia, a França, a Alemanha e os Estados Unidos começaram a produzir inseticidas biológicos à base de Bt (WEISER, 1986).

Nos anos 1960, foi isolada uma estirpe de Bt subsp. *kurstaki*, chamada HD-1 (DULMAGE, 1970) que apresentou toxicidade de 2 a 200 vezes superior às estirpes normalmente utilizadas nos produtos comerciais. A partir de então, a

procura por outras estirpes possuidoras de novas toxinas foi estimulada e, em 1977, Goldberg e Margalit isolaram uma estirpe eficaz contra dípteros (GOLDBERG; MARGALIT, 1977). Alguns anos mais tarde, em 1983, outra estirpe foi identificada como patogênica contra Coleópteros (KRIEG et al., 1983).

O Bs foi isolado em 1902 e atua apenas em insetos da ordem Diptera.

No mundo inteiro, diversas estirpes de Bt e Bs foram isoladas e atualmente diversos laboratórios continuam procurando novas toxinas. Existem várias coleções espalhadas pelo mundo e estima-se que haja 50.000 estirpes conhecidas. Entre estas, existem algumas que são eficazes contra diversas ordens de insetos (lepidópteros, dípteros e coleópteros) e contra outros grupos de invertebrados (nematóides, ácaros e protozoários) (EDWARDS; PAYNE; SOARES, 1989; FEITELSON; PAYNE; KIM, 1992; CRICKMORE et al., 1995).

Isolamento

Bt e Bs são bactérias que estão amplamente distribuídas e podem ser encontradas no solo, em ambientes aquáticos, e em cadáveres de insetos.

Uma forma simples de isolamento de diferentes espécies de *Bacillus* foi descrita no Protocolo da Organização Mundial de Saúde de 1985. Consiste em preparar as amostras (solo, água ou insetos mortos) e submetê-las a choque térmico (80°C por 12 minutos). Esse choque térmico mata as células vegetativas de todas as bactérias, deixando vivos apenas os esporos.

Em seguida, essa solução é semeada em meio NYSM (YOUSTEN, 1984), acrescido de penicilina, na concentração de 100 µg por mL de meio. Nessas condições, somente os esporos de Bt e *B. cereus* germinam. No caso de *B. sphaericus*, o procedimento é semelhante, sendo que essa bactéria é resistente a estreptomicina a uma concentração de 25 µg por mL de meio (MONNERAT; SILVA; SILVA-WERNECK, 2001).

Caracterização

Várias metodologias de caracterização de Bt e Bs foram propostas tais como perfil enzimático, morfologia e reações aos corantes. Até 1960, essas metodologias mostravam-se pouco apropriadas para uma classificação segura das estirpes isoladas em diversas regiões do globo. Nessa época, De Barjac e Bonnefoi (1962), baseados em substâncias existentes no flagelo de *Bacillus*, introduziram o conceito dos “antígenos H” como elemento diferenciador de estirpes. Esse sistema de classificação permitiu grande avanço na sistemática desses microrganismos (DE BARJAC; VERON; DUMANOIR, 1980).

Outras técnicas foram propostas, como a eletroforese de esterases (NORIS, 1964), antígenos do cristal (KRYWIENCZYK; DULMAGE; FAST, 1978), análise de plasmídeos (LERECLUS et al., 1982), a eletroforese multilocus das isoenzimas (SEDLANDER et al., 1986) e a cromatografia dos ácidos graxos (SCHENKEL; FRACHON, 1990).

Atualmente, diversos genes das delta-endotoxinas foram clonados, o que permite a caracterização das toxinas pela análise completa da sequência de DNA de cada grupo (KRONSTAD; WHITELEY, 1986), por sondas específicas de DNA (VISSER, 1989) e pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (STEFFAN; ATLAS, 1991).

As maneiras mais utilizadas para caracterização de Bt e Bs serão descritas a seguir.

Caracterização Morfológica

A forma das células vegetativas, dos esporos e de cristais, de Bt e Bs é facilmente visualizada em microscópio de contraste de fases com aumento de mil vezes. Para preparar o material, deposita-se uma gota da colônia dissolvida em solução salina ou uma gota do isolado crescido em meio líquido em uma lâmina.

A diferença morfológica entre Bt e *B. cereus* é a presença de cristais, assim, caso a bactéria não apresente essa estrutura, trata-se de *B. cereus*. No caso do *B. sphaericus*, o esporângio é distendido apresentando uma forma de raquete (Figura 1).

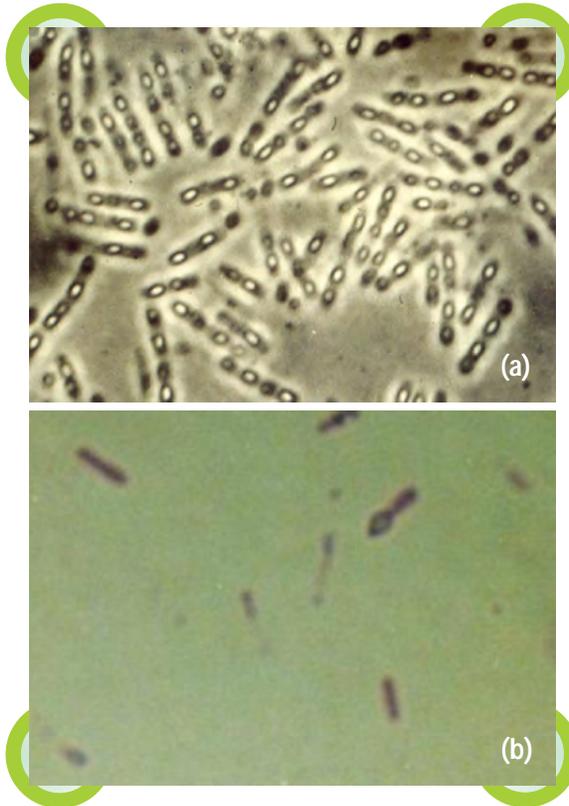


Figura 1. Microscopia de contraste, fases de uma estirpe de *B. thuringiensis* (a) e de *B. sphaericus* (b).

Caracterização Sorológica

A técnica de caracterização sorológica foi desenvolvida por De Barjac e Bonnefoi em 1962, baseada em substâncias existentes nos flagelos dos bacilos entomopatogênicos. Esses pesquisadores introduziram o conceito dos “antígenos

H⁺ como elemento diferenciador de estirpes distintas, o que permitiu grande avanço na sistemática dos bacilos entomopatogênicos. Atualmente, estão descritos 67 grupos antigênicos divididos em 80 serovares (Tabela 1) para Bt e 47 para Bs (DE BARJAC; FRACHON, 1990). Embora esse sistema de classificação seja simples, confiável e tenha sido muito utilizado, não há correspondência entre o sorotipo e a atividade inseticida. Com o fechamento do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas do Instituto Pasteur em 2000, essa classificação está em desuso. O sorotipo determina a subespécie de Bt.

Para a realização desse teste, é necessário que se produzam antígenos e anti-soros. O protocolo está descrito com detalhes em De Barjac, Veron e Dumanoir (1980). Os antígenos flagelares são produzidos a partir de células vegetativas do Bt e do Bs e os anti-soros, em coelhos.

Quando há reação, a suspensão fica com aspecto límpido, com um sedimento floculento e granular no fundo do tubo.

Tabela 1. Serovares de *B. thuringiensis*.

Antígeno H	Subespécie	Abreviatura	Antígeno H	Subespécie	Abreviatura
1	<i>thuringiensis</i>	THU	28a28c	<i>jegathesan</i>	JEG
2	<i>finitimus</i>	FIN	29	<i>amagiensis</i>	AMA
3a3c	<i>alesti</i>	ALE	30	<i>medellin</i>	MED
3a3b3c	<i>kurstaki</i>	KUR	31	<i>toguchini</i>	TOG
3a3d	<i>sumiyoshiensis</i>	SUM	32	<i>cameroun</i>	CAM
3a3d3e	<i>fukuokaensis</i>	FUK	33	<i>leesis</i>	LEE
4a4b	<i>sotto</i>	SOT	34	<i>konkukian</i>	KON
4a4c	<i>kenyae</i>	KEN	35	<i>selouensis</i>	SEO
5a5b	<i>galleriae</i>	GAL	36	<i>malaysiensis</i>	MAL
5a5	<i>canadensis</i>	CAN	37	<i>andaluciensis</i>	AND
6	<i>entomocidus</i>	ENT	38	<i>oswaldocruzi</i>	OSW
7	<i>aizawai</i>	AIZ	39	<i>brasiliensis</i>	BRA

Tabela 1. Continuação.

Antígeno H	Subespécie	Abreviatura	Antígeno H	Subespécie	Abreviatura
8a8b	<i>morrisoni</i>	MOR	40	<i>huazhongensis</i>	HUA
8a8c	<i>ostrinae</i>	OST	41	<i>sooncheon</i>	SOO
8b8d	<i>nigeriensis</i>	NIG	42	<i>jinghongiensis</i>	JIN
9	<i>tolworthi</i>	TOL	43	<i>guiyangiensis</i>	GUI
10a10b	<i>darmstadiensis</i>	DAR	44	<i>higo</i>	HIG
10a10c	<i>londrina</i>	LON	45	<i>roskildiensis</i>	ROS
11a11b	<i>toumanoffi</i>	TOU	46	<i>chanpaisis</i>	CHA
11a11c	<i>kyushuensis</i>	KYU	47	<i>wratislaviensis</i>	WRA
12	<i>thompsoni</i>	THO	48	<i>baleárica</i>	BAL
13	<i>pakistani</i>	PAK	49	<i>muju</i>	MUJ
14	<i>israelensis</i>	ISR	50	<i>navarrens</i>	NAV
15	<i>dakota</i>	DAK	51	<i>xiaguangiensis</i>	XIA
16	<i>indiana</i>	IND	52	<i>kim</i>	KIM
17	<i>tohokuensis</i>	TOH	53	<i>austeriensis</i>	AST
18a18b	<i>kumamotoensis</i>	KUM	54	<i>poloniensis</i>	POL
18a18c	<i>yosoo</i>	YOS	55	<i>palmyolensis</i>	PAL
19	<i>tochigiensis</i>	TOC	56	<i>rongseni</i>	RON
20a20b	<i>yunnanensis</i>	YUN	57	<i>pirenaica</i>	PIR
20a20c	<i>pondicheriensis</i>	PON	58	<i>argentiniensis</i>	ARG
21	<i>colmeri</i>	COL	59	<i>ibérica</i>	IBE
22	<i>shandongiensis</i>	SHA	60	<i>pingluonsis</i>	PIN
23	<i>japonensis</i>	JAP	61	<i>sylvestriensis</i>	SYL
24a24b	<i>neoleonensis</i>	NEO	62	<i>zhaodongensis</i>	ZHA
24a24c	<i>novoribisk</i>	NOV	63	<i>bolívia</i>	BOL
25	<i>coreanensis</i>	COR	64	<i>azorensis</i>	AZO
26	<i>silo</i>	SIL	65	<i>pulsiensis</i>	PUL
27	<i>mexicanensis</i>	MEX	66	<i>graciosensis</i>	GRA
28a28b	<i>mmnterrey</i>	MON	67	<i>vazensis</i>	VAZ

Fonte: Adaptado de De Barjac e Frachon (1990).

Caracterização das Toxinas

SDS-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-SDS)

A análise das proteínas do Bt e do Bs é feita por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) (HÖFTE; WHITELEY, 1989) e possibilita conhecer o número e a massa molecular das toxinas além de auxiliar na identificação do grupo Cry a que pertencem. O extrato das proteínas da estirpe em estudo é migrado em gel de poliacrilamida e corado com *Coomassie blue* que permite observar as proteínas diretamente no gel (Figura 2).

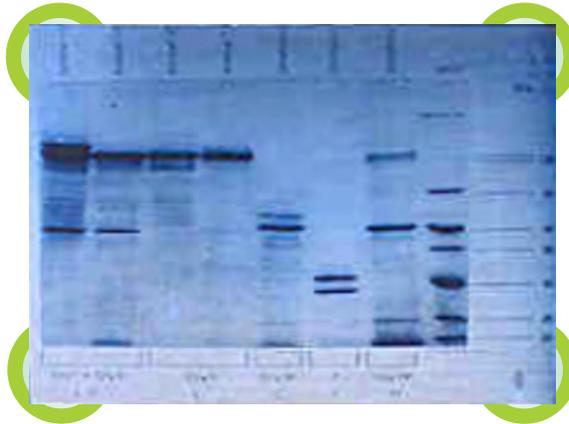


Figura 2. Gel de proteínas de diferentes estirpes de *B. thuringiensis*.

Caracterização dos Genes

Em relação às moléculas, existem técnicas que identificam os genes responsáveis pela toxicidade e que podem ajudar na caracterização de Bt e Bs.

A identificação dos genes cry em novas estirpes é possível por técnica de hibridização DNA-DNA, usando os genes de δ -endotoxinas marcados radioativamente como sondas. O fato de muitas estirpes de Bt possuírem mais de

um gene da toxina, impede o uso dessa técnica para classificação geral dessa bactéria.

PCR

A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) tem sido usada para identificação e caracterização de estirpes de Bt e Bs quanto à presença de genes conhecidos, combinações de genes e predição da atividade inseticida (CAROZZI et al., 1991; KALMAN et al., 1993; CERON et al., 1994, 1995). Essa metodologia tem-se mostrado eficaz para identificação de genes em estirpes de Bt e Bs, principalmente, em coleções, pois permite identificação rápida e precisa, requer pouco DNA para análise e permite o processamento de grande número de amostras em, relativamente, pouco tempo. No que se refere ao uso de sonda, a técnica de PCR apresenta as vantagens de rapidez e da não-utilização de material radioativo.

Para detecção de genes *cry* no DNA plasmidial, são usados *primers* (oligonucleotídeos) gerais, desenhados a partir de regiões altamente conservadas de determinada classe de genes *cry* ou oligonucleotídeos específicos selecionados entre as regiões altamente variáveis (CERON et al., 1994, 1995; BRAVO et al., 1998). Havendo homologia dos *primers* com o DNA em estudo, este é amplificado, por meio de vários ciclos de duplicação e posteriormente visualizado em gel de agarose. O tamanho dos fragmentos amplificados indica a presença de genes de determinadas classes ou subclasses de genes *cry*. Na Tabela 2, podem ser vistos exemplos de tamanhos de fragmentos esperados para alguns genes das classes *cry1*, *cry3* e *cry4*.

Os novos genes responsáveis por toxinas desconhecidas são caracterizados por clonagem e seqüenciamento direto do seu DNA, depois que a análise do gel de proteína e o bioensaio indicarem tratar-se de uma toxina desconhecida (SOSA-GÓMEZ; TIGANO; ARANTES, 1998).

Tabela 2. Características dos primers gerais e específicos para os genes cry1, cry3 e cry4.

Pares de Primers	Genes	Produto de amplificação por PCR (pb)	Sequências	Cristal Protéico (kDa)
gral-cry1 (Bravo et al., 1998)	cry1Aa, cry1Ad	558	5'-CTGGATTACAGGTGGGGATAT(Ø)	133
	cry1Ab, cry1Ae	558	5'-TGAGTCGCTT CGCATATTTGACT(Ø)	130, 134
	cry1Ac	564		133
	cry1Af	558		103
	cry1Ba	558		140
	cry1Bb	555		140
	cry1Bc	555		140
	cry1Ca	594		134
	cry1Cb	555		133
	cry1Da, cry1Db	543		132, 131
	cry1Ea, cry1Fa	558		133, 134
	cry1Eb	555		134
	cry1Fb	555		132
	cry1G	558		132, 133
	cry1Ha	549		133
	cry1Hb	543		131
cry1Ia, cry1Ib	558		81	
cry1Ja	555		133	
cry1Jb	558		134	
cry1K	558		137	

Continua ...

Tabela 2. Continuação.

Pares de Primers	Genes	Produto de amplificação por PCR (pb)	Sequências	Cristal Protéico (kDa)
CJ1-1	cry1Aa	272	5' TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA (d)	133
CJ1-2	cry1Ab	284	5' TATCGGTTTCTGGGAAGTA (r)	130
(cry1 geral)	cry1Ac	272		133
(Ceron et al., 1994)	cry1B	290		140
	cry1C	284		134
	cry1D	284		132
	cry1Ea	275		133
	cry1Eb	290		133
	cry1F	284		134
	cry1Fa	284		132
				134
CJ1	cry1Aa, cry1Ad	246	5' TTATACTTGGTTCAGGCCCC 3'(d)	133, 133
CJ2			5' TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA 3'(r)	
(Ceron et al., 1993)				
CJ3	Cry1Ad	171	5' TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA 3'(d)	133
CJ2			5' CAGCCGATTTACCTTCTA 3'(r)	
(Ceron et al., 1993)				
CJ4	cry1Ab, cry1Ac	216	5' AACAACTATCTGTTCTTGAC 3'(d)	130
CJ5			5' CTCTTATTACTTACACTAC 3'(r)	
(Ceron et al., 1993)				

Continua ...

Tabela 2. Continuação.

Pares de Primers	Genes	Produto de amplificação por PCR (pb)	Seqüências	Cristal Protéico (kDa)
CJ6	cry1Ac (Ceron et al., 1993)	180	5' GTTAGATTAATAAGTAGTGG 3' (d) 5' TGTAGCTGGTACTGTATTG 3' (r)	133
CJ7				
CJ8	cry1B (Ceron et al., 1993)	367	5' CTTTCATCACGATGGAGTAA 3' (d) 5' CATAAATTTGGTCGTTCTGTT 3' (r)	140
CJ9				
CJ10	cry1C (Ceron et al., 1993)	130	5' AAAAGATCTGGAACACACCTTT 3' (d) 5' CAAACTCTAAATCCTTTTCAC 3' (r)	134
CJ11				
CJ12	cry1D (Ceron et al., 1993)	290	5' CTGCAGCAAGCTATCCAA 3' (d) 5' ATTTGAATTTCAAGGCCCTG 3' (r)	132
CJ13				
CJ14	cry1Ea, cry1Eb (Ceron et al., 1994)	147	5' GGAACCAAGACGAACTATTGC 3' (d) 5' GGTTGAATGAACCCCTACTCCC 3' (r)	133, 134
CJ15				
CJ16	cry1F, cry1Fa, cry1Fb (Ceron et al., 1994)	177	5' TGAGGATTCCCAGTTTCTGC 3' (d) 5' CGGTTACCAGCCGTTATTTCG 3' (r)	133, 133, 132
CJ17				

Continua ...

Tabela 2. Continuação.

Pares de Primers	Genes	Produto de amplificação por PCR (pb)	Sequências	Cristal Protéico (kDa)
CJ18 CJ19 (Ceron et al., 1994)	cry1G	235	5' ATATGGAGTGAATAGGGCG 3' (d) 5' TGAACGGCGATTACATGC 3' (r)	132, 133
CJIII20, CJIII21 (cry3 geral) (Ceron et al., 1993)	cry3A cry3B, cry3C cry3C-gall, cry3Cb, cry3Cc cry3D cry3F cry3G	703 709 694 718 652 733	5' TTAACCCGTTTTCCGACAGAGA 3' (d) 5' TCCGCACTTCATGTGTCCAAG 3' (r)	73 75, 73 73 73
CJIIIc22 CJIIIA23 (Ceron et al., 1994)	cry3A	285	5' CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC 3' (d) 5' CCCCGTCTAAACTGAGTGT 3' (r)	72 - 73
CJIIIc22 CJIIIB24 (Ceron et al., 1994)	cry3B	437	5' CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC 3' (d) 5' AACGAAAGATCTGCTCC 3' (r)	72 - 73
CJIIIc22 CJIIIC25 (Ceron et al., 1994)	cry3C	535	5' CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC 3' (d) 5' CCTATTCTTTCATTTGACC 3' (r)	72 - 73

Continua ...

Tabela 2. Continuação.

Pares de Primers	Genes	Produto de amplificação por PCR (pb)	Seqüências	Cristal Protéico (kDa)
CJIIIcte22	cry3C-gall, cry3Cb,	211	5' CAATCCCAGTGTTTACTTTGGAC 3'(d)	72 – 73
CJIIICg26 (Ceron et al., 1994)	cry3Cc		5' AGTGGAGAGTTTACGGTAGCC 3'(r)	
CJIIIcte22	cry3D	312	5' CAATCCCAGTGTTTACTTTGGAC 3'(d)	72 – 73
CJIIID27 (Ceron et al., 1994)			5' CGAAATACGAAATACTATGAG 3'(r)	
CJIII28	cry3E	394	5' TGACAAGTACTGGATTCTGCAA 3'(d)	72 – 73
CJIII29 (Ceron et al., 1994)			5' GTTGTGATGAGGTTCCCCCTT 3'(r)	
cry4aspe (Ibarra et al., 2003)	cry4A	459	5' TCAAAGATCATTTCAAAATTACATG (d)	72
			5' CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (f)	
cry4bspe (Ibarra et al., 2003)	cry4B	321	5' CGTTTTCAAGACCTAATAATAATAATACC (d)	72
			5' CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (f)	

Caracterização Entomopatogênica

Durante a prospecção de novas estirpes, é importante a determinação de quais e quantos são os insetos-alvo daquela estirpe. Assim, são conduzidos bioensaios com o maior número possível de espécies, dependendo da disponibilidade para verificar sua atividade (SOSA-GÓMEZ; TIGANO; ARANTES, 1998).

Os testes de patogenicidade podem ser de dois tipos. Inicialmente, é feito o que se chama de bioensaio seletivo visando investigar se a estirpe é eficaz ou não. Para se determinar a concentração letal, faz-se um bioensaio com diluições seriadas das culturas bacterianas.

Em ambos os casos, cada estirpe da bactéria é cultivada em meio NYSM (YOUSTEN, 1984) por 48 a 72 horas a 200 rpm e 28°C. Nessas condições, elas apresentarão boa quantidade de esporos e cristais.

Um aspecto muito importante para a realização dos bioensaios é o conhecimento e o domínio da técnica de criação de insetos em laboratório, pois os testes devem ser realizados com insetos sadios. Quando a mortalidade da testemunha dos testes é superior a 10%, o bioensaio deve ser descartado e repetido.

Conservação e Armazenamento das Estirpes

Existem diversas maneiras de conservar as estirpes de *Bacillus* sp.

Em Tubos de Ensaio com Meio Inclinado (Slants)

Neste tipo de armazenamento, as estirpes são crescidas por 72 horas em tubos de ensaio contendo meio NYSM e, em seguida, congeladas a -20°C. Essas culturas devem ser repicadas a cada três meses. Essas repicagens sucessivas podem causar a perda ou a diminuição do poder entomopatogênico uma vez que pode haver perda de material genético.

Liofilizados

Depois do crescimento das bactérias, elas são centrifugadas, congeladas e liofilizadas dentro de ampolas estéreis. Essas ampolas são, em seguida, lacradas e podem ser conservadas por 15 anos.

Em Tiras de Papel-Filtro

Para esse tipo de armazenamento, as estirpes são crescidas por 48 horas em meio NYSM e, em seguida, submetidas a choque térmico (80°C por 12 minutos/gelo por 5 minutos). Em seguida, pingam-se duas gotas dessa suspensão em tiras de papel-filtro previamente autoclavadas em tubos de ensaio de três milímetros de diâmetro. Esses tubos são colocados para secar em estufa a 35°C, quando o papel descolar das paredes do tubo, é lacrado e estocado.

Essa metodologia é barata e bastante prática, pois a estocagem se dá à temperatura ambiente, e as estirpes podem ficar armazenadas assim por mais de 15 anos (Figura 3).



Figura 3. Armazenamento de Bt e Bs em papel-filtro.

Toxinas Produzidas por *Bacillus thuringiensis*

δ -Endotoxinas

Esse grupo de toxinas, também chamado de proteínas *Cry*, é um dos formadores do cristal protéico. Essas proteínas apresentam peso molecular variando de 14 a 152 kDa. O processo de formação desse cristal está ligado à esporulação. Os estudos efetuados sobre a esporulação mostraram que o cristal é formado do segundo estágio da esporulação e é liberado quando as células são lisadas. As etapas da esporulação e biogênese do cristal seguem os seguintes passos:

Estágio 1: A célula para seu crescimento e sua parede celular se modifica.

Estágio 2: O septo de esporulação é formado, e a cromatina é dividida em duas partes. Começa, nesse momento, a aparição de uma estrutura condensada que é o cristal.

Estágio 3: Formação do pré-esporo.

Estágio 4: Crescimento do esporo e formação do cristal.

Estágio 5: Formação do envelope esporal em torno do esporo. O cristal, fora desse envelope, continua seu crescimento.

Estágio 6: Maturação do esporo, o cristal atinge seu tamanho máximo.

Estágio 7: Ruptura da célula e liberação do cristal e do esporo.

A classificação das proteínas *Cry* baseia-se na similaridade das seqüências de aminoácidos (CRICKMORE et al., 1998). Existem mais de 300 diferentes genes *Cry* e as proteínas *Cry* estão agrupadas em 49 classes.

A atualização constante dessa nova classificação está disponível no site:
WWW:http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html.

Entre as estirpes de *B. thuringiensis*, algumas apresentam um único gene codificador das proteínas *Cry*. Outras apresentam cinco genes diferentes, como é o caso das subespécies *aizawai* HD-137 e *israelensis* IPS-82. Essa última apresentou cinco genes codificadores da δ -endotoxina e outro gene que codifica uma citolisina, todos localizados em um único plasmídeo de 72Mda.

As toxinas do tipo *Cry1* têm 36 subgrupos representados por *Cry1Aa*,..., *Cry1Ka*. Algumas dessas proteínas são ativas contra insetos da ordem Lepidoptera, como por exemplo, as toxinas *Cry1C* e *Cry1D* que apresentam atividade contra *Spodoptera frugiperda* e *S. exigua* e, ainda, a toxina *Cry1Cb*, isolada de *B. thuringiensis* subsp. *galleriae*, com massa molecular em torno de 130 kDa e tóxica a *S. exigua* e *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). Cita-se, ainda, a proteína *Cry1E* que apresenta distintas eficiências de controle em *Spodoptera* sp. Algumas toxinas pertencentes ao grupo *Cry1* podem apresentar atividade dupla contra lepidópteros e dípteros e contra lepidópteros e coleópteros, como é o caso das proteínas *Cry1Ca* e *Cry1Ba* respectivamente. Vale ressaltar que as proteínas *Cry1Ab* e *Cry1Ca* mostraram atividade contra mosquitos.

O grupo de proteínas do tipo *Cry2* é formado por quatro membros: *Cry2Aa*, *Cry2Ab*, *Cry2Ac* e *Cry2Ad*. A toxina do tipo *Cry2A* foi isolada da subespécie *kurstaki*. A toxina do tipo *Cry2B* apresenta 89% de identidade com a *Cry2A* e é altamente tóxica contra *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) e *T. ni* e não apresentou toxicidade contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Portanto, a toxina do tipo *Cry2* é produzida por estirpes de várias subespécies de *B. thuringiensis*, apresenta alta atividade larvicida para lepidópteros e baixa para dípteros. Essas toxinas apresentam peso molecular de 65 kDa e formam cristais cubóides.

O grupo das proteínas *Cry3* apresenta quatro integrantes: *Cry3Aa*, *Cry3Ba*, *Cry3Bb* e *Cry3Ca*. Essas toxinas apresentam peso molecular de 73 a 75 kDa e

produzem cristais rombóides. Krieg et al. (1983) descreveram a primeira estirpe produtora de gene *cry3*. Essas proteínas são tóxicas a insetos da ordem Coleoptera como por exemplo, *Lepitnotarsa decemlineata* (Besouro-da-batata-do-colorado) (Coleoptera: Chrisomelidae). A toxina *Cry3Ba* foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi*, a proteína *Cry3Bb* é ativa contra *Diabrotica undecimpunctata* (Coleoptera: Chrisomelidae), a proteína *Cry3A* contra o afídeo da batata, *Macrosiphum euphorbiae* (Heteroptera: Aphididae) e a *Cry3Ca* foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e apresentou toxicidade contra *L. decemlineata* superior a das outras proteínas *Cry3*

Na classe *Cry4*, são duas proteínas: *Cry4Aa* e *Cry4Ba*. Essas proteínas são ativas contra dípteros. Os genes *Cry4A* e *cry4B* foram isolados das estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e codificaram proteínas de 128 e 135 kDa, respectivamente, e, além disso, formam cristais complexos de forma ovóide ou composta (esférica ou retangular).

As proteínas *Cry5* são ativas contra nematóides, ácaros e formigas e, ainda, são ativas contra coleópteros e lepidópteros. As proteínas *Cry5Aa* e *Cry5Ab* foram isoladas de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* e apresentam peso molecular de 152 e 142 kDa respectivamente. Ambas as toxinas são ativas contra nematóides e ácaros. Já as proteínas *Cry5Ac* e *Cry5Ba* têm peso molecular de 135 e 140 kDa, respectivamente e são eficazes contra himenópteros e coleópteros.

As toxinas *Cry6* são ativas contra nematóides e ácaros e são formadas por dois integrantes: *Cry6Aa* e *Cry6Ba*.

O grupo das proteínas *Cry7* está representado por dois subgrupos: *Cry7Aa* e *Cry7Ab*. A toxina *Cry7Aa* apresenta peso molecular de 129 kDa e atividade contra coleópteros e lepidópteros. *Cry7Ab* codifica uma proteína de 130 kDa e foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *dakota* e é ativa contra coleópteros.

As toxinas do grupo *Cry8* são três: *Cry8Aa*, *Cry8Ba* e *Cry8Ca*. As proteínas *Cry8Aa* e *Cry8Ba* foram isoladas de *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* e codificam proteínas de 131 e 134 kDa respectivamente. A primeira exerce atividade dupla para coleópteros e afídeos e a segunda apenas contra coleópteros. *Cry8Ca* foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *japonensis* e apresentou atividade contra um escarabeídeo, *Anômala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae), portanto, é eficaz contra insetos da ordem Coleoptera e seu peso molecular é de 130 kDa.

A classe *Cry9* é formada por seis integrantes: *Cry9Aa*, *Cry9Ba*, *Cry9Ca*, *Cry9Da*, *Cry9Ea* e *Cry9Eb*. As proteínas *Cry9Aa* e *Cry9Ba* foram isoladas de *B. thuringiensis* subsp. *galleriae*, sendo que gene *cry9Aa* age sobre *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) e o gene *cry9Ca* foi isolado de *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* e é efetivo contra *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) e *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae), *Cry9Ea* foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* todas com peso molecular de 130 kDa. *Cry9Da* foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *japonensis* e codifica uma proteína de 132 kDa e é ativa contra escarabeídeos da Ordem Coleoptera. Algumas dessas proteínas são também eficazes contra lepidópteros.

O grupo das proteínas *Cry10* é constituído por apenas um subgrupo: *Cry10Aa*. A toxina do tipo *Cry10Aa* foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e codifica uma proteína de 78 kDa. Da mesma forma que *Cry10A*, a toxina do tipo *Cry11Aa*, isolada de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e codifica uma proteína de 72 kDa. *Cry11Ba* foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *Jegathesan*, sendo altamente eficaz contra os mosquitos das espécies *A. aegypti*, *Culex pipiens* e *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) e a *Cry11Bb* foi isolada *B. thuringiensis* subsp. *medellin* e é bastante tóxica às larvas de *A. aegypti*, *Anopheles albimanus* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). O peso molecular dessas proteínas é de 81 e 84 kDa respectivamente. Portanto, as proteínas do grupo *Cry10* e *Cry11* são ativas contra dípteros.

Cry12Aa é uma toxina com atividade dupla contra nematóides e ácaros; seu peso molecular é de 142 kDa, enquanto *Cry13* é tóxica apenas para nematóides e contém uma proteína de 88 kDa. *Cry14Aa* foi isolada da estirpe *B. thuringiensis* subsp. *sotto* codifica uma proteína de 132 kDa e é ativa contra dípteros e coleópteros.

A toxina do tipo *Cry15* exerce uma atividade específica contra lepidópteros, codifica uma proteína de 34 kDa e foi isolada da estirpe *B. thuringiensis* subsp. *thompsoni*.

Ressalta-se, contudo, que nem todos os cristais são oriundos da mesma espécie de bactéria. Por exemplo, as proteínas *Cry16* e *Cry17* cujos genes *cry16Aa* e *cry17Aa* foram isolados da estirpe CH18 da bactéria anaeróbica *Clostridium bif fermentans* subsp. *malaysia* e não de uma subespécie de *B. thuringiensis*. Na proteína *Cry16*, constatou-se atividade contra três insetos da ordem Diptera: *A. aegypti*, *C. pipiens* e *A. stephensi*, entretanto, na proteína *Cry17* não se verificou atividade significativa contra insetos da ordem Diptera. Nessas toxinas, observou-se peso molecular de 71 e 72 kDa respectivamente.

As proteínas *Cry18*, do mesmo modo que as proteínas *Cry16* e *Cry17*, não foram isoladas de nenhuma estirpe de *B. thuringiensis*. *Cry18Aa*, *Cry18Ba* e *Cry18Ca* foram isoladas do cromossomo do patógeno obrigatório *Bacillus popilliae*; nelas, o peso molecular foi de 79, 76 e 78 kDa respectivamente. O gene *Cry18Aa* codifica uma proteína com atividade contra o coleóptero *Melolontha melolontha* L (Coleoptera: Scarabaeidae) cujo percentual de identidade com a proteína *Cry2* de *B. thuringiensis* é de 40%.

As proteínas *Cry19* são ativas contra dípteros e possuem dois integrantes: *Cry19Aa* e *Cry19Ba*. *Cry19Aa* foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan*, com peso molecular de 75 kDa, enquanto *Cry19Ba* foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *higo* com peso molecular de 78 kDa e atividade para *C. pipiens*, mas não para *A. stephensi*, além disso, possui 49% de identidade e 56% de similaridade com *Cry19Aa*.

Cry20Aa foi isolada da estirpe *B. thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* e mostrou atividade contra os dípteros *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* e codifica uma proteína de 86 kDa. *Cry21Aa* e *Cry21Ba* são eficazes contra nematóides, enquanto *Cry22Aa* é eficaz contra himenópteros seu peso molecular é de 79kDa; já as proteínas *Cry22Ab* e *Cry22Ba* são tóxicas para insetos da ordem Coleoptera. Existem, ainda, as proteínas *Cry23* e *Cry24* cujos alvos ainda não foram determinados, embora se tenha conhecimento de que elas são codificadas por um gene críptico.

A proteína do tipo *Cry25Aa* foi isolada da estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* é ativa contra dípteros e seu peso molecular é de 76 kDa. *Cry26Aa* e *Cry28Aa* foram isoladas de *B. thuringiensis* subsp. *finitimus* e não tiveram ainda sua atividade determinada. *Cry27Aa* foi isolada da estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *Higo*, e o peso molecular encontrado foi de 94 kDa.

Cry29Aa e *Cry30Aa* foram isoladas da estirpe *B. thuringiensis* subsp. *medellin* e são eficazes contra insetos da ordem Diptera. As proteínas do tipo *Cry31*, *Cry32* e *Cry33* não tiveram seus alvos determinados até o momento. As proteínas *Cry32Aa*, *Cry32Ba* e *Cry32Ca* foram isoladas de *B. thuringiensis* subsp. *Yunnanensis*, e *Cry33Aa*, da estirpe *B. thuringiensis* subsp. *dakota*.

As proteínas do grupo *Cry34* são formadas por quatro integrantes: *Cry34Aa*, *Cry34Ab*, *Cry34Ac* e *Cry34Ba* com peso molecular de 14 kDa. Já para as proteínas *Cry35Aa*, *Cry35Ab* e *Cry35Ac*, o peso molecular é de 44 kDa. As toxinas do grupo *Cry34* e *Cry35* são ativas contra o coleóptero *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae).

As proteínas *Cry36* e *Cry38* são ativas contra insetos da ordem Coleóptera. *Cry37* ainda não teve seu alvo determinado. *Cry39* e *Cry40* foram isoladas da estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* comprovando-se sua atividade mosquitocida. *Cry41Aa*, *Cry41Ab* e *Cry42Aa*, *Cry43Aa* e *Cry43Ba* ainda não tiveram sua atividade determinada.

A proteína *Cry44Aa* foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus*, evidenciando uma toxina com propriedades mosquitocidas. *Cry45Aa* foi isolada de *Bacillus thuringiensis* subsp. *shandongiensis* tendo sido identificada uma proteína citolítica contra câncer nas células humanas. A proteína *Cry46Aa* foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *dakota* e *Cry46Ab* e *Cry47Aa* não tiveram, ainda, sua atividade determinada. *Cry 48* e *Cry49* foram isoladas de *B. sphaericus*, são tóxicas a mosquitos e tiveram sua atividade testada em laboratório.

As proteínas Cyt são constituídas pelos grupos Cyt1 e Cyt2. A classe Cyt1 possui três integrantes: Cyt1Aa, Cyt1Ab e Cyt1Ba estas foram isoladas, respectivamente, de estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. thuringiensis* subsp. *medellin* e *B. thuringiensis* subsp. *neoboensis*. Todas apresentaram peso molecular de 27 kDa. A classe Cyt2 possui cinco integrantes: Cyt2Aa, Cyt2Ba, Cyt2Bb, Cyt2Bc e Cyt2Ca. As proteínas Cyt2Aa e Cyt2Ba foram isoladas, respectivamente, das estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis* e *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, ambas com peso molecular de 29 kDa. Cyt2Bb foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* e peso molecular de 30 kDa. Todas essas proteínas são ativas contra insetos da ordem Diptera. Em relação a Cyt2Bc, pouco se sabe e, até o momento, seu alvo ainda não foi determinado. Finalmente, a Cyt2Ca é ativa contra insetos da ordem Coleoptera e contra *Ctenocephalides* spp. (Siphonaptera: Pulicidae).

α -exotoxina

A α -exotoxina conhecida também como fosfolipase C, lecitinase ou fosfatidilcolina fosfodrolase é uma enzima que possui atividade citolítica ao atuar sobre os fosfolípidos que formam as membranas de diversos tipos celulares (FAUST; BULLA JR., 1982). Essa toxina é encontrada no sobrenadante de culturas e é altamente tóxica para certos insetos quando administrada via oral ou intra-hemocélica, causando degeneração e lise de hemócitos (KRIEG, 1971). O gene correspondente a essa exotoxina já foi clonado e seqüenciado (LECHNER et al., 1989).

β -exotoxinas

A β -exotoxina ou thuringiensina é uma toxina termoestável produzida por certas estirpes de Bt durante a fase vegetativa e secretada no meio de cultura. Ela é produzida em grande quantidade por estirpes do sorotipo H1 e em menores quantidades por algumas estirpes dos sorotipos H4a4b, H4a4c, H5, H9, H10, H11, H12 (SEBESTA et al., 1981). A toxina do tipo I é um análogo do ATP e é composta de adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico, com massa molecular de 701 daltons (FARKAS et al., 1969). Essa toxina atua inibindo a ação da RNA polimerase por competição pelo ATP e é altamente tóxica para várias ordens de insetos, ácaros, nematóides, bem como para vertebrados, com efeitos teratogênicos e mutagênicos (SEBESTA et al., 1981). Assim, a partir de 1970, os produtos comerciais de Bt à base de linhagens do sorotipo H1 foram substituídos por outros à base de linhagens não produtoras de β -exotoxina (SEBESTA et al., 1981).

A β -exotoxina do tipo II é produzida por estirpes pertencentes ao sorotipo H8a8b (*morrison*), é um análogo do UTP e apresenta toxicidade superior à toxina do tipo I, principalmente, para coleópteros (LEVINSON et al., 1990). Segundo esses autores, os genes responsáveis pela síntese de β -exotoxina estão localizados em plasmídeos de 75 ou 110 kda.

Vip3A

Uma nova classe de proteínas inseticidas, Vip3A, com atividade contra larvas de lepidópteros foi descrita por Estruch et al. (1996). Essas proteínas são produzidas e secretadas por algumas estirpes durante a fase vegetativa e de esporulação, têm massa molecular predita de 88,5 kDa, não têm homologia com proteínas conhecidas e apresentam atividade contra insetos pouco sensíveis à maioria das δ -endotoxinas, como *Agrotis ipsilon*, *S. frugiperda* e *S. exigua*. A clonagem e a caracterização de dois genes homólogos, *vip3A(a)* e *vip3A(b)*, de

diferentes estirpes foram descritas (ESTRUCH et al., 1996). Essa foi uma descoberta importante, pois atualmente não só se aproveita a mistura de esporos e cristais obtida após o cultivo de Bt, como também se poderá utilizar o sobrenadante dela.

Mecanismo de Ação das Proteínas Cry

Os sintomas que são observados a partir do momento em que as larvas dos insetos suscetíveis ingerem os cristais e esporos são: parada alimentar, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e por fim, morte (ARONSON; BECKMAN; DUNN, 1986). Estudos histopatológicos mostraram que, no início, as células colunares do intestino médio são afetadas e, em particular, sua microvilosidade apical que é totalmente destruída (EBERSOLD, et al., 1978). Os efeitos nas células caliciformes (CIOFFI, 1984) são mais lentos, mas nesse caso a citólise também foi observada (BRAVO et al., 1992). O mecanismo de ação das proteínas Cry é um processo de vários passos, quais sejam:

Solubilização

Os cristais produzidos por Bt solubilizam-se em pH alcalino (GRINGORTEN et al., 1992); também é necessário um meio ambiente redutor já que as pontes dissulfeto são abundantes na metade C-terminal das proteínas de 130 kDa. O intestino médio da maior parte das larvas de insetos suscetíveis (lepidópteros, dípteros e alguns coleópteros) caracteriza-se por seu alto pH e condições redutoras (KNOWLES, 1994). Uma exceção é a proteína Cry3A que se dissolve tanto a pH ácido (3,9 a 4,2) quanto em pH alcalino (9,5 a 11,3), mas permanece insolúvel em pH neutro (KOLLER; BAUER; HOLLINGWORTH, 1992). Cry3A é ativo contra larvas de crisomelídeos cujo pH intestinal é ligeiramente ácido (WELTENS et al., 1992) e, nesse caso, supõe-se que existam outros fatores no conteúdo intestinal capazes de promover a solubilização dessa toxina.

Processamento

A maior parte das proteínas Cry é produzida como protoxinas que, para serem ativadas, devem ser processadas pelas proteases do intestino médio dos insetos liberando o fragmento tóxico, ficando assim um fragmento resistente a proteases de 55 e 65 kDa. O alinhamento das seqüências de aminoácidos dos membros da família Cry mostrou que as toxinas de 70 kDa (Cry2, Cry3 e Cry 11) podem ser consideradas como formas naturais truncadas das proteínas de alto peso molecular (HÖFTE; WHITELEY, 1989).

O processamento é fator que pode contribuir na determinação da especificidade. Um exemplo é o caso da toxina Cry1Ab da cepa IC1 de Bt subsp. *aizawai* que é tóxica para lepidópteros (*Pieris brassicae*) quando processada com tripsina e ativa para os dípteros (*Aedes aegypti*) se tratada com suco gástrico desses mosquitos (HAIDER; ELLAR, 1989).

Apesar de se conhecer com certo detalhe como ocorre o processamento das toxinas de Bt, não existe informação suficiente sobre as enzimas que estão envolvidas nesse processo. O seqüenciamento da extremidade N-terminal dos fragmentos tóxicos das toxinas Cry1, Cry2 e Cry4 sugere que as principais proteases envolvidas são enzimas do tipo da tripsina, da quimiotripsina e da termolisina (DAI; GILL, 1993). No caso dos coleópteros, observou-se que as enzimas digestivas predominantes no intestino médio são do tipo cisteíno-proteases (THIE; HOUSEMAN, 1990) e é provável que estas sejam as proteínas envolvidas no processamento das toxinas do tipo Cry3.

União ao Receptor

Depois de ativadas, as proteínas Cry unem-se a sítios específicos localizados na microvilosidade das células colunares do intestino médio das larvas de insetos suscetíveis: lepidópteros (HOFFMANN et al., 1988), coleópteros (BRAVO et al., 1992) e dípteros (RAVOAHANGIMALALA; CHARLES; SCHOELLER-RACCAUD, 1993).

A união a esses sítios é a etapa determinante da alta especificidade das δ -endotoxinas (VAN RIE et al., 1989), por isso, diversos grupos de pesquisa têm dedicado grande esforço para entender como ocorre esse processo. As metodologias mais usadas são os estudos cinéticos de união utilizando proteínas marcadas com isótopos radioativos e vesículas de membrana da microvilosidade apical (VMMA).

Foi demonstrado que, para haver toxicidade, é necessário união, mas o fato de obtê-la não significa a presença de toxicidade (ESTADA; FERRE, 1994; WRIGHT et al., 1997).

União Reversível e Irreversível

Estudos de competição homóloga têm mostrado que a cinética de união das δ -endotoxinas às VMMA dos insetos suscetíveis é bifásica, composta de um passo reversível e outro irreversível (VAN RIE et al., 1989). A interação inicial entre a toxina e seu sítio de união (união reversível) é um requisito para a toxicidade, mas não é suficiente. Os eventos posteriores tais como a união irreversível e a inserção na membrana parecem estar mais correlacionadas com a toxicidade.

Natureza Bioquímica do Receptor

Importantes esforços vêm sendo feitos com a finalidade de identificar, purificar e caracterizar do receptor das proteínas *Cry*, na microvilosidade apical das células colunares do intestino médio. A metodologia mais empregada tem sido a de separar as proteínas VMMA em eletroforese em gel de poliácridamida em condições desnaturantes e, posteriormente, transferi-las para papel de nitrocelulose. A união específica da toxina a alguma das bandas se revela com anticorpo anti toxina e logo com um segundo anticorpo ou, então, pode-se utilizar toxina marcada (biotina-estreptavidina ou ^{125}I). Essa evidência sugere que o sítio que reconhece a toxina na proteína de união é um epítotope muito pequeno ou então um carboidrato (CIOFFI, 1984). Com base nesse tipo de experimento,

tem-se observado que, para a maioria das toxinas Cry1 estudadas, as moléculas com as quais a união ocorre com maior afinidade são glicoproteínas entre 63 e 220 kDa (ODDOU; HARTMANN; GEISER, 1991; INDRASITH; HORI, 1992). Propõe-se que a interação inicial seja a existente entre a toxina e o carboidrato do receptor, enquanto a irreversível seja associada com uma interação proteína-proteína (LIANG; PATEL; DEAN, 1995).

Esses estudos são ainda incipientes para o caso dos coleópteros e dípteros. Entretanto, com base em pesquisas, descobriu-se que coleóptero *Tenebrio molitor*, a molécula de união, é uma proteína de 144 kDa (BELFIORE et al., 1994). Uma banda de 148 kDa e outra de 78 kDa foram identificadas como as proteínas de união para a toxina Cry11Aa nas vesículas dos mosquitos *Anopheles stephensi* e *Tipula oleraca* (FELDMANN; DULLEMANS; WAALWIJK, 1995) respectivamente. Os maiores avanços no esclarecimento da natureza bioquímica dos possíveis receptores para as proteínas Cry1 foram obtidos durante os três últimos anos.

Inserção na Membrana

A fase irreversível da união das δ -endotoxinas na membrana é considerada como uma evidência de que as proteínas Cry inserem-se na membrana para, em seguida, causar a destruição do tecido intestinal das larvas de insetos suscetíveis (VAN RIE et al., 1989; LIANG; PATEL; DEAN, 1995).

Com base no conhecimento que se tem sobre a inserção de outras toxinas bacterianas formadoras de poro (LI, 1992), foram propostos dois modelos possíveis da inserção de toxinas Cry na membrana. O primeiro (modelo de abre cartas) propõe que as α -hélices 5 e 6 sejam inseridas na membrana como consequência de uma mudança morfológica causada pelo receptor, sem maior participação das hélices e domínios restantes; o outro (modelo de guarda-chuva) sugere que, depois da união com o receptor, ocorra a inserção da região α 4- α 5, enquanto as hélices restantes se arranjam sobre a superfície da bicamada

lipídica, expondo para ela sua face hidrofóbica, ficando a molécula, assim, com formato semelhante a um guarda-chuvas (KNOWLES, 1994).

Agregação

Experimentos de proteção osmótica demonstram que após unir-se ao receptor e inserir-se na membrana, as proteínas *Cry* formam poros com um diâmetro de 1 a 2 nm (KNOWLES; ELLAR, 1987). O tamanho desses poros e a aparição freqüente de múltiplos estados de condutância nos estudos da atividade das proteínas *Cry* em bicamadas lipídicas planas (SLATIN; ABRAMS; ENGLISH, 1990; SCHWARTZ et al., 1997) têm sido considerados como evidências da formação de diversos estados de agregação das δ -endotoxinas.

Formação do Poro e Citólise

Foi demonstrado que as proteínas *Cry* causam a morte das células epiteliais ao inativar o sistema que mantém o gradiente de pH (WOLFERSBERGER, 1992) e por citólise osmótica (KNOWLES; ELLAR, 1987). As toxinas *Cry* aumentam a permeabilidade das microvilosidades apicais a cátions, ânions, água e moléculas de maior tamanho. Isso causa um colapso na diferença de potencial e, portanto, perda da força motriz que dirige a entrada de aminoácidos para o interior celular, assim como a redistribuição dos cátions entre o lúmem e o citoplasma. Considera-se que o efeito mais devastador desse processo seja a alcalinização do citoplasma já que isso interfere no metabolismo celular normal e tem como conseqüência final a destruição do epitélio intestinal (WOLFERSBERGER, 1992). Assim que as células colunares e calciformes são destruídas, os esporos de *Bt* têm acesso a hemolinfa, meio no qual se proliferam. Verificou-se que, em alguns casos, o efeito das proteínas *Cry* e dos esporos é sinérgico (JOHNSON; McGAUGHEY, 1996) e que alguns desses esporos contêm toxina na superfície, o que assegura seu acesso à hemolinfa (DU; NICKERSON, 1996). A conseqüência final da destruição do intestino médio e a proliferação de bactérias na hemolinfa é a morte das larvas por inanição e septicemia.

Referências

ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 50, p. 1-24, 1986.

BELFIORE, C. J.; VADLAMUDI, R. K.; OSMAN, Y. A.; BULLA JR., L. A. A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tenebrionis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 200, p. 359-364, 1994.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

BRAVO, A.; HENDRICKX, K.; JANSSENS, S.; PEFEROEN, M. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 60, p. 247-254, 1992.

CAROZZI, N. B.; KRAMER, W. G.; WARREN, G. W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M. G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 3057-3061, 1991.

CERON, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 1, p. 353-356, 1994.

CERON, J.; ORTÍZ, A.; QUINTERO, R.; GÜERECA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n.11, p. 3826-3831, 1995.

CIOFFI, M. Comparative ultrastructure of arthropod transporting epithelia. **American Zoologist**, Thousand Oaks, v. 24, p. 139-156, 1984.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; LAMBERT, B.; LERECLUS, D.; GAWRON-BURKE, C.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for *Bacillus thuringiensis* cry genes. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 28., 1995, Ithaca. **Program and abstracts...** Ithaca: Cornell University, 1995. p. 14.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VANRIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, p. 807-813, 1998.

DAI, S. M.; GILL, S. S. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 23, p. 273-283, 1993.

DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. **Entomophaga**, Paris, v. 7, n. 1, p. 5-31, 1962.

DE BARJAC, H.; VERON, M.; DUMANOIR, V. C. Caracterization biochimique et serologique des souches de *Bacillus sphaericus* pathogenes ou non pour les moustiques. **Annales de Microbiologie B**, Paris, v. 131, p. 191-201, 1980.

DE BARJAC, H.; FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. **Entomophaga**, Paris, v. 35, n. 2, p. 233-240, 1990.

DIAS, J. M. C. S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 59-76, 1992.

DU, C.; NICKERSON, K. W. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3722-3726, 1996.

DULMAGE, H. T. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 15, p. 232-239, 1970.

EBERSOLD, H. R.; LÜTHY, P.; GEISER, P.; ETTLINGER, L. The action of the d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: an electron microscope study. **Experientia**, Basel, v. 34, p. 1672, 1978.

EDWARDS, D. L.; PAYNE, J.; SOARES, G. G. **Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes**. European Patent Application, EP 0 303 426 A2. 15 Feb. 1989.

ESTADA, U.; FERRÉ, J. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) and selection for resistance to one of the crystal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 3840-3846, 1994.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; GRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 5389-5394, 1996.

FARKAS, J.; SEBESTA, K.; HORSKA, K.; SAMEK, Z.; DOLIJS, J.; SORM, F. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 34, p. 1118-1120, 1969.

FAUST, R. M.; BULLA JR., A. L. Bacterial and their toxins as insecticides. In: KURSTAKI, E. (Ed.). **Microbial and viral pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1982. p. 75-206.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. **Bio-technology**, Frankfurt, v. 10, p. 271-275, 1992.

FELDMANN, F.; DULLEMANS, A.; WAALWIJK, C. Binding of the CryIVD toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* to larval dipteran midgut proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 2601-2605, 1995.

GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergenti*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. **Mosquito News**, Aliso Viejo, v. 37, p. 355-358, 1977.

GRINGORTEN, J. L.; MILNE, R. E.; FAST, P. G.; SOHI, S. S.; VAN FRANKENHUYZEN, K. Suppression of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin activity by low alkaline pH. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 60, p. 47-52, 1992.

HAIDER, M. Z.; ELLAR, D. J. Functional mapping of an entomocidal d-endotoxin: single amino acid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity on the protein. **Journal Molecular Biology**, London, v. 208, p. 183-194, 1989.

HOFFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, J.; VAN RIE, J.; JANSSENS, H.; MELLAERT, J. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 85, p. 7844-7848, 1988.

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

INDRASITH, L. S.; HORI, H. Isolation and partial characterization of binding proteins for immobilized delta endotoxin from solubilized brush border membrane vesicles of the silkworm, *Bombyx mori*, and the common cutworm, *Spodoptera litura*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 102 B, p. 605-610, 1992.

JOHNSON, D. E.; MCGAUGHEY, W. H. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified cry proteins towards indian meal moth larvae. **Currents in Microbiology**, v. 33, p. 54-59, 1996.

KALMAN, S.; KIEHNE, K. L.; LIBS, J. L.; YAMAMOTO, T. Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 3057-3061, 1993.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, London, v. 24, p. 275-308, 1994.

KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins with different insect specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 924, p. 509-518, 1987.

KOLLER, C. N.; BAUER, L. S.; HOLLINGWORTH, R. M. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. San Diego native delta-endotoxin crystals. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 184, n. 2, p. 692-699, 1992.

KRIEG, A.; HUGER, A. M.; LANGENBRUCH, G. A.; SCHNETTER, W. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, Berlin, v. 96, p. 500-508, 1983.

KRIEG, A. Is the potential pathogenicity of bacilli for insects related to production of alpha-exotoxin? **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 18, p. 425-426, 1971.

KRONSTAD, J. W.; WHITELEY, H. R. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal-protein genes. **Gene**, Amsterdam, v. 43, p. 29-40, 1986.

KRYWIENCZYK, J.; DULMAGE, H. T.; FAST, P. G. Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3a,3b var. *kurstaki*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 31, p. 372-375, 1978.

LECHNER, M.; KUPKE, T.; STEFANOVIC, S.; GÖTZ, F. Molecular characterization and sequence of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 3, p. 621-626, 1989.

LERECLUS, D.; LECADET, M. M.; RIBIER, J.; DEDONDER, R. Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 186, p. 391-398, 1982.

LEVINSON, B. L.; KASYAN, K. J.; CHIU, S. S.; CURRIER, S.; GONZÁLEZ JR., J. M. Identification of b-exotoxin production, plasmids encoding b-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, p. 3172-3179, 1990.

LI, J. Bacterial toxins. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 2, p. 545-556, 1992.

LIANG, Y.; PATEL, S. S.; DEAN, D. H. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA d-endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, p. 24719-24724, 1995.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 65 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 60).

NORIS, J. R. The classification of *B. thuringiensis*. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 27, p. 439-447, 1964.

ODDOU, P.; HARTMANN, H.; GEISER, M. Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 202, p. 676-680, 1991.

ORGANISATION MONDIAL DE LA SANTE - OMS. **Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of biocontrol agents of disease vectors**. Geneva: World Health Organization, 1987. 41 p.

RAVOAHANGIMALALA, O.; CHARLES, J. F.; SCHOELLER-RACCAUD, J. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxin in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). **Research in Microbiology**, Paris, v. 44, p. 271-278, 1993.

SCHENKEL, R. G. M.; FRACHON, E. Identification by gas chromatographe analysis of fatty acids of *Bacillus sp.* strains isolated from Brazilian soils. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2., 1990, Brasília. **Resumos...** Brasília: Embrapa-Cenargen, 1990. p. 97. (Embrapa-Cenargen. Documentos, 13).

SCHWARTZ, J. L.; JUTEAU, M.; GROCHULSKI, P.; CYGLER, M.; PRÉFONTAINE, G.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 410, p. 397-402, 1997.

SEBESTA, K.; FARKAS, J.; HORSKÁ, K.; VANKOVÁ, J. Thuringiensin, the Beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H. D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. p. 249-281.

SEDLANDER, R. K.; CAUGANT, D. A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J. M.; GILMOUR, M. N.; WHITTAN, T. S. Methods of multilocus enzyme eletrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v. 51, p. 873-884, 1986.

SLATIN, S. L.; ABRAMS, C. K.; ENGLISH, L. d-Endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 169, p. 765-772, 1990.

SOBERON, M.; BRAVO, A. Generalidades sobre *Bacillus thuringiensis*. In: METODOLOGIAS utilizadas en investigacion sobre bacterias entomopatogenas. Cidade do México: CYTED, 2001. 1 CD-ROM.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; TIGANO, M. S.; ARANTES, O. M. N. Caracterização de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 731-763.

STEFFAN, R. J.; ATLAS, R. M. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 45, p. 137-161, 1991.

THIE, N. M. R.; HOUSEMAN, J. G. Identification of cathepsin B, D and H in the larval midgut of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insect Biochemistry**, Cambridge, v. 20, p. 313-318, 1990.

VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 186, p. 239-247, 1989.

VISSER, B. A screening for the presence of four different crystal protein gene types in 25 *Bacillus thuringiensis* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 58, p. 121-124, 1989.

WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In: KRIEG, A.; HUGER, A. M. **Mitteilungen aus der biologischen bundesanstalt für land und forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft**. Berlim: Paul Parey, 1986. v. 233, p. 37-50.

WELTENS, R.; PEFFEROEN, M.; STEELS, P.; VAN KERKHOVE, E. Electrophysiological measurements and cable analysis of coleopteran midgut epithelium: effect of ionic changes and of an insecticidal product. **Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie**, Liege, v. 100, p. 6, 1992.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 40, p. 549-576, 1986.

WOLFERSBERGER, M. G. V-ATPase-energized epithelia and biological insect control. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 172, p. 377-386, 1992.

WRIGHT, D. J.; IQBAL, M.; GRANERO, F.; FERRÉ, J. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1814-1819, 1997.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnological Processes**, New York, v. 3, p. 315-343, 1984.

Fungos Agentes de Controle Biológico

Myrian Silvana Tigano
Sueli Corrêa Marques de Mello

Introdução

A crescente conscientização da sociedade quanto ao uso indiscriminado dos agrotóxicos e a necessidade de se preservar o meio ambiente e a saúde humana, especialmente nos países desenvolvidos, permite-nos antever que os produtos biológicos tornar-se-ão, em curto prazo, fortes competidores dos agroquímicos. O uso de fungos para controle de pragas é um tema que faz parte de programas de pesquisa com resultados promissores em vários países. Diferentes estratégias de biocontrole estão disponíveis e devem ser utilizadas de acordo com cada situação particular, após avaliação cuidadosa, levando-se em conta não apenas os aspectos relacionados à espécie-alvo e ao agente de biocontrole, como também as interações ecológicas envolvidas.

A maioria dos produtos à base de fungos, disponibilizados para comercialização no exterior, é de biopesticidas registrados e apresenta qualidade quanto à formulação, à concentração de ingrediente ativo e à vida de prateleira. Esses produtos geralmente são acompanhados de um processo que inclui a descoberta do fungo agente de biocontrole, o desenvolvimento do produto, a avaliação de mercado, a formulação, o desenvolvimento de processo com extensiva avaliação de eficácia, o registro, *scale up* e testes de mercado

(HEBBAR; LUMSDEN, 1999). Esses produtos apresentam praticidade de uso, sendo formulados em grânulos dispersantes em água ou óleos emulsionáveis ou em forma de pó, a serem adicionados diretamente ao tanque do pulverizador. No Brasil, no entanto, o uso de produtos biológicos à base de fungos para controle de pragas ainda necessita de maior atenção dos segmentos pesquisa, agências de fomento e indústria, a fim de que possa materializar-se como alternativa ou como parte de uma abordagem de manejo integrado para os sistemas de produção agrícolas.

Noções Básicas Sobre os Fungos

Os fungos representam um grupo heterogêneo formado por diversos organismos unicelulares ou pluricelulares que se alimentam da absorção direta de nutrientes. Os alimentos dissolvem-se por causa das enzimas que eles secretam e, em seguida, são absorvidos através da fina parede da célula e se distribuem por difusão simples no protoplasma (FUNGOS, 2006). Esses organismos vivem como saprófitas, parasitas ou simbioses e, embora estejam entre os de maior número de espécies na natureza, estima-se que apenas 5% do total das espécies tenha sido descrito e estudado.

Modificações nos conceitos taxonômicos e nas formas de classificação dos fungos têm ocorrido de maneira acelerada nos últimos anos, principalmente, devido à incorporação de novas técnicas aplicadas à ciência taxonômica, a exemplo da análise de proteínas e de açúcares, além de outras biotecnologias como as baseadas na análise genômica e na caracterização molecular (FIGUEIREDO, 2006). O *Dictionary of the Fungi* em sua nona edição preparada pelo *International Mycological Institute* (KIRK, 2001) distribui esses organismos em três reinos, sendo que os fungos verdadeiros se encontram no reino Fungi, abrangendo quatro divisões: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota e Zigomycota.

Os Deuteromycetes, caracterizados pela ausência de um teleomorfo (fase perfeita ou estado sexual) e também denominados fungos mitospóricos ou imperfeitos, não são formalmente incluídos nessa classificação, pois representam uma classificação artificial. A maioria deles é anamorfa de Ascomycetes, porém, alguns têm afinidades com Basidiomycetes. Para muitos deles, os teleomorfos são desconhecidos e, para outros, não foram ainda descritos ou reconhecidos. Há ainda os que aparentemente perderam a função sexual, em alguns casos, recuperada por mecanismos, como, por exemplo: o ciclo parassexual. Entretanto, a taxonomia dos deuteromicetos, embora artificial, torna-se necessária para uma identificação prática de organismos importantes (PUTZKE; PUTZKE, 2004).

Os Fungos Como Agentes de Controle Biológico de Pragas Agrícolas

Os fungos, agentes de controle biológico, são patógenos de pragas tais como:

- Patógenos de invertebrados conhecidos, também, como fungos entomopatogênicos.
- Fungos que inibem os fitopatógenos por meio de diversos mecanismos como: competição, parasitismo (hiperparasitas) e antibiose.
- Patógenos de plantas daninhas que são fungos fitopatogênicos e, em geral, apresentam certa especificidade para as espécies-alvo, pragas de culturas ou poluidoras de alguns ambientes.

Os bioinseticidas representam o principal segmento de biopesticidas e compreendem ampla diversidade de microrganismos. Entre estes, os fungos entomopatogênicos têm recebido maior atenção como agentes de biocontrole amigáveis ao ambiente. Já as ações relacionadas ao desenvolvimento de biofungicidas representam uma área de pesquisa relativamente nova que têm tido

grandes avanços, especialmente, com espécies de fungos do gênero *Trichoderma*. O controle biológico de plantas daninhas, por sua vez, tem sido pesquisado há vários anos. Existem relatos de mais de 100 patógenos de plantas daninhas. A maioria dos bioherbicidas que tem logrado chegar ao mercado é à base de fungos. Todavia, o sucesso desses produtos tem sido limitado, devido a sua inabilidade para competir com os químicos.

Nesta revisão, a ênfase é dada aos fungos entomopatogênicos e patógenos de doenças que apresentam maior possibilidade de serem utilizados no desenvolvimento e no registro de produtos biológicos no Brasil.

Fungos Entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos pertencem a aproximadamente 90 gêneros e 700 espécies (ALVES, 1998). Eles são encontrados em ambientes aquáticos, terrestres e subterrâneos e representam 80% das doenças dos insetos das diversas ordens, ocorrendo em diferentes estádios de desenvolvimento do hospedeiro. Além dos insetos, esses fungos podem infectar outros invertebrados, tais como: nematóides e ácaros. As espécies mais importantes como agentes de controle biológico encontram-se na ordem entomophthorales dos Zygomycota e nos fungos mitospóricos ou imperfeitos.

Beauveria bassiana Vuill e *Metarhizium anisopliae* Sorok são fungos mitospóricos cosmopolitas, freqüentemente, encontrados na natureza. Representam as espécies mais estudadas como agentes de controle biológico de insetos-praga desde o século XIX. No Brasil, *M. anisopliae* e *B. bassiana* despertaram interesse a partir do início da década de 1970, com os primeiros estudos desenvolvidos no emprego de *M. anisopliae* para o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar no Nordeste.

A mais comum via de penetração desses fungos no hospedeiro é pelo tegumento, embora a infecção via oral seja possível. O conídio adere à cutícula,

germina e penetra através de processos mecânicos e enzimáticos. A adesão significa a fixação do propágulo sobre a superfície do hospedeiro. Esse fenômeno é complexo, envolvendo propriedades físicas e químicas do patógeno, do hospedeiro e de suas interações. A germinação dos conídios sobre o tegumento se dá em função das exigências nutricionais e microclimáticas. Depois da germinação, pode ocorrer a formação de apressório - uma intumescência produzida na extremidade do tubo germinativo ou hifa que se adere à superfície do hospedeiro para auxiliar na penetração, o que envolve processos físicos e enzimáticos. No hemocelo do hospedeiro, o micélio se ramifica formando corpos hifais ou células leveduriformes. A morte do hospedeiro se dá por uma combinação de fatores, tais como ação de toxinas do fungo (por exemplo, os ciclopeptídeos, beauvericina e dextruxinas, para *B. bassiana* e *M. anisopliae*, respectivamente), obstrução física da circulação da hemolinfa, invasão de órgãos e falta de nutrientes. A morte do hospedeiro ocorre antes que o fungo tenha colonizado todo o hemocele. Depois da morte, as hifas normalmente emergem do cadáver e, sob condições apropriadas de temperatura e umidade, produzem conídios no exterior do hospedeiro. Os conídios são então dispersos pelo vento e pela água. Vários fatores bióticos e abióticos podem interferir no ciclo de desenvolvimento do fungo entomopatogênico (ALVES, 1998; GOETTEL; INGLIS, 1997).

Isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* podem ser obtidos tanto de seus hospedeiros quanto de amostras de solo. A identificação dessas espécies é baseada, principalmente, em critérios morfológicos, utilizando chaves para identificação, como as encontradas em Alves (1998), Humber (1997) e Samson, Evans e Latge (1988).

Por muito tempo, a sistemática dos fungos entomopatogênicos foi conduzida com base em características fenotípicas, como aquelas relacionadas à morfologia, à fisiologia e à virulência. Essas características são influenciadas pelas condições ambientais e, em geral, são parâmetros quantitativos, o que

dificulta a análise dos resultados. Atualmente, empregam-se métodos de detecção do polimorfismo genético em nível do DNA, menos suscetíveis às variações do ambiente. Os marcadores moleculares representam segmentos do DNA que correspondem a regiões, expressas ou não, do genoma. Essas regiões do DNA podem ser específicas ou arbitrárias (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). O uso de marcadores moleculares tem auxiliado na resolução de questões geradas pela taxonomia clássica, na identificação de gêneros e espécies, bem como na caracterização de isolados específicos com potencial com agentes de controle biológico. Os marcadores moleculares mais utilizados atualmente na caracterização de fungos entomopatogênicos são os baseados na amplificação de seqüências de DNA por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que exige pequenas quantidades de DNA.

Driver, Milner e Trueman (2000) revisaram a taxonomia do gênero *Metarhizium* utilizando dados de seqüências da região ITS do rDNA de 123 isolados reconhecidos como *M. anisopliae*, *M. flavoviride* ou *M. album*. Um alto nível de diversidade genética foi encontrado em dados de seqüências dessa região, permitindo melhor resolução em nível de espécies e variedades. Para *M. anisopliae*, quatro grupos foram reconhecidos: dois correspondendo às variedades determinadas pela taxonomia clássica, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *majus*; e os outros dois grupos, correspondendo a duas novas variedades descritas neste trabalho, *M. anisopliae* var. *acridum* e *M. anisopliae* var. *lepidiotum*. Os autores mostraram que esses agrupamentos, definidos em termos moleculares, representam grupos de isolados que também apresentam características biológicas e ecológicas semelhantes.

Quanto à segurança, os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentam baixa toxicidade e não infectam mamíferos. Eventualmente, esses fungos podem causar problemas de alergia em seres humanos, o que pode ser evitado com a adoção de medidas profiláticas na produção e aplicação, de modo a restringir o contato de pessoas com os fungos ou com os produtos à base deles (GOETTEL

et al., 2001). Experimentos em campo têm demonstrado que esses fungos não representam riscos para o meio ambiente, quando introduzidos como biopesticidas, pois não afetam a microflora e a fauna nativa (HU; ST. LEGER, 2002; IVIE et al., 2002; WANG et al., 2004).

Fungos Agentes de Controle de Fitopatógenos

Entre os vários exemplos de utilização de fungos como antagonistas no controle de doenças de plantas, podem ser citados, com grande potencial de desenvolvimento e registro no Brasil, os fungos mitospóricos: *Dicyma pulvinata* Arx para controle do mal-das-folhas da seringueira (MELLO; MELO; ÁVILA, 2005), *Gliocladium roseum* Bain para *Botrytis cinerea* Pers. e, principalmente, *Trichoderma* spp. Pers. Para controle de diversos patógenos (DE MARCO et al., 2000; LIMA, 2002; ETHUR et al., 2005; SILVESTRI et al., 2005). Esses antagonistas podem ser aplicados diretamente no solo e em tratamento de sementes (microbiolização das sementes) ou por inoculação das partes aéreas, como folhas e órgãos de propagação, a depender da parte da planta que se deseja proteger. Também, podem ter sua densidade populacional aumentada pela manipulação do ambiente.

As doenças das plantas são causadas por diferentes microrganismos, sendo estimadas em cerca de 70% as ocasionadas por fungos. Estes, além de serem responsáveis por grandes perdas agrícolas, tornam mais onerosos os custos da produção, requerendo aplicações freqüentes de fungicidas. Os sintomas dessas doenças fúngicas podem ocorrer durante todo o ciclo da cultura, diversificando sua gravidade conforme a região e, principalmente, em função das variedades cultivadas, das condições edafoclimáticas e dos sistemas de manejo empregados. São estimadas perdas anuais em torno de 15% a 20% da produção, porém, existem casos em que as perdas chegam a 100%. Justificam-se, portanto, os esforços contínuos na busca de recursos tecnológicos eficazes e seguros para

garantir a rentabilidade do agricultor. Nesse sentido, o controle biológico, além de constituir alternativa saudável ao uso dos fungicidas químicos, oferece respostas para muitos problemas enfrentados na agricultura, quando os métodos tradicionais de controle não produzem resultado satisfatório, sobretudo, no caso de patógenos de solo.

A maioria dos agentes empregados no biocontrole das doenças fúngicas apresenta certo grau de especialização. Espécies de *Trichoderma*, entretanto, têm sido relatadas como parasitas de uma extensa gama de fitopatógenos, embora a efetividade no controle de um grupo particular de fitopatógenos possa variar de acordo com o isolado e com sua particular adaptabilidade às condições específicas de umidade, acidez do solo e temperatura. Pelo exposto, esse gênero de antagonistas tem sido o mais estudado para desenvolvimento de biofungicidas e será objeto da presente revisão.

Os fungos do gênero *Trichoderma* possuem características que os favorecem, em termos de sobrevivência no ambiente e que, ao mesmo tempo, tornam-nos vantajosos como agentes de biocontrole: são saprófitas, apresentando rapidez na colonização de substrato, com requerimentos nutricionais mínimos; produzem clamidósporos que são estruturas de resistência para sobreviver sob condições climáticas adversas; produzem, ainda, substâncias tóxicas (antibióticos), bem como enzimas degradadoras de parede celular de outros fungos (proteases, lipases), sendo igualmente capazes de degradar vários carboidratos estruturais e não estruturais. Desse modo, não é surpresa que as espécies de *Trichoderma* sejam componentes dominantes da micoflora do solo.

Foi a partir do trabalho pioneiro de Weindling (1932) que se constatou a capacidade de *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz (= *Trichoderma viride* Pers.; Fr) parasitar importantes patógenos de solo em culturas. Desde então, foram desenvolvidos vários trabalhos visando à utilização de espécies de *Trichoderma* para fins de controle biológico de patógenos de plantas. Homer, Bell e Jawarski

(1972) realizaram o primeiro experimento de biocontrole, sob condições de campo, usando esse antagonista.

Esse gênero, introduzido por Persoon (1794), é constituído de espécies de fungos anamórficos que podem ser encontrados em diversos *habitats*. Isolado de amostras de solo e de estruturas de seus hospedeiros (esclerócios, por exemplo), pode ser manipulado em laboratório e aplicado em seu ambiente natural.

O gênero *Trichoderma* é freqüentemente reconhecido por suas características macroscópicas, tais como rápido crescimento em meios de cultura, micélio aéreo esparso e pústulas conidiogênicas verdes ou brancas (RIFAI, 1969; BISSET, 1984). Em relação a suas características microscópicas, Rifai (1969) propôs um delineamento genérico, aceito até hoje, pelo qual reconhecem-se nove espécies agregadas: *T. hamatum*, *T. viride*, *T. auroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*, *T. longibrachiatum*, *T. polysporum*, *T. glaucum*. Essas espécies são identificadas com base nas características descritas a seguir: os conidióforos são ramificados repetidas vezes, em geral, sob a forma dendrítica regular, ou seja, em vários níveis, com as ramificações primárias produzindo as secundárias menores as quais também podem se ramificar, sucessivamente, finalizando, em determinadas espécies, com apêndices terminais estéreis. As fiáides variam de ampuliformes a lageniformes e são usualmente constrictas na base, intumescidas na parte mediana e, abruptamente, atenuadas próximo à região apical, formando um “pescoço” subcilíndrico curto. Estas são dispostas em verticilos terminais nas ramificações do conidióforo ou, com menos freqüência, isoladamente ou em esporas logo abaixo do septo localizado ao longo do conidióforo. Os conídios podem ser hialinos ou, mais freqüentemente, verdes, com parede lisa ou rugosa, dependendo da espécie. Clamidióforos, em geral presentes no micélio submerso, podem ser tanto intercalares, como terminais. Quando conhecidos, os teleomorfos de *Trichoderma* encontram-se, sobretudo, no gênero *Hypocrea* Fr da classe dos Ascomycetes. Chaves para identificação das espécies estão disponíveis na literatura, como as de Gams e Bisset (1998) e de Samuels et al. (2005).

Entretanto, de acordo com o conceito proposto por Bisset (1991), que inclui todos os anamorfos de *Hipocrea* nesse gênero, uma clara definição morfológica para o gênero *Trichoderma* constitui ainda problema, pois a estrutura dos conidióforos é bastante variável e, em muitos casos, superficialmente lembram os gênero *Gliocladium* Corda ou *Verticillium* Nees. Talvez as espécies a serem acomodadas nesse gênero possam, em alguns casos, ser resolvidas tão-somente pelas conexões com seus teleomorfos, que no caso de *Gliocladium*, parece ser polifilético e a partir de estudos de relacionamento genético, mediante investigação molecular (GAMS; BISSETT, 1998).

Os mecanismos de ação pelos quais o *Trichoderma* pode atuar são: antibiose, hiperparasitismo, competição. O conhecimento desses mecanismos é de fundamental importância no emprego de métodos racionais de melhoramento genético e para aumentar a vantagem competitiva do agente de biocontrole no ambiente (MENEZES, 2002). Esses mecanismos variam de espécie para espécie e, também, de linhagem para linhagem dentro da mesma espécie, de acordo com a interação hospedeiro-parasita (MELO, 1998). Um dos mais estudados é o parasitismo ou hiperparasitismo que, no caso de *Trichoderma* spp., ocorre em várias etapas, tais como: quimiotropismo, reconhecimento do patógeno, secreção de enzimas hidrolíticas e, finalmente, lise celular (CHET, 1987).

Vale mencionar ainda o efeito direto de algumas linhagens de *Trichoderma* spp. na ativação de defesas da planta e atuando como promotores de crescimento. A aplicação do fungo tem respostas, sobretudo, no aumento do peso seco, na área foliar, na altura e na precocidade de germinação e florescimento. Também, tem sido constatado acréscimo no desenvolvimento de raízes em plantas de milho, bem como maior profundidade alcançada por elas, fazendo com que essas plantas fiquem mais resistentes à seca. Algumas espécies favorecem a solubilização de nutrientes na rizosfera, tornando-os mais disponíveis à absorção pelas raízes e, conseqüentemente, reduzindo a necessidade de adubações nas culturas (BAILEY; LUMSDEN, 1998).

Antes de se utilizar um agente microbiano em programas de biocontrole, é importante a caracterização do agente, pois isso, além de permitir estudos ecológicos relacionados ao impacto do novo organismo introduzido no ambiente, facilita o acompanhamento da pureza durante os processos de produção e de comercialização e, ainda, o monitoramento da eficiência e da persistência da linhagem na área tratada. Com a caracterização, é possível discriminar as diversas linhagens pelo conhecimento de seus padrões fisiológicos, morfológicos e genéticos (SILVA, 2000). A análise das várias características fornece, ainda, suporte para resolver questões geradas pela sistemática clássica na identificação de espécies, assim como permitir a análise filogenética de gêneros e espécies próximas (SOSA-GÓMEZ; TIGANO; ARANTES, 1998).

A caracterização morfológica de fungos é baseada na análise de aspectos morfológicos tanto em nível microscópico, mediante estudo das formas e dimensões de estruturas reprodutivas e vegetativas e dos processos de formação de conídios (conidiogênese), quanto em nível macroscópico, pela análise do aspecto das culturas em meios definidos. Essas características morfológicas nem sempre são suficientes para diferenciar os organismos em níveis intra e infra-específico.

A caracterização isoenzimática permite a diferenciação de linhagens em perfil de eletroforese. A determinação de atividades enzimáticas, por sua vez, pode ser realizada pela leitura de halos de degradação em meios de cultura sólidos ou pela avaliação indireta em filtrados de culturas em meio líquido, utilizando reações específicas para determinar a atividade de cada enzima. Entretanto, as diferenças nas atividades enzimáticas em geral não permitem um agrupamento taxonômico dos isolados e raramente estão relacionadas com outros critérios de diferenciação (SILVA, 2000). Embora as isoenzimas possam ser incluídas na classe de marcadores bioquímicos, essa técnica é bastante dependente das condições de crescimento do fungo (SILVA, 2000).

Técnicas baseadas na genética molecular permitem identificar polimorfismo diretamente na sequência de DNA, possibilitando a avaliação de variações gênicas entre indivíduos e populações (STRONGMAN; MCKAY, 1993). RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), bem como estudos de seqüências de r-DNA (ITS-1, por exemplo), amplamente empregados em taxonomia molecular de fungos, têm se mostrado úteis na diferenciação de isolados de *Trichoderma* spp. (LIMA, 2002).

Finalmente, a caracterização fisiológica permite não apenas determinar a variabilidade de isolados, mas também avaliar o potencial de utilização de certos isolados, pelo conhecimento da patogenicidade a um ou vários hospedeiros, taxa de crescimento, capacidade reprodutiva e produção de metabólitos.

Sucesso no uso de *Trichoderma* para biocontrole de doenças tem sido documentado com as mais diversas culturas, contra vários patógenos, a exemplo de *Gaeumannomyces graminis* Arx & D. L. Oliver, *Phytophthora megasperma* Drech. f. sp. *glicinea* Kuan & Erwin, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary, *Cylindrocladium scoparium* Morgan, *Pythium aphanidermatum* Fitzp., *P. ultimum* Trow. e *Fusarium oxysporum* Schlecht (ELAD; CHET; KATAN, 1980; SIVAN; ELAD; CHET, 1984; SIVAN; CHET, 1989; ELAD, 2000; HARMAN, 2000; LEWIS; LUMSDEN, 2001). Esses patógenos de solo, além de causar grandes perdas econômicas, podem permanecer no ambiente por vários ciclos produtivos, através de estruturas de resistências que germinam sob condições favoráveis. *Trichoderma* tem a capacidade de atuar como destruidor de hifas, paredes de escleródios e outras estruturas dos patógenos.

Várias espécies de *Trichoderma*, além de serem particularmente atrativas no controle de patógenos de solo, em especial em culturas anuais, como o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), soja (*Glycine Max* Merrill), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e milho (*Zea mays* L.), vêm demonstrando, conforme se pode observar nos inúmeros casos citados na literatura, ter potencial de uso contra patógenos das partes aéreas (ELAD, 2000).

O acúmulo de informações sobre a capacidade antagônica e a habilidade de colonização e proliferação em diferentes *habitats*, associado a sistemas de produção massal, formulação e aplicação eficientes tem possibilitado o desenvolvimento de produtos estáveis à base de *Trichoderma* spp. (LIMA, 2002). Hoje existem vários produtos em comercialização nos Estados Unidos, Europa e Israel, como por exemplo, Rootshield™, T-22 Planterbox, Trichodex, Binab-T, BioFungus e Trichoderma 2000.

Apesar da falta de produtos registrados no Brasil, diversos biofungicidas à base de *Trichoderma* spp. vêm sendo desenvolvidos e colocados no mercado sob diversas formas (líquida, gel ou pó solúvel em água). Todavia, ao contrário dos produtos comercializados no exterior, grande parte dos produtos brasileiros não obedece a padrões mínimos de qualidade, apresentando, entre outros, os seguintes problemas: baixa capacidade germinativa dos propágulos, concentrações de propágulos não condizentes com as informações contidas nos rótulos, curto período de vida de prateleira, índices elevados de contaminação. Sendo assim, há necessidade de maior atenção por parte dos órgãos governamentais no que se refere à regulamentação e ao controle da produção dos biofungicidas não só para melhor aproveitamento do potencial desses fungos como agentes de biocontrole como também para evitar que a tecnologia se torne desacreditada.

Considerações Finais

Os fungos são um grupo de organismos complexo, distribuído em três reinos, sendo que a maioria daqueles usados em controle biológico não se enquadra em nenhuma classificação formal. Pertencem a um grupo chamado de fungos mitospóricos que são, na verdade, fases anamorfás (assexuadas) de Ascomycetes ou de Basidiomycetes.

Os fungos entomopatogênicos estão, em sua maioria, na ordem entomophthorales dos Zygomycetes, distribuídos em 90 gêneros e 700 famílias. São encontrados nos mais diversos ambientes e contribuem com 80% das doenças dos insetos, atacando também outros invertebrados.

Beauveria bassiana e *Metarhizium anisopliae* são fungos mitospóricos cosmopolitas, freqüentemente encontrados na natureza, e são as espécies mais estudadas como agentes de controle biológico de insetos-praga.

No biocontrole de fitopatógenos, certos fungos têm demonstrado eficiência por meio da introdução de antagonistas, tanto no solo quanto nas sementes, em outros órgãos de propagação e pela manipulação do ambiente. Entre os agentes de biocontrole mais estudados, têm-se destacado espécies do gênero *Trichoderma* spp.

No Brasil, apesar das perspectivas favoráveis para o mercado de biopesticidas, há uma série de dificuldades a ser superada. Muitas delas poderão ser solucionadas, pelo controle mais rigoroso dos processos de desenvolvimento e de comercialização, passando por regras claras quanto ao registro desses produtos. Há necessidade de atenção por parte da pesquisa, especialmente, nos aspectos da produção, formulação e aplicação. Ao contrário do que ocorre no Brasil, os bons produtos comercializados no exterior apresentam maior concentração de ingrediente ativo e maior vida de prateleira. Alguns produtos podem ser armazenados por mais de oito meses à temperatura ambiente. Além disso, seu uso é bem mais prático, podendo ser formulados como grânulos dispersíveis em água ou óleos emulsionáveis e serem adicionados diretamente ao tanque do pulverizador.

Referências

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.

BAILEY, B. A.; LUMSDEN, R. D. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Ed.). ***Trichoderma and gliocladium: enzymes, biological control and commercial applications***. London: Taylor & Francis, 1998. v. 2, p. 185-204.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma* I. Section *Logibrachiatum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 62, p. 924-931, 1984.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma* II. Infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, p. 2357-2372, 1991.

CHET, I. *Trichoderma*: application, mode of action, and potencial as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: CHET, I. (Ed.). **Innovative approaches to plant disease control**. New York: John Wiley, 1987. p. 137-160.

DE MARCO, J. L.; LIMA, L. H. C.; SOUSA, M. V. de; FELIX, C. R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 16, p. 383-386, 2000.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 134-150, 2000.

ELAD, Y. *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases: control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, p. 139-146, 1996.

ELAD, Y.; CHET, I.; KATAN, J. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, p. 119-121, 1980.

ELAD, Y. Biocontrol of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, Surrey, v. 19, p. 709-714, 2000.

ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A. C. F.; STEFANELO, D. R.; ROCHA, E. K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 27-133, 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p.

FIGUEIREDO, M. B. **Noções básicas sobre fungos**. Disponível em: < http://www.geocities.com/~esabio/mario/nocoes_basicas_fungos.htm >. Acesso em: 31 jan. 2006.

FUNGOS. Disponível em: < <http://cienciasecia.vilabol.uol.com.br/fungos.htm>>. Acesso em: 31 jan. 2006.

GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Ed.). ***Trichoderma and Gliocladium***: basic biology, taxonomy and genetics. London: Taylor & Francis, 1998. v. 1, p. 3-34.

GOETTEL, M. S.; HAJEK, A. E.; SIEGEL, J. P.; EVANS, H. C. Safety of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C. W.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential**. Oxon: CABI Publishing, 2001. p. 347-376.

GOETTEL, M. S.; INGLIS, G. D. Fungi: hyphomycetes. In: LACEY, L. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. New York: Academic Press, 1997. p. 213- 249.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* t-22. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, p. 377-393, 2000.

HEBBAR, K. P.; LUMSDEN, R. D. Biological control of seedling diseases. In: HALL, F. R.; MENN, J. J. (Ed.). **Biopesticides: use and delivery**. Totowa: Humana Press, 1999. p. 103-116.

HOMER, W. D.; BELL, D. K.; JAWARSKI, C. A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biological control for *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 62, p. 442-447, 1972.

HU, G.; ST. LEGER, R. J. Field studies using a recombinant mucoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 12, p. 6383-6387, 2002.

HUMBER, R. A. Fungi: identification. In: LACEY, L. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. New York: Academic Press, 1997. p. 153-185.

IVIE, M. A.; POLLOCK, D. A.; GUSTAFSON, D. L.; IVIE, L. L.; RASOLOMANDIMBY, J.; SWEARINGEN, W. D. Field-based evaluation of biopesticide impacts on native biodiversity: Malagasy coleopteran and anti-locust entomopathogenic fungi. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 95, p. 651-660, 2002.

KIRK, P. M. **Dictionary of the fungi**. The Netherlands: CABI Publishing, 2001. 624 p.

KÜÇÜK, Ç.; KIVANÇ, M. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. **Turkish Journal of Biology**, v. 27, p. 247-253, 2003.

LEWIS, J. A.; LUMSDEN, R. D. Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, Surrey, v. 20, p. 49-56, 2001.

LIMA, A. L. **Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp. isoladas de solo de cerrado**. 2002. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v. 2, p. 18-67.

MELLO, S. C. M.; MELO, D. F.; ÁVILA, Z. R. de. **Avaliação de pesticidas sobre o crescimento e esporulação de *Dicyma pulvinata*, agente de biocontrole de *Microcyclus ulei***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 8 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 120).

MENEZES, J. P. ***Trichoderma* spp**: microrganismo utilizado no controle de fitopatógenos. 2002. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=91>>. Acesso em: 31 jan. 2006.

PERSOON, C. H. Dipositio methodica fungorum. **Romer's Neues Magazin Botanische**, v. 1, p. 81-128, 1794.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. 2. ed. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004. v. 1, 605 p.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycology**, v. 116, p. 1-56, 1969.

SAMSON, R. A.; EVANS, H. C.; LATGE, J. P. **Atlas of entomopathogenic fungi**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. 187 p.

SAMUELS, G. J.; CHAVERRRI, P.; FARR, D. F.; McCRAY, E. B. ***Trichoderma* online, systematic botany & mycology laboratory**. Disponível em: <<http://nt.arsgrin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>>. Acesso em: 3 nov. 2005.

SILVA, P. R. Q. **Transformação de *Trichoderma harzianum* com os genes egfp e b-tubulina**. 2000. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

SILVESTRI, P.; RIBEIRO, R. T. S.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; BARROS, N. M. Alternativas de controle de *Rhizoctonia* sp. no morangueiro. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 31, p. 153-157, 2005.

SIVAN, A.; CHET, I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, p. 198-203, 1989.

SIVAN, A.; ELAD, Y.; CHET, I. Biological control effects of a new isolate of *Trichodem harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, p. 498-501, 1984.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; TIGANO, M. S.; ARANTES, O. M. N. Caracterização de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 731-763.

STRONGMAN, D. B.; MCKAY, R. M. Discrimination between *Hirsutella longicolla* var. *longicolla* and *Hirsutella longicolla* var. *cornuta* using random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Mycologia**, New York, v. 85, p. 65-75, 1993.

WANG, C.; FAN, M.; LI, Z.; BUTT, T. M. Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. **Journal of Applied Microbiology**, Danvers, v. 96, p. 861-870, 2004.

WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasitic of other soil fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v. 22, p. 837-845, 1932.

Baculovírus: Agentes de Controle Biológico

Maria Elita Batista de Castro
Marlinda Lobo de Souza

Introdução

Cerca de 15% da perda da produção agrícola global é causada por insetos. O controle deles tem sido feito quase que totalmente por inseticidas químicos. Os inseticidas têm importante papel no desenvolvimento da produção agrícola, sobretudo, no que se refere ao manejo integrado de pragas e à agricultura sustentável. Todavia, o uso continuado de inseticidas químicos em dosagens e alvos inadequados, além dos efeitos causados pela poluição, pode favorecer o aumento da resistência dos insetos a esses produtos com conseqüente desequilíbrio biológico do meio. Tais problemas vêm reforçar a necessidade de incrementar estratégias alternativas para um manejo mais racional dos agroecossistemas. O uso de práticas integradas, incluindo o biológico natural, é alternativa que promove os baculovírus por serem capazes de causar doença crônica ou fatal nos insetos-alvo, sem trazer danos ao meio ambiente (SUMMERS et al., 1975).

Mais de 17 famílias ou grupos de vírus têm sido reconhecidos como patogênicos a insetos, dos quais os baculovírus têm sido os mais documentados (THEILMANN et al., 2005).

Agentes Seguros de Controle Biológico

Os baculovírus (do latim *baculum*) constituem o maior grupo de vírus que ataca insetos, predominantemente da ordem Lepidoptera (borboletas e mariposas) (FEDERICI, 1997). Alguns baculovírus têm sido identificados em outras ordens de insetos, tais como Hymenoptera (vespões), Diptera (moscas, mosquitos), Coleóptera, bem como em crustáceos, ordem Decapoda (camarões) e Arachnidae (ADAMS; McCLINTOCK, 1991; O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1994; THEILMANN et al., 2005).

Esses vírus são excelentes candidatos ao uso em controle biológico sendo, na maioria dos casos, bastante virulentos e específicos a seus hospedeiros e, portanto, seguros à saúde humana e ao meio ambiente. Não causam impactos negativos a plantas, mamíferos, pássaros, peixes ou mesmo a insetos não-alvo. Nos últimos vinte anos, testes de segurança têm sido feitos e nenhum problema de saúde ou ambiental foi documentado. Diante disso, a Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1973) tem recomendado concentrar, no grupo baculovírus, o desenvolvimento de vírus patogênicos a insetos.

O crescente interesse na utilização desses vírus para o controle biológico de insetos-praga, tanto na agricultura como em áreas florestais, tem sido reforçado pelos efeitos adversos decorrentes do emprego de inseticidas químicos. Vários baculovírus têm sido comercializados para o controle de diversas pragas: *Cydia pomonella* (CpGV), *Lymantria dispar* (LdMNPV), *Spodoptera exigua* (SeMNPV), *Trichoplusia ni* (TnSNPV) *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens* (ambos por HzSNPV) nos Estados Unidos; *Spodoptera exigua* (SeMNPV) e *Cydia pomonella* (CpGV) na Europa e pragas de floresta tais como *Orgyia pseudotsugata* (OpMNPV), *Choristoneura fumiferana* (CfMNPV) e *Neodiprion sertifer* (NeseNPV), em vários países, incluindo Canadá, EUA e Reino Unido (MOSCARDI, 1998).

No Brasil, destaca-se o uso do *Anticarsia gemmatilis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) para o controle da lagarta-da-soja, com uma

área tratada de 2,0 milhões de hectares de plantação da soja, representando o maior programa com aplicação de pesticida viral no mundo (MOSCARDI, 1999; MOSCARDI; MORALES; SANTOS, 2002; MOSCARDI; SANTOS, 2005). A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia colabora com esse programa estudando a caracterização morfológica, bioquímica e molecular do *Anticarsia gemmatalis* MNPV (DALMOLIN et al., 2005; CARPES et al., 2005; SOUZA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2001; CASTRO; SOUZA; BILIMORIA, 1999; RIBEIRO; SOUZA; KITAJIMA, 1998; CASTRO et al., 1997). Outros dois vírus também têm se apresentado com grande potencial para o uso no controle de pragas: o *Spodoptera frugiperda nucleopolyhedrovirus*, em formulação pó molhável, para o controle da lagarta-do-cartucho-do-milho (Embrapa Milho e Sorgo) e *Erinnyis ello granulovirus*, ainda empregado na forma impura, para controle do mandarová-da-mandioca e do mandarová-da-seringueira (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. – EPAGRI) e (Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR). Essas pragas causam severos danos à cultura da mandioca e da seringueira, e o combate é feito tradicionalmente com inseticidas químicos.

Atualmente, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia mantém uma Coleção de Vírus de Insetos com intuito de dar suporte básico à pesquisa aplicada na área de controle biológico, bem como para o desenvolvimento de estudos em áreas de patologia de insetos, virologia fundamental, taxonomia e filogenia de vírus, com o propósito de estabelecer um Banco de Germoplasma de Vírus Entomopatogênicos. A Coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia está sendo enriquecida pela introdução de novos isolados virais obtidos de coletas em campo e/ou de outras Coleções já existentes no País. A coleta sistemática no campo é feita quando a existência de vírus ainda não foi relatada para determinada espécie de inseto, em certa região, ou quando se pretende encontrar novos isolados de um dado vírus. A maioria dos vírus da Coleção está conservada a -20°C . Os vírus são de fácil armazenamento podendo ser congelados (-20°C ou -80°C) por vários anos (Tabela 1).

Tabela 1. Coleção de Isolados de Baculovírus da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Isolados	Procedência	N° de Isolados
<i>Agraulis sp</i> MNPV	Brasil (Distrito Federal)	01
<i>Anticarsia gemmatalis</i> NPV		
Isolados geográficos	Várias regiões do Brasil, Argentina e Uruguai	10
Isolados temporais	Brasil (Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso)	19
<i>Bombyx mori</i> NPV	Brasil (Paraná)	02
<i>Condylorrhiza vestigialis</i> MNPV	Brasil (Paraná)	02
<i>Cydia pomonella</i> GV	Argentina	01
<i>Dione juno juno</i> NPV	Brasil (Distrito Federal, Pará)	04
<i>Erinnyis ello</i> GV	Diferentes regiões do Brasil	05
	Brasil (Santa Catarina)	09
<i>Megalopyge albicolis</i> SNPV	Brasil (Distrito Federal)	01
<i>Spodoptera frugiperda</i> GV	Brasil (Minas Gerais)	03
<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV		
Isolados geográficos	Diferentes regiões do Brasil	07
Isolados temporais	Brasil (Minas Gerais)	05
<i>Spodoptera littoralis</i> MNPV	Reino Unido	01
TOTAL		70

Vetores de Expressão Gênica

Os baculovírus, além de seu potencial de aplicação como agentes de controle de insetos-praga, são utilizados como vetores de expressão de genes com a finalidade de produzir grandes quantidades de proteínas heterólogas em células de insetos para aplicações biotecnológicas. Mais recentemente, esses vetores têm-se mostrado bastante promissores para a indústria farmacêutica (KABA et al., 2004) e para terapia gênica em vertebrados (LIANG et al., 2003; TANI et al., 2003; GHOSH et al., 2002).

A maioria das pesquisas tem-se concentrado no estudo do *Autographa californica multiple nucleopolyedrovirus* (AcMNPV) devido a sua fácil propagação em cultura de células e a seu amplo espectro de hospedeiros.

Ecologia e Biologia

Os baculovírus ocorrem naturalmente em seus hospedeiros e as doenças causadas por esses agentes são freqüentes, em especial, em lepidópteros e himenópteros apresentando alta mortalidade larval. Os mecanismos pelos quais os vírus persistem no campo são o ponto-chave na ecologia dos baculovírus. A principal rota de transmissão viral em *Lepidoptera* é a liberação de partículas virais denominadas corpos de oclusão, OBs (do inglês *occlusion bodies*) que contaminam a folhagem por outras larvas suscetíveis (transmissão horizontal). Outra rota de transmissão é a vertical em que os adultos passam o vírus para sua progênie.

Por definição, um evento de doença em proporções epidêmicas é conhecido como uma epizootia que pode ocasionalmente devastar populações de determinadas espécies, sobretudo, quando há altos níveis de ocorrência de insetos (EVANS, 1986). A tendência de uma doença causada por baculovírus tornar uma epizootia depende da escala de dispersão e da persistência do vírus dentro e fora do hospedeiro. A epizootia natural, em geral, requer várias gerações do hospedeiro para se desenvolver. A distribuição e a abundância do hospedeiro são importantes fatores para determinar a eficiência do ciclo do vírus. Larvas mortas representam relevante fonte de inóculo para ocorrência e manutenção de epizootia em populações epidêmicas (CASTILLO; ACOSTA; CILIÉZAR, 1995).

Evans (1986) identificou dois tipos de fontes de inóculo viral: a primária e a secundária. A primária consiste no período em que nenhum hospedeiro suscetível está disponível, e a secundária, o vírus replica na larva que morre pela infecção de um inóculo primário, resultando na liberação de um inóculo secundário.

Uma larva em seu último estágio de desenvolvimento é capaz de produzir cerca de 10^{10} OBs, vírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e 10^{11} OBs, vírus do gênero *Granulovirus* (GV).

A forma viral oclusa, que é a mais usada para propagação horizontal da doença, é altamente estável no meio ambiente, permitindo persistência do vírus e subseqüentes infecções nas populações de insetos (FUNK; BRAUNAGEL; ROHRMANN, 1997). A capacidade de persistir fora do hospedeiro é uma das características marcantes dos NPVs e GVs. Porém, ela é afetada pela taxa em que as partículas OBS tornam inativas no ambiente natural nos períodos de baixa densidade do hospedeiro (CORY; HAILS; SAIT, 1997). Essas partículas podem permanecer no solo, em fendas de plantas, ou em outros refúgios por vários anos.

Enquanto os baculovírus continuam a ser o grupo de vírus de insetos mais bem estudado, surpreendentemente, mesmo com os avanços da biologia molecular e o desenvolvimento de modelos matemáticos, pouco se conhece sobre sua ecologia (CORY; HAILS; SAIT, 1997). O conhecimento da biologia desses vírus e de sua aplicação tem avançado de forma significativa. O emprego de diferentes técnicas de caracterização desses vírus é importante na busca de novos agentes de controle biológico e é essencial para o registro e avaliação de biopesticidas.

Modo de Ação e Replicação Viral

Parasitas Intracelulares Obrigatórios

Os vírus, diferentemente dos microrganismos, em geral, apresentam uma característica particular que é a existência de um hospedeiro para sua replicação (Figura 1). Ao serem ingeridos pelo inseto hospedeiro, utilizam a maquinaria dele para se multiplicar. Com a progressão da infecção, inúmeras partículas virais são formadas causando rompimento do tegumento do inseto e conseqüente liberação das partículas.

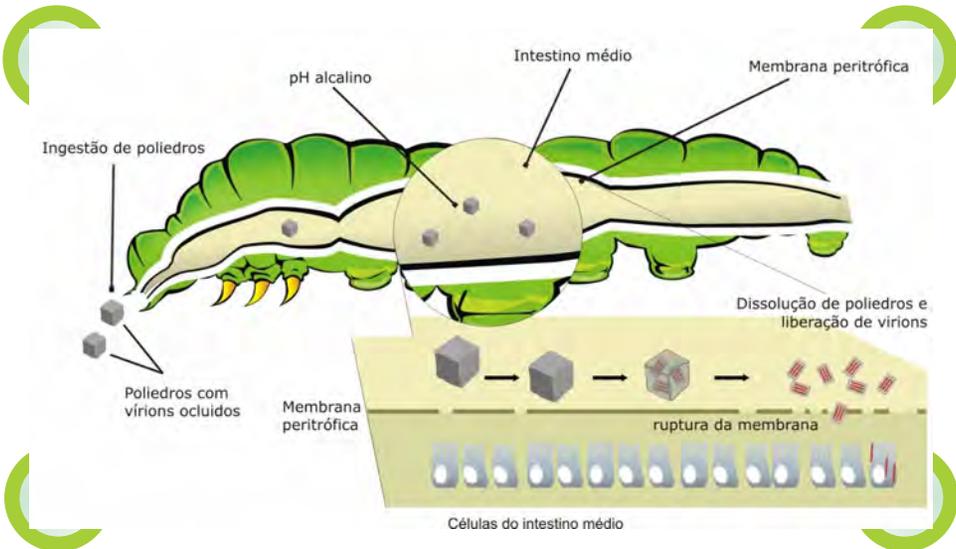


Figura 1. Esquema do processo inicial de infecção viral no intestino médio de uma lagarta infectada por baculovírus.

Fonte: Ilustração adaptada de Kalmakoff e Ward (2003).

Ciclo de Vida

A infecção se inicia quando lagartas se alimentam de folhas nas quais foram aplicados baculovírus. Os vírus ao infectar o inseto replicam em vários tecidos e podem romper componentes envolvidos em sua fisiologia interferindo na alimentação, na oviposição e no movimento do inseto. No terceiro/quarto dia de infecção, as larvas param de se alimentar pela perda de apetite e mais no final do ciclo apresentam sintomas como corpos flácidos, descoloração da epiderme, mobilidade reduzida e, frequentemente, dirigem-se para o topo das plantas, tornando-se presas pelos pseudópodes posteriores (geotropismo negativo), quando então morrem por infecção sistêmica (Figura 2). Diferentes vírus podem causar variados sintomas, porém, ambos: NPV e GV causam liquefação do inseto e fácil rompimento das cutículas liberando inúmeras partículas virais infecciosas no ambiente.



Figura 2. Lagarta *Anticarsia gemmatilis* infectada por baculovírus. Na fase tardia da infecção, a lagarta se posiciona de cabeça para baixo.

A principal rota de infecção dos baculovírus é por ingestão do alimento contaminado com o vírus na forma viral oclusa (OB). Ao alcançar o intestino médio do inseto, os OBs são rapidamente dissolvidos, devido ao pH alcalino e à ação de proteases presentes no meio, e os vírus derivados dos corpos de oclusão, ODVs (do inglês *occlusion derived viruses*), são então liberados atravessando a membrana peritrófica dando início à infecção das células colunares do epitélio (GRANADOS; LAWLER, 1981; HORTON; BURAND, 1993) que prossegue resultando em um ciclo de infecção bifásico (Figuras 1 e 3). Na primeira fase, os nucleocapsídeos são produzidos no núcleo da célula e liberados para o citoplasma formando os vírus extracelulares chamados de BVs (do inglês *budded viruses*) que são produzidos por brotamento na membrana plasmática da célula infectada. Esses vírus alcançam a hemolinfa dando origem à infecção sistêmica na larva hospedeira. Essas partículas (BV) são, portanto, responsáveis pela transmissão do vírus de célula para célula dentro do inseto, bem como em células de insetos em cultura (ENGELHARD et al., 1994). Na segunda fase, os nucleocapsídeos são envoltos no núcleo por uma membrana sintetizada *de novo*

e então imersos em uma matriz protéica cristalina formando os corpos de oclusão. Esses corpos de oclusão são altamente estáveis no meio ambiente, permitindo persistência e disseminação do vírus em populações de insetos no campo (FUNK; BRAUNAGEL; ROHRMANN, 1997).

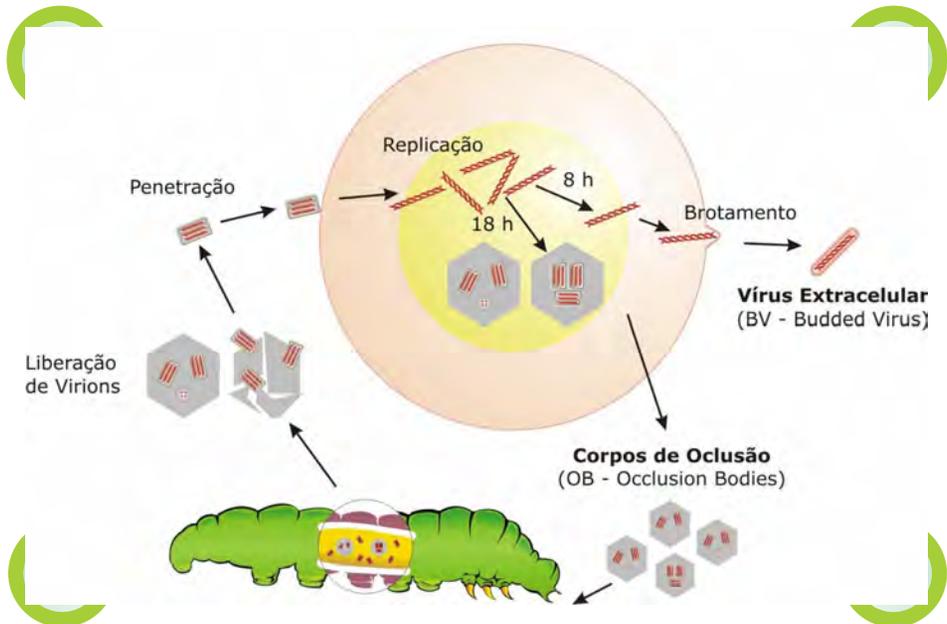


Figura 3. Ciclo representativo da replicação dos baculovírus.

A infecção se inicia quando a lagarta se alimenta de folhas de uma planta contaminada com partículas virais (corpos de oclusão) e estas alcançam o intestino da lagarta onde são dissolvidas liberando os virions que entram nas células por fusão com a membrana. No núcleo, essas partículas se replicam e formam, em um único ciclo, duas progênies infecciosas, os BVs que vão espalhar a infecção por todos os tecidos da lagarta e os OBs que são acumulados no núcleo levando à hipertrofia do núcleo e dos tecidos, resultando na liquefação do inseto e liberação das partículas para infectar mais insetos dando continuidade ao ciclo.

Produção em Sistemas *In Vivo* e *In Vitro*

A obrigatoriedade de replicação viral em hospedeiros muitas vezes constitui ponto de estrangulamento no processo de produção do vírus. Essas dificuldades tornam-se mais acentuadas, quando o espectro de hospedeiros suscetíveis é reduzido, e/ou ainda quando não existem condições adequadas para criação dos insetos, incluindo dieta artificial disponível, ou também não se dispõem de linhagens celulares de insetos estabelecidas e permissivas ao vírus.

Até o momento, os baculovírus são produzidos, principalmente, em larvas de insetos (Figura 4). Os vírus infectam somente insetos-alvo e espécies próximas. Esse processo é laborioso e difícil para produção em larga escala. Além disso, insetos são facilmente contaminados. A tecnologia moderna de cultura de células tem facilitado o crescimento de células de insetos em suspensão utilizando biorreatores. Sucessivamente, essas células podem ser infetadas com partículas extracelulares do baculovírus (BVs), após o que as células produzirão a forma oclusa do vírus (OB) encontrada na natureza. Apesar das limitações para produção de baculovírus *in vitro*, a extração e a purificação têm sido mais fácil nesse sistema e com muito mais eficiência comparada com a produção *in vivo*.



Figura 4. Lagarta crescida em dieta artificial.

Fenótipos Virais

Os vírus, até o momento, são a forma de vida mais simples recuperada de insetos. Consistem de um ácido nucléico circundado por um complexo protéico denominado capsídeo. O conjunto de ácido nucléico e capsídeo é referido como nucleocapsídeo.

Os baculovírus possuem um genoma que consiste de uma molécula de DNA fita dupla circular com o tamanho variando de 80 a 180 kb (pares de kilobases), podendo codificar de 100 a 200 proteínas (SMITH; SUMMERS, 1978; THEILMANN et al., 2005). São formados por nucleocapsídeos em forma de bastão, com 200 a 450nm de comprimento e 30 a 100nm de diâmetro, envoltos por um envelope composto por uma bicamada de lipídios, chamados vírions. Os vírions são adicionalmente protegidos por uma matriz protéica chamada de corpo de oclusão, formando os poliedros ou grânulos que têm como principal proteína a poliedrina ou granulina respectivamente. Essa forma de oclusão dá estabilidade física e biológica às partículas, tornando-as relativamente fáceis para formulação e aplicação pelo uso convencional.

Dois fenótipos alternantes são formados durante o ciclo de replicação viral, o vírus derivado do corpo de oclusão, ODV e o vírus extracelular BV. O genoma viral codifica proteínas estruturais e não estruturais localizadas no envelope e no capsídeo, para BV, e no envelope, no capsídeo e em corpos de oclusão, para ODV. Embora esses fenótipos sejam similares em estrutura, diferem na composição dos seus envelopes e na sua função. O ODV está imerso em uma estrutura cristalina protéica que ajuda proteger as partículas infecciosas da degradação ambiental. Nos NPVs, o ODV é composto de vírions contendo um único nucleocapsídeo (SNPV) ou vários nucleocapsídeos (MNPV). O envelope do BV é adaptado para movimento e infecção de tecidos dentro do inseto, enquanto o envelope do ODV é adaptado para interação com estrutura *poliedron* nos processos de oclusão e para facilitar a infecção do epitélio do intestino médio do inseto (Figura 5).

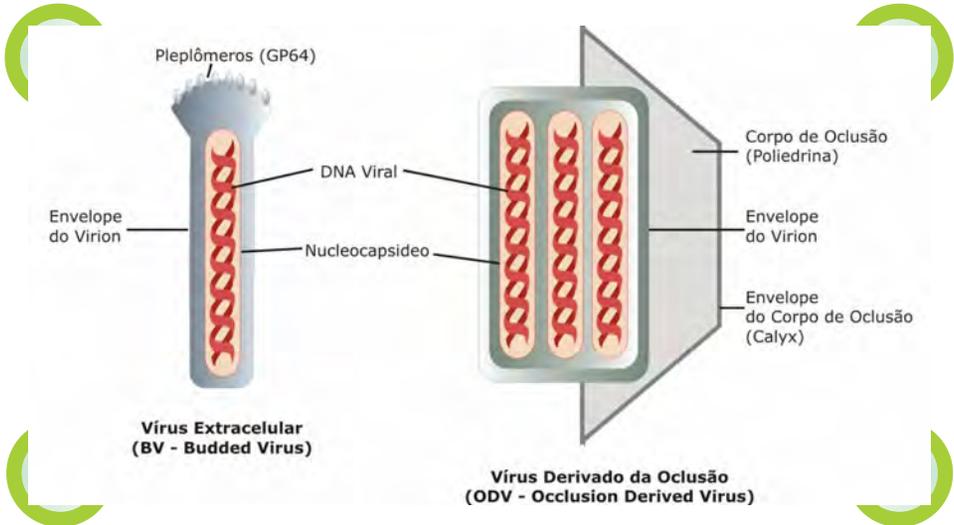


Figura 5. Diagrama representativo dos fenótipos BV (vírus extracelulares) e ODV (vírus derivado de corpos de oclusão).

Fonte: Ilustração adaptada de Kalmakoff e Ward (2003).

Nesta figura, podem ser observados a morfologia das partículas e seus componentes principais. Enquanto os fenótipos são idênticos quanto ao seu genoma (DNA viral, indicado no centro do diagrama), são diferentes quanto a sua composição lipídica e protéica. O fenótipo BV não é incluso, sendo seu envelope constituído principalmente da glicoproteína GP64. Apresenta em uma de suas extremidades (indicação na figura do BV) projeções denominadas de pleplômeros que são responsáveis pela disseminação do BV de célula para célula. O ODV é incluso numa matriz protéica formada predominantemente de uma proteína chamada poliedrina em NPV (ou granulina em GV).

Purificação de Partículas Virais

Para isolamento de vírus de insetos infectados, os procedimentos utilizados são distintos em se tratando de partículas OB e BV. Para obtenção de OBs, larvas mortas conservadas a -20°C são inicialmente maceradas para liberação das partículas virais dos tecidos. Em seguida, o material é filtrado através de diversas

camadas de gaze e lã de vidro que servem para remover fragmentos de cutícula e dos tecidos dos insetos. O material obtido (OBs) estará, em parte, purificado. Para obtenção de partículas BVs, hemolinfa coletada de lagartas no quarto dia de infecção é utilizada como inóculo para infecção de células em cultura. O sobrenadante dessas células infectadas contendo as partículas BVs é então utilizado para purificação do vírus. Para purificação completa tanto das partículas BVs como OBs, procedimentos de uma série de centrifugações baixas e altas, com gradientes de sacarose, são empregados. Partículas virais podem ser identificadas utilizando técnicas de microscopia eletrônica, de transmissão ou de varredura, bem como técnicas de imunocitoquímica. A morfologia do vírus pode servir como ajuda na diagnose rápida de vírus, em especial, quando combinado com microscopia de imunofluorescência que permite a visualização de amostras nas concentrações de 10^2 a 10^3 partículas/mL. No caso de partículas visíveis (OBs) em microscópio de luz, a quantificação pode ser feita por contagem das partículas em câmaras de Neubauer. Para quantificação de partículas BVs, o procedimento utilizado é a titulação viral, que é feita pelo método da diluição final ($TCID_{50}$) do sobrenadante de cultura de células contendo BVs (REED; MUENCH, 1938; O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1994).

Classificação Taxonômica

Periodicamente, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) reúne-se para revisão e atualização da taxonomia dos vírus e para publicação do relatório constando os ajustes/mudanças na classificação e na análise de propostas, tais como: inclusão, exclusão ou ainda alterações de espécies, gêneros e famílias. No ano de 2005, por exemplo, a Divisão de Virologia da União Internacional de Sociedades de Microbiologia, responsável pela nomenclatura e classificação de vírus, publicou o **VIIIth ICTV Report** que documenta o estado da arte em nomenclatura e taxonomia de vírus (FAUQUET et al., 2005).

Entre as famílias de vírus de insetos, a *Baculoviridae* é a de maior importância, compreendendo o maior grupo de vírus de insetos. Mais de 700 espécies de insetos já foram relatadas (ADAMS; McCLINTOCK, 1991; FEDERICI, 1997). Com base na morfologia (forma e tamanho) dos corpos de oclusão, essa família está dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) (THEILMANN et al., 2005).

Os vírus pertencentes ao gênero NPV produzem grandes corpos de oclusão variando de 0,15 a 15 μm que, devido a sua forma, são também chamados de poliedros. Cada poliedro pode conter múltiplos vírions. Enquanto os vírus pertencentes ao gênero GV são menores, com corpos de oclusão variando de 0,3 a 0,5 μm , são chamados de grânulos e, em geral, contêm somente um vírion.

Uma subdivisão dos NPVs em dois grupos, NPV I e NPV II, foi proposta com base em estudos filogenéticos, usando, inicialmente, o gene da poliedrina (*polh*) (ZANOTTO; KESSING; MARUNIAK, 1993). Essa subdivisão tem sido mantida por todos os genes conservados que foram usados nas análises filogenéticas realizadas até o momento (revisado por HERNIOU et al., 2003; NAKAI et al., 2003).

Nomenclatura dos Baculovírus

Por convenção, as espécies de baculovírus são conhecidas pelo nome científico do inseto hospedeiro no qual o vírus foi isolado pela primeira vez, seguido do gênero do baculovírus identificado, *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) ou *Granulovirus* (GV). Por exemplo:

- Gênero: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV)

Nome científico do hospedeiro (ex: *Autographa californica*) + NPV*

Espécie tipo: *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV)

*NPV com vários nucleocapsídeos por envelope dá-se a denominação de *multiple* (M), com somente um nucleocapsídeo por envelope *single* (S).

- Gênero: *Granulovirus* (GV)
Nome científico do hospedeiro (ex: *Cydia pomonella*) + GV
Espécie tipo: *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV)

Considerações Finais

Os baculovírus têm sido apresentados como agentes de grande potencial para uso em controle biológico por mais de meio século. Contudo, somente uns poucos têm alcançado sucesso como biopesticidas e, menos ainda, na produção em larga escala ou no âmbito de sua comercialização. Até agora, os biopesticidas representam pequena fração do mercado mundial de pesticidas. Porém, os riscos ao homem e ao ambiente, com o uso intensivo de pesticidas químicos de alta toxicidade e de amplo espectro, têm gerado demanda com a finalidade de explorar estratégias de controle de pragas que permitam a produção sustentada das culturas com o mínimo de impacto ambiental.

Os baculovírus são considerados excelentes candidatos por apresentar alta especificidade, sendo característica desejável quando insetos benéficos estão sendo conservados em um programa de manejo integrado (PMI) ou quando uma área ecologicamente sensível está sendo tratada. Com poucas exceções, os baculovírus são bastante específicos, infectando uma única espécie de insetos ou umas poucas espécies dentro do mesmo gênero como relatado em algumas publicações. Por sua vez, essa característica torna-se uma desvantagem quando o agricultor prefere usar um único produto para controlar uma variedade de pragas na cultura. Os baculovírus apresentam outras poucas desvantagens comparadas aos inseticidas químicos, tais como a ação relativamente lenta, sensibilidade à luz ultravioleta e requerimento de sistemas de produção *in vivo* que limitam a expansão de seu uso como bioinseticida.

Outra via para produção de baculovírus, que já começa a ser explorada, é a produção em sistemas de cultivos celulares. No entanto, existem dificuldades de

se produzir vírus nesses sistemas, sobretudo, devido à perda de virulência causada pela formação de mutantes.

O maior exemplo de sucesso no uso de inseticidas virais é o controle da lagarta-da-soja pelo baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV). A produção desse vírus para uso como bioinseticida no Brasil é essencialmente feita pela infecção da lagarta no campo estando, portanto, dependente da ocorrência natural da praga. Outras estratégias para produção em laboratórios estão sendo desenvolvidas, uma vez que há crescente demanda para aplicação desse vírus no campo.

Desde a década de 1970, o conhecimento da biologia e da aplicação desses bioinseticidas tem progredido rapidamente. O avanço e a utilização da biologia molecular, notadamente a partir de 1990, com o uso de técnicas de engenharia genética para ampliar a faixa de hospedeiros e diminuir o tempo de morte dos insetos, constituíram um passo para nova era no desenvolvimento de inseticidas mais eficazes a partir de baculovírus recombinantes.

Apesar do desenvolvimento da pesquisa básica em microrganismos usados no controle biológico, somente poucas instituições estão envolvidas em projetos de pesquisa, com limitada transferência de tecnologia e limitada colaboração entre profissionais com experiência nessa área.

Referências

ADAMS, J. R.; McCLINTOCK, T. J. Baculoviridae: nuclear polyhedrosis virus. In: ADAMS, J. R.; BONANI, J. R. (Ed.). **Atlas of invertebrate viruses**. Boca Raton: CRC, 1991. p. 87-204.

CARPES, M. P.; CASTRO, M. E. B.; SOARES, E. F.; VILLELA, A. G.; PINEDO, F. J. R.; RIBEIRO, B. M. The inhibitor of apoptosis gene (*iap-3*) of *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) encodes a functional IAP. **Archives of Virology**, New York, v. 150, p. 1549-1562, 2005.

CARRUTHERS, W. R.; CORY, J. S.; ENTWISTLE, P. F. Recovery of pine beauty moth (*Panolis flammea*) nuclear polyhedrosis-virus from pine foliage. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 52, p. 27-32, 1988.

CASTILLO, P.; ACOSTA, N.; CILIÉZAR, A. Control microbiológico de plagas artrópodas. In: CAVE, R. D. (Ed.). **Manual para la enseñanza del control biológico en América Latina**. Zamorano: Zamorano Academic Press, 1995. p. 51-72.

CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; ARAÚJO, S.; BILIMORIA, S. L. Replication of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 69, p. 40-45, 1997.

CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; BILIMORIA, S. L. Host-specific transcription of nucleopolyhedrovirus gene homologues in productive and abortive *Anticarsia gemmatalis* MNPV Infections. **Archives of Virology**, New York, v. 144, p. 1111-1121, 1999.

CORY, J. S.; HAILS, R. S.; SAIT, S. M. Baculovirus ecology. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 301-339.

DALMOLIN, C. C.; SILVA, F. R. da; MELLO, L. V.; RIGDEN, D. J.; CASTRO, M. E. B. Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of the DNA polymerase gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **Virus Research**, Amsterdam, v. 110, p. 99-109, 2005.

DUFFEY, S. S.; HOOVER, K.; BONNING, B.; HAMMOCK, B. D. The impact of host plant on the efficacy of baculoviruses. **Reviews of Pesticide Toxicology**, v. 3, p. 137-275, 1995.

ENGELHARD, E. K.; KAM-MORGAN, L. N. W.; WASHBURN, J. O.; VOLKMAN, L. E. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 3224, 1994.

EVANS, H. F. Ecology and epizootiology of baculoviruses. In: GRANDOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Ed.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v. 2, p. 89-132.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Ed.). **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 1259 p. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses.

FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum, 1997. p. 33-59.

FUNK, C. J.; BRAUNAGEL, S. C.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus structure. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum, 1997. p. 7-32.

GHOSH, S.; PARVEZ, M. K.; BANERJEE, K.; SARIN, S. K.; HASNAIN, S. E. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: a novel strategy. **Molecular Therapy**, v. 6, p. 5, 2002.

GRANADOS, R. R.; LAWLER, K. A. *In vitro* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. **Virology**, New York, v. 108, p. 297-308, 1981.

HERNIOU, E. A.; OLSZEWSKI, J. A.; CORY, J. S.; O'REILLY, D. S. The genome sequence and evolution of baculoviruses. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 48, p. 211-234, 2003.

HORTON, H. M.; BURAND, J. P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**, Washington, v. 67, p. 1860, 1993.

KABA, S. A.; SCHAAP, D.; ROODE, E. C.; NENE, V.; MUSOKE, A. J.; VLAK, J. M.; VAN OERS, M. M. Improved immunogenicity of novel baculovirus-derived *Theileria parva* p67 subunit antigens. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 121, p. 53-64, 2004.

KALMAKOFF, J.; WARD, V. K. **Baculoviruses**. Dunedin: University of Otago, 2003. Disponível em: <<http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/kalmakoff/baculo/baculo.html>>. Acesso em: 25 nov. 2005.

LIANG, C. Y.; WANG, H. Z.; LI, T. X.; HU, Z. H.; CHEN, X. W. High efficiency gene transfer into mammalian kidney cells using baculovirus vectors. **Archives of Virology**, New York, v. 149, p. 51-60, 2003.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 44, p. 257-289, 1999.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 509-539.

MOSCARDI, F.; MORALES, L.; SANTOS, B. The successful use of AgMNPV for the control of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in soybean in Brazil. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8.; INTERNATIONAL CONFERENCE ON BACILLUS THURINGIENSIS, 6.; ANNUAL MEETING OF THE SIP, 35., 2002, Foz do Iguassu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. p. 86-91. (Embrapa Soja. Documentos, 184; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 74).

MOSCARDI, F.; SANTOS, B. Produção comercial do nucleopoliedrovírus de *Anticarsia grmmatalis* Hubner (Lep.: Noctuidae) em laboratório. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 9., 2005, Recife. **Anais...** Recife: FIOCRUZ, 2005. p. 42.

NAKAI, M.; GOTO, C.; KANG, W.; SHIKATA, M.; LUQUE, T.; KUNIMI, Y. Genome sequence and organization of a *nucleopolyhedrovirus* isolated from the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai*. **Virology**, New York, v. 316, p. 171-183, 2003.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. New York: Oxford University Press, 1994. 347 p.

REED, L.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 27, p. 493, 1938.

RIBEIRO, B. M.; SOUZA, M. L.; KITAJIMA, E. W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 481-507.

RODRIGUES, J. C.; SOUZA, M. L.; O'REILLY, D.; VELLOSO, L. M.; PINEDO, F. J.; RAZUCK, F. B.; RIBEIRO, B.; RIBEIRO, B. M. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*) gene of *Antiacarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **Virus Genes**, Norwell-Mass, v. 22, p. 103-112, 2001.

SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. **Virology**, New York, v. 89, p. 517-527, 1978.

SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; SIHLER, W.; RIBEIRO, Z. M. A.; MOSCARDI, F. **Metodologias para caracterização de vírus de insetos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 13 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 13).

SUMMERS, M. D.; ENGLER, R.; FALCON, L. A.; VAIL, P. V. (Ed.). **Baculoviruses for insect pest control: safety considerations**. Washington: American Society for Microbiology, 1975. 186 p.

TANI, H.; LIMN, C. K.; YAP, C. C.; ONISHI, M.; NOZAKI, M.; NISHIMUNE, Y.; OKAHASHI, N.; KITAGAWA, Y. *In vitro* and *in vivo* gene delivery by recombinant baculoviruses. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, p. 9799-9808, 2003.

THEILMANN, D. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B.; JEHLE, J.; O'REILLY, D. R.; ROHRMANN, G. F.; THIEM, S.; VLAK, J. M. Family *Baculoviridae*. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Ed.). **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. p. 177-186. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The use of viruses for the control of insect pests and disease vectors: report of a Joint FAO/WHO Meeting on Insect Viruses**. Geneva, 1973. (World Health Organization Technical Report Series, 531).

ZANOTTO, P. M. A.; KESSING, B. D.; MARUNIAK, J. E. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 62, p. 147-164, 1993.

Produção, Formulação,
Aplicação e Comercialização
de Produtos à Base de
Agentes Biológicos



Tecnologia de Produção e Formulação de Nematóides Entomopatogênicos

Claudia Dolinski

Introdução

Como mostrado no Capítulo 4, nematóides são importantes agentes no controle biológico de insetos. Neste capítulo, será focada a produção e a formulação desses nematóides para que eles possam efetivamente ser usados no controle biológico.

Os nematóides pertencentes à família Mermitidae precisam de um hospedeiro para completar o ciclo de vida, sendo somente multiplicados *in vivo*. Muitos trabalhos têm sido realizados com a finalidade de se estabelecer o cultivo desses nematóides *in vitro*, contudo, sem sucesso (KAISER, 1991). Na década de 1970, a espécie *Romanomermis culicivorax*, entre outras, foi comercializada como produto biológico à base de ovos, juvenis, infectantes e adultos, visando ao controle de larvas de mosquitos, sendo este produto chamado de *Skeeter Doom*. Esses nematóides eram multiplicados em larvas do mosquito *Culex* sp., sendo essa criação relativamente barata e fácil de se manter. Entretanto, com a descoberta do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, o uso desses nematóides foi-se tornando menos freqüente e poucos pesquisadores continuam a estudá-los (GIBLIN, 1987).

Os nematóides pertencentes à família Phaenopsitylenchidae são multiplicados *in vitro*, no fungo *Amylostereum areolatum*, em meio BDA (batata/dextrose ágar). Completado o desenvolvimento do fungo no meio de cultura, juvenis retirados do aparelho reprodutor de machos de *Sirex* sp. (vespa-da-madeira) são inoculados na cultura de fungo já estabelecida. Dessa forma, consegue-se de 3 a 10 milhões de juvenis entre 4 e 6 semanas a 24°C, posteriormente, esses juvenis são levados ao campo para o controle da vespa (BEDDING, 1984a). No Brasil, a produção desse nematóide em larga escala está sendo feita pela Embrapa Florestas (IEDE; PENTEADO; REIS FILHO, 2003).

Como os nematóides entomopatogênicos (Steinernematidae e Heterorabditidae: Rhabditida) são os mais utilizados e mais estudados como agentes do controle biológico de pragas agrícolas, eles serão tratados mais detalhadamente.

Assim sendo, neste capítulo são mostradas as técnicas de produção, bem como apresentados alguns prováveis tipos de formulação que podem ser usados com nematóides entomopatogênicos no Brasil.

Nematóides Entomopatogênicos

Nematóides parasitas de insetos são conhecidos desde o século XVII (NICKLE, 1984), mas somente na década de 1930, os nematóides entomopatogênicos- NEPs começaram a ser usados efetivamente no controle de insetos-praga, como importantes agentes do controle biológico de insetos, principalmente, no solo e em ambientes crípticos. Eles infectam e matam insetos de dezenas de famílias e ordens. Algumas características que os fazem bons controladores de pragas são: (a) juvenis infectantes podem ser produzidos de maneira barata em insetos hospedeiros ou em meios artificiais (BEDDING, 1981); (b) podem ser armazenados (BEDDING, 1984b); (c) são facilmente aplicados no campo via água de irrigação ou pulverizados (CABANILLAS; RAULSTON, 1996);

(d) possuem a habilidade de buscar o hospedeiro (LEWIS; GAUGLER; HARRISON, 1993); (e) são compatíveis com a maioria dos pesticidas (FORSCHLER; ALL; GARDNER, 1990; ROVESTI; DESEO, 1990, 1991); (f) são seguros a invertebrados e vertebrados (AKHURST; SMITH, 2002); (g) reproduzem-se no hospedeiro produzindo novas gerações (WOUTS, 1991); e (h) possuem estreito espectro de hospedeiros, sendo muitas vezes bastante específicos, não causando, portanto, mortalidade indiscriminada (PETERS, 1996). Outras características desse agente de controle são documentadas no Capítulo 4 deste livro.

Na literatura, existem inúmeros casos de testes de NEPs com diferentes insetos-praga, ressaltando-se algumas avaliações feitas com diferentes linhagens de nematóides entomopatogênicos contra os coleópteros *Cosmopolites sordidus*, *Diaprepes abbreviatus*, *Curculio caryae* e *Ligyris subtropicus* (testes no campo); contra o lepidóptero *Choristoneura rosaceana* (testes em laboratório e a campo, apenas para citar alguns. Vale citar, ainda, alguns trabalhos com testes de infectividade de *Steinernema carpocapsae* contra *Agrotis ipsilon*, *S. riobrave* contra *Helicoverpa zea*; *S. carpocapsae* contra *Spodoptera exigua*, *Diabrotica virgifera* e *Curculio caryae* (SOSA JR.; BEAVERS, 1985; TREVERROW; BEDDING; DETTMANN, 1991; CABANILLAS; RAULSTON, 1995; JACKSON; BROOKS, 1995; DUNCAN; MCCOY; TERRANOVA, 1996; GOTHAMA; LAWRENCE; SIKOROWSKI, 1996; BÉLAIR et al., 1999; SHAPIRO et al., 1999; SHAPIRO-ILAN; STUART; MCCOY, 2003).

No Brasil, trabalhos com nematóides entomopatogênicos são ainda escassos. Schmitt, Gowen e Hague (1992) conseguiram bons níveis de controle de *Cosmopolites sordidus*, o moleque-da-bananeira, mediante aplicação de *S. carpocapsae* em iscas. Passos Júnior, Alves e Silveira Neto (1995) estudaram os efeitos da aplicação de *S. carpocapsae* sobre a saúva-limão, *Atta sexdens rubropilosa*, sem muito êxito. Passos Júnior e Alves (1995) realizaram observações

preliminares sobre a patogenicidade de *S. carpocapsae* ao cupim *Heterotermes tenuis*, mas não obtiveram resultados conclusivos. Mais recentemente, testes com a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro (*Dysmicoccus texensis*) e contra o gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii*), dentro de um manejo integrado, estão em andamento (ANDALÓ et al., 2004a, 2004b; DOLINSKI et al., 2003, 2005; BURLA; DOLINSKI, 2005; BARRETO; DOLINSKI, 2005). Além desses, NEPs vêm sendo testados no controle biológico do carrapato bovino, *Boophilus microplus*, (VASCONCELOS et al., 2004; FREITAS et al., 2005).

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) objetiva manter a população de insetos-praga abaixo do nível de dano econômico e, para o seu estabelecimento, a utilização de métodos alternativos é essencial. O MIP visa à produtividade, mas leva em conta fatores importantes como a preservação dos inimigos naturais e a prevenção do surgimento de resistência em pragas e doenças devido ao excessivo uso de agrotóxicos. Nesse contexto, o controle biológico vem conquistando cada vez mais seu espaço no controle de pragas agrícolas. Segundo Driesche e Bellows Jr. (1996), o controle biológico volta a ser alternativa importante devido à crescente constatação dos efeitos maléficos dos produtos químicos sobre os seres humanos, a vida silvestre e ao meio ambiente em geral. NEPs constituem uma opção bastante viável para o controle de pragas agrícolas, mas sua produção em larga escala no Brasil ainda é incipiente.

Produção de Nematóides Entomopatogênicos

Os atuais sistemas de produção são capazes de gerar NEPs em pequena, média e larga escala, mas o alto custo da maioria dos processos ainda constitui fator limitante para o uso deles em programas de MIP. São duas as técnicas que se usam na produção de nematóides entomopatogênicos: produção *in vivo* e produção *in vitro*. Como mostrado anteriormente no Capítulo 4, tais nematóides

possuem uma associação simbiote com bactérias entomopatogênicas dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*. Essa associação favorece o cultivo do nematóide por esses dois métodos, já que as bactérias precisam estar em condições nutricionais e ambientais favoráveis para que os nematóides possam se desenvolver e multiplicar.

Existem cerca de 30 empresas fabricando e/ou comercializando sete espécies de nematóides entomopatogênicos no mundo (GAUGLER, 2005).

Produção In Vivo

Sem dúvida, a técnica mais simples e mais utilizado hoje em dia para multiplicar nematóides entomopatogênicos é a realizada em insetos hospedeiros. Essa técnica foi tentada primeiramente vez por Glaser (1931), mas foi Dutky (1959) que obteve pela primeira vez grande produção de juvenis infectantes em larvas de *Galleria mellonella* (Lepdoptera: Pyralidae), a traça pequena dos favos (Figura 1a). O número de JIs obtido vai depender não só da suscetibilidade do hospedeiro, mas também da espécie de nematóide multiplicada (MOLINA; MOINO JÚNIOR; CAVALCANTI, 2004). Em geral, obtêm-se de 100.000 a 300.000 JIs por larva infectada (POINAR JR., 1990). Nesse tipo de produção, o inseto hospedeiro atuará como pequeno reator biológico em que as bactérias utilizarão nutrientes dissolvidos na hemolinfa e também quebrarão compostos e tecidos do inseto com suas próprias enzimas.

As larvas de insetos são infectadas adicionando-se juvenis infectantes em meio aquoso a um papel absorvente ou submergindo as larvas no mesmo meio, sendo que esse banho de nematóides não deve passar de dois segundos (Figuras 1b e 1c). Em geral, são utilizados cerca de 100 JIs por larva no primeiro método e 4000 JIs/mL no segundo, podendo ser submersas nesta solução mais do que 400 larvas (SHAPIRO-ILAN et al., 2002).



(a)

Fotos: (a) Claudia Dolinski; (b, c) Edwin Lewis



(b)



(c)

Figura 1. (a) Larvas no sétimo ínstar de *Galleria mellonella* (Lepdoptera: Pyralidae). (b) Larvas de *G. mellonella* sendo colocadas sobre papel absorvente com solução aquosa de juvenis infectantes (JIs). (c) Larvas de *G. mellonella* sendo submersas em solução aquosa de JIs.

Depois de 24 a 48 horas de infecção, as larvas adquirem a coloração característica do complexo nematóide-bactéria que as estão colonizando e depois de completados dois a três ciclos do nematóide no hospedeiro (cerca de 5 a 10 dias), já não há mais alimento disponível, e os juvenis infectantes começam a deixar o cadáver em busca de novos hospedeiros. Essa etapa, também chamada

de colheita, pode ser feita em diferentes escalas desde placas de Petri até sistemas de colheita para grande volume de nematóides como o LOTEK (Figuras 2a e 2b) (WHITE, 1927; GAUGLER et al., 2002).

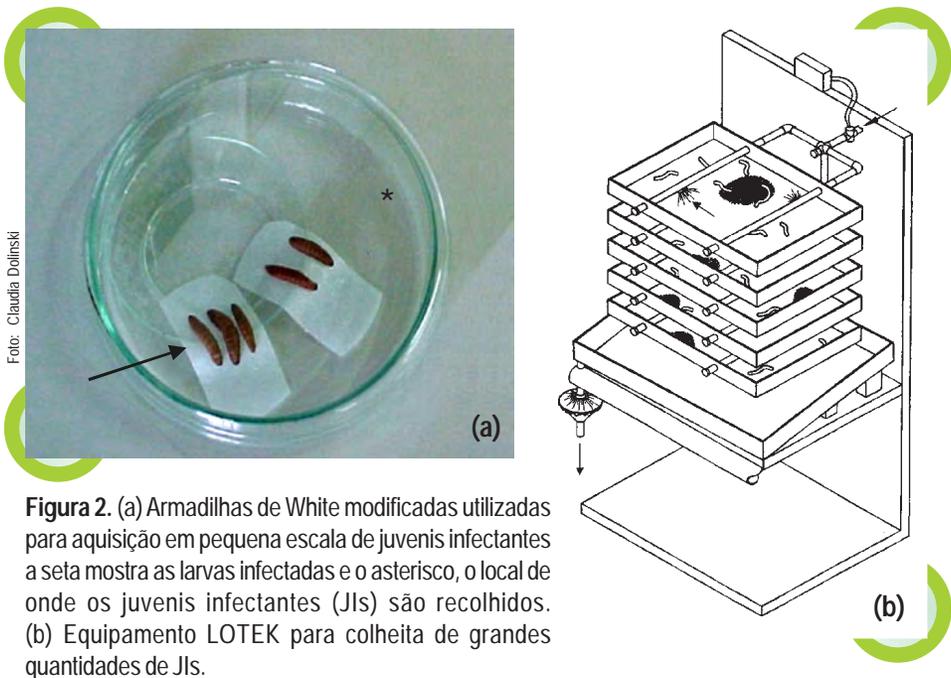


Foto: Claudia Dolinski

Figura 2. (a) Armadilhas de White modificadas utilizadas para aquisição em pequena escala de juvenis infectantes a seta mostra as larvas infectadas e o asterisco, o local de onde os juvenis infectantes (JIs) são recolhidos. (b) Equipamento LOTEK para colheita de grandes quantidades de JIs.

Fonte: Desenho retirado de Gaugler et al. (2002).

Terminada a coleta, os JIs podem ser armazenados em água, esponja, gel ou em outros inertes a temperaturas variando de 4°C a 16°C, por 1 a 3 meses. Cada nematóide precisa de tempo e temperatura ótimos de armazenamento (GREWAL, 2002). Algum tempo de armazenamento, pode haver queda na infectividade dos JIs.

A cultura *in vivo* possui uma série de vantagens, entre elas: a simplicidade, o baixo custo da matéria-prima e dos equipamentos empregados, e a não-exigência de mão-de-obra especializada. Como era de se esperar, o maior gasto nesse sistema está na criação das larvas cuja dieta colabora com a maior parcela

dos gastos de criação. Essa dieta vem sendo modificada com sucesso, para que se torne mais barata, e a multiplicação dos nematóides mais viável. A seqüência de criação das larvas e a infecção dos nematóides é ilustrada na Figura 3.

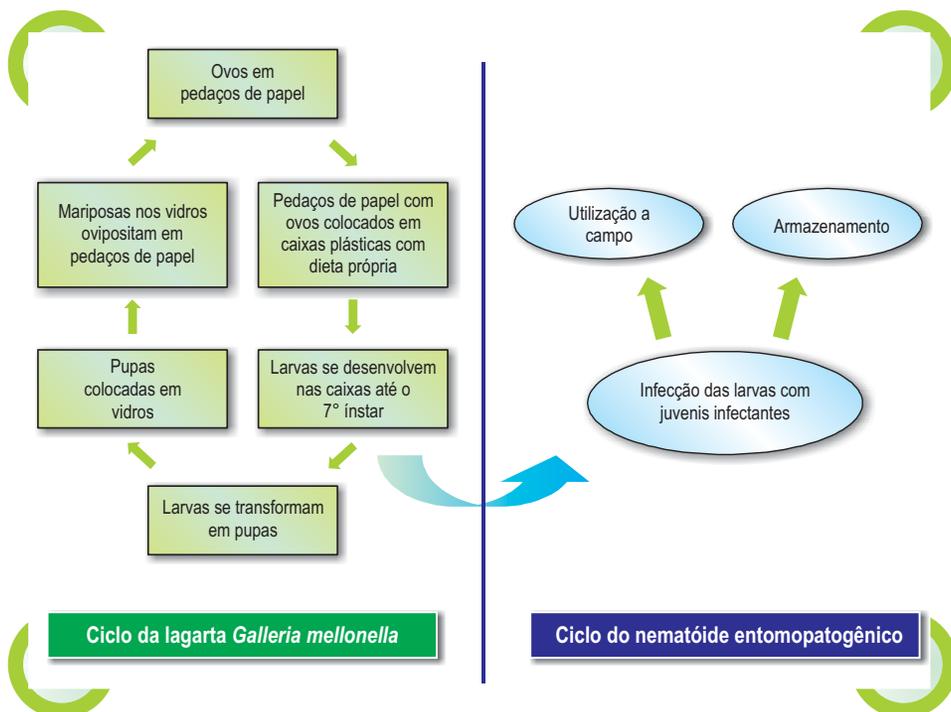


Figura 3. Esquema da criação de larvas de *Galleria mellonella* para uso na produção de nematóides entomopatogênicos.

Nos EUA, larvas de *G. mellonella* podem ser compradas por US\$0,01 cada, considerando que uma larva produz cerca de 1 a $3,5 \times 10^5$ JIs (DUTKY, 1964), então 25.000 larvas são necessárias para tratar um hectare com base em $2,5 \times 10^9$ JIs/ha. Para baixar ainda mais o custo de produção, é preciso continuar melhorando alguns aspectos da criação das larvas e estabelecer sistemas de armazenamento e conservação de nematóides (FLANDERS; MILLER; SHIELDS, 1996).

Produção In Vitro

A produção em meios artificiais começou 30 anos antes de Dutky (1964) ter proposto a multiplicação *in vivo*. Glaser (1931) cultivava NEPs em bandejas cobertas com 4 mm de um meio composto de vísceras de animais e dextrose ágar. Nesse sistema, eram produzidos de 9000 a 12.000 nematóides por cm² de meio de cultura, atingindo 140 milhões de juvenis ao dia. Muitos outros meios foram testados, uns com mais e outros com menos sucesso, mas somente a partir da descoberta a bactéria simbiote, foi que se pôde eliminar do meio as vísceras animais, tão fáceis de contaminar e tão desagradáveis de se trabalhar. Apesar de não conhecer a existência da bactéria simbiote, Glaser (1931) observou que nematóides mantidos nesse meio por muito tempo perdiam sua infectividade e que de tempos em tempos deveria infectar larvas de insetos para recuperá-los. Hoje a produção *in vitro* pode ser feita em meio artificial sólido e líquido.

Meio Artificial Sólido

A produção em meio sólido era feita usando pedaços de um suporte inorgânico, como esponja de poliuretano, embebidos em um meio nutritivo constituído de tecidos animais e óleo como substrato, para a reprodução e desenvolvimento do complexo nematóide-bactéria. Dos meios desenvolvidos, o de Bedding (1981) foi considerado o de maior sucesso e, graças a esse meio e a sua alta produção de JIs, a exploração comercial dos NEPs teve início. Ao invés de bandejas, Bedding usou garrafas de *Erlenmeyers* com esponja e substrato, obtendo produções da ordem de 1300 milhões de juvenis por 3 kg de meio.

O meio deve ser autoclavado juntamente com a espuma em sacos plásticos ou *Erlenmeyers*. A bactéria simbiote é adicionada ao meio e 24 horas depois os nematóides são adicionados. Depois de 14 a 15 dias, faz-se a colheita, espremendo a esponja (ou centrifugando) em peneiras, onde são retidos os juvenis infectantes. Hoje, ao invés de pedaços de animais usam-se: meio nutritivo,

extrato de levedura, óleos vegetais e ração de cachorro (HUSSAINI et al., 2002). Essa mudança nos componentes do substrato vem tornando o processo mais acessível e hoje o custo de produção: US\$ 0,01 por 1 milhão de nematóides (WOUTS, 1991).

A multiplicação de nematóides em meio sólido é considerada um método maleável, uma vez que pode ser de pequena, de média e de grande escala, com custos de capital e matéria-prima relativamente baixos, sem a necessidade de mão-de-obra especializada. Por isso, é considerado atrativo a muitas pequenas empresas começar a produzir nematóides entomopatogênicos. Ainda são necessários ajustes e melhorias nos processos de mistura do meio com o suporte, na inoculação da bactéria e dos JIs e na colheita dos JIs (FRIEDMAN, 1990). A grande vantagem desse método em relação ao método *in vivo* é a maior produção de JIs no mesmo espaço de tempo.

Meio Artificial Líquido

O método de multiplicação de nematóides utilizando meio sólido, apesar de prático, é considerado como laborioso, pois tanto o meio quanto a esponja precisam ser autoclavados antes das inoculações. Ressalta-se que as esponjas não são biodegradáveis e descartar toneladas delas pode ser não só dispendioso como também danoso ao meio ambiente. Pensando nisso, surgiu a produção de NEPs *in vitro* em meio líquido, utilizando fermentadores do tipo tanque de 3000 a 10.000 L, com produções de 90×10^3 JIs/mL. Friedman (1990) relata concentrações superiores a 95×10^3 JIs/mL em fermentadores *airlift*, nos quais a aeração é feita pelas hélices no fundo dos fermentadores que fazem o líquido circular de baixo para cima. Não obstante os aspectos positivos desse sistema, como por exemplo, a não-utilização de esponjas ou centrífugas, o controle de qualidade e o volume produzido, os rendimentos continuam sendo insatisfatórios dado o alto custo de produção. Nesse sistema, bactérias precisam ser crescidas em fermentadores menores, de 2 L de capacidade para, então, serem adicionadas a

um fermentador maior com os nematóides. Uma desvantagem adicional desse método é ter de renovar a virulência das bactérias, multiplicando os nematóides *in vivo* de tempos em tempos. Esse processo leva de 15 a 18 dias e, não raro, depois desse tempo, verifica-se contaminação por outros microrganismos e que não houve multiplicação dos nematóides e todo o material deve ser descartado¹.

O equipamento utilizado e o custo de produção são caros. O fermentador precisa ser conectado a um computador que faz leituras constantes do pH, do nível de espuma, da temperatura e da pressão e todos esses fatores precisam ser corrigidos caso haja necessidade e para tal, mão-de-obra especializada se faz necessária (EHLERS et al., 2000). A composição do meio líquido empregado não é conhecida. Em geral, as empresas se protegem patenteando todo o processo de produção, o que vai variar conforme a espécie de NEP a ser produzida. Essa mudança de espécies encarece mais ainda o sistema, pois todo o equipamento deve ser desinfetado antes de usado para outra espécie de nematóide (WOUTS, 1991).

Formulação dos Nematóides Entomopatogênicos

Diferentes tipos de formulação têm sido testados para diferentes espécies de nematóides entomopatogênicos. Formulações variam desde esponja a grânulos solúveis em água, e estudos vêm sendo feitos para lançar uma formulação utilizando insetos-cadáver. O tipo de formulação vai depender da forma como os nematóides são produzidos, da disponibilidade de material, do tipo de nematóide e do financiamento disponível (GEORGIS, 1990).

Alguns nematóides possuem uma característica única que é de perder água paulatinamente sem perder sua integridade. Esse fenômeno é chamado de anidrobiose. NEPs são capazes de entrar em anidrobiose parcial, denominada anidrobiose quiescente (WOMERSELY, 1990). Essa característica foi explorada

¹ Comunicação pessoal de Randy Gaugler, Rutgers University, à autora em fevereiro de 2005.

para criar formulações com maior tempo de prateleira, como é o caso dos grânulos solúveis em água (GREWAL, 2002) (Tabela 1). Atualmente, as formulações comercialmente disponíveis podem ser subdivididas em formulações nas quais os nematóides permanecem ativos ou com mobilidade reduzida, ou ainda em anidrobiose parcial. Formulações em que os nematóides são levados ao campo em insetos-cadáver serão comentadas também.

Tabela 1. Tempo de prateleira de diferentes formulações usadas com nematóides entomopatogênicos.

Formulações	Espécies de nematóides	Linhagens	Tempo de prateleira (meses) em diferentes temperaturas	
			22-25°C	2-10°C
Nematóides ativos				
Esonja*	<i>S. carpocapsae</i>	All	0,03-0,1	2,0-3,0
	<i>H. bacteriophora</i>		0	1,0-2,0
Vermiculita*	<i>S. carpocapsae</i>	All	0,1-0,2	5,0-6,0
	<i>H. megidis</i>	UK	0	2,0-3,0
Nematóides com mobilidade reduzida				
Gel de alginato	<i>S. carpocapsae</i>	All	3,0-4,0	6,0-9,0
Concentrado líquido	<i>S. carpocapsae</i>	All	0,16-0,2	0,4-0,5
	<i>S. riobrave</i>	RGV	0,1-0,13	0,23-0,3
Nematóides em anidrobiose				
Pó molhável*	<i>S. carpocapsae</i>	All	2,0-3,5	6,0-8,0
	<i>S. feltiae</i>	UK	2,5-3,0	5,0-6,0
Grânulos*	<i>S. carpocapsae</i>	All	4,0-5,0	9,0-12,0
	<i>S. feltiae</i>	SN	1,5-2,0	5,0-7,0
	<i>S. riobrave</i>	RGV	2,0-3,0	4,0-5,0

* Formulação disponível comercialmente.

Fonte: Grewal (2002).

Formulações com Nematóides ativos

Nessas formulações, o tempo de prateleira não é grande, porque os nematóides permanecem em movimento, gastando energia.

Esponja de poliuretano

Esse tipo de formulação é bastante utilizada por seu custo baixo e pela facilidade de manuseio. Contudo, seu tempo de prateleira deixa a desejar. Outra desvantagem seria a extração dos nematóides, pois as esponjas precisam ser encharcadas e espremidas para a retirada dos nematóides e para grandes áreas de aplicação isto se torna inviável. Os nematóides em suspensão aquosa são adicionados a camadas de esponja. Em geral, consegue-se manter 500-1000 JIs/cm². No *Flea TMâ* e *GrubStakeTM*, com os nematóides *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*, respectivamente, são exemplos de produtos com formulação em esponja que continuam sendo comercializados.

Formulações utilizando vermiculita têm maior tempo de prateleira do que em esponja, além de serem melhores para aplicação e conseguem concentração maior de nematóides por volume. Da mesma forma que a primeira, nematóides em suspensão são adicionados e misturados à vermiculita e essa mistura pode ser armazenada ou misturada em água para pulverização quando necessário.

Formulações com Nematóides com Mobilidade Reduzida

Nesse tipo de formulação, nematóides se movimentam menos e, portanto, perdem menos energia e permanecem viáveis por mais tempo.

Alginato de cálcio

Nesta formulação, o que se objetiva é prender os nematóides para que não haja movimentação. Nematóides são adicionados a telas plásticas circulares com 10 cm de diâmetro cobertas com alginato de cálcio, que permanecem viáveis por

vários meses em temperatura ambiente ou sob refrigeração (Tabela 1). Foi a primeira formulação elaborada com tempo de prateleira superior a um mês à temperatura ambiente. Na hora da aplicação, essas telas são lavadas com citrato de sódio que dissolve o gel e libera os nematóides. As desvantagens desse método estão no trabalho em retirar os nematóides, no custo das telas e no lixo produzido com as telas que não são biodegradáveis (GEORGIS, 1990). Essa formulação até hoje só mostrou bons resultados com duas espécies de *Steinernema* (Tabela 1).

Concentrado líquido

Nessa formulação, diminui-se o metabolismo dos nematóides adicionando-se um inibidor que faz com que ele se movimente menos, respire menos e, portanto, gaste menos energia. Esse composto foi patenteado e não se sabe do que se trata. Essa formulação é bastante usada nos EUA para aplicação de *S. riobrave* em *Diaprepes* na Flórida (GREWAL, 1998).

Formulações com Nematóides em Anidrobiose Parcial

Nematóides requerem pelo menos um filme de água ao seu redor para manter o metabolismo ótimo e poder se movimentar. Nessas formulações, eles são parcialmente desidratados, ou seja, a água livre ao seu redor é retirada, mas a umidade relativa da formulação permanece alta (80%).

Pó molhável

Essa formulação foi primeiramente proposta e patenteada por Bedding (1988). Nela os nematóides eram misturados à argila que os desidratava parcialmente. A argila não é um bom inerte, pois entope os bicos dos pulverizadores. Outras tentativas foram feitas adicionando absorvedores de água à formulação, mas o tipo de absorvedor não é conhecido (GREWAL, 1998). O produto Nemasys[®] da Inglaterra, com o nematóide *S. feltiae* e outros, é formulado com absorvedores (Figura 4a).

Grânulos

Os grânulos solúveis em água foram um avanço em termos de formulação de NEPs, pois apresentam longo tempo de prateleira, são fáceis de aplicar, mas, por sua vez, demandam mão-de-obra e equipamentos especializados, o que aumenta seu custo.

Nesses grânulos de 10 a 20 mm de diâmetro, os nematóides, em altas concentrações, são primeiramente envolvidos em um gel feito de celulose ou lignina, ou em outros componentes. Gotas desse gel, contendo os juvenis infectantes, caem sobre uma bandeja com diferentes pós, como: sílica, argila, amido, talco, entre outros. Ao entrar em contato com os pós, o gel começa a perder água e endurece (GREWAL, 2002). Os nematóides em seu interior entram em anidrose parcial entre 4 e 7 dias de formado o grânulo, por isso nem todas as espécies de NEPs são viáveis para esse tipo de formulação. Nematóides grandes como *S. glaseri* ou que se movimentam muito como *H. bacteriophora* não podem ser usados nesse tipo de formulação² (Figura 4b).

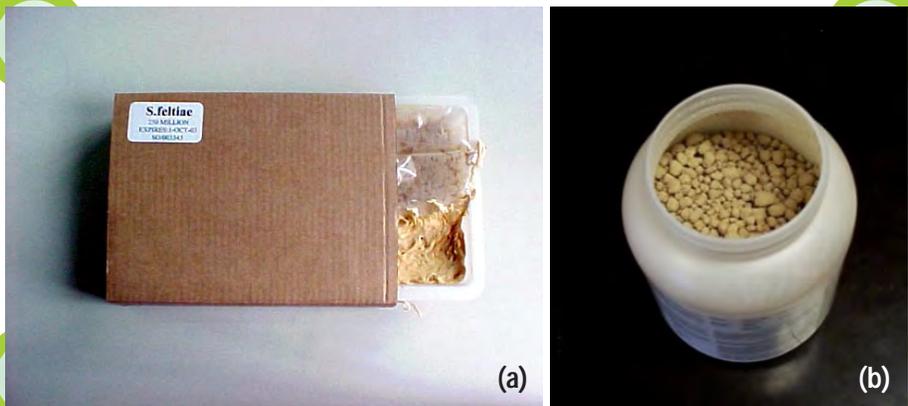


Figura 4. Formulações nas quais os nematóides precisam ser parcialmente desidratados. (a) Pó molhável. (b) Grânulo.

² Comunicação pessoal de Randy Gaugler, Rutgers University, à autora em fevereiro de 2005.

Formulação com Insetos-cadáver

Esse tipo de formulação pode ser usado com todos os nematóides entomopatogênicos e possui baixo custo. Pode ser utilizado quando a multiplicação dos nematóides é feita *in vivo* em larvas de *G. mellonella*. Os juvenis infectantes provenientes dos cadáveres são mais viáveis do que aqueles em outras formulações (SHAPIRO; GLAZER, 1996).

Larvas de *G. melonella* são infectadas com o nematóide que se quer utilizar no campo depois de quatro dias de infecção são envoltas em óleo vegetal e amido (SHAPIRO et al., 2001). Isso confere ao cadáver turgidez e durabilidade, sem afetar os nematóides em seu interior (Figuras 5a e 5b). Dessa forma, as larvas infectadas podem ser embaladas em caixas e transportadas sem o risco de se romper ou grudar umas nas outras. Para aplicar, são feitos pequenos buracos de 5 cm de profundidade onde os cadáveres são colocados (Figura 5c).

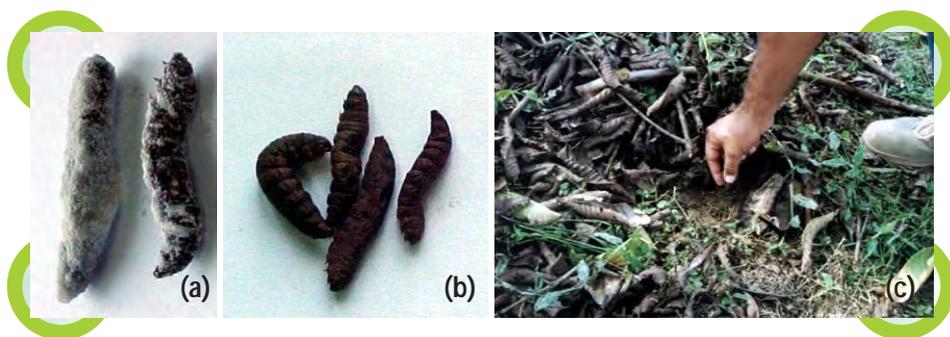


Figura 5. Larvas de *Galleria melonella* infectadas com *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (a) Cobertas por óleo e amido. (b) Sem cobertura. (c) Aplicação das larvas infectadas a campo.

Considerações Finais

A metodologia para a produção de NEPs evoluiu de forma significativa nos últimos 70 anos, principalmente, no cultivo *in vitro*. Isso ocorreu devido à necessidade de se obter maior quantidade de JIs para aplicação nas lavouras

contra importantes pragas. No Brasil, a aplicação dos nematóides no campo está apenas no começo e mais estudos nessa área são necessários.

O sistema de multiplicação de nematóides deve ser escolhido de acordo com a necessidade e a disponibilidade de espaço e investimento. A produção *in vivo* pode ser boa alternativa em laboratórios para associações ou pequenas empresas. Esse tipo de produção favorece a formulação em cadáveres. A desvantagem desse método seria a impossibilidade de se aumentar a produção (*scale-up*), pois demanda muito espaço e mão-de-obra. A produção *in vitro* em meio sólido também parece outra opção para pequenos mercados em franca expansão. A multiplicação em meio líquido precisa ser mais estudada antes de ser adotada para que não haja perda da confiabilidade nos nematóides entomopatogênicos pelo mercado. Por ser um método mais elaborado, deve-se fazer uma boa pesquisa de mercado para constatar a real necessidade de se produzir tão grande quantidade de juvenis infectantes e aplicar tantos recursos. Esse tipo de produção deve estar associado à formulação em pós molháveis ou em grânulos para que possa atingir grandes mercados.

Produtos biológicos não devem chegar ao mercado com preços mais elevados do que produtos químicos já estabelecidos. Por isso, o custo de produção precisa ser baixo e o produto de alta qualidade.

Outro ponto que se deve manter em mente é que uma espécie de NEP não deve e não pode ser utilizada para o controle de todas as pragas, portanto, quando se almeja produzir várias espécies ao mesmo tempo, deve-se focar no cultivo *in vivo* ou *in vitro* em meio sólido.

Referências

AKHURST, R. J.; SMITH, K. Regulation and safety. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 311-332.

ANDALÓ, V.; MOINO JÚNIOR, A.; SANTACECÍLIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com agrotóxicos visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 463-467, 2004a.

ANDALÓ, V.; MOINO JÚNIOR, A.; SANTACECÍLIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Seleção de isolados de fungos e nematóides entomopatogênicos para a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 181-187, 2004b.

BARRETO, E. L. S.; DOLINSKI, C. M. Controle das larvas do gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii*) com torta de nim e nematóides entomopatogênicos. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2005, Campos de Goytacazes. **Anais**. Campos dos Goytacazes: [s.n.], 2005. 1 CD-ROM.

BEDDING, R. A. Low cost *in vitro* mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. **Nematologica**, Leiden, v. 27, p. 109-114, 1981.

BEDDING, R. A. Nematode parasites of Hymenoptera. In: NICKEL, W. R. (Ed.). **Plant and insect nematodes**. New York: Marcel Dekker, 1984a. p. 755-795.

BEDDING, R. A. Large scale production, storage and transport of the insect parasitic nematodes *Neoplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 104, p. 117-120, 1984b.

BEDDING, R. A. **Storage of insecticidal nematodes**. Int. A01N 63/00. PCT/AU1988/000127. 17 Nov. 1988.

BÉLAIR, G.; VINCENT, C.; LEMIRE, S.; CODERRE, D. Laboratory and field assays with entomopathogenic nematodes for the management of oblique banded leafroller *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Tortricidae). **Journal of Nematology**, New Delhi, v. 31, n. 4S, p. 684-689, 1999.

BURLA, R. S.; DOLINSKI, C. M. Aplicação do óleo de nim para o controle do gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii*, Coleoptera: Curculionidae) adulto. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2005, Campos de Goytacazes. **Anais**. Campos dos Goytacazes: [s.n.], 2005. 1 CD-ROM.

CABANILLAS, H. E.; RAULSTON, J. R. Evaluation of *Steinernema riobravis*, *S. carpocapsae*, and irrigation timing for the control of Corn Earworm, *Helicoverpa zea*. **Journal of Nematology**, New Delhi, v. 28, n. 1, p. 75-82, 1996.

CABANILLAS, H. E.; RAULSTON, J. R. Impact of *Steinernema riobravis* (Rhabditida: Steinernema) on the control of *Helicoverpa zea* (Lepdoptera: Noctuidae) in corn. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 88, p. 58-64, 1995.

DOLINSKI, C. M. Controle dos gorgulhos em goiabeira com nematóides entomopatogênicos: pesquisa e desenvolvimento. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 9., 2005, Recife. **Anais...** Recife: FIOCRUZ, 2005. p. 37.

DOLINSKI, C. M.; DEL VALLE, E. E.; RIBEIRO, J. P.; SOUZA, T. S.; ALMEIDA, A.; MACHADO, I. R.; OLIVEIRA, L. M.; CARDOSO, E. C. S. Studies on the entomopathogenic nematodes for the control of the guava-weevil (*Conotrachelus psidii*) in the North and Northeast regions of the state of Rio de Janeiro, Brazil. In: LATIN AMERICAN SYMPOSIUM ON ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND NEMATODES, 1, 2003, Campos dos Goytacazes, RJ. **Proceedings...** Campos dos Goytacazes: [s.n.], 2003. p. 36.

DRIESCHE, V. R. G.; BELLOWS JR., T. S. **Biological control**. New York: Chapman & Hall, 1996. 539 p.

DUNCAN, L. W.; MCCOY, C. W.; TERRANOVA, C. Estimating sample size and persistence of entomogenous nematodes in sandy soils and their efficacy against the larvae of *Diaprepes Abbeviatus* in Florida. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 28, n. 1, p. 56-67, 1996.

DUTKY, S. R. Insect microbiology. In: DUTKY, S. R. (Ed.). **Advances in applied microbiology**. New York: Academic Press, 1959. v. 1, p. 175-200.

DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V.; CANTWELL, G. E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. **Journal Insect Pathology**, San Diego, v. 6, p. 417-422, 1964.

EHLERS, R.-U.; NIEMANN, I.; HOLLMER, S.; STRAUCH, O.; JENDE, D.; SHANMUGASUNDRAM, M.; MEHTA, U. K.; EASWARAMOORTHY, S. K.; BURNELL, A. Mass production potential of the bacto-helminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica-Photorhabdus luminescens*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 10, p. 607-616, 2000.

FLANDERS, K. L.; MILLER, J. M.; SHIELDS, E. J. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* "Oswego" (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 89, n. 2, p. 373-380, 1996.

FORSCHLER, B. T.; ALL, J. N.; GARDNER, W. A. *Steinernema feltiae* activity and infectivity in response to herbicide exposure in aqueous and soil environments. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 55, p. 375-379, 1990.

FREITAS, G. M.; FURLONG, J.; VASCONCELOS, V. O.; DOLINSKI, C. M. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* Santa Rosa and All strains (Steinernema:Rhabditidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 911-919, 2005.

FRIEDMAN, M. J. Commercial production and development. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. R. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 153-172.

GAUGLER, R. **Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae & Heterorhabditidae)**. Disponível em: <<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/nematodes.html>>. Acesso em: 29 set. 2005.

GAUGLER, R.; BROWN, I.; SHAPIRO-ILAN, S.; ATWA, A. Automated technology for *in vivo* mass production of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, San Diego, v. 24, p. 199-206, 2002.

GEORGIS, R. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 173-191.

GIBLIN, R. M. Culture of nematode associates and parasites of insects. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (Ed.). **Vistas on nematology**. Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p. 408-413.

GLASER, R. W. The cultivation of a nematode parasite of an insect. **Science**, Washington, v. 73, n. 1901, p. 614-615, 1931.

GOTHAMA, A. A. A.; LAWRENCE, G. W.; SIKOROWSKI, P. P. Activity and persistence of *Steinernema carpocapsae* and *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis against *S. exigua* larvae on soybean. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 28, n. 1, p. 68-76, 1996.

GREWAL, P. S. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic Nematology**, New York: CABI Publishing, 2002. p. 265-287.

GREWAL, P. S. Formulation for entomopathogenic nematodes for storage and application. **Japanese Journal of Nematology**, v. 28, p. 68-74, 1998.

HUSSAINI, S. S.; SINGH, S. P.; PARTHASARATHY, R.; SHAKEELA, V. *In vitro* production of entomopathogenic nematodes in different artificial media. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 32, n. 1, p. 44-46, 2002.

IEDE, E. T.; PENTEADO, S. R. C.; REIS FILHO, W. Uso do entomopatôgeno, *Deladenus siricidicola*, em Pinus. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 24., 2003, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Sociedade Brasileira de Nematologia: Embrapa Semi-Árido, 2003. p. 47-49.

JACKSON, J. J.; BROOKS, M. A. Parasitism of western corn rootworm larvae and pupae by *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 21, n. 1, p. 15-20, 1995.

KAISER, H. Terrestrial and semiterrestrial mermitidae. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 899-965.

LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; HARRISON, R. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 71, n. 4, p. 765-769, 1993.

MOLINA, J. P. A.; MOINO JÚNIOR., A.; CAVALCANTI, R. S. Produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 347-354, 2004.

NICKLE, W. R. History, development and importance of insect nematology. In: NICKEL, W. R. (Ed.). **Plant and insect nematodes**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 627-653.

PASSOS JÚNIOR, N. C.; ALVES, S. B. Controle de *Heterotermes tenuis*, cupim subterrâneo da cana-de-açúcar, com *Steinernema carpocapsae*. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 3., 1995, São Carlos, SP. **Resumos...** São Carlos, SP: USP, 1995. p. 380.

PASSOS JÚNIOR, N. C.; ALVES, S. B.; SILVEIRA NETO, S. Patogenicidade de *Steinernema carpocapsae*, formulação Exhibit, sobre diferentes castas de saúva-limão, *Atta sexdens rubropilosa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15., 1995, Caxambu. **Resumos...** Lavras: SEB: ESAL, 1995. p. 342.

PETERS, A. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, p. 389-402, 1996.

POINAR JR., G. O. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 23-58.

ROVESTI, L.; DESEO, K. V. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). **Nematologica**, Leiden, v. 36, p. 237-245, 1990.

ROVESTI, L.; DESEO, K. V. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis heliothidis*. **Nematologica**, Leiden, v. 37, p.113-116, 1991.

SCHMITT, A. T.; GOWEN, S. R.; HAGUE, N. G. M. Baiting technique for the control of *Cosmopolites sordidus* Germar by *Steinernema carpocapsae*. **Nematropica**, Auburn, v. 22, p. 159-163, 1992.

SHAPIRO, D. I.; GLAZER, I. Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. **Environmental Entomology**, College Park, v. 25, p. 1455-1461, 1996.

SHAPIRO, D. I.; LEWIS, E. E.; BEHLE, R. W.; MCGUIRE, M. R. Formulation of entomopathogenic nematode-infected cadavers. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 78, p. 17-23, 2001.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GAUGLER, R.; TEDDERS, W. L.; BRWON, I.; LEWIS, E. Optimization of inoculation for *in vivo* production of entomopathogenic nematodes. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 34, n. 4, p. 343-350, 2002.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; LEWIS, L. C.; OBRYCKI, J. J.; ABBAS, M. Effects of fertilizers on suppression of Black cutworm (*Agrotis ipsilon*) damage with *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 31, n. 4S, p. 690-693, 1999.

SHAPIRO-ILAN, D.; STUART, R.; MCCOY, W. Comparison of beneficial traits among strains of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, for control of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, San Diego, v. 28, p. 129-136, 2003.

SOSA JR., O.; BEAVERS, J. B. Entomogenous nematodes as biological control organisms for *Ligyris subtropicus* (Coleoptera: Scarabaeidae) in sugarcane. **Environmental Entomology**, College Park, v. 14, n. 1, p. 80-82, 1985.

TREVERROW, W. N.; BEDDING, R. A.; DETTMANN, E. B. Evaluation of entomopathogenic nematodes for control of *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera, Curculionidae), a pest of bananas in Australia. **Annals Applied Biology**, Cambridge, v. 119, n. 1, p. 139-145, 1991.

VASCONCELOS, V. O.; FURLONG, J.; FREITAS, G. M.; DOLINSKI, C. M.; AGUILLERA, M. M.; RODRIGUES, R. C.; PRATA, M. C. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae), as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Parasitology Research**, Berlin, v. 94, p. 201-206, 2004.

WHITE, C. F. A method for obtaining larvae from culture. **Science**, Washington, v. 66, p. 302-303, 1927.

WOMERSELY, C. Z. Dehydration survival and anhydrobiotic potential. In: GAUGLER, R.; KAY, H. K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 117-137.

WOUTS, W. M. *Steinernema* and *Heterorhabditis* species. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 855-897.

Introdução

Entre os bioinseticidas empregados em todo o mundo para controle de pragas agrícolas e de vetores de enfermidades em saúde pública, estão os produtos que utilizam como princípio ativo bactérias esporulantes pertencentes ao gênero *Bacillus*, destacando-se *Bacillus thuringiensis* (**Bt**) e *Bacillus sphaericus* (**Bs**) que representam mais de 90% do mercado mundial de produtos biológicos. De acordo com Tamez-Guerra et al. (2001), o continente americano representa 50% do mercado mundial, concentrando-se o consumo nos Estados Unidos e no Canadá. A América Latina contribui com apenas 8% a 10% do consumo total, estimando-se que sejam aplicadas anualmente 13.000 toneladas de bacilos em todo o mundo.

Durante a esporulação, essas bactérias produzem inclusões cristalinas contendo uma ou mais proteínas, conhecidas como δ -endotoxinas, tóxicas para alguns insetos (SCHNEPF et al., 1998). Algumas das vantagens do emprego de bactérias do gênero *Bacillus* são: eficácia, alta seletividade, não-acumulativas, não-poluente, praticamente inócuas aos mamíferos e aos vertebrados, e não-tóxicas às plantas (WHITELEY; SCHNEPF, 1986; ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE, 1987). Podem, também, ser produzidas em larga escala *in vitro*, por meio sintético e são aplicadas com os mesmos equipamentos usados para os inseticidas convencionais.

Dentre as limitações, destacam-se: o elevado custo dos produtos, quando comparado aos inseticidas químicos, o estreito espectro de ação, a necessidade de o organismo-alvo ingerir o produto, o baixo poder residual e o desconhecimento de produtores e de agentes de saúde sobre a correta utilização desses biolarvicidas.

A produção industrial desses bioinseticidas bacterianos, por meios sintéticos e com diferentes metodologias de fermentação está sediada em vários países, concentrando-se, sobretudo, na Europa, Ásia e América do Norte.

Produção de Bactérias Entomopatogênicas

Para a produção comercial de produtos microbianos à base de bactérias, é necessário, primeiramente, seleção de uma linhagem que, além de eficaz contra o organismo-alvo, seja estável, ou seja, mantenha inalteradas suas características de virulência, eficácia e que, também, seja bem adaptada ao processo fermentativo que será adotado, a fim de maximizar a produção e realizar o crescimento sob condições econômicas de fermentação (DE NARDO; CAPALBO, 1998).

Para *B. thuringiensis* e para o *B. sphaericus*, o processo fermentativo submerso é o mais usual. Nesse processo, um meio líquido nutritivo é empregado para suspender e propagar a biomassa bacteriana; pode ser descontínuo, denominado de semicontínuo ou descontínuo-alimentado - o *feedback* - e, ainda, contínuo.

A fermentação descontínua consiste na adição inicial de meio de cultivo para que o microrganismo cresça de forma exponencial até que se esgotem os nutrientes, e o substrato torne-se limitante ao crescimento. No decorrer do processo, somente são controlados o pH e a saturação de oxigênio.

No *feedback*, durante o processo, há acréscimo de meio de cultivo completo ou de algum nutriente específico em momentos estratégicos ou continuamente, não havendo a remoção do meio esgotado.

Os sistemas contínuos caracterizam-se por manter equiparados os fluxos de adição de nutrientes ou de meio de cultivo e a remoção de meio exaurido ou de metabólitos. Essa forma de cultivo é a menos empregada por ocasionar a diminuição da toxicidade de produtos à base de Bt (GONZÁLEZ, 2004).

Etapas da Produção de Bactérias Entomopatogênicas

A produção de um bioinseticida bacteriano compreende as seguintes etapas: preparo do inóculo, fermentação, separação (recuperação da biomassa), padronização e formulação (DIAS, 1992; ROBERG, 2000). Uma representação esquemática das etapas de produção de bioinseticidas bacterianos pode ser apreciada na Figura 1.

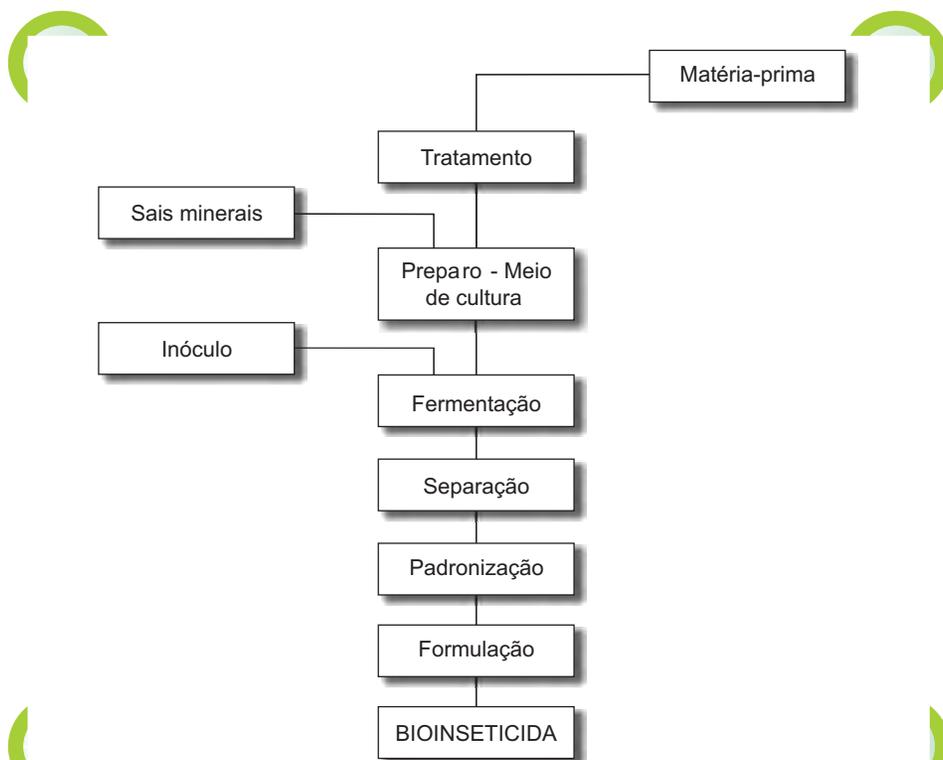


Figura 1. Etapas para a produção de um bioinseticida bacteriano.
Fonte: Adaptado de Dias (1992).

Meio de Cultura

A preparação de meios de cultura para o desenvolvimento de processos fermentativos é uma etapa fundamental para assegurar a produtividade deles (ERTOLA; YANTORNO; MIGNONE, 1994).

Na seleção dos componentes que irão constituir determinado meio de cultura são levados em consideração, em especial, os três fatores que seguem: disponibilidade, custo e habilidade dos microrganismos para utilizá-los (ARCAS, 1996). Deve ser considerada, também, a constância nutricional desses componentes (GONZÁLEZ, 2004). Eles não podem sofrer variações significativas de teores, sob pena de resultarem em baixas produções de biomassa ou causarem a inefetividade da biomassa gerada (ALVES; ALVES; CAPALBO, 1997). Existem vários subprodutos, como os resíduos agroindustriais que podem ser utilizados na preparação de meios de cultura para a fermentação submersa (DIAS, 1992). *B. thuringiensis* consome açúcares e amido, além de aminoácidos e proteínas, tornando mais simples a escolha de seus substratos (DIAS, 1992; BELTRÁN et al., 1998; SÁNCHEZ-YÁÑEZ, 2005). Já *B. sphaericus* não metaboliza carboidratos, e os componentes do seu meio de cultura têm de necessariamente apresentar altos teores protéicos.

Íons metálicos são considerados importantes para o crescimento de espécies do gênero *Bacillus*, são eles: magnésio, ferro, zinco e cálcio (ARCAS, 1996; BERNHARD; UTZ, 1993). A presença do cálcio é essencial no processo de esporulação visto ser integrante da parede do esporo, responsável pela resistência ao calor e raios ultravioleta (BELTRÁN et al., 1998). De acordo com Lacey (1984), a presença de manganês também é necessária para que ocorra a formação do esporo.

De acordo com Sánchez-Yáñez (2005), glicose, amido ou sacarose são utilizados como fonte de carbono orgânico, componente esse de grande importância para a síntese de cristais.

Extrato de leveduras tem sido recomendado como fonte de nitrogênio para processos industriais, pois, além de custo compatível, contém vitaminas e fatores de crescimento importantes para a atividade metabólica do microrganismo, principalmente, as do complexo B que são necessárias como constituintes ou precursores de enzimas e coenzimas, além de aminoácidos e outras substâncias estimulantes (ROBERG, 2000).

Inóculo

Inóculo, pé-de-cuba ou pé-de-fermentação é definido como um dado volume de suspensão da bactéria ou do microrganismo que se deseja cultivar, devendo estar em concentração adequada, ou seja, capaz de garantir, em condições econômicas, a fermentação de determinado volume de meio de cultura ou mosto.

Usualmente, o volume do inóculo a ser introduzido em um reator biológico industrial é da ordem de 10% de sua capacidade útil, podendo variar de 0,5% a 50%, dependendo do organismo e do processo em questão.

Nessa etapa, a manutenção da cepa é tão importante que a grande maioria das empresas faz testes de viabilidade, estabilidade genética, visando à reprodutibilidade dos resultados que levaram à escolha de dada cepa. É uma etapa crítica, pois qualquer contaminação resultará no fracasso da fermentação.

Fermentação

O processo fermentativo, por definição, é a reação em que se faz uso de recipiente chamado fermentador em geral ou biorreator, no qual substratos que compõem o meio de cultura são transformados por ação microbiana em metabólitos e biomassa bacteriana. Ao realizar uma fermentação industrial, é importante observar o reator e as condições de operação que devem ser tais que assegurem a produtividade máxima do processo e a qualidade do produto que,

em certos casos, depende das condições de operação empregadas, Ertola, Yantorno e Mignone (1994).

Conforme Arcas (1996), *Bacillus thuringiensis* é um microrganismo que transforma aerobicamente carboidratos em ácidos orgânicos. As diferentes variedades de *B. thuringiensis* podem ser sensivelmente diferentes quanto aos requerimentos nutricionais (DULMAGE; CORREA; GALLEGOS-MORALES, 1999). Um bom meio de cultura para uma variedade pode não ser um bom meio para outra, isso impossibilita a tarefa de definir um único meio que cumpra com a exigência de promover um abundante crescimento, esporulação e sínteses de δ -endotoxinas (SÁNCHEZ-YÁÑEZ, 2005). Também as condições de processo em termos de temperatura, pH, aeração e pressão são decisivas para o sucesso da fermentação e podem variar em função da espécie ou mesmo da cepa a ser fermentada.

O processo mais usado para produzir δ -endotoxinas a partir de *B. thuringiensis* é o cultivo descontínuo visto que o cristal protéico é metabólito secundário (OSÓRIO, 2004).

Durante a fermentação, o consumo dos nutrientes pode ocasionar mudanças de pH, sendo que essas devem ser controladas, mantendo-se o pH, na faixa entre 5,5 e 8,5. A temperatura durante o processo deve ser mantida próxima aos 30°C e a saturação de oxigênio em torno de 20%. Os cultivos de Bs e Bt são realizados entre 1 e 3 atm, e o tempo de processo, dependendo das condições, pode ser de 24 a 72 horas.

Separação

Terminado o processo de fermentação, usualmente determinado pelo percentual de esporulação, existe a necessidade de recuperação do complexo esporo/cristal que deve ser separado do mosto fermentado. Cumpre destacar que os sólidos totais, representados por esporos, cristais, restos celulares e resíduos

não metabolizados representam poucos gramas de biomassa, quando comparados ao volume total, devendo-se proceder à redução do volume de trabalho pela retirada de água do sistema.

Vários são os métodos utilizados em plantas industriais, mencionando-se a centrifugação, a sedimentação, a filtração tangencial em membrana, filtração presa de membrana e ultrafiltração. Os processos *downstream* fornecem um concentrado cremoso (mosto concentrado ou mosto técnico) que, posteriormente, deverá ser formulado de modo a apresentar características favoráveis para ser utilizado em condições de campo (ARCAS, 1996; DIAS, 1992; ROBERG, 2000).

O mosto concentrado ou mosto técnico pode ser desidratado em estufa por liofilização ou em *spray dryer* para formar um pó que, acrescido ou não de adjuvantes, pode ser empregado como ingrediente ativo de formulações de base seca.

Padronização

A padronização visa ajustar o mosto concentrado ou pó técnico para que a quantidade de ingrediente ativo a ser utilizada na formulação do bioinseticida tenha a qualidade e a potência necessárias. Para tanto, são feitas correções na biomassa bacteriana, acrescentando-se adjuvantes, fazendo-se diluições ou concentrações suplementares.

Controle de Qualidade

Na produção de bioinseticidas bacterianos, é importante que, ao longo do processo, ou seja, do inóculo ao lote do produto acabado, exista um eficiente sistema de controle de qualidade cuja finalidade é dificultar quaisquer contaminações por outros microrganismos e que a biomassa gerada mantenha as características de virulência inerentes à cepa selecionada. São empregados

diferentes métodos, como microscopia por contraste de fase, plaqueamento em meios seletivos e bioensaios com o organismo-alvo.

Registro

O registro é parte importante para que os bioinseticidas bacterianos possam ser empregados com segurança. A obtenção do registro em órgãos competentes indica que o produto já foi testado quanto à toxicidade, à eficácia e quanto ao impacto ambiental. No Brasil, não são raros os casos de problemas ocasionados por bioinseticidas à base de bactérias, muitas vezes produzidos em condições inadequadas. Existem relatos da ineficácia e do impacto ambiental, como a mortalidade de peixes. Tais fatos têm denegrido a imagem dos bioinseticidas bacterianos de maneira geral em órgãos públicos e em comunidades, causando descrença quanto à eficácia desses produtos.

Formulação de Bactérias Entomopatogênicas

Tecnicamente, uma formulação é qualquer combinação de um biocida ativo com um segmento material. Dependendo das características desejadas para o produto, o material empregado na formulação de bioinseticidas pode ter propriedades aderentes, emulsificantes, tensoativos, conservantes, dispersantes, protetores contra radiação ultravioleta, flutuantes, atraentes, fagoestimulantes e, ainda, enchimento, veículos ou inertes. Na escolha dos adjuvantes, independentemente da sua finalidade, deve-se priorizar a segurança ao aplicador e ao meio ambiente.

A formulação que, muitas vezes é a etapa que mais onera a produção de um bioinseticida, tem como objetivo melhorar o desempenho do produto tanto no momento da produção quanto na utilização. Os formulados apresentam, em geral, maior uniformidade, facilitando o controle de qualidade e as recomendações de

uso em campo (DIAS, 1992; MOINO JÚNIOR, 2003). As formulações comerciais devem conferir as seguintes características aos produtos:

- Facilitar o armazenamento e o transporte.
- Manter a viabilidade e a estabilidade do ingrediente ativo, propiciando um prazo de validade preferencialmente por períodos superiores a 12 meses.
- Melhorar a aplicação, permitindo que o ingrediente ativo alcance o organismo-alvo e fique disponível para facilitar a dispersão e a cobertura para aumentar a aderência às superfícies, com a finalidade de atrair o organismo-alvo para o local onde o bioinseticida foi aplicado.
- Aumentar o poder residual do produto.
- Permitir a compatibilidade com outros praguicidas.

As características dos formulados irão variar em função da espécie-alvo e do ambiente onde se encontra. Existem diferentes tipos de formulação merecendo destaque, entre as líquidas, as suspensões concentradas e os concentrados emulsionáveis. Os formulados secos são mais numerosos, compreendendo os pós secos, os pós molháveis, os briquetes, os grânulos impregnados e os grânulos dispersíveis em água, as pastilhas e os tabletes. Espuma, gelo, pasta e gel são formulações experimentais com grande potencial. Entretanto, nenhum bioinseticida nessas apresentações está disponível no mercado brasileiro. Para o aumento da persistência, formulações microencapsuladas têm apresentado ótimos resultados não só as microcápsulas formadas por polímeros como também pelo encapsulamento por células bacterianas recombinantes.

Por consistir em fator-chave para o desempenho do produto comercial, as formulações constituem segredo industrial e, em decorrência, são muito escassas as informações sobre esse tema.

Dois exemplos de formulações podem ser observados na Figura 2.



Figura 2. Formulações para biolarvicidas bacterianos. (a) Produto experimental à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*, na forma de pastilhas. (b) Produto comercial de *Bacillus sphaericus* formulado como suspensão concentrada.

Utilização de Bactérias Entomopatogênicas

As bactérias entomopatogênicas são importantes ferramentas do Manejo Integrado de Pragas (MIP), empregadas na supressão de população de insetos indesejáveis em duas grandes áreas, na saúde pública e na agricultura.

Na Saúde Pública

No Brasil, algumas espécies de insetos da Ordem Diptera, pertencentes às famílias Culicidae e Simuliidae são fundamentais na transmissão de agentes etiológicos de doenças humanas. Essas enfermidades são de importância para a saúde pública, com milhões de pessoas sendo afetadas anualmente por parasitoses transmitidas por esses insetos.

Os bioinseticidas bacterianos são empregados na supressão populacional das larvas de culicídeos e simulídeos. Para tanto, os criadouros devem ser

tratados com a bactéria, procurando-se disponibilizá-la de maneira que seja prontamente ingerida pelo inseto-alvo.

O sucesso de um programa de controle que tenha no bioinseticida bacteriano sua espinha dorsal dependerá da escolha correta do princípio ativo, da formulação adequada, da aplicação no momento oportuno de forma correta e do conhecimento do recurso humano envolvido na operação.

Os Culicídeos, popularmente conhecidos como mosquitos, pernilongos, carapanãs ou muriçocas são vetores de importantes doenças, como a febre amarela (silvestre e urbana), a dengue (na sua forma clássica e hemorrágica), a malária, a leishmaniose e as filarioses, além das encefalites virais (CIMERMAN; CIMERMAN, 2001; REY, 1992). Essa família congrega mais de três mil espécies, sendo os gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* os de maior importância no Brasil. A fase imatura desses insetos é necessariamente de hábito aquático, desenvolvendo-se sempre em águas lânticas (paradas) naturais ou antropizadas, límpidas ou poluídas (Figura 3).



Figura 3. Diferentes tipos de criadouros de mosquitos – Criadouros: (a) de *Aedes aegypti*; (b) de *Anopheles* spp; (c) de *Culex* spp.

O mosquito *Aedes aegypti* é o causador de surtos da dengue em quase todos os estados brasileiros. No verão de 2001/2002, foram registrados mais de 750.000 casos no Brasil, sendo o Estado do Rio de Janeiro o de maior incidência, apresentando cerca de 250.000 ocorrências. *A. aegypti* transmite ainda, a febre amarela urbana. Em 1997, iniciou-se um programa de erradicação do *A. aegypti*, usando inseticidas químicos. Mesmo que a utilização de bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* (Bti) estivesse prevista, o emprego deles não ocorreu na prática até que, no início de 2001, foi detectada a presença de população de mosquitos resistentes ao inseticida organofosforado denominado temefós. A partir desse período, *B. thuringiensis israelensis* começou a ser empregado. É importante lembrar que todo o bioinseticida usado nas campanhas antivetoriais da dengue foi importado, pois as indústrias nacionais não estavam capacitadas a produzir produtos à base Bti em escala industrial (VILARINHOS, 2002).

No Brasil, a filariose brancofitiana (elefantíase), transmitida por *Culex quinquefasciatus* está presente na cidade de Recife, e em municípios vizinhos, apresentando números significativos de pessoas infectadas (REGIS et al., 2002).

A malária, doença causada por algumas espécies de protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida por algumas espécies de *Anopheles*, afeta anualmente cerca de um milhão de pessoas no Brasil. No Estado de Rondônia, há espécies de *Anopheles* resistentes aos inseticidas convencionais (VILARINHOS, 2002). No Acre, cidades como Mâncio Lima, com cerca de 12 mil habitantes, tem reportado até 1600 casos de malária por mês. Em 2004, mais de 60 mil agravos à saúde tendo como agente etiológico o *Plasmodium* foram reportados na zona urbana de Manaus, AM.

Em 2002, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) adquiriu e empregou 360 toneladas de *B. thuringiensis israelensis*, sob a forma grânulos de sabugo de milho impregnados, para o controle de larvas do mosquito *A. aegypti*, substituindo

parte dos seis milhões de quilos de temefós anualmente empregados no controle desse mosquito, onde a população do vetor apresentou resistência ao organofosforado (VILARINHOS, 2002). Ainda que a formulação escolhida tivesse sido a mais adequada, visto que se destinava em grande parte a ser utilizada em água potável, o fato representou importante mudança de paradigmas naquela instituição. Em 2005, a Secretaria de Vigilância em Saúde utilizou cerca de 30 toneladas da Bti, na formulação WDG, essa sim adequada para uso em água destinada ao consumo humano.

A Prefeitura Municipal de Manaus, através da Fundação de Vigilância em Saúde (FVS), em parceria com o Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), elaborou e está conduzindo um programa de aplicação sistemática de bioinseticida à base de Bs para controle de larvas de anofelinos. Os principais criadouros são os igarapés que tiveram seus cursos de água alterados e obstruídos por invasões de terra na periferia da cidade de Manaus e os tanques de piscicultura cuja construção foi incentivada, visando à segurança alimentar e à oportunidade de trabalho da população carente. Os coordenadores do programa optaram pelo emprego da formulação suspensão concentrada, visto que as apresentações granuladas serviam de alimento para peixes e patos, prejudicando o desempenho delas.

O programa de combate a filariose bancroftiniana conduzido pelo Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ) em Recife é um exemplo do emprego do Bs no controle do pernilongo comum (*Culex quinquefasciatus*). Anualmente, são utilizadas cerca de 4,5 toneladas de *B. sphaericus* na formulação granulada que é aplicada em grande diversidade de criadouros. Esse programa pioneiro é outro marco na utilização de bactérias entomopatogênicas no Brasil, servindo de referência para muitas outras iniciativas.

A cidade de Campo Azul, MG, desenvolveu um método inusitado de tratamento de fossas, locais que serviam de criadouros para *Culex* que acabavam

infestando toda a cidade, com cerca de 5000 habitantes. Utilizou *B. sphaericus* sob a forma de suspensão concentrada, aplicando 5 mL do produto comercial no vaso sanitário e imediatamente realizando a descarga, permitindo assim que o produto chegasse às fossas. Esse simples procedimento acabou com a infestação crônica do pernilongo comum na cidade.

Os simulídeos são insetos cujas fêmeas hematófagas causam picadas doloridas e alergênicas que muitas vezes evoluem para dermatites e infecções bacterianas importantes. O gênero *Simulium* (borrachudo), na África e na América do Sul, transmite a oncocercose, doença causada pela ação de uma microfilária (*Onchocerca volvulus*) no globo ocular humano, também conhecida como cegueira-dos-rios, ou mau-dos-garimpeiros. Essa doença já foi detectada no Brasil no Estado de Roraima (VILARINHOS, 2002). Em 2005, houve relatos da doença no Município de Minassul e Serra da Mesa, Estado de Goiás. A fase imatura encontra criadouro em águas lólicas, como córregos e rios de alta drenagem. Constitui sério problema nos estados das Regiões Sul e Sudeste onde não são considerados como vetores de endemias para os seres humanos, mas atacam fortemente o homem e as criações, prejudicando o turismo e o agronegócio.

A Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul coordena um programa que abrange 200 municípios, a grande maioria, na Serra Gaúcha que trata exclusivamente do combate ao borrachudo *Simulium pertinax*. Essa espécie é endêmica da região, muito antropofílica, ocasionando sérios problemas de dermatites, além de estressar as criações, causando perdas de produtividade. Inicialmente o programa empregava o inseticida químico temefós. Em virtude do aparecimento de população resistente, passou-se a empregar o Bti, na formulação de suspensão concentrada, com grande sucesso, fundamentado, sobretudo, no baixo impacto ambiental dos produtos que utilizam essa bactéria como ingrediente ativo. A forma de aplicação do Bti nos criadouros de borrachudos é apresentada na Figura 4. O método prático emprega regadores

cujo conteúdo deve ser vertido em 1 minuto, visando obter concentrações médias do produto comercial da ordem de 15 ppm/metro cúbico de água do criadouro/ minuto.

A Fundação 25 de Julho (Joinville, SC) desenvolve trabalho semelhante ao programa gaúcho, naquele município, consumindo 500 litros de Bti líquido por mês. O produto é aplicado quinzenalmente em 3600 pontos de tratamento nos rios e córregos da região.

Ilha Bela, em São Paulo, é outra região turística que realiza o controle de borrachudos. Embora o programa tenha apresentado oscilações, em 2005, a SUCEN, adquiriu 10.000 litros de Bti para serem empregados no combate àqueles insetos.



Figura 4. Aplicação de Bti em criadouro de borrachudo (*Simulium* spp.).

Produtos Registrados e Empregados na Saúde Pública

Os bioinseticidas bacterianos utilizados na saúde pública são registrados como saneantes. Estes são mais numerosos e apresentam maior diversidade de formulações entre todos os biolarvicidas bacterianos disponíveis no mercado

brasileiro. Existem suspensões concentradas à base de Bti, como Aquabac XT, Bactivec, Bt-horus SC, Teknar HPD. Vectobac AS. Na mesma apresentação, para Bs, dispõem-se o Grislesf, o Sphaerus SC e o Spherico SC. Os granulados que empregam sabugo de milho estão liberados para uso o Vectobac CG para Bti e o Vectolex CG para Bs. Mosquito Dunk é um briquete que emprega Bti como ingrediente ativo. Existe um único representante de Bti na formulação WDG (Grânulos Dispersivos em Água) que é o Vectobac WDG.

Na Agricultura

O potencial inseticida do *B. thuringiensis* é conhecido desde 1915 e já em 1938 era lançada, na França, a primeira formulação comercial destinada ao controle de lagartas (uso agrícola), sendo denominada de Sporeine. Entretanto, a produção industrial em larga escala teve início no final dos anos 50, com a entrada no mercado do produto Thuricide (DE MAAGD; BOSCH; STIEKEMA, 1999).

Em decorrência da sua grande eficácia, especificidade e semelhança na forma de aplicação com os inseticidas químicos tradicionais, as formulações à base de Bt perfazem mais de 200 em todo o mundo, sendo esse o microrganismo o mais amplamente usado no combate às pragas agrícolas, atuando sobre mais de 170 espécies de lepidópteros-praga em todo o globo.

No Brasil, utilização agrícola do Bt ainda é muito pequena, quando se leva em conta a extensão das áreas agricultáveis, evidenciando que esses produtos virão a ocupar importante nicho de mercado na agricultura convencional, na agricultura orgânica, em pastagens e florestas. Estima-se que anualmente sejam tratados 150.000 hectares com produtos à base desse microrganismo, sendo os maiores volumes concentrados em hortaliças.

No Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estão registrados sete produtos comerciais à base de *Bacillus* empregados no combate

a aproximadamente 30 lepidópteros-praga em florestas, pastagens, lavouras e hortas (POLANCZYK; ALVES, 2003). Como ingredientes ativos, encontram-se duas subespécies, o *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstakii* (**Btk**) e o *Bacillus thuringiensis* subesp. *azawai* (**Bta**). Xentari WDG é o único representante do Bta. À base de Btk, são formulados os produtos Bac-Control, Bactur e Dipel como pós-molháveis (PM) e Dipel, Agree e Ecothec Pro, como suspensões concentradas. Cabe destacar o Bac-Control por ser o único produto brasileiro. Existe ainda o Dymmpel, um Btk na formulação pó molhável, comercializado pela empresa Busher & Lepper como saneante para uso em jardinagem amadora.

Considerações Finais

O Brasil, em decorrência da grande extensão das áreas agrícolas, e, em função dos sérios problemas ocasionados pelos dípteros vetores de endemias, apresenta um potencial muito grande para a utilização de bioinseticidas bacterianos. Entretanto, o custo do produto, ainda elevado, quando comparado aos inseticidas convencionais, a falta de tradição no uso de biolarvicidas, somada à falta de capacitação dos atores envolvidos no processo de aplicação desses produtos, têm mantido seu uso muito aquém do real potencial do País. O desenvolvimento de indústrias nacionais que possibilitem a utilização de produtos registrados mais acessíveis, acompanhados de capacitação e treinamento dos recursos humanos envolvidos, certamente reverterá o quadro atual.

Referências

ALVES, L. F. A.; ALVES, S. B.; CAPALBO, D. M. F. Seleção de matéria prima para a elaboração de meio de cultura para a produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kustarki* Berliner. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 379-382, 1997.

ARCAS, J. A. Producción de bacterias entomopatógenas. In: LECUONA, R. E. (Ed.). **Microrganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga**. Buenos Aires: BsAs, 1996. p. 207-222.

BELTRÁN, L.; DÍAZ, S.; BERDUGO, C.; ZAMORA, A.; BUITRAGO, G.; MORENO, N. Estrategia para el diseño de um médio de cultivo para ala fermentacion com *Bacillus thuringiensis*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 1, n. 1, p. 28-34, 1998.

BERNHARD, H.; UTZ, R. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. Chichester: John Willey, 1993. p. 255-267.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 390 p.

DE MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, p. 9-13, 1999.

DE NARDO, E. A. B.; CAPALBO, D. M. F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentações. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. p. 231-256.

DIAS, J. M. C. S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 59-76, 1992.

DULMAGE, H. T.; CORREA, J. A.; GALLEGOS-MORALES, G. Potencial for improved formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* through standardization and fermentation development. In: DE BARJAC, H.; SUTHERLAND, D. (Ed.). **Bacterial control of mosquitoes and black flies: biochemistry, genetics and applications of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus***. New Brunswick, Rutgers: University Press, 1999. p. 110-133.

ERTOLA, R.; YANTORNO, O.; MIGNONE, C. **Microbiología industrial**. Israel: Bem Gurion University, 1994. Disponível em: <http://www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/mbio_ind.htm>. Acesso em: 7 fev. 2006.

GONZÁLEZ, R. **Mejoramiento de medios de cultivo para fermentaciones de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis***. 2004. Trabajo dirigido (Grado) - Universidade de los Andes, Bogotá, 2004.

LACEY, L. A. Production and formulation of *Bacillus sphaericus*. **Mosquito News**, Aliso Viejo, v. 44, p. 153-159, 1984.

MOINO JÚNIOR, A. Produção de fungos, vírus e bactérias entomopatogênicas. In: BUENO, V. H. P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2003. p. 173-186.

ORGANISATION MONDIAL DE LA SANTE - OMS. **Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of biocontrol agents of disease vectors.** Geneva: World Health Organization, 1987. 41 p.

OSÓRIO, P. A. A. **Modelado del proceso de producción de ã-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* en un reactor discontinuo alimentado a pulsos con retención celular completa.** 2004. 100 f. Tesis (Maestría en Ingeniería Química) - Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, 2004.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Chapingo, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2003.

REGIS, L.; SILVA-FILHA, M. H.; SANTOS, M. A. V. M.; OLIVEIRA, C. M. F.; LEROUX C. N. Strains and application strategies for improving the use of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* against mosquitoes. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8.; INTERNATIONAL CONFERENCE ON BACILLUS THURINGIENSIS, 6.; ANNUAL MEETING OF THE SIP, 35., 2002, Foz do Iguassu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. p. 303-305. (Embrapa Soja. Documentos, 184; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos, 74).

REY, L. **Bases da parasitologia médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 349 p.

ROBERG, R. A. P. **Aproveitamento de resíduos industriais para a produção de biomassa entomopatogênica à base de *Bacillus sphaericus*.** 2000. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

SÁNCHEZ-YÁÑEZ, J. M. **Producción de bioinsecticida a base de *Bacillus thuringiensis*; Minirevisión.** Disponível em: <<http://www.monografias.com/trabajos15/bioinsecticida/bioinsecticida.shtml>>. Acesso em: 25 out. 2005.

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

TAMEZ-GUERRA, P.; GALÁN-WONG, L. J.; MEDRANO-ROLDAN, H.; GARCIA-GUTIÉRRES, C.; RODRIGUEZ-PADILLA, C.; GOMEZ-FLORES, R. A.; TAMEZ-GUERRA, R. S. Bioinsecticidas: su empleo, producción e comercialización em México. **Ciência UANL**, v. 4, n. 2, p. 143-152, 2001.

VILARINHOS, P. T. R.; MARUNIAK, J. E.; HALL, D. W. Characterization and biological activity of brazilian isolate of *Bacillus sphaericus* (Neide) highly toxic to mosquito larvae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 6, p. 771-776, 1996.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 40, p. 549-576, 1986.

VILARINHOS, P. T. R. Dengue transmission and *Aedes aegypti* control in Brazil. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8.; INTERNATIONAL CONFERENCE ON BACILLUS THURINGIENSIS, 6.; ANNUAL MEETING OF THE SIP, 35., 2002, Foz do Iguassu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. p. 55-57. (Embrapa Soja. Documentos, 184; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos, 74).

Produção, Formulação e Aplicação de Fungos para o Controle de Pragas

Roberto Teixeira Alves

Introdução

Muitos são os governos que, hoje, advogam a redução do uso de agrotóxicos na produção de alimentos. Essa tendência, encontrada principalmente entre os países produtores e exportadores de alimento como a Argentina e o Brasil, tem justificativa comercial e ambiental. Nesse contexto, o controle biológico é importante ferramenta para ser utilizada no manejo integrado de diferentes insetos-praga na agricultura, uma vez que utiliza inimigos naturais para manter a população da praga abaixo dos níveis de dano econômico, evitando, ao mesmo tempo, prejuízos ambientais.

Produtos à base de fungos benéficos, utilizados no controle de insetos, são chamados de micoinseticidas e podem desempenhar significativo papel em uma agricultura moderna e sustentável. Para tanto, é essencial que se amplie o conhecimento sobre esses fungos e, também, que se desenvolvam técnicas de produção, de formulação e de aplicação apropriadas.

Produção de Fungos

Os fungos entomopatogênicos são capazes de se desenvolver e esporular sobre diferentes meios de cultura. Podem, igualmente, ser cultivados sobre seus

insetos hospedeiros *in vivo* ou usando métodos *in vitro* de cultivo que são mais econômicos e mais rápidos. Em geral, a escolha do método dependerá da facilidade com que os propágulos desejados serão formados (FERRON, 1978).

O controle microbiológico, aumentativo ou inundativo, de insetos-praga requer uma produção massal do microrganismo benéfico. Existem métodos de produção *in vitro* de fungos entomopatogênicos em substratos sólidos, fermentação líquida e fermentação líquido-sólida.

Produção em Substratos Sólidos

Fungos entomopatogênicos podem ser produzidos sobre meios de cultura contendo ágar, outros nutrientes e antibióticos como: batata, dextrose e ágar (BDA); batata, cenoura e ágar (BCA); sabouraud, dextrose e ágar (SDA); ou sobre substratos naturais como arroz cozido durante o processo de autoclavagem em Erlenmeyers, sacos plásticos ou bandejas. Os substratos sólidos são usados para a produção de conídios aéreos. Em geral, grande área de superfície é necessária para a esporulação do fungo. Muitos estudos sobre processos de multiplicação de fungos como o *Metarhizium anisopliae* foram desenvolvidos no Brasil e em outros países do mundo (GUAGLIUMI, 1971; GUAGLIUMI; MARQUES; VILAS BOAS, 1974; MOURA COSTA et al., 1974; AQUINO et al., 1975; AQUINO et al., 1977; ALVES, 1986).

No trabalho de Aquino et al. (1975), foi desenvolvida a idéia básica do processo de produção massal de *M. anisopliae* em arroz autoclavado. Depois disso, vários autores vêm realizando melhoramentos e ajustes nesse sistema de produção.

Produção com Fermentação Líquida

Os microrganismos podem ser desenvolvidos em *Erlenmeyers* ou em tanques fermentadores visando à produção em maior escala onde podem ser

mais bem controlados e monitorados. O fungo se desenvolve, geralmente, como micélio submerso em cultura líquida. Os produtos finais desejados são conídios (esporos), porém, é mais comum se produzir blastosporos e corpos hifais com esse método. Blastosporos são hidrofílicos, sem pigmentação e menos resistentes às condições adversas do clima que os conídios aéreos (FERRON, 1978; VAN WINKELHOFF; McCOY, 1984).

Existem dois micoinseticidas produzidos, no mercado internacional, por fermentação líquida, usando o fungo *Verticillium lecanii* como ingrediente ativo, o Vertalec para controle de moscas-brancas; e o Mycotal para controle de pulgões (GOETTEL, 1994). A colheita dos conídios produzidos em meio líquido é baixa, pois eles são hidrofóbicos e por isso mais difíceis de serem formulados em óleos para aplicação em Ultra Baixo Volume (ULV).

Fermentação Líquido-sólida

Este sistema de fermentação em dois estágios combina os benefícios da alta produção de biomassa na fase líquida e da produção estável de conídios aéreos hidrofóbicos no meio sólido. O produto da fase de fermentação líquida é o micélio que rapidamente coloniza o substrato sólido. Organismos contaminantes ficam menos competitivos devido à grande quantidade do inóculo desejável colocada sobre o meio sólido. Apesar de vários cereais terem sido testados, o arroz tem-se mostrado o mais apropriado para a esporulação de *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. na segunda fase desse método.

A espécie *M. anisopliae* tem sido cultivada em meios de cultura artificiais como Sabouraud-Dextrose-Ágar ou Batata-Dextrose-Ágar, entre outros, para uso em bioensaios de laboratório. As condições de incubação devem ser de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ de temperatura e 24 horas de escuro de 10 a 15 dias. De preferência, o fungo a ser utilizado na produção não deve ter sido repicado mais de quatro vezes sobre meio artificial.

Alguns experimentos necessitam de maiores quantidades de conídios (produção massal), e a produção deve ser feita pelo método de fermentação em dois estágios descrito anteriormente. O meio líquido de cultura submersa utiliza um meio contendo 20 g/litro de extrato de levedura, 20 g/litro de glicose e 1000 mL de água em um Erlenmeyer agitando em um *shaker* a 150 rotações por minuto, durante três dias, na temperatura de 27°C, com a finalidade de produzir corpos hifais e micélio para a inoculação na segunda fase. Arroz branco autoclavado em sacos plásticos de polipropileno é usado como o substrato sólido para a inoculação na segunda fase. Eles serão incubados por, pelo menos, 12 dias a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ para um bom desenvolvimento e esporulação do fungo. Feitos esses procedimentos, os sacos plásticos são abertos para secagem do fungo no substrato a $20 \pm 3^\circ\text{C}$. Depois de cinco dias, a umidade será ao redor de 20%. Os conídios poderão ser extraídos por peneiramento (300 mm mesh), por extração ou, ainda, por aspiração (tipo aspirador de pó). O ideal é que a umidade final dos conídios fique próxima de 5%, o que permite a formulação em óleos puros ou emulsionáveis e aplicados no campo contra os insetos-praga.

Formulação de Fungos

A formulação de micoinseticida refere-se à composição resultante da mistura de fungos entomopatogênicos com outros ingredientes. Estes devem contribuir para a alta viabilidade, estabilidade, virulência e eficácia do agente de controle microbiano e para a aceitação do produto pelo usuário.

Conídios, blastosporos e até o micélio podem ser o ingrediente ativo do micoinseticida que será o componente biológico da formulação.

O desenvolvimento de nova formulação de micoinseticida envolve ou necessita de estudos sobre:

- compatibilidade dos formulantes com os conídios do fungo;

- possibilidade de armazenamento do produto formulado em prateleiras, de preferência, em temperatura ambiente;
- aumento da eficiência do fungo em relação a outras formulações anteriormente utilizadas;
- capacidade de espalhamento sobre o corpo do inseto e sobre a folhagem (superfícies hidrofóbicas);
- testes de volatilidade provando diminuí-la;
- bioensaios com diferentes proporções dos formulantes e do ingrediente ativo;
- medições da viscosidade com diferentes proporções para relacioná-la à evaporação e à qualidade da pulverização;
- capacidade de proteger os conídios contra a radiação solar;
- proposição de melhorias na atomização da suspensão formulada de modo que possa ser utilizada a aplicação de gotas controladas (CDA) com equipamentos convencionais de uso cotidiano;
- facilidade de adoção/uso pelo produtor rural.

Tipos de Formulação

Pulverizadas

Concentrados emulsionáveis, suspensões concentradas, suspoemulsões, emulsões em água, pós molháveis, grânulos dispersíveis em água, suspensões encapsuladas, géis emulsificáveis e para ultrabaixo volume (GLOBAL CROP PROTECTION FEDERATION, 1994).

Seca

Pós, grânulos, iscas e fumigantes.

Outros Tipos

Nebulizada, fumaça, tira plástica.

A maioria dos produtores aplica inseticidas em formulações à base de água para controlar insetos-praga em baixos, médios e altos volumes de aplicação usando pulverizadores com bico hidráulico ou atomizadores (MATTHEWS, 1992).

Os resultados obtidos com fungos não-formulados são bastante variáveis, sendo diretamente influenciados pelas condições climáticas, pela qualidade dos micoinseticidas utilizados e pelo correto manuseio e aplicação deles.

Resultados de Sucesso

Resultados de sucesso foram obtidos com formulações à base de óleos puros contra diferentes insetos-praga e mostraram o potencial de alguns óleos empregados na formulação que ajudam o fungo a superar ou a minimizar as condições adversas do clima (AGUDELO; FALCON, 1983; BATEMAN et al., 1993; PRIOR; JOLLANDS; LE PATOUREL, 1988).

O uso de óleos emulsionáveis tem grande potencial para formular (suspoemulsões) e aplicar micoinseticidas visando ao controle de pragas.

Estudos laboratoriais da formulação de fungos em óleos adjuvantes emulsionáveis para controle biológico de pragas foram desenvolvidos pela Embrapa Cerrados para servir de base a futuros trabalhos de campo sobre as interações cultura-praga-micoinseticida-pulverização.

Formulações em óleo emulsionável misturam-se com água, permitindo a aplicação do micoinseticida com equipamentos convencionais já utilizados pelos

produtores rurais (ALVES et al., 2000a), além de aumentar a infectividade do fungo (ALVES et al., 1998a), diminuir a evaporação (ALVES et al., 2000b) e minimizar a ação deletéria dos raios ultravioleta sobre os conídios (ALVES et al., 1998b).

O grau com que uma gota se espalha sobre determinada superfície como a cutícula de um inseto, é geralmente caracterizado por um ângulo de contato entre a superfície sólida e a tangente da gota. Formulações que contêm maior concentração de óleo adjuvante emulsionável diminuem a tensão superficial do líquido e, como consequência, o ângulo de contato é bem menor que no caso de formulações sem concentrações ou com baixas concentrações do referido óleo (MAAS, 1971).

As formulações à base de óleos puros, por causa de sua baixa tensão superficial, espalham-se num grau mais elevado que as formulações em óleos emulsionáveis e estes, por sua vez, espalham-se bem melhor que as formulações convencionais contendo conídios, água e um espalhante adesivo.

Um rápido espalhamento pode aumentar o número de conídios em contato com a cutícula do inseto. Por sua vez, pode ser uma desvantagem para formulações com baixa viscosidade e alta volatilidade, como as convencionais com espalhante adesivo, porque pequenas gotas possuem alta proporção entre área de superfície e volume (BATEMAN, 1996). Por isso, em ambientes secos, pode ocorrer evaporação maior e mais rápida dessas formulações convencionais, apesar de os conídios não evaporarem.

Comparações sobre o espalhamento de gotas demonstraram que, quando a concentração de óleos adjuvantes emulsionáveis foi aumentada, o espalhamento também aumentou e isso ajuda muito o fungo a controlar o inseto-praga mais rapidamente (ALVES et al., 2001).

Quando a concentração de óleos adjuvantes emulsionáveis foi aumentada, a viscosidade aumentou e a evaporação diminuiu, mantendo o fungo no alvo desejado por mais tempo (ALVES et al., 2000b).

Uma característica essencial a um micoinseticida é a de ele poder ser armazenado nas prateleiras de uma revenda de produtos agropecuários ou em refrigeração (8°C), por um período de tempo de pelo menos seis meses. Os esporos de *Metarhizium anisopliae*, formulados em óleos adjuvantes emulsionáveis, podem ser armazenados a 27°C, por 35 semanas, mantendo viabilidade acima de 80% e por cerca de 40 semanas, a 10°C, com viabilidade superior a 90% (ALVES et al., 2002a).

O óleo emulsionável funciona tão bem quanto os óleos puros já utilizados em outros micoinseticidas (BATEMAN et al., 1993, 1994; MILNER et al., 1994; KOOYMAN et al., 1997; LOMER; PRIOR; KOOYMAN, 1997). No entanto, traz grande vantagem: ele se mistura com água, permitindo a pulverização do bioinseticida com os mesmos equipamentos já utilizados pelos produtores rurais (ALVES et al., 2000c). Já os micoinseticidas à base de óleos puros exigem equipamentos para aplicação em ultrabaixo volume (≤ 5 L/ha). Outra questão é que o produtor rural prefere formulações prontas para se misturar com água, pois estas evitam pós-químicos, alergias e até intoxicações mais graves por inalação. Então, nesse caso, o micoinseticida deverá ser apresentado na forma líquida, já misturado ao óleo emulsionável, para que o produtor apenas o dilua em água, aplicando-o na lavoura.

A adição de óleos adjuvantes emulsionáveis aumentou a infectividade de *Metarhizium anisopliae* em formulações à base de água sobre larvas do besouro *Tenebrio molitor*, quando comparada à formulação de água com espalhantes adesivos convencionais (ALVES et al., 1998a).

Também, foi avaliado o resíduo da pulverização de esporos de *M. anisopliae* var. *acridum* formulado em óleo adjuvante emulsionável sobre folhas de trigo, o qual foi tão eficiente quanto o resíduo da pulverização de formulações em óleos minerais puros para matar gafanhotos (ALVES et al., 2001).

As formulações com óleos adjuvantes emulsionáveis, selecionados na pesquisa, aumentaram a tolerância de esporos de *M. anisopliae* contra os efeitos

da radiação ultravioleta por até seis horas, o que ajuda a preservar o fungo em melhores condições no meio ambiente (ALVES et al., 1998b).

Resultados de pesquisas demonstraram que a vazão de pulverizadores não foi afetada quando a concentração de óleos adjuvantes emulsionáveis foi aumentada em até 10%. Todos os pulverizadores convencionais testados podem ser utilizados na aplicação de formulações de fungo à base de água na faixa apropriada de tamanho de gotas (70-150 micrômetros) dentro do contexto de aplicações de gotas controladas (CDA), mas é necessário ajustar a pressão e utilizar o bico apropriado para se atingir o alvo desejado. Nenhuma das diferentes combinações de pulverizadores, tampouco os bicos testados por Alves et al. (2000b), afetou a viabilidade do fungo.

Técnicas de Aplicação de MicoInseticidas

O processo de aplicação eficiente de micoInseticida ou de qualquer pesticida, descrito por Steinke e Giles (1995), consiste em algumas etapas como:

Mistura

Pode ocorrer tanto na formulação do produto na biofábrica quanto no momento da diluição do produto no tanque do pulverizador em função do volume de aplicação (litros/ha). Os diluentes no tanque podem ser água, óleo, espalhantes adesivos.

Atomização

É a etapa de formação de gotas do produto ou do produto com o diluente. É realizada com o auxílio de bicos hidráulicos, atomizadores rotativos ou pneumáticos. Forças electrodinâmicas e ultra-sônicas também podem ser utilizadas para formar gotas de pulverização. Material seco, em geral, não é quebrado ou atomizado no momento da aplicação, mas pode ser finamente

separado e colocado em uma corrente de ar formada no próprio equipamento e ser aplicado como uma fina poeira.

Transporte

O transporte das gotas ou de pós é muitas vezes acompanhado, propositadamente, de uma corrente de ar e liberado através de pressão hidráulica ou de força gravitacional.

Coleta

Resulta da deposição do produto no alvo desejado que pode ser inseto, planta ou animal. A coleta do produto pode incluir processos impactantes, interceptação, difusão, descida do produto por gravidade e atração eletrostática.

Formação de Depósito e Migração

Depois de a gota ou partícula ser coletada na superfície-alvo ela pode ou não mudar o processo de formação de depósito. As gotas ou partículas podem ser transportadas pelos insetos-praga no ambiente.

Interação com o Inseto-praga

Depois de o produto ser depositado na praga, na vegetação ou em outra superfície, haverá uma interação entre o produto e o inseto-praga. Isto poderá ocorrer pelo contato (como o caso de conídios na cutícula do inseto), absorção, ingestão, inalação ou por outro modo de ação.

Ação Biológica

Se todas as etapas mencionadas anteriormente foram executadas com sucesso, e, uma dose necessária do produto foi aplicada sobre o inseto-praga de forma apropriada e em um estado viável, o resultado desejado terá grandes chances de ser alcançado.

Se a compra e a utilização de um equipamento de aplicação especial forem pré-requisito para adoção de um novo micoinseticida, então a probabilidade de esse produto ser utilizado em grande escala será muito pequena (CHAPPLE; BATEMAN, 1997).

As faixas para os diferentes volumes de aplicação podem ser vistas na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1. Volume de aplicação em diferentes culturas (litros/ha).

Termos	Culturas anuais	Árvores e arbustos
Alto volume	> 600	> 1000
Médio volume	200 - 600	500 - 1000
Baixo volume	50 - 200	200 - 500
Muito baixo volume	5 - 50	50 - 200
Ultrabaixo volume	< 5	< 50

Fonte: Matthews (1992).

As formulações de fungos em óleos emulsionáveis podem ser aplicadas desde muito baixo volume (5 a 50 L/ha) a médios volumes (200 a 600 L/ha) com técnicas de gotas controladas e permitir, ainda, o uso de equipamentos convencionais de pulverização e água.

Aplicação de Gotas Controladas (CDA)

Boas formulações devem proporcionar melhorias na atomização da suspensão formulada de modo que a aplicação de gotas controladas (CDA) possa ser utilizada com equipamentos convencionais de uso cotidiano pelo produtor rural.

Características Desejáveis para uma Boa Pulverização

- Tamanho de gotas entre 50 e 100 micrômetros de VMD para formulações oleosas.
- Tamanho de gotas entre 70 e 150 micrômetros de VMD para formulações aquosas.
- Uniformidade do tamanho das gotas $\text{Span} < 1,0$.

VMD é o diâmetro do volume mediano que divide as gotas de um líquido pulverizado em duas partes, as maiores e as menores que o próprio diâmetro do volume mediano.

Span indica uma faixa de tamanhos semelhantes de gotas e é calculada por meio da distribuição do volume aplicado pela fórmula:

$$\text{Span} = (D_{(v,0,9)} - D_{(v,0,1)}) / D_{(v,0,5)}$$

- Densidade das gotas (n° de gotas/cm²) igual ou maior que 20 gotas/ cm² para inseticidas biológicos ou químicos.

Referências

AGUDELO, F.; FALCON, L.A. Mass production, infectivity and field application studies with the entomogenous fungus *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 42, p. 124-132, 1983.

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C. Performance of *Metarhizium anisopliae* formulations with oil adjuvants on *Tenebrio molitor*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADJUVANTS FOR AGROCHEMICALS, 5., 1998, Memphis, TN. **Proceedings**. Memphis: ISAA, 1998a. p. 170-175.

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. **Crop Protection**, Surrey, v. 17, p. 675-679, 1998b.

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P. Development of mycopesticide formulations and application techniques. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21., 2000, Foz do Iguassu, PR. **Abstracts**. Londrina: Embrapa Soja, 2000a. p. 509. (Embrapa Soja. Documentos, 143).

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Volatility comparisons of different formulations used to apply mycoinsecticides. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21., 2000, Foz do Iguassu, PR. **Abstracts**. Londrina: Embrapa Soja, 2000b. p. 512. (Embrapa Soja. Documentos, 143).

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Evaluation of application techniques of an emulsifiable adjuvant oil fungal formulation. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21., 2000, Foz do Iguassu, PR. **Abstracts**. Londrina: Embrapa Soja, 2000c. p. 512. (Embrapa Soja. Documentos, 143).

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Espalhamento e eficiência de uma formulação de fungo à base de óleo adjuvante emulsionável. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7., 2001, Poços de Caldas. **Livro de resumos**. Poços de Caldas: SICONBIOL, 2001. p. 229.

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; GUNN, J.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium* spp. conidia. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 91-99, 2002a.

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R.; OLIVEIRA, M. A. S.; ICUMA, I. M. Effects of formulations and volume application rate on the secondary pick-up of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia pathogenic to the desert locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19., 2002, Manaus. **A entomologia no século 21 e o manejo da biodiversidade: resumos**. [S.l.]: Sociedade Entomológica do Brasil; [Manaus]: INPA: Fundação Universidade do Amazonas, 2002b. p. 45-46.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p. 73-126.

AQUINO, M. L. N.; CAVALCANTI, V. A. L. B.; SENA, R. C.; QUEIROZ, G. F. **Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarhizium anisopliae***. Recife: CODECAP, 1975. 31 p. (Boletim Técnico, 4).

AQUINO, M. L. N.; VITAL, A. F.; CAVALCANTI, V. A. L. B.; NASCIMENTO, M. G. **Cultura de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin em sacos de polipropileno**. Recife: CODECAP, 1977. 11 p. (Boletim Técnico, 5).

BATEMAN, R. P. **Formulation and application of insect pathogens**. [S.l.: s.n.], 1996. 74 p. (LUBILOSATechnical Bulletin, 4).

BATEMAN, R. P.; CAREY, M.; MOORE, D.; PRIOR, C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 122, p. 145-152, 1993.

BATEMAN, R. P.; PRICE, R. E.; MULLER, E. J.; BROWN, H. D. Controlling brown locust hopper bands in South Africa with a myco-insecticide spray. In: BRITISH CROP PROTECTION CONFERENCE PESTS AND DISEASES, 1994, Brighton. **Proceedings...** Brighton: British Crop Protection Council, 1994. p. 609-616.

CHAPPLE, A. C.; BATEMAN, R. P. Application systems for microbial pesticides: necessity not novelty. In: EVANS, H. F. (Ed.). **Microbial insecticides: novelty or necessity?** Farnham: British Crop Protection Council, 1997. p. 181-190.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Reviews of Entomology**, Palo Alto, v. 23, p. 409-442, 1978.

GLOBAL CROP PROTECTION FEDERATION. **Catalogue of pesticide formulation types and international coding system**. 3th ed. Brussels, 1994. 36 p. (Technical Monograph, 2).

GOETTEL, M. S. A simple method for mass culturing entomopathogenic Hyphomycete fungi. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 3, p. 15-20, 1994.

GUAGLIUMI, P. Pragas da cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 28-29, 1971.

GUAGLIUMI, P.; MARQUES, E. J.; VILAS BOAS, A. M. **Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin no controle da cigarrinha-da-folha *Mahanarva posticata* no nordeste do Brasil**. Recife: CODECAP, 1974. 56 p. (Boletim Técnico, 3).

KOOYMAN, C.; BATEMAN, R. P.; LANGEWALD, J.; LOMER, C. J.; OUAMBAMA, Z.; THOMAS, M. B. Operational-scale application of entomopathogenic fungi for the control of Sahelian grasshoppers. **Proceedings of the Royal Society of London, Serie B, Biological Sciences**, London, v. 264, p. 541-546, 1997.

LOMER, C. J.; PRIOR, C.; KOOYMAN, C. Development of *Metarhizium spp.* for the control of grasshoppers and locusts. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, Ottawa, v. 171, p. 265-286, 1997.

MAAS, W. **ULV application and formulation techniques**. Amsterdam: NV Philips-Duphar, 1971. 165 p.

MATTHEWS, G. A. **Pesticide application methods**. 2nd ed. Harlow Essex: Longman Scientific & Technical, 1992. 405 p.

MILNER, R. J.; HARTLEY, T. R.; LUTTON, G. G.; PRIOR, C. Control of *Phaulacridium vittatum* (Sjostedt) (Orthoptera: Acrididae) in field cages using an oil-based spray of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of the Australian Entomological Society**, Brisbane, v. 33, p. 165-167, 1994.

MOURA COSTA, M. D.; MATTA, E. A. F.; MAGALHÃES, C. D.; MATOS, D. P. Nova técnica para produção em larga escala do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok em laboratório. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, Salvador, v. 13, p. 85-89, 1974.

PRIOR, C.; JOLLANDS, P.; LE PATOUREL, G. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 52, p. 66-72, 1988.

STEINKE, W. E.; GILES, D. K. Delivery systems for biorational agents. In: HALL, F. R.; BARRY, J. W. (Ed.). **Biorational pest control agents: formulation and delivery**. Washington: American Chemical Society, 1995. p. 80-94.

VAN WINKELHOFF, A. J.; MCCOY, C. W. Conidiation of *Hirsutella thompsonii* var. *synnematos* in submerged culture. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 43, p. 59-68, 1984.

Introdução

Entre os diversos vírus associados a insetos e a outros invertebrados (RIBEIRO; SOUZA; KITAJIMA, 1998; EVANS, 2000), aqueles pertencentes à família Baculoviridae têm sido isolados de mais de 700 espécies de invertebrados, incluindo Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Coleoptera, Neuroptera, Trichoptera e Thysanura, bem como Crustaceae, sendo os mais empregados mundialmente como inseticidas microbianos. Essa família é composta de dois gêneros: o *Nucleopolyedrovirus*, que compreende os vírus de poliedrose nuclear (VPN); e o *Granulovirus*, que engloba os vírus de granulose (VG). A principal via de infecção é a oral, quando larvas hospedeiras se alimentam de folhas ou outros substratos alimentares contaminados com corpos protéicos de inclusão (CPI) (poliedros ou grânulos) contendo as partículas virais. No intestino médio (ventrículo), devido ao pH altamente alcalino, os CPIs são dissolvidos, liberando os virions (nucleocapsídeo(s) + envelope viral), cujos envelopes se fundem às membranas das microvilosidades das células epiteliais do ventrículo. Em seguida, os nucleocapsídeos migram através do citoplasma da célula e, no caso dos VPNs, penetram por meio dos poros nucleares, atingindo o núcleo, onde liberam o DNA viral, aí ocorrendo a transcrição dos genes do vírus e a replicação do seu genoma. Nessa fase primária de infecção, são sintetizados no núcleo apenas

nucleocapsídeos, geralmente, não havendo formação de CPI, à exceção de VPNS associados a larvas de himenópteros desfolhadores, nos quais a infecção se restringe às células epiteliais do ventrículo, com formação de CPI. Os nucleocapsídeos formados passam pela membrana nuclear e atravessam a membrana basal das células, adquirindo novo envelope. Nessa fase, são chamados de *budded virions*(BV), com características morfológicas e presença de proteínas específicas. Atingindo a hemolinfa do inseto, provocam infecções sistêmicas em vários tecidos do hospedeiro. Em estágios avançados da infecção, há a formação de CPI, nos quais ocorre a oclusão de virions. Gradativamente, os núcleos das células infectadas tornam-se repletos de CPI, havendo a ruptura das membranas celulares e a liberação de grande quantidade de CPI na hemolinfa do hospedeiro. No processo de infecção, o inseto é debilitado, perdendo a capacidade motora e de alimentação, apresentando, geralmente, a característica de se deslocar para as partes superiores da planta onde morre em cerca de 5 a 10 dias, apresentando o corpo descolorido em relação à lagarta sadia. Em pouco tempo, o corpo da lagarta se rompe, liberando grande quantidade de vírus sobre partes da planta, constituindo em inóculo para a transmissão horizontal do vírus. Para mais detalhes quanto aos aspectos básicos: taxonomia, processo infectivo, biologia, ecologia, ver o Capítulo 8.

A maior utilização de baculovírus no controle de pragas, em nível mundial, em relação a outros vírus entomopatogênicos tem ocorrido, principalmente, devido a algumas características importantes (MOSCARDI, 1998, 1999) para seu uso em programas de manejo integrado de pragas, tais como: (i) em geral, apresentam alta virulência e especificidade ao hospedeiro; (ii) as partículas virais são oclusas em massas de proteínas (poliédricas ou granulares) que as protegem, em certo grau, contra a desativação pela radiação solar e a degradação microbiana; (iii) são restritos aos invertebrados, não se encontrando vírus similares em plantas e vertebrados, o que confere segurança (inocuidade) a esses organismos; (iv) por ser altamente específicos ao hospedeiro de origem,

não afetam outras espécies de pragas e de inimigos naturais (predadores e parasitóides), não causando desequilíbrio biológico em agroecossistemas; e (v) por ser inócuos aos vertebrados e plantas e ocorrer naturalmente, não se constituem em risco de contaminação do solo e de águas superficiais e subterrâneas e tampouco se acumulam em cadeias alimentares, tornando-se inseticidas biológicos importantes para uso em programas de manejo integrado de pragas.

Neste capítulo, serão abordados, principalmente, os baculovírus, quanto aos aspectos relativos à produção, à formulação e à aplicação (uso) no controle de pragas, utilizando, sempre que possível, o uso do nucleopoliedrovírus da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) no Brasil como exemplo, pois, atualmente, tem sido o maior programa mundial de uso de um entomopatógeno contra uma única praga em uma cultura.

Produção e Formulação de Baculovírus

Apesar de muitas tentativas e avanços quanto à produção de baculovírus *in vitro*, utilizando células de insetos em biorreatores, essa técnica é usada apenas em laboratório, em pequena escala para estudos de processos relacionados à infecção viral e à produção de proteínas de interesse medicinal, através da modificação genética de baculovírus. No entanto, sua aplicação prática, visando à produção comercial desses agentes como inseticidas biológicos, ainda esbarra em problemas técnicos e econômicos, inviabilizando seu uso até o momento. Portanto, apenas a produção *in vivo*, envolvendo, necessariamente, a produção do inseto hospedeiro do agente viral, tem sido realizada em todos os casos conhecidos de utilização de baculovírus (SHAPIRO, 1986; ALVES et al., 1998; MOSCARDI, 1999). Essa produção é realizada para a maioria dos baculovírus, em laboratório, onde o inseto hospedeiro é criado continuamente, sendo a fase larval alimentada com dieta artificial apropriada a cada espécie. Nesse sistema, cerca

de 95% da produção diária de lagartas são utilizadas para a produção de vírus, sendo as lagartas alimentadas com dieta artificial contaminada com o vírus, coletando-se as mortas pelo patógeno, para posterior processamento e formulação. Em alguns casos, a produção pode ser efetuada no campo, aproveitando a ocorrência natural do inseto hospedeiro, para aplicar determinado baculovírus sobre a planta preferencial do inseto e coletar as lagartas mortas pelo vírus, para armazená-las sob congelamento, visando ao processamento posterior para obter uma formulação do inseticida biológico.

Em geral, a formulação de bioinseticidas virais envolve o ingrediente ativo (vírus), o inerte principal e outros adjuvantes, como dispersantes, protetores contra a radiação ultravioleta (UV), entre outros, que variam de acordo com a formulação (pó molhável, suspensão aquosa.) (BURGES, 1998). A exemplo de outros entomopatógenos utilizados como inseticidas biológicos, os componentes da formulação de inseticidas virais não podem afetar o agente ativo. Estes devem ser testados separadamente e em conjunto, de modo a garantir a atividade viral na formulação.

De modo geral, as técnicas para a produção de vírus entomopatogênicos em laboratório variam de acordo com o inseto hospedeiro e o vírus, demandando condições específicas a cada sistema (SHAPIRO, 1986; ALVES et al., 1998), o que envolve as seguintes etapas: (i) elaboração de procedimentos de criação do inseto que possibilitem sua produção massal, envolvendo condições ambientais, físicas (recipientes de criação), sanitárias (impedindo contaminações indesejáveis) e nutricionais (dieta artificial adequada à espécie), ótimas para o desenvolvimento e a manutenção contínua dos insetos em laboratório; (ii) seleção do isolado mais virulento do vírus a ser produzido e sua caracterização morfológica e molecular; (iii) determinação dos parâmetros para a produção massal do vírus (condições ambientais, estágio larval a ser inoculado para máxima produção/lagarta, modo de inoculação da dieta e dosagem do vírus, tipo de recipiente a ser utilizado e densidade populacional ótima de lagartas/

recipiente); e (iv) método apropriado para coleta e armazenamento de insetos mortos pelo patógeno, visando a posteriores processamento e formulação. Um esquema de produção massal do nucleopoliedrovírus da lagarta-da-soja, *A. gemmatalis* (AgMNPV), em laboratório, é apresentado na Figura 1.

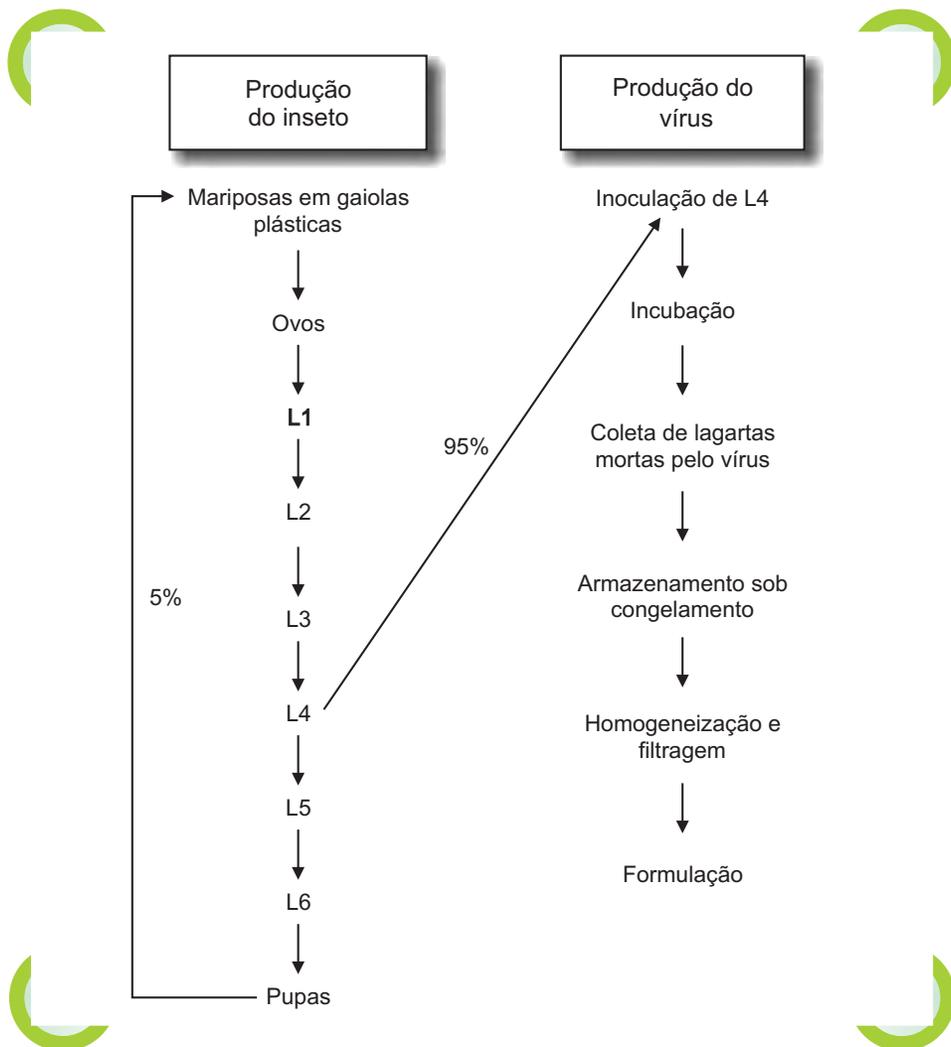


Figura 1. Esquema simplificado para a produção do nucleopoliedrovírus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV), em laboratório. Pré-oviposição: de 3 a 4 dias; L1 a L4: 6 dias; L4: de 2 a 3 dias; L5: 4 dias; L6+pré-pupa: 6 dias; pupa: de 9 a 10 dias, a 26°C.

No campo, a produção de vírus entomopatogênicos é realizada aproveitando a ocorrência natural do inseto-alvo, para a aplicação do vírus contra populações médias e altas, visando à coleta de lagartas mortas pelo patógeno para armazenamento sob congelamento (-10°C) e posteriores processamento e formulação. Essa técnica é apropriada para espécies de lagartas que se alimentam expostas (desfolhadoras) e que não têm o tegumento rompido assim que morrem pela infecção viral, como é o caso da lagarta-da-soja que morre dependurada em folhas e hastes de soja, sem rompimento do tegumento, por cerca de dois a três dias, permitindo sua coleta manual. Para a maioria das espécies, no entanto, há a associação de quitinase ao processo de replicação viral, com o tegumento do inseto se rompendo com muita facilidade por ocasião da morte larval. Nesse caso, uma alternativa seria coletar as larvas, ainda moribundas, cerca de um dia antes da morte.

Para a produção do AgMNPV no campo, as seguintes etapas são adotadas (MOSCARDI; SOSA-GÓMEZ, 2000): (i) seleção de áreas de sojicultores com 15 a 20 lagartas/m linear de soja; (ii) aplicação diária do vírus em duas a três lavouras; (iii) inspeção de lavouras no sexto dia após o tratamento (DAT), selecionando, pelos sintomas da doença e número de lagartas, a melhor das áreas para coleta; (iv) coleta aos oito ou nove DAT, utilizando diaristas; (v) a cada duas horas, os diaristas entregam o material coletado, que é colocado em bandejas plásticas, sendo descartado por pessoas treinadas, tudo o que for indesejável (folhas, lagartas sem sintomas, lagartas de outras espécies), acondicionando as lagartas mortas pelo AgMNPV em caixas de isopor com gelo; e (vi) o material coletado durante cada dia é, em seguida, colocado em sacos plásticos e armazenado em câmara fria ou *freezer* (-4° a -10°C), para posterior processamento e formulação (Figura 2). Nesse processo, a aplicação do vírus e a coleta ocorrem diariamente, durante o período de ocorrência natural da lagarta-da-soja, obtendo-se média de 1,8 kg de lagartas mortas/diarista/dia.

O processamento e a formulação de baculovírus envolvem diferentes técnicas (BATISTA FILHO et al., 1998; BURGÉS, 1998; MOSCARDI; SOSA-

GÓMES, 2000; WILLIAMS; CISNEROS, 2001). As larvas mortas, obtidas da produção em laboratório ou em campo, passam por um processo inicial de homogeneização (trituração em liquidificadores industriais), filtragem do material para separar os tecidos do inseto do líquido larval que contém o vírus (existem equipamentos, como máquinas extratoras de sucos de frutas adaptadas que realizam, simultaneamente, a homogeneização e a filtragem do material), adição de inertes e outros componentes da formulação, secagem (em bandejas por ar forçado, em atomizadores), controle de qualidade e embalagem. Um esquema de processamento e da formulação do AgMNPV é apresentado na Figura 2.

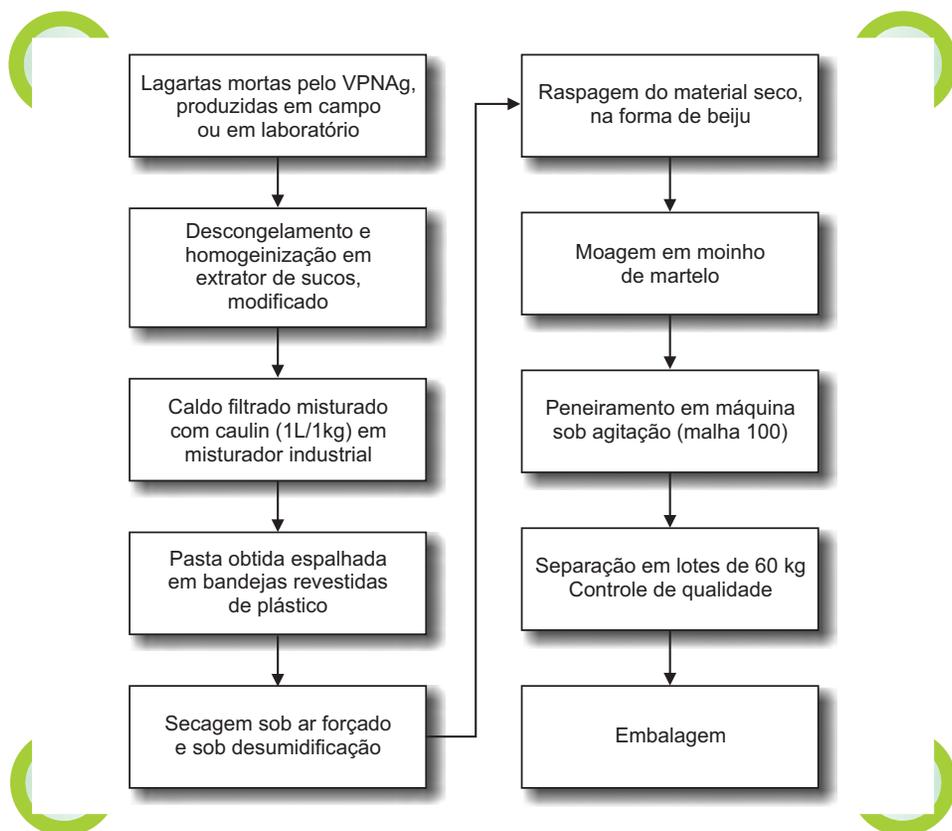


Figura 2. Esquema simplificado do processamento e da formulação do AgMNPV para o controle da lagarta-da-soja, *A. gemmatilis*.

A formulação de vírus entomopatogênicos deve ser realizada de forma a se obter um produto: (i) de fácil manuseio pelo agricultor; (ii) que tenha estabilidade no armazenamento; (iii) que tenha propriedades físico-químicas adequadas para mistura com água ou óleo e cobertura da planta-alvo; e (iv) que permita maximizar a persistência do inóculo viral sobre a planta. Em relação a esse aspecto, é importante mencionar que os baculovírus são muito afetados pelo espectro ultravioleta (UV-A e B) da radiação solar e, quando aplicados como inseticidas biológicos, sua atividade pode ser perdida em horas ou poucos dias (MOSCARDI, 1998, 1999). Desse modo, é desejável que formulações de baculovírus contêmham alguma substância que atue como “protetor solar”, permitindo prolongar a atividade do agente ativo no campo e o controle eficiente da praga visada. Várias substâncias podem ser utilizadas nesse sentido (SHAPIRO, 1992, 1995).

Outro aspecto da formulação de baculovírus é que determinadas substâncias podem aumentar a atividade viral em relação ao controle do hospedeiro visado, algumas delas, proporcionando, também, proteção contra UV, como é o caso dos ácidos stilbenes ou branqueadores óticos (SHAPIRO; ROBERTSON, 1992). O ácido bórico, a quitinase, enzimas associadas a alguns baculovírus (ex. fator sinérgico – *enhancin* – que é uma metaloprotease) e derivados do ácido stilbene dissulfônico (branqueadores óticos) (SHAPIRO, 1995) têm sido utilizados em formulações de baculovírus. Os resultados mais promissores têm sido obtidos com branqueadores óticos, que são produtos utilizados em sabões em pó, detergentes, amaciantes de roupa, tintas. Esses produtos rapidamente absorvem a luz UV, que é convertida em ondas longas e emitida a 440 nanômetros na porção azul do espectro visível (VILLAUME, 1958), conferindo, portanto, proteção a bioinseticidas à base de baculovírus contra a desativação pela radiação solar. O primeiro relato sugerindo o efeito de branqueadores óticos como agentes de proteção contra a luz ultravioleta para um vírus de inseto foi feito por Martignoni e Iwai (1985), com o branqueador Tinopal DCS na concentração de 5,0%, associado ao vírus de *Orgyia pseudotsugata*. Shapiro (1992), avaliando o efeito de proteção de baculovírus por branqueadores óticos contra raios UV, verificou que alguns desses produtos também provocavam aumento substancial

da virulência do VPN de *Lymantria dispar*. Em estudos subsequentes, vários autores observaram, também, aumento substancial da atividade viral para vários sistemas baculovírus-hospedeiro, bem como redução no tempo médio de mortalidade do inseto visado (MORALES et al., 2001).

Estudos, associando vários branqueadores disponíveis no mercado brasileiro com o VPN da lagarta-da-soja, *A. gemmatalis*, indicaram que quatro desses branqueadores Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS, BRY-10 D2 100 e Leukophor DUB, na concentração de 0,5%, aumentaram a atividade desse inseticida biológico, variando cerca de 32 vezes (Leukophor DUB) a 145 vezes (Tinopal UNPA-GX), em lagartas de segundo ínstar, e de cinco a 356 vezes, respectivamente, em lagartas de quarto ínstar, além de reduzir bastante o tempo médio de mortalidade do inseto e proporcionarem proteção considerável ao vírus contra sua desativação pelo espectro UV da radiação solar (MORALES, 2000, MORALES et al., 2001). O aumento mais expressivo da associação do AgMNPV com branqueadores ópticos deu-se, no entanto, contra populações de lagartas de *A. gemmatalis*, selecionadas em laboratório, para uma alta resistência ao AgMNPV, com aumento da atividade viral, variando de 10.000 vezes (Leukophor DUB) a 61.600 vezes (Tinopal UNPA-GX) (MORALES et al., 2001). Portanto, branqueadores ópticos do grupo do ácido stilbene dissulfônico possuem grande potencial para serem utilizados em formulações à base de baculovírus, visando ao aumento da atividade viral, à redução do tempo de mortalidade do hospedeiro, à proteção contra raios UV e, ainda, ao manejo de eventual desenvolvimento de resistência a baculovírus por populações de hospedeiros, em condições de campo. De acordo com a literatura, o aumento da atividade viral por branqueadores ópticos pode ocorrer por ação não-rúptil dessas substâncias sobre a membrana peritrófica do inseto (WANG; GRANADOS, 2000), permitindo passagem inicial de grande número de nucleocapsídeos virais para multiplicação em células epiteliais do intestino médio e/ou diretamente através dessas, atingindo rapidamente a hemolinfa do hospedeiro ou, ainda, por interferir no mecanismo de descarte/substituição pelo hospedeiro de células infectadas do intestino médio (WASHBURN et al., 1998). O uso futuro de branqueadores ópticos

em formulações de bioinseticidas à base de baculovírus, como o AgMNPV, não significa risco à saúde humana, uma vez que essas substâncias são utilizadas em baixas concentrações na formulação de inseticidas biológicos (0,5% ou menos), além de serem utilizadas rotineiramente em detergentes, sabões em pó, amaciantes.

Aplicação de Baculovírus para o Controle de Pragas

Breve Histórico

Uma das primeiras tentativas de utilização de vírus para o controle de insetos ocorreu, em 1942, com a introdução de um VPN em populações de *Lymantria monacha*, em florestas de *Pinus*, na Alemanha (HÜBER, 1986). Balch e Bird (1944) relataram a importância do controle natural exercido por um VPN de larvas do himenóptero *Gilpinia hercyniae*, introduzido, acidentalmente, no Canadá junto com parasitóides importados da Europa para o controle biológico do inseto. Esse vírus, apesar de sua introdução acidental no Canadá, resultou num dos poucos casos de controle biológico clássico (introdução e colonização) utilizando vírus entomopatogênicos que resolveu o problema da praga naquele país. Os primeiros experimentos realizados com êxito, em campo, a partir de VPN produzido em laboratório, foram conduzidos por Steinhaus e Thompson (1949), na Califórnia (EUA) para o controle da lagarta-da-alfafa, *Colias eurytheme*, constituindo-se em um marco histórico do controle microbiano através de vírus. No início da década de 1950, agricultores da Califórnia, EUA, tinham por hábito coletar lagartas de *C. eurytheme*, mortas por VPN em epizootias naturais, para o controle do inseto em alfafa, através da maceração de lagartas, filtragem e uso das suspensões obtidas para pulverização na cultura (THOMPSON; STEINHAUS, 1950). Ainda, durante vários anos, nos EUA, agricultores coletaram e aplicaram VPN de espécies de Plusiinae, principalmente de *Trichoplusia ni* e de *Autographa californica*, bem como de *Spodoptera* spp., em vários cultivos (FALCON, 1975).

A partir da década de 1960, esforços foram realizados, principalmente nos EUA, quanto ao desenvolvimento de produtos biológicos à base de vírus

entomopatogênicos, visando ao seu registro como inseticidas biológicos. Passados mais de dez anos de desenvolvimento, o VPN de *Heliothis (Helicoverpa) zea* foi registrado nos EUA, em 1975, pelo nome Elcar®, produzido pela empresa Sandoz, para o controle do inseto em algodoeiro (IGNOFFO; COUCH, 1981). Esse registro constituiu-se num marco histórico e teve influência significativa no desenvolvimento, registro e uso de outros baculovírus nos EUA e em outros países.

Programas de Uso de Baculovírus no Controle de Insetos

Alguns dos mais importantes programas envolvendo a utilização de baculovírus são apresentados na Tabela 1. Os principais programas envolvem o uso do VPN da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* no Brasil, o VPN de *Helicoverpa* spp. (EUA, China, Austrália, Tailândia), VPNs de espécies de *Spodoptera* (China, EUA, Brasil, Guatemala, Tailândia, Europa) e o VG de *Cydia pomonella* (EUA, Europa, Rússia). No geral, o uso desses agentes é ainda muito restrito, à exceção do baculovírus da lagarta-da-soja no Brasil (MOSCARDI, 1999), programa este que será discutido na sequência.

Controle da Lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*: um Caso de Sucesso de Uso de um Baculovírus como Inseticida Biológico

Histórico

A lagarta-da-soja, *A. gemmatalis*, é o principal desfolhador de soja no Brasil, contra a qual é realizada a maioria das aplicações de inseticidas na cultura (média de duas aplicações/safra). Na década de 1970, antes da implementação de um programa de manejo integrado de pragas da soja (MIPSoja), o número médio de aplicações de inseticidas, especialmente contra esse inseto e percevejos, era de cinco a seis aplicações por safra. Além disso, os produtos

utilizados se constituíam, na maioria, de organoclorados (como DDT, Endrin) e organofosforados (monocrotofos, paration metílico) de alta toxicidade ao homem, de baixa seletividade e de impacto negativo ao meio ambiente (solo e águas). Com o advento da implementação de um programa de MIPSoja, a partir de 1977, essa situação começou a ser revertida, com progressiva e rápida redução no número médio de aplicações de inseticidas contra as principais pragas da cultura e do perfil dos produtos químicos utilizados (MOSCARDI, 1993).

Tabela 1. Principais baculovírus utilizados como inseticidas microbianos.

Espécie de Inseto	Cultura	Baculovírus	País/Região
<i>Adoxophyes orana</i>	VG	maçã	Suíça
<i>Anagrapha falcifera</i>	VPN	algodão, hortaliças	EUA
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	VPN	soja	Brasil, Paraguai, México
<i>Autographa californica</i>	VPN	algodão, hortaliças	EUA, China
<i>Cydia pomonella</i>	GV	maçã, pêra	EUA, Rússia, Europa
<i>Dendrolimus sibericus</i>	VPN	pinheiro	Rússia
<i>Erinnyis ello</i>	GV	mandioca	Brasil
<i>Helicoverpa</i> spp.	VPN	algodão, hortaliças e leguminosas	China, Índia, Austrália, Rússia, Tailândia e EUA
<i>Homona magnânima</i>	VG	chá	Japão
<i>Hypantria cunea</i>	VG e VPN	frutíferas e parques	Bulgária, Rússia
<i>Leucoma salicis</i>	VPN	parques ornamentais	Rússia, Polônia
<i>Lymantria dispar</i>	VPN	florestas	EUA, Canadá e Rússia
<i>Mamestra brassicae</i>	VPN	couve, ervilha, beterraba	Rússia e Europa
<i>Neodiprion lecontei</i>	VPN	florestas	Canadá
<i>Neodiprion sertifer</i>	VPN	pinheiro	EUA, Rússia e Europa
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	VPN	florestas	EUA, Canadá
<i>Pieris rapae</i>	VG	hortaliças	China
<i>Spodoptera litura</i>	VPN	algodão, hortaliças	China
<i>Spodoptera littoralis</i>	VPN	algodão	África, França
<i>Spodoptera exigua</i>	VPN	hortaliças, ornamentais	EUA, Europa, Tailândia
<i>Spodoptera frugiperda</i>	VPN	milho	Brasil

Fontes: Moscardi (1998, 1999).

A partir de 1979, por um esforço de pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa de Soja, na Embrapa Soja, em Londrina, PR, foi desenvolvido um programa para o uso de um baculovírus, isolado de lagartas mortas de *A. gemmatalis*, na região de Londrina, PR, caracterizado como um vírus de poliedrose nuclear de inclusão múltipla de nucleocapsídeos (AgMNPV), para o controle da lagarta-da-soja (MOSCARDI, 1986). Durante duas safras consecutivas (1980/1981 e 1981/1982), o AgMNPV foi testado em várias propriedades agrícolas do Paraná e Rio Grande do Sul, mostrando-se eficiente para reduzir populações da praga e manter o potencial produtivo das lavouras de soja, quando comparado a áreas pareadas com controle químico ou sem aplicação de medidas de controle (testemunha) (MOSCARDI, 1986). Em seguida (safra 1982/1983), o programa foi difundido para agricultores pelos órgãos de assistência técnica oficiais (Ematers) e privados (cooperativas, empresas de planejamento). Houve progressivo aumento do uso do baculovírus nas safras subseqüentes, atingindo patamar de cerca de um milhão de hectares tratados na safra 1989/1990. Na safra 1997/1998, o uso desse inseticida microbiano atingiu cerca de 1.250.000 ha (cerca de 10% da área de soja cultivada com soja no País) (MOSCARDI, 1999). Nos dias atuais, esse produto biológico é utilizado em aproximadamente 2.000.000 ha de soja no País, e a sua utilização na Região Centro-Oeste tem aumentado, rapidamente, nas últimas cinco safras.

No início da década de 1990, empresas privadas realizaram contratos com a Embrapa para produção e comercialização desse inseticida biológico, com *royalties* das vendas sendo revertidos para a Embrapa Soja. As empresas envolvidas (Coodetec, Nitral, Nova Era e Tecnivita, PR, e Geratec, RS) foram instrumentais para a difusão de produtos de alta qualidade entre sojicultores das várias regiões do País. Além disso, a Embrapa Soja, em Londrina, PR, através de sua Associação de Empregados, e a Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados, MS, também foram importantes para o atendimento desse objetivo. Presentemente, a utilização do AgMNPV tende a aumentar sobremaneira na

Região Centro-Oeste. Apenas a Coodetec comercializou o produto para uso em 350.000 ha na safra 2001/2002 no Estado do Mato Grosso¹.

Desenvolvimento de Processo para Produção Comercial do AgMNPV em Laboratório

A produção comercial de vírus entomopatogênicos em laboratório sempre foi um desafio para pesquisadores envolvidos com o controle biológico de pragas, devido aos altos custos relacionados à dieta artificial do inseto e à mão-de-obra. No entanto, esses problemas foram resolvidos com o nucleopoliedrovírus da lagarta-da-soja, *A. gemmatalis* (AgMNPV), levando à inauguração, em novembro de 2004, da maior biofábrica mundial de um vírus entomopatogênico, com o desenvolvimento dessa inovação sendo relatada a seguir.

No início do programa para uso do AgMNPV, uma colônia de *A. gemmatalis* foi estabelecida na Embrapa Soja (início da década de 1980) para produzir o vírus em laboratório, visando fornecer inóculo para a assistência técnica realizar dias de campo e instruir sojicultores sobre como utilizar o vírus. Para aumentar sua disponibilidade, iniciou-se um programa de produção no campo, aproveitando a ocorrência natural do inseto. A partir de 1990, a Embrapa Soja firmou contratos com cinco empresas para a produção e a comercialização do AgMNPV. Duas delas estabeleceram produção do vírus em laboratório com a tecnologia então vigente. A Geratec chegou a produzir vírus para 150 mil ha/ano, mas essa empresa e a Nova Era desistiram desse tipo de produção, em virtude de o custo do produto final não ser competitivo com o dos inseticidas químicos.

Portanto, a produção em campo passou a ser o único método empregado, com pequenas empresas se especializando para fornecer matéria-prima (lagartas mortas pelo vírus, coletadas em campo) para as empresas privadas. No entanto, a

¹ Comunicação pessoal do Dr. Ivo Marcos Carrato da Coodetec ao autor em agosto de 2005.

partir de 1999, a produção passou a não atender a crescente demanda do inseticida biológico. Com isso, os produtores de lagartas mortas pelo vírus em campo passaram a gerar maior volume, mas de qualidade inferior, com o material coletado contendo muita matéria orgânica não desejável (folhas, outros insetos). Além disso, a produção no campo, em cada safra, era muito variável, devido a fatores bióticos e abióticos que influem na abundância de populações da lagarta-da-soja. Portanto, o aperfeiçoamento de procedimentos de criação do inseto e de multiplicação do AgMNPV em laboratório tornou-se prioridade. Nesse contexto, resultados de Moscardi, Leite e Zamataro (1997) e Abot (1997) serviram como ponto de partida para tese de doutorado de Santos (2003), desenvolvida na Embrapa Soja, com a finalidade de viabilizar técnica e economicamente a produção comercial do inseticida biológico em laboratório. Avanço significativo no processo de produção do AgMNPV foi obtido nesse estudo, com posterior estabelecimento de um laboratório-piloto na COODETEC, Cascavel, PR, em junho de 2003. Estudos iniciais resultaram em expressiva redução nos custos da dieta de *A. gemmatalis*, tornando economicamente viável a criação massal do inseto. Obteve-se redução do custo entre 60% e 85%, substituindo o ágar-ágar por outro gelificante e reduzindo em 50% a caseína na dieta. Os insetos foram criados em caixas plásticas (30 x 35 x 12 cm), contendo 400 g de dieta artificial inoculada com vírus e recebendo cerca de 350 lagartas no início do 4º ínstar. Nesse sistema, obteve-se a produção de 26 g de lagartas por caixa, considerando uma taxa média de canibalismo de 42%. Nessa condição, o custo de produção de uma dose (produto para um ha) foi de R\$ 0,93. Comparativamente, o custo de produção em campo era de R\$ 0,63, pois, por esse método, obtêm-se de 35 a 50 doses/kg de material coletado. Os resultados da produção em laboratório, após processar 1000 kg de lagartas, variaram de 65 a 72 doses/kg, compensando, o maior custo da produção em laboratório que, também, proporciona um abastecimento contínuo de matéria-prima de maior qualidade para a formulação do bioinseticida.

Depois 17 meses de produção-piloto e comprovada sua viabilidade econômica, foi construída uma biofábrica, composta de dois blocos independentes e climatizados, sendo um para produção do inseto (700 m²) e outro para produção do vírus (750 m²), além de cerca de 500 m² já existentes na empresa para o processamento e a formulação do inseticida biológico. No primeiro, realiza-se a criação desde a fase adulta, para a obtenção dos ovos, até o início do quarto ínstar larval. Diariamente, 3% dessas lagartas são destinados à obtenção de pupas para manter a colônia do inseto. O restante (97%) é destinado ao laboratório de produção do vírus onde as lagartas são criadas em caixas com cerca de 350 lagartas e 420 g de dieta inoculada com o vírus. Depois de sete dias, as lagartas mortas são coletadas e destinadas à formulação do bioinseticida COOPERVÍRUS PM. Nessa condição, tem-se obtido rendimento de 35 g de lagartas mortas/cx, superior ao obtido no projeto-piloto. Com os trabalhos iniciados em dezembro de 2004, o laboratório está expandindo a produção até atingir o máximo de sua capacidade, quando haverá a geração de 45 empregos diretos e a produção de vírus para a aplicação em 1,8 a 2,0 milhões de hectares de soja/ano, demandando a inoculação de cerca de 800 mil a 1 milhão de lagartas/dia.

A Embrapa Soja finalizou a construção de um Laboratório-piloto para aperfeiçoar o processo e propiciar treinamento de outras empresas conveniadas interessadas em produzir o inseticida biológico em laboratório. Com isso, espera-se atender à crescente demanda pelo produto e ofertar um produto de alta qualidade aos sojicultores.

Benefícios do Programa de Uso do AgMNPV

Considerando o uso atual desse inseticida biológico em cerca de 2 milhões de ha no País, nessa área, estima-se que cerca de 2 milhões de litros de inseticidas químicos deixem de ser utilizados anualmente, levando em conta que são realizadas duas aplicações de inseticidas químicos, em média, contra a

lagarta-da-soja, significando consideráveis benefícios ambientais. Considerando, ainda, que o custo atual do AgMNPV para o sojicultor é de aproximadamente 40% inferior ao custo médio dos inseticidas químicos e que o vírus é, em geral, aplicado apenas uma vez durante a safra. Comparado a uma média de duas aplicações de inseticidas químicos, o retorno econômico relativo ao uso do vírus atinge cerca de R\$ 17,00/ha/safra, incluindo os custos do produto e de aplicação (combustível, mão-de-obra, desgaste dos equipamentos). Ou seja, na área considerada (2 milhões de ha), os benefícios econômicos diretos aos sojicultores significam aproximadamente R\$ 34 milhões/safra. Desde a implementação do programa (safra 1982/1983) até a safra 2004/2005, estima-se que o uso cumulativo do AgMNPV atingiu cerca de 23 milhões de ha, representando benefícios econômicos diretos a sojicultores da ordem de R\$ 390 milhões nesse período. Importância maior, desde o início do programa, mais de 23 milhões de litros de inseticidas químicos não foram pulverizados no ambiente, resultando em benefícios consideráveis para a sociedade como um todo. Outro aspecto importante é que o programa de uso do AgMNPV tem contribuído, ao longo dos anos, para a mudança do perfil dos inseticidas utilizados contra *A. gemmatalis* em soja (MOSCARDI et al., 2002).

Razões do Sucesso do Programa

Vários fatores contribuíram para o sucesso do programa de uso do baculovírus da lagarta-da-soja no Brasil, tais como:

- alta virulência contra o hospedeiro (*A. gemmatalis*) e transmissão eficiente do vírus nas populações do hospedeiro por fatores bióticos e abióticos;
- possibilidade de produção do vírus em campo, com o custo do produto final competitivo com o dos inseticidas químicos disponíveis para o controle desse inseto;

- larvas de *A. gemmatilis*, por serem desfolhadoras, são continuamente expostas ao baculovírus aplicado sobre as plantas de soja;
- em geral, na maioria das regiões produtoras de soja, não há outras pragas simultâneas à *A. gemmatilis* que demandem controle;
- a soja tolera desfolha substancial (>30%) no período vegetativo sem que ocorra redução significativa do rendimento de grãos da cultura;
- implementação de um programa de manejo integrado de pragas da soja, na década de 1970, favorecendo a aceitação do baculovírus pelos sojicultores;
- ação proativa e formal da assistência técnica oficial em alguns estados, como Paraná e Rio Grande do Sul; e
- mais recentemente, a viabilização da produção comercial do vírus em laboratório, indicando perspectivas futuras favoráveis à expansão do programa de uso do AgMNPV.

Os fatores que favoreceram a implementação e o uso do baculovírus da lagarta-da-soja no Brasil dificilmente são encontrados na grande maioria dos outros sistemas vírus-hospedeiro-plantas, dificultando o uso de baculovírus como inseticida biológico. Às vezes, dispõe-se de um vírus altamente virulento a determinada espécie de inseto, mas seu hábito críptico (brocas, minadores, insetos subterrâneos) dificulta a ingestão de uma dose letal do patógeno. Em outros casos (ex. algodoeiro), a ocorrência simultânea de várias pragas importantes limita o uso de um produto tão seletivo como um baculovírus. Em outros sistemas, o inseto-alvo afeta diretamente o fruto (maçã, pêra, tomate), tornando a tecnologia de aplicação de vírus sofisticada e intensa durante a safra, para evitar dano aos frutos e sua rejeição pelo mercado ou depreciação. A expansão do uso de baculovírus como inseticida biológico vem sendo limitada por esses e outros fatores (MOSCARDI, 1998,1999; MOSCARDI; SOUZA, 2002).

Potencial de Uso de Vírus de Insetos no Brasil

Apesar das limitações para uso de vírus da família Baculoviridae, há enorme potencial para emprego desses agentes no controle biológico de pragas em várias culturas no Brasil. Talvez o principal exemplo seja o baculovírus da lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda*, praga essa que tem demandado um número cada vez maior de aplicações de inseticidas químicos para seu controle em milho, trigo e, mais recentemente, em algodão, sobretudo na Região Centro-Oeste. Se esse vírus estivesse disponível para comercialização, traria consideráveis benefícios econômicos aos agricultores, bem como benefícios ambientais e sociais, resultantes da redução no uso de inseticidas químicos de amplo espectro e de alta toxicidade. Esse vírus chegou a ser produzido pela Embrapa Milho e Sorgo em laboratório, para a aplicação em até 5.000 ha, há alguns anos (MOSCARDI, 1998), mas sua produção decresceu devido a problemas na criação do inseto e, principalmente, quanto à produção do vírus que hoje se encontra desativada. No entanto, há uma iniciativa dessa instituição para o desenvolvimento do processo de produção do vírus em laboratório². Mas há outras possibilidades de uso de Baculoviridae (VPN e/ou VG), tanto em sistemas agrícolas como de reflorestamento, que incluem o curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillaceae*), a lagarta-da-maçã (*Cydia pomonella*), recentemente introduzida no sul do Brasil, a lagarta-do-maracujá (*Dione juno juno*), a lagarta-falsa-medideira-da-soja (*Pseudoplusia includens*), que tem assumido papel de praga economicamente importante em diferentes regiões produtoras de soja no País, a lagarta-da-couve (*Plutella xylostella*), lagartas associadas ao dendê, como *Opsiphanes* spp. e *Sibine* spp. e a lagarta-do-álamo (*Condylorrhiza vestigialis*), entre outras espécies que são passíveis de controle por VPN ou GV no Brasil. O potencial de uso desses agentes no Brasil é enorme, mas

² Comunicação pessoal do Dr. Fernando Hercos Valicente da Embrapa Milho e Sorgo ao autor em setembro de 2005.

há limitações quanto à disponibilidade de pesquisadores para desenvolver programas que levem ao seu uso comercial no País.

Considerações Finais

O nucleopoliedrovírus da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV), é o único inseticida biológico à base de vírus registrado no Brasil. Esse registro, obtido no início da década de 1990, por diferentes empresas privadas, seguiu a legislação da época. Atualmente, há nova legislação para registro de produtos biológicos (Decreto 4074 de 2002). Embora haja aperfeiçoamentos, há problemas na legislação atual que levam algumas empresas produtoras de inseticidas biológicos (vírus e fungos, principalmente) a atuar na clandestinidade, dadas as exigências atuais para a obtenção do Registro Especial Temporário (RET) e para registro de determinado produto, que demandam considerável volume de dados e custos elevados. Para determinada empresa, em geral de pequeno a médio portes e que se aventura na produção de inseticidas biológicos, esses custos só se justificam quando o produto em questão tem amplo mercado e possibilidade de retorno justo aos investimentos efetuados no seu desenvolvimento. Sabe-se que o vírus de granulose do mandarová-da-mandioca, *Erinnyis ello* e o vírus de poliedrose nuclear da lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda*, têm sido produzidos e utilizados em pequena escala no Brasil, há muitos anos, sem que tenham sido registrados de acordo com a legislação brasileira. Do mesmo modo, isso ocorre com alguns inseticidas biológicos à base de fungos entomopatogênicos. Isso ocorre por que a legislação vigente sobre agrotóxicos e afins não proporciona adequado incentivo governamental quanto ao uso de produtos biológicos que não intoxicam vertebrados, inclusive a espécie humana, não poluem o meio ambiente, incluindo solo e águas (de superfície e subterrâneas), não se acumulam em cadeias alimentares e não causam desequilíbrios em agroecossistemas.

O potencial de uso de vírus entomopatogênicos como inseticidas biológicos, no Brasil, é enorme, conforme já mencionado anteriormente. No entanto, a legislação atual dificulta o uso desses agentes em sistemas onde não há interesse em desenvolver produto comercial, mas apenas resolver problemas locais ou regionais, evitando o uso de inseticidas químicos para o controle de determinadas pragas. Como exemplos, podem ser citados os vírus de lagartas que atacam o dendê (cerca de 80.000 ha), o álamo (cerca de 5.000 ha), entre outros vírus com potencial de uso. Sugere-se, portanto, aos órgãos governamentais envolvidos com o RET e ao registro de produtos destinados ao controle de pragas que efetuem revisão da legislação atual, de forma que os produtos biológicos tenham legislação específica, bem como incentivos governamentais para as empresas que produzem esse tipo de produto, tendo em vista os benefícios que esses representam à saúde humana, ao meio ambiente e à sociedade em geral.

Referências

- ABOT, A. R. **Parâmetros para a produção do vírus de poliedrose nuclear *Baculovirus anticarsia*, visando o controle d *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidóptera: Noctuidae)**. 1997. 94 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.
- ALVES, S. B.; BOTELHO, P. S. M.; ALVES, L. F. A.; MOSCARDI, F. Produção de vírus entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 871-887.
- BALCH, R. E.; BIRD, F. T. A disease of the european spruce sawfly *Gilpinia hercyniae* (Htg.) and its place in natural control. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 25, p. 65-80, 1944.
- BATISTA FILHO, A.; ALVES, S. B.; ALVES, L. F. A.; PEREIRA, R. M.; AUGUSTO, N. T. Formulação de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 917-965.
- BURGES, H. D. **Formulation of microbial biopesticides**: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatment. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. 496 p.

EVANS, H. F. Viruses. In: LACEY, L. A.; KAYA, H. K. (Ed.). **Field manual of techniques in invertebrate pathology**: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 179-208.

FALCON, L. A. Use of field-collected insect viruses for pest control. In: ENGLER, M.; FALCON, L. A.; VAIL, P. (Ed.). **Baculoviruses for insect pest control**: safety considerations. Washington: American Society of Microbiology, 1975. p. 161.

HÜBER, J. Use of baculovirus in pest management programs. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Ed.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v. 2, p. 181-202.

IGNOFFO, C. M.; COUCH, T. L. The nucleopolyhedrosis virus of *Heliothis* species as a microbial insecticide. In: BURGESS, H. D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant diseases**. London: Academic Press, 1981. p. 329-362.

MARTIGNONI, M. E.; IWAI, P. J. Laboratory evaluation of new ultraviolet absorbers for protection of Douglas fir tussock moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 78, p. 982-987, 1985.

MORALES, L. **Avaliação dos efeitos biológicos da associação de branqueadores óticos ao vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2000. 80 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

MORALES, L.; MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PARO, F. E.; SOLDORIO, I. L. Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV-susceptible and resistant strains of the insect. **Biological Control**, New York, v. 20, p. 247-253, 2001.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus para o controle da lagarta da soja. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p.188-202.

MOSCARDI, F. Soybean integrated pest management in Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 41, p. 91-100, 1993.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 509-539.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for the control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 44, p. 257-289, 1999.

MOSCARDI, F. O controle de pragas agrícolas e a sustentabilidade ecológica. **Ciência & Ambiente**, Santa Maria, v. 27, p. 67-84, 2003.

MOSCARDI, F.; LEITE, L. G.; ZAMATARO, C. E. Production of nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae): effect of virus dosage, host density and age. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 26, p. 121-132, 1997.

MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Microbial control of insect pests of soybeans. In: LACEY, L. A.; KAYA, H. K. (Ed.). **Field manual of techniques in invertebrate pathology**: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 447-466.

MOSCARDI, F.; MORALES, L.; SANTOS, B. The successful use of AgMNPV for the control of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in soybean in Brazil. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8.; INTERNATIONAL CONFERENCE ON BACILLUS THURINGIENSIS, 6.; ANNUAL MEETING OF THE SIP, 35., 2002, Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. p. 86-91. (Embrapa Soja. Documentos, 184; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos, 74).

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L. de. Baculovírus para o controle de pragas: panacéia ou realidade? **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, p. 22-29, 2002.

RIBEIRO, B. M.; SOUZA, M. L.; KITAJIMA, E. W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 481-507.

SANTOS, B. **Avanços na produção massal de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) infectadas com o seu vírus de poliedrose nuclear, em laboratório e do bioinseticida à base desse vírus**. 2003. 80 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

SHAPIRO, M. "In vivo" production of baculoviruses. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Ed.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v. 2, p. 31-61.

SHAPIRO, M. Use of optical brighteners as radiation protectants for gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis vírus. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 85, p. 1682-1686, 1992.

SHAPIRO, M. Radiation protection and activity enhancement of viruses. In: HALL, F. R.; BARRY, J. W. (Ed.). **Biorational pest control agents: formulation and delivery**. Washington: American Chemical Society, 1995. p. 153-164. (ACS Symposium Series, 595).

SHAPIRO, M.; ROBERTSON, J. L. Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus activity by optical brighteners. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 85, p. 1120-1124, 1992.

STEINHAUS, E. A.; THOMPSON, C. G. Preliminary field testes using a polyhedrosis virus to control the alfafa caterpillar. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 42, p. 301-305, 1949.

THOMPSON, C. G.; STEINHAUS, E. A. Further tests using a polyhedrosis to control the alfafa caterpillar. **Hilgardia**, Berkeley, v. 12, p. 411-445, 1950.

VILLAUME, F. G. Optical brighteners in soaps and detergents. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 35, p. 558-566, 1958.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 30, p.135-143, 2000.

WASHBURN, J. O.; KIRKPATRICK, B. A.; HASS-STAPLETON, E.; VOLKMAN, L. E. Evidence that the stilbene-derived optical brightener M2R enhances *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by preventing sloughing of infected midgut epithelial cells. **Biological Control**, New York, v. 11, p. 58-69, 1998.

WILLIAMS, T.; CISNEROS, J. Formulaci3n y aplicaci3n del os baculovirus bioinsecticidas. In: CABALLERO, P.; L3PEZ-FERBER, M.; WILLIAMS, T. (Ed.). **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas ene l control biol3gico de plagas**. Valencia: Phytoma, 2001. p. 313-372.

Comercialização de Agentes Microbiológicos para Controle de Pragas. Experiências de Países da América Latina

Deise Maria Fontana Capalbo

Introdução

A agricultura moderna enfrenta desafios econômicos e ambientais que impulsionam os processos produtivos para a adoção de princípios de conservação dos ecossistemas naturais. Nessa nova realidade, não se pode depender unicamente do uso de produtos de origem química para o controle de insetos, doenças e plantas invasoras dos cultivos, sendo por isso necessário um enfoque integrado para manejo das culturas.

Nesse contexto de manejo integrado, o desenvolvimento e a utilização de produtos biológicos merecem destaque, especialmente, aqueles à base de insetos benéficos e microrganismos.

Alguns exemplos de programas integrados de controle, realizados no século 20, na América Latina, podem ser lembrados (VARON, 2005):

- Controle da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) – com o desenvolvimento da criação massal de insetos benéficos (*Trichogramma* spp., *Paratheresia* spp., *Metagonistylum minens*), em países como Brasil, Colômbia, Peru, Cuba;

- Controle da broca-do-café – pelo uso de insetos benéficos (como *Cephaelonoma stephanoderis*) e uso de fungos (como *Beuaveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*), no Brasil e na Colômbia;
- Controle de *Heliothis* sp. e *Alabama argillacea*, em cultivo de algodão – pela aplicação massal de *Trichogramma* spp. na Colômbia, reduzindo o número de aplicações de pesticidas químicos de 25 para 4 a 6, apenas. Essa tecnologia expandiu-se para outros cultivos como soja, fumo, milho, tomate e hortaliças em países como Equador, Venezuela, Costa Rica, Guatemala;
- Controle de doença causada por *Rhizoctonia solani*, em arroz, tabaco, batata – com o desenvolvimento da produção massal de *Trichoderma* sp. Estimativa de produção atual ao redor de 25.000 kg por ano apenas para aplicações em tratamento de sementes de arroz;
- Programa de controle da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) - com *Baculovirus anticarsia*, iniciado nos anos 70, no Brasil – maior programa mundial de controle de insetos com vírus.
- Controle de vetores de doenças para humanos – desenvolvimento de produção massal de produtos à base de bactérias, em especial, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*.

Já neste início deste século, os esforços continuam na linha de manejo integrado, com produtores de flores utilizando massivamente *Dygliphus* sp., para controle de *Liriomyza* sp., empresas reforestadoras testando o controle de *Glena bisulca* com *Telenomus alsophilae* em conjunto com o de produtos à base de *Bacillus thuringiensis*.

Segundo informações de Fernandez-Larrea¹ o mercado de produtos microbianos está composto das seguintes parcelas:

¹ Comunicação pessoal de Orietta Fernandez-Larrea, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal - Cuba à autora em maio de 2005.

Produtos à base de microrganismos	US\$ 300 milhões
Feromônios	US\$ 60 milhões
Produtos bioquímicos	US\$ 40 milhões
Insetos benéficos	US\$ 40 milhões

O uso e a aplicação de insetos e microrganismos para controle de pragas, não obstante os vários exemplos apresentados, não atingiram a expectativa de mercado prevista no século 20 por alguns autores (LYSANSKY; COOMBS, 1992, 1994), representando menos de 2% do mercado mundial de pesticidas.

Nos próximos itens, abordaremos alguns dos fatos e motivos relacionados ao mercado latino-americano dos produtos de origem microbiana, em especial, aqueles à base de bactérias.

Microrganismos no Controle Biológico de Insetos-praga

Vários são os casos de microrganismos com sucesso notável de uso para controle de pragas agrícolas, como resultado dos esforços para se atingir bons processos de produção e formulação. As bactérias são, atualmente, os agentes de controle biológico mais promissores. Mais de cem espécies de bactérias já foram descritas infectando insetos. Algumas são, inclusive, produzidas comercialmente, entre elas: *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), *Bacillus sphaericus* (*Bs*) e *Bacillus moritai* (AIZAWA, 1990; IGNOFFO; ANDERSON, 1979; KHETAN, 2001; MORAES et al., 2001b; REGIS et al., 2001). Outras como *Bacillus popilliae*, agente causador da enfermidade leitosa em larvas de escarabeídeos, têm sido comercializadas, mas sua disponibilidade no mercado é limitada.

A bactéria *B. thuringiensis* é conhecida desde 1915, sendo essa espécie a mais utilizada mundialmente como biopesticida. Essas bactérias são altamente eficientes contra algumas pragas agrícolas e vetores de doenças, sendo mais utilizadas em países desenvolvidos, onde são feitos maiores investimentos no

desenvolvimento de produtos. Tamez-Guerra et al. (2001) indicam que dos 140 milhões de dólares anuais comercializados em produtos à base de *Bt*, 50% são referentes à comercialização nos Estados Unidos e Canadá.

O tópico de processos de produção foi abordado por outros autores neste livro, não necessitando maior detalhamento. Apenas gostaríamos de deixar algumas sugestões de leitura complementar para aqueles que desejam maiores detalhes sobre:

- Seleção, multiplicação em pequena escala e estudos básico: Alves (1998).
- Processos de produção em larga escala: Bernhard e Utz (1993) e Couch (2000).
- Escolha de substrato e opções de fontes de carbono, nitrogênio e sais: Del Bianchi et al. (2001), Arruda (1999), Moraes e Capalbo (1985) e por Aranda, Lorence e Trejo (2000).
- Parâmetros de produção: Moraes, Capalbo e Arruda (1998, 2001a).
- Tipos de reatores para processo de produção, controle e monitoramento desses processos, parâmetros mais importantes e sua forma de acompanhamento: Arruda e Moraes (2003), Capalbo e Moraes (1997), Moraes, Capalbo e Arruda (1998).

É notável o esforço realizado em alguns países latino-americanos para desenvolver tal produção massal de bactérias e seus derivados por fermentação líquida ou semi-sólida.

A produção industrial de *Bt*, apesar desses esforços, é dominada por grandes companhias multinacionais que cobrem mais de 70% do mercado mundial. Segundo Aranda, Lorence e Trejo (2000), nos países menos desenvolvidos, o custo elevado dos bioprodutos (por serem importados), aliado à falta de conhecimento de manejo de pragas, é o fator determinante para que haja limitação de aplicação de controle microbiano de pragas. Dessa forma, essa

autora também estima que a pequena produção local, próxima aos pontos onde serão utilizados os produtos, poderá diminuir as despesas de transporte, reduzindo conseqüentemente os custos do produto.

Outra oportunidade importante é a de ser explorada a diversidade local de cepas bacterianas com características entomopatogênicas que favorecem o controle mais específico das pragas regionais. Além disso, há um aspecto socioeconômico de destaque que é a geração de empregos e o desenvolvimento tecnológico devido à instalação de plantas industriais de fermentação. A pequena produção local também é adequada por controlar pragas em colheitas com produção de alto custo e área cultivada pequena para pragas regionais específicas e/ou para as etapas iniciais de um programa de MIP.

Produção de bactérias na América Latina

A competência científica, estabelecida na maioria dos países latino-americanos citados anteriormente, a existência de cepas bem adaptadas às necessidades de controle de pragas e a integração entre grupos multidisciplinares no desenvolvimento de alternativas específicas a cada ambiente parecem indicar que o ponto crítico para o atingimento do maior uso de controle microbiano na agricultura está na transposição para o setor produtivo. Esse passo importante depende, entretanto, do fortalecimento da confiança no produto por parte dos usuários e, também, da maior confiança no mercado por parte da iniciativa privada. A integração da produção com as demandas locais por sistemas de manejo parece ser a meta para estabelecer a escala desejável – isso pode ser atingido com uma escala de produção menor que a de países industrializados.

O controle de qualidade nas menores escalas de produção tem sido como um diferencial significativo. O mercado só poderá ser ampliado se um produto competitivo em preço e em qualidade e com continuidade de oferta for obtido.

Dent e Waage (2000) apontam várias razões para o baixo volume de mercado dos biopesticidas, além dos vários já apontados: a falta de proteção dos

novos isolados microbianos por lei, como a de patentes; a comercialização de produtos de baixa qualidade que levou à descrença o processo de controle de pragas pela pouca eficiência de alguns produtos; o uso de modelo inadequado de desenvolvimento e comercialização de biopesticidas. Segundo os autores, o modelo mais adequado é o modelo (d) da Figura 1, pois os produtos microbianos são específicos em relação a seus alvos com vida de prateleira relativamente baixa, sendo mais apropriado produzi-los sob demanda para pequenos mercados locais ou regionais.

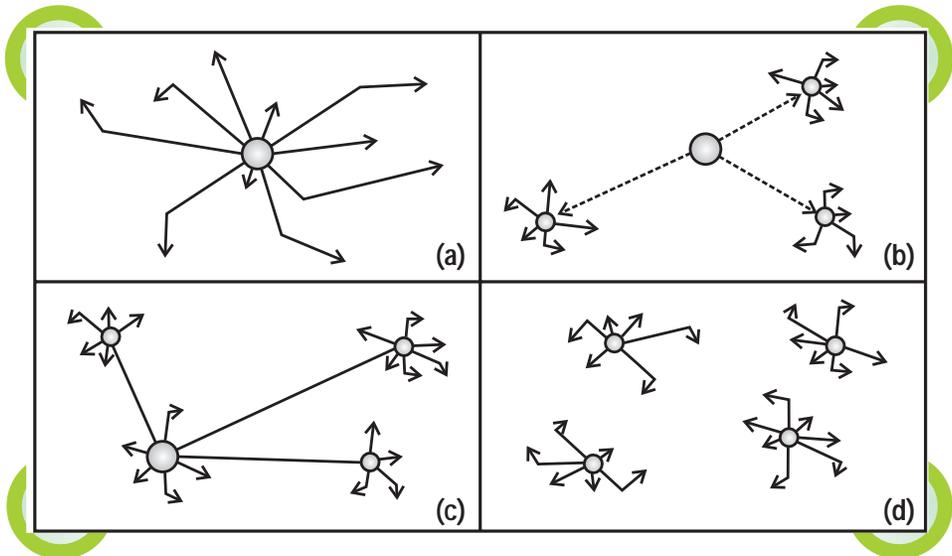


Figura 1. Modelo de produção e comercialização de pesticidas: (a) uma indústria produz em determinado local e distribui globalmente; (b) uma indústria subcontrata produção e comercialização e vende em diversos locais; (c) uma indústria comercializa mediante *franchising* a produção e comercialização em diversos mercados; (d) várias indústrias produzem e comercializam regionalmente.

Um levantamento dos estudos realizados em cinco países da América Latina e os relatos sobre a escala de produção atingida em cada um deles são apresentados a seguir, visando identificar oportunidades para o controle biológico e dificuldades comuns a esses países.

No Brasil, vários estudos estão sendo desenvolvidos por pesquisadores de universidades e instituições de pesquisa, abordando desde o isolamento e caracterização de cepas nativas brasileiras até a produção em escala-piloto e industrial utilizando substratos adequados à realidade nacional e expectativas de mercado regional. A vantagem comparativa entre pequena produção local e larga escala, bem como as escalas que se têm mostrado adequadas parecem concorrer para escalas de produção mediana, com objetivo de atingir mercados específicos. No cenário nacional, destacam-se iniciativas de empresas privadas associadas a institutos de pesquisa, desenvolvendo produtos para controle de pragas agrícolas e de vetores de importância para a saúde humana.

No México, estudos vêm sendo realizados pelos grupos de pesquisa do CINVESTAV, da Universidad Autónoma de Nuevo Leon e Universidad Nacional Autónoma de México, permeando temas como isolamento, seleção de cepas, mecanismos de ação, genética microbiana e produção em fermentação submersa. O processo de produção em estado sólido foi considerado interessante para o desenvolvimento de produção de cepas nativas mexicanas em sistemas denominados *rurais locais* onde a pesquisa poderia interagir mais diretamente com os produtores. Os substratos sugeridos são resíduos agroindustriais disponíveis na região (quirera de arroz, bagaço da cana-de-açúcar, farelo de milho ou de soja).

No Peru, os estudos são liderados por pesquisadores da Universidade Peruana Cayetano Heredia e do Instituto Medicina Tropical Alexander von Humboldt. *Bt* variedade *israelensis* vem sendo produzido em meio contendo coco, mandioca e aspargos, por processo artesanal, local, em meio líquido, para controle de alguns vetores de doenças tropicais que se desenvolvem em poços artificiais. Como em outros países latino-americanos, um cuidado especial é tomado com o controle de qualidade dos produtos obtidos. A chave para o sucesso desse processo é a participação da comunidade no programa.

Os estudos, **na Argentina**, sobre aspectos da fermentação e produção de *Bt*, vêm sendo realizados por pesquisadores da Universidad Nacional de La Plata e pelo Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária (INTA) que adaptaram e, em alguns casos, desenvolveram tecnologia para produzir *Bt* visando controlar lepidópteros, pragas de culturas. Foi desenvolvido o pacote tecnológico completo para a produção, avaliação e emprego desse bioinseticida, meios de cultivo líquidos, levando em consideração a disponibilidade contínua desse material e sua homogeneidade e qualidade. O resultado desses trabalhos foi um bioinseticida formulado como pó molhável, de muito baixo custo de produção e cuja estabilidade e eficiência foi comprovada em estudos de laboratório e de campo.

A produção em **Cuba** (Figura 2), com resultado bastante interessante devido ao sistema em que são produzidos e utilizados (pequena a média escala, visando à diversificação de culturas com uso de cepas específicas), demonstra que, para a realidade daquele país, a meta pode ser atingida com pequena produção regional (FERNÁNDEZ-LARREA, 1993, 1999, 2001, 2002).

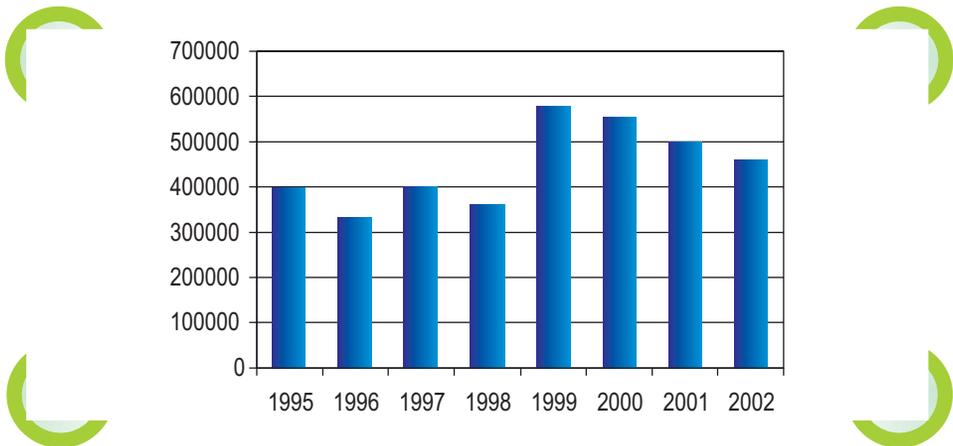


Figura 2. Uso de *Bacillus thuringiensis*, em Cuba (em litros de produto fermentado)¹.

¹ Comunicação pessoal de Orietta Fernandez-Larrea, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal - Cuba à autora em maio de 2005.

Nas pequenas plantas de produção, alguns cuidados devem ser tomados pelos técnicos de supervisão: controle de qualidade (especialmente padronização e prevenção de contaminação microbiana); formulação (eficiência e eficácia); descarte no ambiente (possível atividade contra organismos não-alvo, persistência; disseminação); regulamentação (diretrizes para registro). Também a elaboração de um manual de utilização do biopesticida é recomendável: o fato de a ação do pesticida biológico ser diferente da atuação do inseticida químico levou alguns produtores rurais ao descrédito desse produto. (MORAES; CAPALBO; ARRUDA, 1998; MORAES et al., 2001b).

Reflexão e Considerações finais

Na década de 1980, os propósitos da pesquisa sobre bactérias entomopatogênicas concentravam-se no conhecimento da estrutura e no modo de ação desses microrganismos. A partir dos anos 90, as pesquisas buscam conhecer como os produtos à base de *Bt* interagem com o ambiente, fortalecendo os fundamentos para um uso ecologicamente seguro desses produtos. Esses trabalhos têm enfoque fortemente inter e multidisciplinar.

Na produção de pesticidas bacterianos eficazes, a multidisciplinaridade é fundamental para a etapa do processo fermentativo de produção e também na obtenção de um bom espalhamento da formulação, adequada taxa de propagação do agente, boa virulência e estabilidade do produto no campo, baixo custo de produção como também estabelecimento de medidas de biossegurança.

Diante do grande potencial de aplicação de bactérias entomopatogênicas para controle de insetos que causam danos à produção agrícola e à saúde pública, da sua utilização crescente em outros continentes e da simplicidade dos processos de produção aqui apontados, que não requerem tecnologia sofisticada, a produção de pesticidas bacterianos na América Latina pode ser considerada ainda incipiente. É exceção de Cuba, onde o estabelecimento de um programa de

produção em rede foi motivado pelos altos custos da importação de produtos para o controle de pragas, o que existe em outros países são iniciativas pontuais, geralmente, de grupos isolados de pesquisadores conscientes das vantagens e da viabilidade de produção e uso desses produtos em substituição aos inseticidas químicos.

Uma reflexão sobre os motivos da utilização ainda limitada dos pesticidas bacterianos na América Latina é importante para orientar ações com a finalidade de ampliar seu uso e estimular a produção local. Podem ser apontados como fatores limitantes à expansão do uso de produtos microbianos e, com certa segurança, pode-se extrapolar essas conclusões para outros produtos biológicos: o desconhecimento das vantagens e da facilidade de uso operacional, a pressão de venda exercida pela indústria de pesticidas químicos; a cultura de confiança nos inseticidas sintéticos, bem como o desconhecimento da relação positiva custo/benefício (apesar de o preço dos produtos serem altos em alguns casos, os resultados são muito positivos especialmente quando se considera a segurança ambiental e do ser humano).

Do ponto de vista da produção de pesticidas bacterianos na América Latina, constata-se a existência de bons produtos, competitivos quanto à eficiência e quanto à qualidade em relação aos produtos disponíveis no mercado internacional, desenvolvidos por grupos competentes de pesquisadores. O ponto crítico parece ser a transposição para o setor produtivo, um passo que depende do fortalecimento da confiança no produto por parte dos usuários e, também, no mercado, por parte da iniciativa privada. Assim, o escalonamento de processo, viável para produção de bactérias, parece ser restritivo para o aumento de escala de porte industrial para o caso de fungos e principalmente limitante para produção de vírus.

Em relação à necessidade de estabilidade durante armazenamento e nas condições de campo, sabe-se de vários estudos envolvendo formulações promissoras. Para o caso de fungos, esse tópico é especialmente limitante. Para

baculovírus e bactérias formadoras de esporos, não obstante importância de formulação para estabilidade de armazenamento, o princípio ativo é mais estável e requer temperaturas mais amenas do que os fungos para os quais a condição de refrigeração é geralmente imperativa.

São mencionadas, com frequência, entre os fatores de desestímulo à produção de biopesticidas, as exigências de registro que são: caras, demoradas de se obter e muito complexas. Isso indica que devem ser redobrados os esforços para que as avaliações sejam mais simples e, conseqüentemente, mais baratas para tais produtos biológicos, por serem menos danosos ao ambiente.

Como possibilidades para o processo de geração do produto à base de bactérias entomopatogênicas, a produção local de menor escala desponta como uma opção interessante para a América Latina. Pode-se facilmente relacionar várias vantagens que resultam da produção local de inseticidas microbianos, em pequena ou média escala, nos países em desenvolvimento: *estabilidade* – redução do risco de perda de toxicidade pelo transporte e armazenamento por períodos prolongados em temperaturas variáveis; *formulações* – a produção local permite o desenvolvimento de formulações adequadas às condições ambientais locais específicas e aos insetos-alvo naquela região; *biodiversidade* - a produção local explora a oportunidade de os microrganismos locais naturais serem utilizados em todo o País; *ambientalmente correto* – as plantas de produção utilizariam resíduos agroindustriais locais como substrato, o que resulta na diminuição da contaminação ambiental e também dos custos de produção. Outro ponto de destaque é a economia de recursos financeiros por dispensar a importação de pesticidas.

Há inúmeras possibilidades de programas de cooperação na América Latina que podem ser apontadas, como o desenvolvimento de novos processos fermentativos (FSS, produção artesanal; impactos ambientais de biopesticidas; desenvolvimento de metodologias e estudos para apoiar decisões de políticas públicas). Essa interação é estimulante, e a troca de experiências entre países

com grau de desenvolvimento semelhante traz o benefício do baixo custo, aliado e alinhado às prioridades dos fundos de financiamento científico e tecnológico dos países.

No âmbito de colaboração multiinstitucional envolvendo grupos de pesquisas do México, Brasil, Colômbia, Argentina, Chile, Costa Rica e Espanha, está em desenvolvimento um projeto coordenado pelo Instituto de Biotecnologia da UNAM em Cuernavaca no México com o objetivo de identificar cepas latino-americanas com alto nível de toxicidade contra pragas da agricultura e culicídeos vetores de doenças endêmicas de grande importância na América Latina. Nesse projeto, cepas de *Bt* com elevada atividade larvicida contra mosquitos e contra *Spodoptera fugiperda* já foram selecionadas, algumas delas produzindo novas toxinas e atestando a importância de explorar a rica biodiversidade latino-americana em busca de novos agentes entomopatogênicos.

Certamente, poderemos chegar a melhores métodos de produção, utilização e aplicação das bactérias entomopatogênicas e suas toxinas, se buscarmos e desenvolvermos os estudos em cooperação entre países e com equipes multidisciplinares, a exemplo do grupo mencionado anteriormente.

Em complemento, uma íntima relação entre indústria, ciência, agricultores e governos permitirá o desenvolvimento do mercado para esses produtos que se prevê como de crescimento para um futuro muito próximo.

Referências

AIZAWA, K. Registration requirements and safety considerations for microbial pest control agents in Japan. In: LAIRD, M.; LACEY, L. A.; DAVIDSON, E. W. (Ed.). **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 31-39.

ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

ARANDA, E.; LORENCE, A.; TREJO, M. R. Rural production of *Bacillus thuringiensis* by solid state fermentation. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 317-332.

ARRUDA, R. O. M. **Estudo da fermentação semi-sólida para produção de *Bacillus thuringiensis***. 1999. 87 f. Tese (Doutorado)-Faculdade Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1999.

ARRUDA, R. O. M.; MORAES, I. O. Pasteurização de substrato fermentativo com microondas. **Farmácia e Química**, v. 36, p. 28-33, 2003.

BERNHARD, K.; UTZ, R. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. Chichester: John Wiley, 1993. p. 255-267.

CAPALBO, D. M. F.; MORAES, I. O. Use of agroindustrial residues for bioinsecticidal endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* or *kurstaki* in solid state fermentation. In: ROUSSOS, S.; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. (Ed.). **Advances in solid state fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p. 475-482.

COUCH, T. L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 297-316.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação semi-sólida. In: SCHMIDELL, W. et al. (Ed.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 2, p. 247-276.

DENT, D.; WAAGE, J. Wanted: investors in biological control. **Pesticide News**, v. 45, p.10-11, 2000.

FERNÁNDEZ-LARREA, O. **Norma de especificaciones para el control de la calidad de las producciones de BT**. La Habana: CEN Normas Cubanas, 1993. 6 p.

FERNÁNDEZ-LARREA, O. A review of *Bacillus thuringiensis* (Bt) production and use in Cuba. **Biocontrol News and Information**, London, v. 20, n. 1, p. 47-48, 1999.

FERNÁNDEZ-LARREA, O. V. Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de *Bacillus thuringiensis* berliner y su control de la calidad. In: TEMAS interesantes acerca del control microbiológico de plagas La Habana. La Habana: INISAV, 2001. p. 19-30.

FERNÁNDEZ-LARREA, O. V. Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, Turrialva, n. 64, p. 110-115, 2002.

IBARRA, J.; RINCÓN, M. D.; ORDUZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C. M. F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M. H.; DÁNCHEZ, J.; PEÑA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5269-5274, 2003.

IGNOFFO, C. M.; ANDERSON, R. F. Bioinsecticides. In: PEPPLER, H. J.; PERLMAN, D. (Ed.). **Microbial technology**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1979. v. 1, p. 1-28.

KHETAN, S. K. **Microbial pest control**. New York: Marcel Dekker, 2001. 300 p.

LYSANSKY, S. G.; COOMBS, J. Technical improvements to biopesticides. In: BRITISH CROP PROTECTION CONFERENCE PESTS AND DISEASES, 1992, Farnham. **Proceedings**. Farnham: British Crop Protection Council, 1992. p. 345-350.

LYSANSKY, S. G.; COOMBS, J. Developments in the market for biopesticides. In: BRITISH CROP PROTECTION CONFERENCE PESTS AND DISEASES, 1994, Brighton. **Proceedings**. Brighton: British Crop Protection Council, 1994. p. 1049-1054.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. The use of agricultural by-products as culture media for bioinsecticide production. In: LE MAUGER, M.; JELEN, P. (Ed.). **Food engineering and process applications**. London: Elsevier, 1985. p. 371-381.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; ARRUDA, R. O. M. Produção de bioinseticidas. In: SCHMIDELL, W. et al. (Ed.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001a. v. 3, p. 249-278.

MORAES, I. O.; ARRUDA, R. O. M.; TAMBOURGI, J. E.; MORAES, R. O.; PELIZER, L. H.; CAPALBO, D. M. F.; DEL BIANCHI, V. L. The history of *Bacillus thuringiensis* development in Brazil. In: ITALIAN CONFERENCE ON CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING, 2001, Florença. **Proceeding**. Florença: The Italian Association of Chemical Engineering, 2001b. v. 2, p. 1061-1063.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; ARRUDA, R. O. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 815-843.

REGIS, L.; SILVA-FILHA, M. H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 377-380, 2001.

SILVA, S. M. B.; SILVA-WERNECK, J. O.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C.; FRAGOSOS, R. R.; QUEZADO, M. T.; NETO, O. B. O.; AGUIAR, J. B.; DIAS, M. F. G.; BRAVO, A.; MONNERAT, R. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 128, p. 102-107, 2004.

TAMEZ-GUERRA, P.; GALÁN-WONG, L. J.; MEDRADO-ROLDÁN, H.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; RODRÍGUEZ-PADILLA, C.; GÓMEZ-FLORES, R. A.; TAMEZ-GUERRA, R. S. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización em México, **Ciência UANL**, Monterrey, v. 4, n. 2, p. 143-152, 2001.

VARON, U. Produção e comercialização de produtos biológicos na América Latina: a visão da iniciativa privada. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 9, 2005, Recife. **Anais...** Recife: FIOCRUZ, 2005. p. 71.



Avaliação e Regulação

Histórico da Avaliação de Segurança de Microrganismos para Controle de Pragas: Agentes Químicos X Agentes Biológicos

Eduardo Cyrino Oliveira-Filho

Introdução

O primeiro produto comercial da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, chamado Sporeineã, estava disponível em 1938 na França (VAN FRANKENHUYZEN, 1993). Nos Estados Unidos, o primeiro agente microbiológico para controle de pragas (*Bacillus popilliae*) foi registrado em 1948 pelo Departamento de Agricultura daquele país e somente em 1957 foi produzida a primeira formulação comercial de *B. thuringiensis*. O então denominado Thuricideã era indicado para controle de lagartas, e os estudos toxicológicos foram incluídos na solicitação de registro do produto à Agência de Drogas e Medicamentos dos Estados Unidos (USFDA), em 1958, resultando na liberação para uso temporário no mesmo ano e registro definitivo em 1960 (IGNOFFO, 1973).

Entretanto, essa medida gerou uma série de dúvidas, nos órgãos reguladores de todo o mundo, quanto à maneira de se avaliar tais produtos. Afinal, esses diferiam significativamente dos tradicionais químicos sintéticos.

Os primeiros agentes microbiológicos de controle foram submetidos a todos os testes requeridos para substâncias químicas, incluindo os estudos de longo prazo, como carcinogenicidade. Todavia, logo se tornou evidente que os testes indicados para avaliação da segurança de produtos químicos não

poderiam ser aplicados diretamente para agentes microbiológicos pelas seguintes razões:

1. Nos testes toxicológicos convencionais, assume-se que a medida do efeito biológico de uma substância química pode ser avaliada quando a dose administrada for suficientemente alta. Em geral, essa medida se expressa como a Dose Letal para 50% da população exposta (DL50). Todavia, a obtenção da DL50 de um microrganismo administrado em espécies não-hospedeiras pode-se tornar impraticável por vias convencionais tais como aplicações orais, dérmicas ou por inalação, já que muitas vezes a quantidade de material necessária para levar à morte seria tão grande que o animal morreria sufocado ou por bloqueio do trato gastrointestinal (SHADDUCK, 1983).
2. Também, nos testes com substâncias químicas, assume-se que o composto administrado pode ser metabolizado ou excretado e que produtos metabólicos podem ser tão ou mais tóxicos que o composto original. Contudo, não existem evidências que demonstrem que os Agentes Microbiológicos de Controle (AMCs) podem ser ativados metabolicamente em mamíferos. Embora a endotoxina delta, alcalino-solúvel, do *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* seja tóxica quando administrada pela via endovenosa em camundongos e em outros testes *in vitro*, a mesma ativação não ocorre se a administração for via oral pelo fato de as condições de ingestão dos mamíferos não serem favoráveis (THOMAS; ELLAR, 1983; ARMSTRONG; ROHRMANN; BEAUDREAU, 1985; GILL; SINGH; HORNUNG, 1987).
3. Assume-se, ainda, que, nas avaliações de segurança para substâncias químicas, o conhecimento da estrutura química ou de compostos relacionados pode fornecer informações sobre o perigo potencial para o homem, enquanto grande disparidade pode ocorrer entre microrganismos do mesmo gênero em relação à virulência e à patogenicidade. Por exemplo, apesar da grande relação genética entre *B. thuringiensis* e *B. anthracis* (Anthrax), o primeiro não é patogênico aos mamíferos (SIEGEL; SHADDUCK, 1990).

Por essas razões, entre outras, foi percebido pela comunidade científica e reguladora internacional que a avaliação de segurança não poderia ser realizada da mesma maneira para os dois tipos de produto (químicos e microbiológicos), embora tenha ficado evidente que a determinação de efeitos de toxicidade de prováveis toxinas como: a irritação e a alergia, além da infectividade e da patogenicidade propriamente dita, teria de estar incluída em qualquer bateria de teste referente aos produtos à base de microrganismos.

Nesse contexto, surgiu uma abordagem diferente para a avaliação da segurança dos AMCs: os testes de desafio máximo, sugerindo a utilização da maior dose possível, dependendo da natureza física do material e da dose recomendada para uso, a ser administrada pela rota que mais severamente compromete as defesas naturais do animal. Desse modo, embora sejam recomendadas rotas invasivas (intracerebral, intraocular, intraperitoneal), é possível quantificar efeitos biológicos, sem a utilização de doses maciças do AMC. Para a escolha da via mais indicada, aconselha-se a verificação dos registros bibliográficos sobre os órgãos-alvo de vertebrados, selecionados para infecção de microrganismos semelhantes (SHADDUCK, 1983). Todavia, a execução dos testes de desafio máximo é controversa, devido à dificuldade na interpretação dos dados de mortalidade e à extrapolação dos resultados para a segurança humana. Segundo Burges (1981), o valor de um estudo de injeção intracerebral é que este representa o pior caso (*worst case scenario*), e um resultado negativo fornece forte evidência da segurança do AMC. Contudo, organismos não patogênicos podem ser letais se injetados via intracerebral, e esse resultado levaria à rejeição prematura de um microrganismo candidato.

Por algum tempo, os protocolos para avaliação de substâncias químicas ainda serviram como modelos e, com a percepção das diferenças apresentadas, esses passariam por algumas alterações com o objetivo de verificar os possíveis efeitos produzidos pelo microrganismo propriamente dito (IGNOFFO, 1973). No início, somente estudos agudos eram conduzidos para avaliar a potencial toxicidade/patogenicidade de um patógeno de insetos para outros organismos. Os

testes mais longos, geralmente, eram executados pela indústria, depois da comprovação de que o microrganismo teria condições de se tornar um forte candidato a AMC, não apresentando problemas nos testes iniciais (agudos).

Os testes desenvolvidos para avaliar a segurança dos primeiros candidatos a AMC estão descritos nas Tabelas 1 e 2 a seguir, e seus protocolos estão detalhados em Ignoffo (1973).

Tabela 1. Série de estudos *in vivo* utilizados para avaliar a segurança do *Bacillus thuringiensis* para vertebrados, invertebrados e plantas.

Tipo de Estudo	Sistema Teste
Toxicidade Aguda/Patogenicidade	
Via dieta	Peixes, galinha, camundongo, rato, cobaia, porco e homem
Via intraperitoneal	Galinha, camundongo, rato, cobaia e coelho
Via subcutânea	Camundongo e cobaia
Via inalatória	Camundongo e homem
Sensibilidade/Irritação	
Olhos	Coelho
Pele	Cobaia e coelho
Toxicidade subaguda/patogenicidade	
Via Dieta	Galinha, rato e homem
Via inalatória	Rato e homem
Sensibilidade/alergenicidade	Cobaia e homem
Transmissão e virulência	Camundongo
Persistência em mamíferos	Camundongo
Especificidade de ação	Artrópodes benéficos
Fitotoxicidade	Culturas agrícolas

Tabela 2. Série de estudos que estabeleceu a segurança do vírus *Heliothis* Nuclear Poliedrosis.

Tipo de Estudo	Sistema Teste
Toxicidade aguda/patogenicidade	
Via dieta	Rato ou camundongo, pássaro, peixe, ostra, camarão
Via inalatória	Rato e cobaia
Via dérmica	Rato, coelho e cobaia
Via intraperitoneal	Rato ou camundongo
Via subcutânea	Rato
Via intravenosa	Rato, camundongo
Via intracerebral	Camundongo
Sensibilidade/irritação	
Ocular	Coelho
Dérmica	Cobaia, coelho e homem
Toxicidade subaguda/patogenicidade	
Via dieta	Macaco, cachorro, rato ou camundongo
Via inalatória	Macaco, cachorro, rato ou camundongo
Via subcutânea	Macaco, cachorro, rato ou camundongo
Teratogenicidade	Rato ou camundongo
Carcinogenicidade	Rato ou camundongo
Potencial replicação	Homem, primata, cultura de tecidos
Especificidade de ação	Artrópodes benéficos e outros

Em todos esses estudos iniciais, não houve evidências de toxicidade ou patogenicidade.

Percebido o conflito por causa das inúmeras exigências e das diferenças em relação aos agrotóxicos químicos convencionais, em 1981, a Organização Mundial de Saúde (MAMMALIAN...1981) elaborou um memorando referente aos testes de segurança e regulamentação de AMCs. O principal objetivo dos testes definidos pela OMS era realizar análises do risco/benefício para cada um dos diferentes usos destinados aos vários agentes microbiológicos. Nesse contexto, foi então elaborado um esquema de teste de segurança para mamíferos em três fases (Figura 1) e recomendações para a realização de vigilância sorológica regular em todos os indivíduos expostos ao microrganismo durante seu desenvolvimento e utilização, além de sugestões para estudos epidemiológicos (SAIK; LACEY; LACEY, 1990).

A avaliação em três fases, proposta pela OMS, foi desenvolvida buscando reduzir as exigências para produtos considerados menos agressivos ao meio ambiente e à saúde humana e pelo fato de serem produtos considerados de baixa toxicidade e persistência ambiental. Nesse caso, a proposta da OMS tinha como objetivo principal evitar que o processo de registro desses produtos fosse inviabilizado pelo excesso de exigências e pelo alto custo dos testes toxicológicos. Tal proposição logo foi adotada pelos Estados Unidos e, atualmente, esses elementos podem ser encontrados entre as exigências do Canadá e de nações-membro da Comunidade Européia. Segundo Siegel (1997), é bastante incomum que um AMC, submetido à Fase III, seja registrado nos Estados Unidos ou em algum outro país.

De modo geral, os protocolos para avaliação de segurança de AMCs, em vários países, combinam elementos de testes toxicológicos convencionais, tais como administração oral e exposição dérmica, com rotas de exposição mais invasivas como as injeções intravenosa ou intraperitoneal, dependendo do microrganismo e as avaliações de infectividade e patogenicidade, elementos típicos para avaliação dos efeitos adversos de organismos vivos.

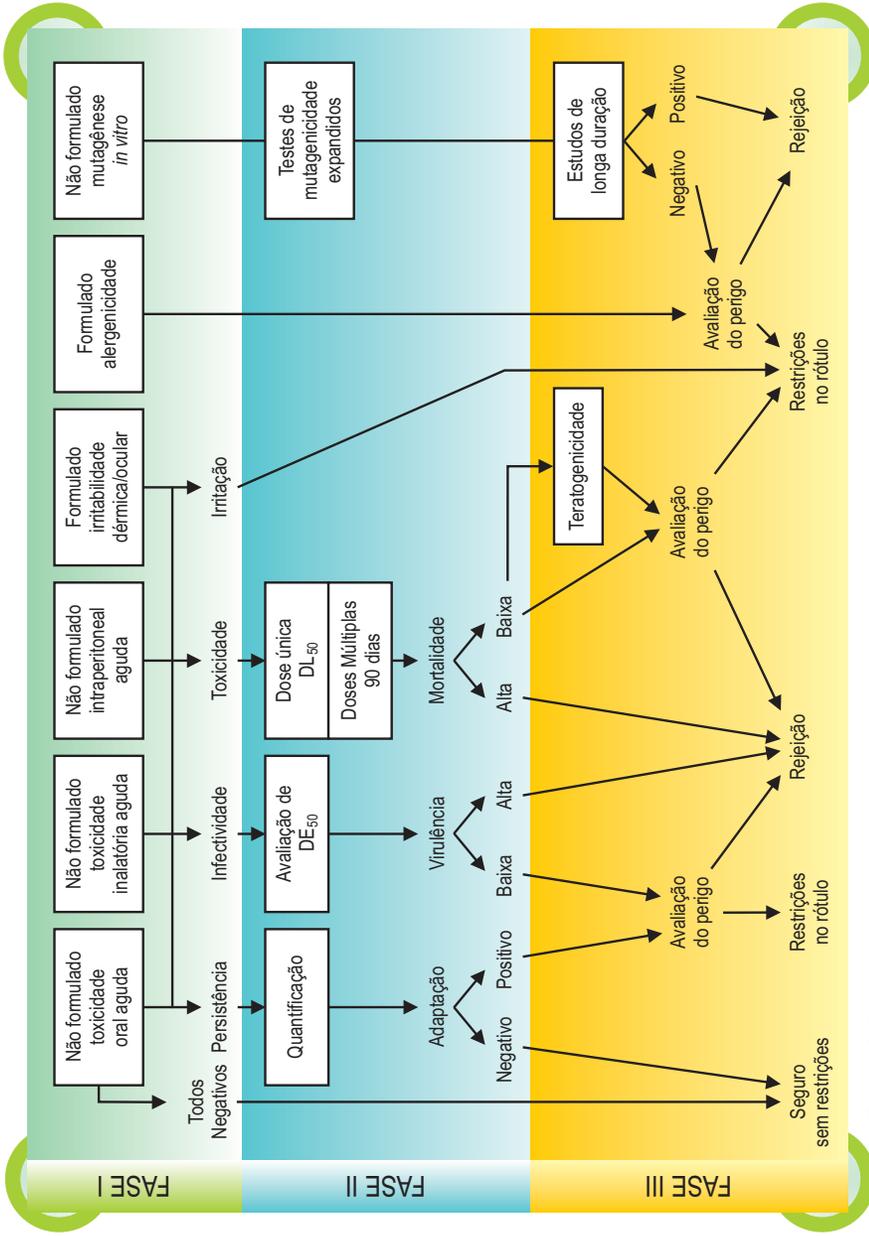


Figura 1. Procedimentos para avaliação de segurança de bactérias e fungos, utilizados para o controle de vetores, segundo o memorando da OMS de 1981.

Fonte: Mammalian..., 1981.

No Brasil, só a partir de 1997, a legislação começou a se adequar aos padrões internacionais. Naquele ano, tendo em vista o apoio da comunidade científica, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) publicou a Portaria Normativa Nº 131, de 3 de novembro de 1997 (IBAMA, 1997), preconizando avaliações toxicológica e ecotoxicológica em três fases, conforme o memorando da OMS de 1981. Nesse contexto, é solicitada ainda, a avaliação da patogenicidade de produtos à base de microrganismos, o que até então era uma proposta inexistente no cenário legislativo nacional.

Em 2002, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), também com o apoio de pesquisadores, representantes do IBAMA e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou, em 8 de julho de 2002, a RDC Nº 194 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002), uma resolução com modelo muito parecido com a Portaria Nº 131/97 do IBAMA, para a avaliação toxicológica e da patogenicidade de agentes microbiológicos de controle. De modo geral, ambas são semelhantes ao modelo da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) que preconiza a avaliação em três fases com uma mistura de testes toxicológicos convencionais e de testes para avaliar a patogenicidade do microrganismo candidato.

Recentemente, foi publicada a Instrução Normativa (IN) Conjunta Nº 03, de 10 de março de 2006 (BRASIL, 2006), entre MAPA, ANVISA e IBAMA, definindo os critérios e exigências para o registro de um AMC no Brasil. Trata-se fundamentalmente de uma combinação de itens da Portaria Nº 131 e da RDC Nº 194, contando, ainda, com alguns requisitos específicos referentes aos critérios para avaliação da eficiência e da praticabilidade do produto.

No momento, existe grande expectativa por parte da comunidade científica de que essa IN Conjunta, atrelada aos critérios para a efetivação do artigo 12 do Decreto Nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002 (prioridade de análise para produtos de baixa toxicidade e periculosidade) (BRASIL, 2002), venha facilitar e minimizar as

exigências existentes para a regularização de produtos microbiológicos no Brasil, para que produtos dessa natureza possam estar mais presentes no mercado nacional, tornando menos química as defesas fito e domissanitária.

Toxicidade X Patogenicidade

Com base nos fatos descritos anteriormente, demonstra-se que a avaliação da segurança de produtos agrotóxicos sempre foi baseada na avaliação de agentes químicos. Nesse contexto, foi percebida a necessidade de adaptação dos requerimentos rotineiros de avaliação de produtos químicos para possíveis efeitos adversos causados pelo uso de agentes microbiológicos. A grande diferença está entre a avaliação de toxicidade, propriedade intrínseca de substâncias químicas e a avaliação de patogenicidade, ou seja, a capacidade de um microrganismo causar doença em seu hospedeiro. A toxicidade a ser avaliada resume-se, fundamentalmente, na possível liberação de toxinas pelos microrganismos propostos. No primeiro momento (Fase I), deve-se observar a mortalidade dos animais experimentais. Em caso de mortes, o produto deve seguir para a Fase II, na qual será determinada a Dose Letal para 50% dos animais (DL50) e, na ausência de morte, o produto deve passar pelos outros testes da Fase I para outras avaliações. Sobre a patogenicidade, os testes da Fase I apresentarão indícios em caso de positividade, o que poderá ser confirmado com mais detalhes nos testes da Fase II.

Um dos pontos diferenciais entre a avaliação de toxicidade convencional e a avaliação de toxicidade e patogenicidade é a taxa de eliminação do microrganismo do corpo do animal (*clearance*) que deve ser determinada com o auxílio de provas imunológicas ou via exame de DNA para identificar a presença do microrganismo em tecidos do corpo. Trata-se de duas avaliações distintas, nas quais o laboratório executor tem de possuir a infra-estrutura exigida e o técnico avaliador, conhecimentos específicos para realizar tal tarefa.

Considerações Finais

Na língua portuguesa, o termo segurança significa que está seguro ou numa condição livre de perigo. A avaliação toxicológica de agrotóxicos e afins, nos moldes legislativos atuais seja visando à saúde humana, seja à do meio ambiente, é fundamentalmente uma avaliação do perigo oferecido pelo produto, faltando ainda alguns passos para que se processe a real avaliação do risco.

Do ponto de vista toxicológico, sabe-se que, para substâncias químicas, o risco zero não existe e, de certo modo, esse mesmo princípio pode ser empregado para os AMCs. O registro de um agrotóxico químico é essencialmente uma autorização de uso, na qual os riscos são aceitáveis, e o mesmo procedimento deve ser aplicado aos AMCs.

Assim, com base em estudos realizados e solicitados por ocasião do registro do produto, incluindo entre outros os testes de segurança, determinar-se-á o quão seguro é um AMC. Os testes sugeridos nos protocolos deverão subsidiar pesquisadores e órgãos reguladores na determinação do perigo oferecido pelo AMC candidato, tanto a mamíferos quanto ao meio ambiente em geral. A partir da avaliação realizada, irão ser definidos os critérios relacionados à melhor forma de utilização e o manuseio que, em geral, são apresentados nos rótulos e nas bulas dos produtos e que devem ser cumpridos, de modo a garantir a eficiência e a segurança do usuário e do ambiente.

A grande questão para os reguladores de hoje é a compreensão das diferenças entre químicos e biológicos e da capacidade para distinguir e avaliar toxicidade e patogenicidade.

Considera-se que, pelo bom senso, alguns patógenos de vertebrados não serão utilizados para fins agrícolas ou domissanitários, pois isso, em condições desfavoráveis, podem se tornar uma ameaça à saúde pública. Todavia, destaca-se que, em todo o caso, as pesquisas bibliográfica e *on-line* são sempre

ferramentas prioritária e fundamental para se conhecer o estado da arte de determinado microrganismo ou do grupo ao qual ela pertence, além de levantar suas condições de registro em outros países.

Na verdade, sabe-se que ainda não existe o agrotóxico (pesticida) ideal seja ele natural, seja sintético, biológico, seja químico. A almejada seletividade contra a espécie-alvo ainda é uma busca que de certo modo tem diminuído, à medida que determinado produto concentra sua ação, fundamentalmente, em algumas ordens da classe *insecta* e, nesse caso, torna-se muito fácil o gerenciamento da relação risco/benefício da utilização de um AMC.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução-RDC nº 194, de 8 de julho de 2002. Regulamentação de produtos microbiológicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 jul, 2002a. Seção 1, p. 228-229.

ARMSTRONG, J. L.; ROHRMANN, G. F.; BEAUDREAU, G. S. Delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 161, n. 1, p. 39-46, 1985.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 8 jan. 2002. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm>. Acesso em: 14 dez. 2005.

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta nº 01, de 23 de janeiro de 2006. Estabelecer procedimentos para obtenção de registro de produtos semioquímicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 jan. 2006. p. 7-8.

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta nº 03, de 10 de março de 2006. Estabelecer procedimentos para obtenção de registro de agentes microbiológicos de controle. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 mar. 2006. p. 23-25.

BURGES, H. D. Safety, safety testing, and quality control os microbial pesticides. In: BURGES, H. D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980**. New York: Academic Press, 1981. p. 738-769.

GILL, S. S.; SINGH, G. J. P.; HORNUNG, J. M. Cell membrane interaction of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, cytotoxic toxins. **Infection and Immunity**, Washington, v. 55, n. 5, p. 1300-1308, 1987.

IGNOFFO, C. M. Effects of entomopathogens on vertebrates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 217, p. 141-172, 1973.

IBAMA. Portaria Normativa nº 131, de 3 de novembro de 1997. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 nov. 1997. p. 24988-24991.

MAMMALIAN safety of microbial agents for vector control: a WHO memorandum. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 59, n. 6, p. 857-863, 1981.

SAIK, J. E.; LACEY, L. A.; LACEY, C. M. Safety of microbial insecticides to vertebrates - domestic animals and wildlife. In: LAIRD, M.; LACEY, L.; DAVIDSON, E. (Ed.). **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 115-132.

SHADDUCK, J. A. Some observations on the safety evaluation of nonviral microbial pesticides. **Bulletin of the World Health Organization**, New York, v. 61, p. 117-128, 1983.

SIEGEL, J. P. Testing the pathogenicity and infectivity of entomopathogens to mammals. In: LACEY, L. A. **Manual of techniques in insect pathology (biological techniques)**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 325-336.

SIEGEL, J. P.; SHADDUCK, J. A. Safety of microbial insecticides to vertebrates-humans. In: LAIRD, M.; LACEY, L.; DAVIDSON, E. (Ed.). **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 101-113.

THOMAS, W. E.; ELLAR, D. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal delta endotoxin: effect on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 60, p. 181-197, 1983.

VAN FRANKENHUYZEN, K. V. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. New York: John Wiley & Sons, 1993. p. 1-35.

Registro de Saneantes Categorizados como Desinfestantes Contendo Princípios Ativos Biológicos

Marco Antonio Abla

Francisco Alexandre Shammass de Mancilha

Introdução

Neste capítulo, são apresentados os aspectos reguladores mais importantes, do ponto de vista técnico, para registro de produtos saneantes categorizados como desinfestantes contendo princípios ativos biológicos.

Considerações Gerais

A Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976 (BRASIL, 1976) estabelece como um dos produtos sujeitos à regulamentação sanitária, os desinfestantes de registro obrigatório, como um saneante, de acordo com a definição:

Substâncias ou preparações destinadas à higienização, desinfecção ou desinfestação domiciliar, em ambientes coletivos e/ou públicos, em lugares de uso comum, e no tratamento da água compreendendo:

Inseticidas - destinados ao combate, à prevenção e ao controle dos insetos em habitações, recintos e lugares de uso público e suas cercanias.

Raticidas - destinados ao combate a ratos, camundongos e outros roedores em domicílios, embarcações, recintos e lugares de uso público, contendo substâncias ativas, isoladas ou em associação as quais não ofereçam risco à vida ou à saúde

do homem e dos animais úteis de sangue quente, quando aplicados em conformidade com as recomendações contidas em sua apresentação.

Em termos específicos, o registro desses produtos foi tratado na Resolução RDC nº 326 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2005) e na Portaria da Secretaria de Vigilância Sanitária nº 322 (BRASIL, 1997), nas quais se normatizaram o uso de inseticidas, raticidas, repelentes e os produtos para aplicação em jardinagem amadora respectivamente.

Os princípios ativos para desinfestantes, enquadrados como saneantes, são previamente aprovados pela Gerência Geral de Toxicologia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que faz constar, em monografia, a discriminação das categorias e as formas físicas permitidas, com as respectivas concentrações limítrofes sendo, só a partir disto, que a Gerência Geral de Saneantes aprecia o pleito de registro de produto que os contenham.

Produtos, Formas Físicas e Respectivas Concentrações Permitidas

De acordo com a Resolução – RE nº 165 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2005), apenas dois princípios ativos de origem biológica estão permitidos para produtos desinfestantes: *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*, conforme transcrição abaixo:

Monografia B01 - *Bacillus thuringiensis*

Identificação: *Bacillus thuringiensis*, Var. israelensis, Sorotipo H14

Modalidade de emprego: Empresas especializadas e jardinagem amadora

Empresas especializadas

Tipos de formulações autorizadas:

a) Granulado – concentração máxima de *B. thuringiensis*: 1200 Unidades Tóxicas Internacionais por miligrama (1200 UTI/mg) ou 3000 Unidades *Aedes aegypti* por miligrama (3000 U.aa/mg).

b) Suspensão concentrada – concentração máxima de *B. thuringiensis*: 1200 Unidades Tóxicas Internacionais por miligrama (1200 UTI/mg) ou 3000 Unidades *Aedes aegypti* por miligrama (3000 U.aa/mg).

c) Solução aquosa concentrada – concentração máxima de *B. thuringiensis*: 1200 Unidades Tóxicas Internacionais por miligrama (1200 UTI/mg).

Jardinagem amadora

Tipos de formulações autorizadas:

a) Pó – concentração máxima de *B. thuringiensis*: 1200 Unidades Tóxicas Internacionais por miligrama (1200 UTI/mg).

Monografia B31 - Bacillus sphaericus

Identificação: *Bacillus sphaericus* estirpe 2362 (USDA/USA)

Modalidade de emprego: somente Empresas especializadas

Tipos de formulações autorizadas:

a) Pó molhável – concentração máxima de *B. sphaericus*: 1700 Unidades Tóxicas Internacionais (UTI)/mg.

b) Suspensão concentrada – concentração máxima de *B. sphaericus*: 1700 Unidades Tóxicas Internacionais (UTI)/mg.

c) Grânulos – concentração máxima de *B. sphaericus*: 1700 Unidades Tóxicas Internacionais (UTI)/mg.

Inseticidas para Empresas Especializadas

Esses produtos são regulamentados pela Resolução nº 326 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2005) podendo-se destacar os seguintes pontos:

Somente serão permitidos desinfestantes para venda a entidades especializadas de produtos formulados cuja diluição final de uso apresente Dose Letal 50%, por via oral, superior a 2000 mg/kg de peso corpóreo para produtos sob a forma líquida ou a 500 mg/kg de peso corpóreo para produtos sob a forma sólida, incluídos na classe III da Classificação de Pesticidas segundo a Periculosidade recomendada pela OMS.

O uso de mascarantes é vedado na formulação de tais produtos.

Os testes para registro desses produtos, além dos demais documentos exigidos legalmente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004) estão discriminados abaixo:

- Determinação do(s) teor(es) do(s) princípio(s) ativo(s)
- Toxicidade oral aguda (DL 50 oral)
- Toxicidade dérmica aguda (DL 50 dérmica) – produto formulado
- Sensibilização cutânea (SC) – produto formulado
- Irritabilidade dérmica – produto formulado
- Irritabilidade ocular – produto formulado
- Estabilidade
- Eficácia – produto formulado

NOTA: Os testes de eficácia para esses produtos foram recentemente discutidos, devendo ser incluídos na próxima revisão do Manual de Testes de Eficácia para Produtos Desinfestantes.

Produtos para Jardinagem Amadora

Esses produtos, utilizados normalmente para eliminação de lagartas em plantas, são regulamentados pela Portaria nº 322 (BRASIL, 1997) dos quais se exige que:

Os produtos utilizados em jardinagem amadora, para venda direta ao consumidor, serão comercializados na diluição de uso ou em dose única e devem ter o ingrediente ativo na menor concentração possível visando a uma ação eficaz conforme suas indicações e instruções de uso.

Somente serão permitidos, para uso em jardinagem amadora, para venda direta ao consumidor, produtos formulados cuja Dose Letal 50%, por via oral, seja superior a 2000 mg/kg de peso corpóreo para produtos sob a forma líquida ou a 500 mg/kg de peso corpóreo para produtos sob a forma sólida, incluídos na classe III da Classificação de Pesticidas, segundo a Periculosidade recomendada pela OMS.

Os testes para registro desses produtos, além dos demais documentos exigidos legalmente, estão discriminados abaixo:

- Determinação do(s) teor(es) do(s) princípio(s) ativo(s)
- Toxicidade oral aguda (DL 50 oral)
- Estabilidade
- Eficácia - produto formulado

Considerações Finais

Um dos aspectos para gerenciamento de risco dos produtos sujeitos à regulamentação sanitária é seu registro em que, de alguma maneira, a empresa se vê obrigada a prestar e a comprovar à autoridade sanitária que o produto que

ela deseja colocar no mercado é seguro para o consumidor e eficaz para os fins aos quais se propõe.

Embora não seja, ainda, o modelo ideal de controle sanitário, representa o primeiro modelo de fiscalização a exemplo dos praticados nos EUA e em países da Comunidade Européia, tidos como modelos bem-sucedidos.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução-RE nº 165, de 29 de agosto de 2003. Determina a publicação do “Índice das monografias dos ingredientes ativos de agrotóxicos, domissanitários e preservantes de madeira”, cujo emprego encontra-se autorizado conforme descrito na monografia. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 set. 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=8673>>. Acesso em: 19 jun. 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de eficácia para produtos desinfestantes**. 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/saneantes/desinfestantes.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução-RDC nº 326, de 9 de novembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para produtos desinfestantes domissanitários harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 49/99. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 nov. 2005. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=19641>>. Acesso em: 22 jun. 2006.

BRASIL. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 set. 1976. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L6360>. Acesso em: 30 jun. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 322 de 28 de julho de 1997. Aprova as Normas Gerais para Produtos para Jardinagem Amadora. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 ago. 1997. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=293>>. Acesso em: 19 jun. 2006.

Introdução

Os agrotóxicos são definidos pela Lei 7.802 como: *"produtos ou agentes de processo físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores da produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos"* (BRASIL, 1989).

Com base nessa definição, é possível enquadrar todos os produtos que hoje compõem a gama de alternativas para os profissionais que trabalham com agricultura no controle das diferentes pragas e doenças.

Os agrotóxicos ou os afins de agrotóxicos são considerados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como uma importante ferramenta para o estabelecimento de culturas economicamente viáveis no Brasil. O grande número de pragas que assolam as diferentes culturas nacionais age como fatores que reduzem a produção (CONCEIÇÃO, 2000). Como qualquer ferramenta de trabalho, os riscos de sua utilização devem sempre ser ponderados de forma que a ferramenta seja utilizada com segurança e eficiência.

É sobre este paradigma que o registro de agrotóxicos no Brasil é baseado: eficiência, segurança e qualidade.

Evolução do Registro de Agrotóxicos

A partir da publicação da Lei 7.802 em 1989, o registro de agrotóxicos no Brasil passou a ser trabalhado conjuntamente por três pastas do poder executivo: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ministério da Saúde e Ministério do Meio Ambiente. Dessa forma, o registro de agrotóxicos é considerado um ato complexo com a observância de pareceres das três pastas para que se garantam as características já descritas de qualidade, segurança e eficiência dos produtos registrados.

A evolução dos produtos para controle de pragas vem ocorrendo desde a síntese da primeira molécula orgânica desenvolvida para esse controle: o DDT. Desde o início do século XX, quando moléculas químicas começaram a ser utilizadas no controle de pragas, até os dias de hoje, houve evolução significativa. As principais mudanças foram na eficiência, na dosagem e na segurança dos produtos (CONCEIÇÃO, 2000).

Em linhas gerais, a média da DL50 (Dose Letal experimental responsável pelo óbito de 50% das cobaias), dos produtos utilizados na agricultura, aumentou significativamente nos últimos 30 anos, transformando-se em produtos cada vez mais seguros para os organismos não-alvo (Figura 1). Esse progresso se deveu a diversos fatores, entre eles a preocupação do governo e da população com a segurança dos trabalhadores, dos consumidores e do meio ambiente. Dessa forma, produtos persistentes no ambiente e produtos com indícios de mutagenicidade ou carcinogênicos são paulatinamente substituídos por outros menos tóxicos e menos agressivos ao meio ambiente (CONCEIÇÃO, 2005).

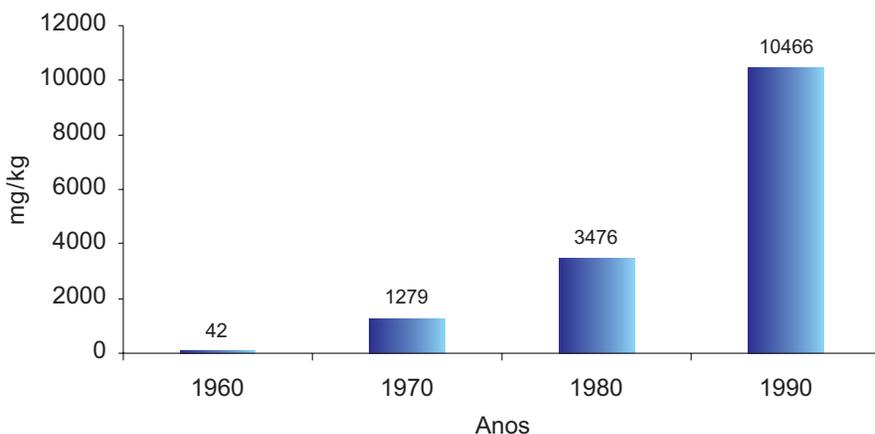


Figura 1. Progressão da redução de DL50 de produtos inseticidas ao longo dos anos.

Fonte: Conceição (2005).

O reflexo na busca de produtos mais seguros vem, também, da própria sociedade. A procura por alimentos orgânicos vem crescendo ano após ano e, considerando a necessidade desses sistemas de produção, quanto ao controle de pragas e doenças, o desenvolvimento e o registro de produtos adequados a suas premissas tornam-se necessários.

Hoje os principais produtos considerados de baixa toxicidade e periculosidade são os inseticidas microbiológicos e os feromônios (Tabela 1). Entretanto, o número de registros desses produtos no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ainda é muito baixo (Figura 2). Foi considerando esses aspectos e a necessidade de aumento da oferta de produtos dessa natureza registrados, visando ao aumento da sustentabilidade das atividades agrícolas, que os órgãos do governo, responsáveis pelo registro de agrotóxicos, elaboraram um conjunto de normas técnicas para regular o registro de produtos de baixa toxicidade e periculosidade, entre eles: os semioquímicos, os microbiológicos, os bioquímicos e os inimigos naturais.

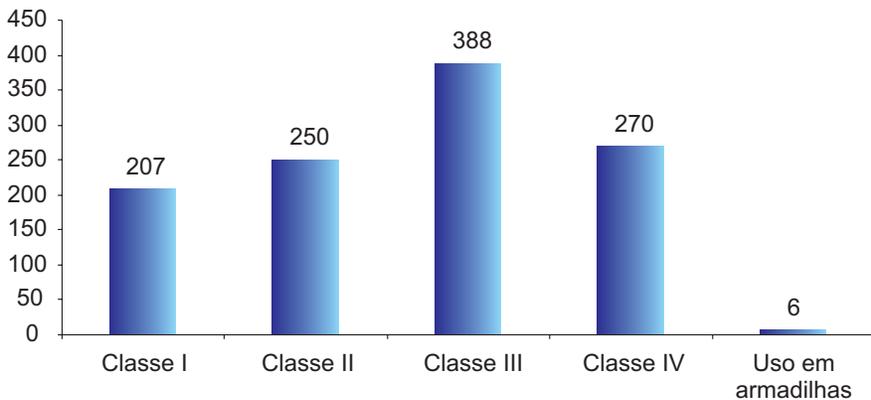


Figura 2. Produtos registrados no Brasil pertencentes às diferentes classes toxicológicas.

Fonte: Brasil (2005a).

Sustentabilidade

A palavra sustentabilidade ou desenvolvimento sustentável tem um significado bastante complexo: encontrar o que se precisa no presente sem comprometer as gerações futuras de encontrar o que eles precisarem de acordo com as suas necessidades (UNITED NATIONS, 2005). Na agricultura, a palavra sustentabilidade vem adquirindo vários significados, considerando a necessidade de ampliação da produção para atender a uma população crescente, porém, mantendo a capacidade produtiva e um equilíbrio viável no custo de produção.

Tabela 1. Classificação ambiental dos principais representantes dos produtos biológicos registrados.

Classificação de produtos	Número de produtos	Principais representantes
Baixo risco ambiental	9	Feromônios para uso em armadilhas.
Pouco tóxico ao meio ambiente	87	Óleos, <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , hormônios vegetais, inorgânicos (S e Cu), Baculovírus e feromônios

Fonte: Brasil (2005a).

O desenvolvimento de agrotóxicos que se enquadrem nas características de baixa toxicidade e periculosidade, em geral, colabora para a manutenção da definição de sustentabilidade na agricultura e são importantes componentes na aplicação do Manejo Integrado de Pragas.

O Manejo Integrado de Pragas é definido como: *"um sistema de apoio à tomada de decisões para a seleção e uso de táticas de controle de doenças, pragas e plantas daninhas harmonicamente coordenadas em estratégias de manejo, baseadas em análises de custo benefício que levam em consideração os interesses dos produtores, da sociedade e do meio ambiente"* (ZAMBOLIM, 2000).

Para a aplicação desses conceitos, é necessário que haja a disponibilidade de produtos que se enquadrem nas características de sustentabilidade e, hoje, aqueles que mais se enquadram nessas definições são os produtos já listados neste capítulo.

As pesquisas realizadas com produtos de baixa toxicidade e periculosidade vêm sendo desenvolvidas há bastante tempo por diversas instituições, principalmente, aquelas diretamente envolvidas com a sustentabilidade do agronegócio brasileiro, como a Embrapa e as Universidades Federais. Entretanto, para a evolução das pesquisas de produtos dessa natureza, é importante observar como os pesquisadores abordam as ações de controle de determinado produto ou agente biológico.

Definições de Produtos Biológicos

Por meio de atos de regulação como as Instruções Normativas, é possível definir os parâmetros técnicos exigidos para um registro. As Instruções Normativas que versam sobre o registro de agrotóxicos estão subordinadas ao Decreto 4.074 de 04 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2002) que por sua vez regulamenta a já mencionada Lei 7.802/89.

De acordo com as novas Instruções Normativas (INs) Interministeriais, as definições técnicas para semioquímicos, agentes microbiológicos e agentes biológicos de controle são:

Produtos Semioquímicos – “entende-se por produtos semioquímicos aqueles constituídos por substâncias químicas que evocam respostas comportamentais ou fisiológicas nos organismos receptores e que são empregados com a finalidade de detecção, monitoramento e controle de uma população ou de atividade biológica de organismos vivos, podendo ser classificados, a depender da ação que provocam, intra ou interespecífica, como feromônios e aleloquímicos, respectivamente”.

Agentes Microbiológicos de controle – “os microrganismos vivos de ocorrência natural, bem como aqueles resultantes de técnicas que impliquem na introdução natural de material hereditário, excetuando-se os organismos cujo material genético (ADN/ARN) tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética (OGM)”.

Inimigos Naturais ou Agentes Biológicos de Controle – “os organismos que naturalmente infectam, parasitam ou predam uma praga específica, dentre eles, os parasitóides, predadores e nematóides entomopatogênicos”.

Outros conceitos são utilizados nas normas que regulamentam esses produtos como:

Infectividade – “habilidade do microrganismo para atravessar ou escapar das barreiras naturais, colonizando o hospedeiro”.

Patogenicidade – “habilidade do microrganismo para causar doença ao hospedeiro após a infecção”.

Toxicidade – “lesão ou dano causado ao hospedeiro, por um veneno ou toxina, independentemente da infecção, da replicação ou da viabilidade do microrganismo”.

Toxina: “substância tóxica, gerada por um microrganismo, planta ou animal, capaz de causar lesão ou dano ao interagir com as células do hospedeiro”.

Técnica do Inseto Macho Estéril (TIE) – “consiste na liberação de machos que foram esterilizados por radiação ionizante como método de controle que pode ser usado na supressão ou erradicação de pragas”.

Esses conceitos, retirados de definições científicas, montam o arcabouço das normas para produtos de natureza biológica e estabelecem de forma mais exata quais os candidatos a registros desta natureza e que podem ser tratados de forma diferenciada.

Muitos produtos enquadrados nessas definições podem ser utilizados nos sistemas de produção da agricultura orgânica e de acordo com o art. 9º, da Lei 10.831 de 23 de dezembro de 2003: “os insumos com uso regulamentado para a agricultura orgânica deverão ser objeto de processo de registro diferenciado, que garanta a simplificação e agilização de sua regularização” (BRASIL, 2003).

Avaliação da Eficiência Agronômica em Produtos Biológicos

A competência exclusiva do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no registro de agrotóxicos é avaliar a eficiência dos produtos candidatos ao registro. Para avaliação dessa eficiência, o MAPA utiliza os parâmetros definidos no art. 2º da portaria nº 45 de 10 de dezembro de 1990 (BRASIL, 1990).

A evolução dos experimentos em agronomia, acompanhada de diferentes metodologias desenvolvidas e adequadas a cada situação, coloca as normas anteriormente publicadas em certa desarmonia com as correntes de pesquisa modernas. A pesquisa com agrotóxicos pode ser enquadrada, de maneira geral, em um modelo pré-definido de tratamentos, padrões, testemunhas e repetições.

No entanto, nem todos os produtos modernos devem ser avaliados segundo a mesma metodologia.

A descrição das metodologias que são adotadas pelos pesquisadores durante a execução dos testes de campo deve ser bem detalhada, da forma o mais precisa possível, e devidamente contextualizada, para que haja uma avaliação de qualidade pelos órgãos reguladores.

Em um teste de campo que visa comprovar a eficiência de determinado produto, o primeiro ponto a ser observado, diz respeito às condições e aos parâmetros testados que deverão ser aquelas que o produtor encontrará no campo. A dose a ser utilizada, os alvos combatidos ou monitorados e a forma de utilização dos produtos deverão ser os mesmos conforme as indicações de uso na bula do produto.

As constatações dos pesquisadores nos testes de eficiência realizados não podem suscitar dúvidas quanto à eficiência do produto. Do contrário, o parecer sobre eficiência e praticabilidade agrônômica fica comprometido.

Outro problema freqüentemente encontrado nos testes de eficiência agrônômica com produtos biológicos é a escolha do produto-padrão de comparação nos testes. Segundo as regras estabelecidas para realização dos testes de eficiência, é necessário utilizar um produto-padrão, e este deve estar registrado para a cultura e o alvo biológico a ser combatido. Para produtos biológicos, no entanto, a utilização de padrões químicos convencionais nem sempre traz representatividade significativa na comparação de seus efeitos de controle. Dessa forma, recomenda-se a aplicação de maior número de doses durante os testes e o artifício de análises estatísticas que permitam concluir com mais precisão qual a dose mais efetiva de controle.

No Brasil, todas as pesquisas com agrotóxicos necessitam de registro para serem realizadas. Para a modalidade de pesquisa e experimentação, o registro de

agrotóxicos é diferenciado e está previsto na Lei 7.802/89 no Decreto 4.074/02. Mais recentemente, essa modalidade de registro foi normatizada pela Instrução Normativa Conjunta nº 25 de 14 de setembro de 2005. Segundo essas normas, todas as pesquisas realizadas com agrotóxicos no território nacional necessitam de Registro Especial Temporário – RET, sem exceção (BRASIL, 2005b).

Contudo, é importante ressaltar e identificar quando um produto biológico passa a ser enquadrado como agrotóxico. A pesquisa sobre índices de parasitismo de determinado parasitóide ou pesquisas preliminares sobre o efeito de semioquímicos no comportamento sexual de lepidópteros não podem ser enquadradas ainda como agrotóxicos, por que não são utilizadas no *“setor da produção (...) para o controle da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”* (Lei 7.802/89). A partir da identificação da capacidade de um produto ou agente de controle biológico agir como um “agrotóxico” e da necessidade de execução de experimentação para estabelecer e comprovar doses, composição, efeitos toxicológicos e eficiência de controle, é que há a necessidade de registro para pesquisa e experimentação para produtos dessa natureza.

As pesquisas com organismos vivos, nesse caso, devem obedecer não só a legislação específica mas também a de agrotóxicos.

Considerações Finais

O avanço da legislação brasileira no que tange à regulamentação do registro de produtos biológicos visa trazer para a legalidade produtos que fazem parte de alternativas sustentáveis para o controle de pragas na agricultura brasileira.

O enquadramento dos produtos biológicos, como os inimigos naturais e os feromônios, na definição de agrotóxicos, trouxe freqüente dificuldade para seu registro, considerando as exigências, muitas vezes complexas de serem cumpridas, bem como os custos relacionados a elas.

As novas normas para registro de agrotóxicos biológicos visam dividir as exigências para registro em fases de forma a reduzir, quando adequado, as exigências toxicológicas e ecotoxicológicas para o registro desses produtos. Recentemente publicadas, a Instrução Normativa Conjunta nº 32, de 26 de outubro de 2005 e as INs Nºs 01 e 02, de 23 de janeiro de 2006, possuem justamente esse objetivo.

Dessa forma, o governo federal, responsável pelo registro de produtos dessa natureza, cumpre sua parte como órgão regulamentador reduzindo alguns vieses existentes na legislação e aumentando a possibilidade de registro de produtos biológicos no mercado brasileiro, mantendo sempre seu papel de garantir a qualidade a segurança e a eficiência dos produtos destinados à agricultura.

Referências

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 jul. 1989. Seção 1, p. 11459-11460.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 45 de 10 dez. 1990. **Para efeito de obtenção de registro, renovação e extensão de uso de agrotóxicos**. Brasília, DF, 1998. p. 63-66.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 8 jan. 2002. Seção 1, p. 1-12.

BRASIL. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 dez. 2003. Disponível em: <<http://www.presidencia.gov.br/ccivil/leis/2003/l10.831.htm>>. Acesso em: 10 set. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **AGROFIT**: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 set. 2005a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta nº 25, de 14 de setembro de 2005. Estabelece procedimentos para obtenção de registro especial temporário. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 set. 2005b. Seção 1, p. 4-6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta nº 32, de 26 de outubro de 2005. Estabelece procedimentos para obtenção de registro de produtos bioquímicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 nov. 2005c. Seção 1, p. 3-4.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta nº 01, de 23 de janeiro de 2006. Estabelece procedimentos para obtenção de registro de produtos semioquímicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 jan. 2006a. Seção 1, p. 7-8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta nº 02, de 23 de janeiro de 2006. Estabelece procedimentos para obtenção de registro de agentes biológicos de controle. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 jan. 2006b. Seção 1, p. 4.

CONCEIÇÃO, M. Z. Manejo integrado em defesa vegetal. In: ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado: doenças, pragas e plantas daninhas**. Viçosa: UFV, 2000. p.1-79.

CONCEIÇÃO, M. Z. **A defesa vegetal no Brasil**. Brasília, DF: ABEAS; Viçosa: UFV, 2005. 58 p.

UNITED NATIONS. **Division for sustainable development**. Disponível em: <<http://www.un.org/esa/sustdev>>. Acesso em: 14 out. 2005.

ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado: doenças, pragas e plantas daninhas**. Viçosa: UFV, 2000. 416 p.

Regulamentação e Avaliação Toxicológica de Produtos de Baixa Toxicidade

Luiz Cláudio Meirelles
Maria Ionária de Oliveira Santos

Introdução

Os produtos de baixa toxicidade, notadamente os de natureza biológica empregados no controle de pragas e doenças na agricultura, vêm, nos últimos dez anos, ocupando significativo espaço entre os agrotóxicos autorizados para uso agrícola.

Esse fomento em pesquisas, abrangendo maior diversidade de produtos, bem como a necessidade de atualização do marco regulador, pode ser verificado no número das solicitações de registro e no aumento de produtos registrados, atualmente, no País.

Algumas das razões para a mudança desse cenário são os custos para desenvolvimento e pesquisa de substâncias químicas com toxicidade relevante e as dificuldades de monitoramento dos impactos na água, no solo, nos alimentos e na saúde humana associados ao uso desses produtos químicos.

Nesse contexto, o setor de saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desenvolveu estratégias e instrumentos para o entendimento dos mecanismos de avaliação toxicológica de produtos biológicos utilizados no Brasil, traduzindo-os em decisões reguladoras que permitissem o desenvolvimento dessa área.

Assim, no texto a seguir, são apresentados os aspectos legais, as estratégias e os resultados da atuação da ANVISA nesse setor, na seguinte seqüência: (1) a importância da avaliação toxicológica e do controle dos agrotóxicos; (2) o marco regulador dos agrotóxicos e dos produtos de baixa toxicidade; (3) os procedimentos para a avaliação toxicológica dos produtos agrotóxicos e produtos de baixa toxicidade.

Importância da Avaliação Toxicológica e do Controle dos Agrotóxicos

No Brasil, como em outros países, a existência de agências especializadas em vigilância sanitária deve-se à necessidade de as sociedades contemporâneas controlar e garantir a qualidade sanitária de produtos e serviços oferecidos à população, de forma a evitar agravos à saúde e à contaminação ambiental.

Há várias décadas, vem-se observando significativo incremento na geração de novas tecnologias e do crescimento da indústria, numa difusão crescente de novas substâncias químicas. Essas substâncias podem trazer problemas para a população se não corresponderem ao resultado esperado ou, ainda, se provocarem efeitos adversos, considerando suas funções e situações de uso. É preciso assegurar que, além de possuírem a eficácia desejada, essas substâncias químicas não gerem problemas de saúde para a população ou para o meio ambiente.

Nem todas as substâncias químicas industrializadas são controladas ou têm efeitos sobre a saúde e sobre o meio ambiente se pesquisados cientificamente. Em tese, a produção de qualquer substância química deveria ser autorizada por um órgão regulador, mas existem exceções como, por exemplo: tintas, metais pesados e produtos químicos de uso industrial que podem não estar sujeitos à regulamentações específicas, tais como as existentes para os agrotóxicos. Desse modo, esses produtos são analisados apenas a partir de problemas já existentes e não por medida preventiva sistemática.

Nos últimos dois anos, dobrou-se o volume de agrotóxicos consumido no Brasil. Contudo, os serviços de saúde e os serviços sanitários responsáveis pelo controle dos agrotóxicos na fase de pós-registro não cresceram de modo proporcional à produção e ao consumo, de modo a desenvolver ações e estratégias de controle eficientes para a produção total e comercialização de agrotóxicos. Os dados foram de aproximadamente 500 mil toneladas no ano de 2004, alcançando a cifra de US\$ 4,5 bilhões, cerca de 10,8 bilhões de reais.

A ANVISA tem como missão institucional *“Proteger e promover a saúde da população, garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção de seu acesso”* e como valores fundamentais para alcance dessa missão o conhecimento técnico e científico, a transparência de suas ações e a cooperação técnica entre todos os atores sociais envolvidos com a temática.

A Agência tem ainda ampliado o controle na fase da produção e no pós-registro dos agrotóxicos, atendendo à legislação em vigor e apoiando a estruturação dos serviços de vigilância sanitária de estados e municípios, de forma a cumprir seu papel de prevenir e controlar os impactos associados ao volume crescente de agrotóxicos comercializados no Brasil.

A articulação intragovernamental constitui importante fator para o êxito da missão da ANVISA. Os procedimentos prescritos na Lei de Agrotóxicos requerem a integração entre o Ministério da Saúde (MS); o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Ministério do Meio Ambiente (MMA), cada um discutindo diferentes aspectos, dentro de suas respectivas áreas de conhecimento e competências.

A Gerência Geral de Toxicologia (GGTOX) é responsável pelo desenvolvimento, planejamento e orientação do Sistema Nacional de Vigilância Toxicológica, com objetivo de **regulamentar, analisar, controlar e fiscalizar** produtos e serviços que envolvam risco à saúde, notadamente, agrotóxicos, componentes e afins e outras substâncias químicas, agentes ou substâncias de interesse toxicológico.

Marco Regulador de Agrotóxicos e dos Produtos de Baixa Toxicidade

No Brasil, a história jurídica dos produtos agrotóxicos e afins teve início nos anos 30, com Decreto-Lei de 1934 (BRASIL, 1934), legado jurídico tecnicamente primoroso para a época, porém, em sentido amplo, pouco efetivo, visto não existir, então, a grande maioria dos agrotóxicos hoje conhecidos e amplamente utilizados. Dentro desses preceitos e no contexto geral, a toxicologia dessas substâncias era pouco relevante para os que produziam, comercializavam e consumiam esses produtos.

Nos anos 80, com o problema do ajuste estrutural, representado pelas reformas direcionadas para o mercado e o ajuste fiscal e, nos anos 90, com a reforma do Estado com foco na reforma administrativa, o Estado brasileiro passou a ser pensado como parte de um mundo globalizado. Dessa forma, o Brasil foi incluído no contexto da regulação dos agrotóxicos, componentes e afins.

Dos anos 90 até os dias atuais, o processo de regulação tem permitido vislumbrar novos rumos para desenvolvimento do País. Para a saúde, esse crescimento tem-se mostrado eficaz com a criação de uma agência reguladora no campo da vigilância sanitária. Por exemplo, os regulamentos existentes tais como a Portaria Nº 03/1992 (BRASIL, 1992) não tratavam da especificidade dos produtos de baixa toxicidade, dessa forma, novos mecanismos foram criados, tais como as regulamentações específicas para microbiológicos e semioquímicos, as Resoluções Diretoria Colegiada (RDCs) Nº 194 e 195 de 2002 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002a, 2002b), com foco na especificidade de produtos desta natureza, objetivando diferenciá-los e priorizá-los no contexto dos agrotóxicos e afins. Tais resoluções mais recentemente foram publicadas como as Instruções Normativas Conjuntas Nºs 01 e 03 de 2006 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002a, 2002b), contemplando, além do aspecto referente à avaliação da ANVISA, as questões relativas às avaliações do IBAMA e do MAPA.

De maneira geral, os parâmetros legais, relativos à avaliação toxicológica, foram orientados para análise toxicológica de substâncias químicas de elevada toxicidade, a exemplo da Portaria Nº 03, de janeiro de 1992 (BRASIL, 1992) cuja ferramenta legal não possibilitava a avaliação adequada de produtos biológicos ou produtos de baixa toxicidade.

Nos dias atuais, a ANVISA, em articulação com outros órgãos que participam do registro de agrotóxicos, Ministério do Meio Ambiente e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, bem como a comunidade científica, tem buscado instituir mecanismos para que produtos de baixa toxicidade sejam avaliados de acordo com a sua especificidade. Esses produtos, mesmo antes da finalização do Decreto Nº 4.074 de 2002 (BRASIL, 2002), foram objeto de trabalho de grupos interinstitucionais que elaboraram vários regulamentos específicos.

Os resultados, entre outros, foram as Resoluções da ANVISA – RDCs Nºs 194 (regulamentação de microbiológicos) e 195 (regulamentação de semioquímicos), ambas publicadas em 11 de julho de 2002, posteriores ao Decreto 4.074/2002 que traz no seu texto a criação de novos regulamentos, conceituando baixa toxicidade e priorizando os produtos enquadrados nessa categoria.

Posteriores a essas RDCs, foram recentemente publicadas Instruções Normativas Conjuntas, trabalhadas e elaboradas pelos órgãos responsáveis pelo registro, cuja finalidade é avaliar os produtos de baixa toxicidade. A IN Conjunta Nº 03/06, de 10 de março de 2006 (BRASIL, 2006b), que regula a avaliação de produtos microbiológicos, tem como objetivo no seu aspecto toxicológico, avaliar efeitos adversos do produto técnico e/ou formulado sobre mamíferos, considerando os principais tópicos:

- Patogenicidade do agente microbiológico de controle e de contaminantes microbianos.
- Infectividade/persistência do agente microbiológico de controle e de contaminantes microbianos.

- Toxicidade do agente microbiológico de controle, de contaminantes microbianos e de seus subprodutos. Ressaltam-se ainda, os seguintes pontos:
 - Definições.
 - Obrigatoriedade do Registro Especial temporário – RET.
 - Especificações de documentos de acordo com o Decreto 4.074/2002.
 - Identificação do produto.
 - Informações do processo de fabricação.
 - Avaliação toxicológica e da patogenicidade, realizada em três fases, é configurada da seguinte maneira:

Fase I – consiste em uma bateria de testes de curta duração em que o organismo-teste (mamífero) recebe dose máxima única do agente microbiológico de controle, visando obter a máxima chance de o agente de controle causar toxicidade, infectividade e patogenicidade. Se nenhum efeito adverso for observado nessa fase, não há necessidade de se realizar nenhum dos testes da Fase II e Fase III.

Fase II – Regulamentação e Avaliação Toxicológica de Produtos de Baixa Toxicidade foi elaborada para avaliar uma situação particular, quando for observada toxicidade ou infectividade na Fase I, sem evidências de patogenicidade. Se for observada a patogenicidade na Fase I, devem ser realizados os estudos da Fase III.

Nas fases II e III, estudos adicionais para avaliar efeito de toxicidade de preparações do agente microbiológico de controle deverão ser realizados de acordo com protocolos apropriados.

Na Instrução Normativa Nº 01, de 23 de janeiro 2006 (BRASIL, 2006a), que trata da avaliação de produtos semioquímicos, são destacados outros pontos:

- Apresentação do Registro Especial Temporário.

- Isenção da apresentação dos testes toxicológicos para os produtos utilizados em programas de monitoramento populacional.
- Avaliação, em fases distintas, efetuada da seguinte maneira:
 - Sempre que um ou mais testes da Fase I tiverem seus resultados enquadrados na Classe I, em termos de potencial de toxicidade ou resultado positivo para o teste de mutagenicidade, o produto deverá ser submetido à Fase II.
 - Sempre que os testes de mutagenicidade realizados na Fase II ou de Resposta de Imunidade Celular forem positivos ou indicarem grande comprometimento imunocelular, respectivamente, o produto deverá ser submetido à Fase III.

Procedimentos para Avaliação Toxicológica de Produtos Agrotóxicos e Afins

A GGTOX é responsável pela avaliação toxicológica de produtos agrotóxicos, componentes e afins destinados ao uso agrícola, domissanitário, campanhas de saúde pública, preservantes de madeira, uso em florestas plantadas, ambientes hídricos, áreas industriais, ferrovias, rodovias, linhas de transmissão e outros ecossistemas. Responde também pela avaliação de outras substâncias químicas de interesse toxicológico, tais como: solventes, metais pesados, fibras (por exemplo, asbestos), ftalatos e toxinas, entre outros.

Em março de 2006, a GGTOX controlava 440 ingredientes ativos (substâncias químicas) de produtos técnicos de agrotóxicos já registrados. Atualmente, possuem registro 700 produtos técnicos, 1100 produtos formulados e 1500 componentes desses produtos registrados.

A GGTOX tem um serviço estruturado em três gerências – a de avaliação toxicológica, responsável por processos de registro; a de normatização,

responsável pela elaboração de propostas relativas a regulamentações e reavaliações de registros; e a de avaliação de riscos, responsável pelos ensaios de resíduos e de controle de resíduos de agrotóxicos nos alimentos in natura.

Por meio de suas gerências, a GGTOX concretiza as competências estabelecidas de forma sistemática e articulada, contribuindo para a orientação, planejamento e coordenação do Sistema Nacional de Vigilância Toxicológica. Para efetivar sua missão, prossegue em seu desenvolvimento, buscando alinhamento internacional, propondo e elaborando regulamentos, capacitando quadros técnicos e ampliando seu sistema de prevenção e controle.

Para que se efetive uma avaliação toxicológica de um agrotóxico ou afim, é necessário obedecer a determinados critérios preconizados mundialmente. A apresentação de testes toxicológicos com animais é um dos recursos utilizados, estes são pautados em metodologias recomendadas pela comunidade científica.

A avaliação toxicológica dos agrotóxicos realizada na ANVISA/GGTOX tem como fundamentos:

- A análise dos estudos em curto e longo prazos considerando-se metodologias padronizadas internacionalmente. Essa análise tem como principais resultados, a classificação toxicológica do produto, a prescrição de medidas de proteção e segurança e a determinação de limites máximos de resíduos nos alimentos.
- A análise das características intrínsecas do ingrediente ativo, bem como das impurezas do processo de síntese e metabólitos de degradação do produto.

Dentre os procedimentos de análise toxicológica, destacam-se as modalidades abaixo, de acordo com a finalidade de uso dos produtos:

- Produtos Técnicos – os produtos técnicos são compostos de ingrediente ativo, impureza e componentes adicionais. Não podem ser comercializados nessa forma e são utilizados na preparação de pré-misturas e produtos formulados.

- Registro de Componentes – são matérias-primas, ingredientes inertes e aditivos utilizados na preparação de produtos técnicos e na formulação dos agrotóxicos.
- Registro de Pré-misturas – são intermediários entre o produto técnico e o produto formulado, com a finalidade de proporcionar estabilidade ou facilitar o transporte dos produtos técnicos.
- Registro de Produtos Formulados – são os produtos comercializados e utilizados na agricultura.
- Registro de Agrotóxicos por Equivalência – registro concedido a um produto técnico com base na equivalência de outro produto técnico já registrado, anteriormente, no Brasil.
- Registro de Agrotóxicos para Exportação – concedido para produtos que não serão utilizados no País.
- Registro Especial Temporário – concedido em caráter temporário, para pesquisa e experimentação de novos produtos ou novas finalidades de uso.
- Inclusão de Culturas – avaliação para inclusão de novos usos de agrotóxicos já registrados.
- Inclusão de Uso Domissanitário – avaliação para autorização de uso em ambiente domissanitário.
- Registro de Produtos de Baixa Toxicidade – esse tipo de pedido é tratado como prioridade, considerando os benefícios à saúde e ao meio ambiente.

Nos processos de registro, todos os estudos e informações toxicológicas são exigidos com base nas metodologias adotadas para estudos laboratoriais padronizadas internacionalmente, em particular, pela Organização Mundial de Saúde (ONU/OMS), Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), United States Environmental Protection Agency (USEPA) e Food and Agriculture Organization (ONU/FAO).

Outro aspecto importante para avaliação toxicológica tem sido a disponibilidade de bases de dados bibliográficas muito mais completas, permitindo que os analistas possam comparar as informações agregadas aos processos, com a informação disponível em diversas bases de dados sobre toxicologia de substâncias químicas. Além dessas bases de dados, hoje assinadas pela ANVISA, dispõe-se ainda de uma biblioteca virtual de toxicologia em cooperação com a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) para atender não só à GGTOX, mas a todo o público interessado em toxicologia.

No caso de ingredientes ativos nunca utilizados anteriormente no mundo, isto é, moléculas novas para as quais, ainda, não existe diversidade em termos do conhecimento científico e/ou epidemiológico, a avaliação estará necessariamente restrita à interpretação de resultados de ensaios laboratoriais. Consideram-se então, apenas esses resultados para avaliação das possibilidades de ocorrências de efeitos agudos ou crônicos sobre a saúde.

Hoje, é possível diferenciar dois momentos importantes da análise toxicológica dos produtos agrotóxicos e afins:

- Avaliação dos agrotóxicos em geral, com apresentação dos testes agudos e crônicos para todos os agrotóxicos, como critério básico.
- Avaliação de produtos de baixa toxicidade, com apresentação dos testes toxicológicos em fases, de acordo com a especificidade.

A análise toxicológica dos agrotóxicos exige conhecimentos sobre os efeitos tóxicos, agudos e crônicos (ingredientes ativos e/ou produtos técnicos), tendo em vista a possível toxicidade das substâncias químicas sintéticas.

Em um segundo momento, os procedimentos de análise são diferenciados, tendo em vista que os produtos de baixa toxicidade podem apresentar algum risco. Assim, a análise é realizada em fases.

Todos os dados físico-químicos, agronômicos, toxicológicos, entre outros, exigidos e apresentados para avaliação toxicológica, são importantes, e o detalhamento de cada informação é singular a cada produto. Dessa maneira,

visualizando apenas o contexto da apresentação dos estudos toxicológicos, pode-se ilustrar a exigência dos testes toxicológicos de duas formas:

a) Para os agrotóxicos em geral

Estudos agudos	Notas
DL 50 Oral DL50 Dérmica CL50 Inalatória	Apresentação obrigatória para produtos técnicos e produtos formulados. A partir desses testes, pode-se inferir a classificação toxicológica.
Estudos de Irritação	
Irritação dérmica Irritação ocular Sensibilização cutânea	
Estudos de toxicidade em curto prazo/ Toxicidade subcrônica	Notas
Dérmica subaguda em 21 dias	Apresentação quando houver risco de exposição humana não intencional por meio de contatos dérmicos repetidos
Toxicidade em curto prazo para uma espécie roedora e para uma espécie não roedora	Apresentação obrigatória para produtos técnicos e/ou ingredientes ativos.
Estudos de toxicidade em longo prazo/ Toxicidade crônica	Notas
Toxicidade em longo prazo com duas espécies com verificação de possíveis efeitos carcinogênicos	Apresentação obrigatória para produtos técnicos e/ou ingredientes ativos. A necessidade da apresentação dos testes de longo prazo em duas espécies tem como objetivo principal atestar os efeitos carcinogênicos da substância testada.
Reprodução e prole com uma espécie	Apresentação obrigatória para produtos técnicos e/ou ingredientes ativos.
Teratogênese	
Mutagênese	O teste de mutagênese não é um teste de longo prazo, porém, é muito importante no contexto da avaliação tanto de longo como de curto prazo. É exigido para produtos técnicos e produtos formulados.
Neurotoxicidade retardada	Exigidos para produtos técnicos e/ou ingredientes ativos, quando necessário.

b) Para os agrotóxicos de baixa toxicidade ou produtos de natureza biológica

A avaliação dos produtos de baixa toxicidade é realizada com base no entendimento de que, quanto menor a toxicidade de produtos usados no controle de pragas e doenças, maior será a segurança da população e do meio ambiente. Considerando a possível baixa toxicidade desses produtos, o escopo da análise toxicológica divide-se em três fases (I, II e III) e objetiva exigir o que é realmente necessário para comprovar a toxicidade desses produtos diferenciados. Dessa forma e de maneira geral, sempre que determinado produto, testado na fase I, e cujos resultados, em termos de potencial de toxicidade ou positividade para mutagenicidade (infetividade e patogenicidade ou outros a depender do produto a ser testado), enquadrarem-no na Classe I, este será submetido à fase II, se não, os testes a serem apresentados serão apenas aqueles exigidos da Fase I, e os testes da Fase II e III serão desnecessários. Para efeitos de demonstração, exemplificamos a seguir os testes toxicológicos requeridos para produtos semioquímicos:

Fase I

Estudos agudos	Notas
DL 50 Oral DL50 Dérmica CL50 Inalatória Irritação dérmica Irritação ocular Sensibilização cutânea	A apresentação dos testes é obrigatória para produtos técnicos e formulados e condicionalmente requeridos para feromônios de cadeia aberta cujo potencial seja comprovadamente conhecido.

Fase II

Estudo	Notas
Mutagênese (células de mamíferos)	A apresentação dos testes é obrigatória para produtos técnicos e formulados

Continua ...

Estudo	Notas
Subcrônico oral	A apresentação dos testes é obrigatória para produtos técnicos
Subcrônico dermal	
Subcrônico inalatório	
Resposta de imunidade celular	
Teratogenicidade	

Fase III

Estudo	Notas
Teste de toxicidade crônica /Carcinogenicidade	A apresentação dos testes é obrigatória para produtos técnicos

As classes toxicológicas para agrotóxicos e afins estão relacionadas no Anexo III da Portaria Nº 03, de 16 de janeiro de 1992 (BRASIL, 1992) e são divididas em quatro níveis, Classe I (Extremamente Tóxico), II (Altamente Tóxico), Classe III (Medianamente Tóxico) e IV (Pouco Tóxico), existe ainda uma cor para cada faixa, como forma de identificar o perigo oferecido. Os resultados da avaliação toxicológica dos estudos agudos, estudos de irritação, condições de exposição e formas de aplicação permitem classificar o produto em um dos quatro níveis preestabelecidos. Essa classificação está orientada para produtos mais tóxicos que, quando utilizados de acordo com especificação admitida pelos órgãos responsáveis pelo registro, oferecem maior segurança.

Para alguns produtos de baixa toxicidade, a identificação do perigo mediante a utilização de faixa, designando a classe toxicológica ao qual pertence, além do uso de pictogramas tais como caveira/tíbias entre outros símbolos, também são entendidos como inadequados.

Desse modo, hoje são trabalhados novos parâmetros, mais especificamente novos regulamentos, para enquadrar melhor os produtos

considerados de baixa toxicidade. No que é pertinente à classificação toxicológica dos produtos de baixa toxicidade, somente os semioquímicos, a exemplo, os feromônios possuem parâmetro de classificação diferenciados.

Os produtos podem ser identificados, porque trazem no seu rótulo e nas instruções de bula a frase “*produto de baixa exposição para uso restrito em armadilhas*” e são autorizados, quando indicados para utilização em armadilhas, com a finalidade de monitoramento populacional.

Os parâmetros usados para a classificação toxicológica da grande maioria dos agrotóxicos são apresentados de acordo com a Tabela 1.

Para permitir publicidade ao resultado das avaliações toxicológicas, a ANVISA estabelece uma monografia técnica do ingrediente ativo. Essa monografia contém obrigatoriamente:

- Nome técnico ou comum.
- Sinonímia.
- Nomes químicos.
- Fórmula bruta e estrutural.
- Classe (classe de uso).
- Classificação toxicológica e;
- Modalidade de emprego (para uso agrícola ou domissanitário).

Considerando as especificações gerais da monografia, entende-se que os parâmetros descritos na legislação em vigor para estabelecê-la, nos casos de produtos de natureza biológica e outros de baixa toxicidade, não poderão ser similares e devem seguir sua especificidade. Como exemplo, pode ser citada a monografia do microrganismo *Bacillus sphaericus* cujo escopo agrega informações somente para esse tipo de agente de controle as quais estão de acordo com a modalidade de emprego autorizada.

Tabela 1. Classificação toxicológica vigente no Brasil para os agrotóxicos e afins, de acordo com a Portaria Nº 03/1992.

Classificação	DL ₅₀ Oral (mg/Kg)		DL ₅₀ Dermal (mg/Kg)		CL ₅₀ Inalatória (mg/L/h)	Irritação Dérmica	Irritação Ocular
	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido			
Classe I Extremamente Tóxico 	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40	≤ 0,2	Ulceração ou corrosão na pele	Opacidade da córnea reversível ou não dentro de sete dias ou irritação persistente nas mucosas oculares
Classe II Altamente Tóxico 	> 5 ≤ 50	> 20 ≤ 200	> 10 ≤ 100	> 40 ≤ 400	> 0,2 ≤ 2,0	Irritação severa, Draize-Cools ≥ 5	Sem opacidade da córnea; irritação da mucosa ocular reversível em sete dias.
Classe III Medianamente Tóxico 	> 50 ≤ 500	> 200 ≤ 2000	> 100 ≤ 1000	> 400 ≤ 4000	> 2 ≤ 20	Irritação moderada, Draize-Cools ≥ 3 < 5	Sem opacidade da córnea; irritação da mucosa ocular reversível em 72 h.
Classe IV Pouco Tóxico 	> 500	> 2000	> 1000	> 4000	> 20	Irritação leve, Draize-Cools < 3	Sem opacidade da córnea; irritação da mucosa ocular reversível em 24 h.

Obs. A cor da tarja, apresentada na tabela, encontra-se na rotulagem dos produtos e representa sua classificação toxicológica.

Considerações Finais

No Brasil, o processo de análise de agrotóxicos visa à prevenção na qual se avalia o potencial de perigo com base em evidências laboratoriais e são exigidos, nos processos de registro, estudos e informações toxicológicas prescritos nas metodologias adotadas para estudos laboratoriais padronizadas internacionalmente, em particular pela ONU/OMS – Organização Mundial de Saúde, OECD – Organization for Economic Co-operation and Development, EPA/USA e ONU/FAO – Food and Agriculture Organization. Conforme abordado, no caso de produtos de baixa toxicidade, tem-se buscado o alinhamento com protocolos e procedimentos internacionais adequando essas exigências às características toxicológicas dessas substâncias.

Nos últimos anos, o marco regulador nacional vem acompanhando a tendência de maiores restrições a substâncias químicas perigosas à saúde e evoluindo de forma significativa, o que permitiu o incremento à pesquisa e ao registro de produtos de baixa toxicidade. O exemplo principal dessa questão é a priorização estabelecida no Decreto Nº 4.074/2002 para avaliação diferenciada dessa categoria de produtos, acompanhada de significativo aumento no número de monografias técnicas publicadas pela ANVISA.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução-RDC nº 194, de 8 de julho de 2002. Regulamentação de Produtos Microbiológicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 jul, 2002a. Seção 1, p. 228-229.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução-RDC nº 195, de 8 de julho de 2002. Regulamentação de Produtos Microbiológicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 jul, 2002b. Seção 1, p. 229-230.

BRASIL. Decreto nº 24.114, de 12 de abril de 1934. **Aprova o regulamento de defesa sanitária vegetal**. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/D24114.htm>. Acesso em: 14 dez. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Departamento Técnico-Normativo. Diretrizes e exigências referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins. Portaria nº 03 de 16 jan. 1992. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 fev. 1992.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 8 jan. 2002. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm>. Acesso em: 14 dez. 2005.

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta nº 01, de 23 de janeiro de 2006. Estabelece procedimentos para obtenção de registro de produtos semioquímicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 jan. 2006a. p. 7-8.

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta nº 03, de 10 de março de 2006. Estabelece procedimentos a serem adotados para efeito de registro de agentes microbiológicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 mar. 2006b. p. 23-25.

Avaliação Ambiental de Produtos Biológicos

Maria Luiza Marcico Publio de Castro
Eduardo Cyrino Oliveira-Filho

Introdução

O Decreto nº 4.074/02 (BRASIL, 2002) que regulamenta a Lei de Agrotóxicos e Afins nº 7.802/89 (BRASIL, 1989) cita como uma das competências do Ministério do Meio Ambiente a realização da avaliação ambiental, dos agrotóxicos, seus componentes e afins, estabelecendo sua classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental. Nesse contexto, a Lei nº 7.802/89 enquadra como agrotóxicos e afins os produtos de natureza biológica, tais como: semioquímicos, fungos, vírus, bactérias, predadores, parasitóides e alguns nematóides, já que não é a origem do produto que o classifica, mas a finalidade para a qual ele se destina, ou seja, controlar seres vivos considerados nocivos.

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), como representante do Ministério do Meio Ambiente, executa a avaliação ambiental de todos os produtos regidos pela Lei nº 7.802/89 observando os parâmetros físico-químicos e de estudos ecotoxicológicos e toxicológicos.

Devido às características próprias apresentadas por tipo de produto biológico específico, a avaliação ambiental é feita caso a caso pelo IBAMA. Os instrumentos jurídicos necessários para a realização da avaliação ambiental de

um produto são a Lei nº 7.802/89, o Decreto nº 4074/02 e regulamentações específicas para cada tipo de produto. Os interessados em registrar produtos semioquímicos deverão seguir as exigências especificadas na Instrução Normativa Conjunta nº 01/06 (BRASIL, 2006a). Para o registro de agentes biológicos de controle, tais como: parasitóides, predadores e nematóides deverão ser seguidas as exigências da Instrução Normativa Conjunta nº 02/06 (BRASIL, 2006b). No caso do registro de produtos microbiológicos, a nova regulamentação conjunta definitiva ainda não foi publicada e, portanto, o interessado deve solicitar informações aos órgãos responsáveis pelo registro sobre os procedimentos necessários.

Como já foi dito anteriormente, a avaliação ambiental para esses produtos não segue um padrão preestabelecido, como acontece com os agrotóxicos convencionais, pois os produtos biológicos apresentam peculiaridades que os colocam em uma situação individualizada e, muitas vezes, inéditas para o avaliador. Desse modo, ressalta-se a importância do oferecimento do máximo de informações disponíveis, mesmo que não seja sobre a forma de ensaios realizados já que muitas vezes o conhecimento da literatura científica pode oferecer material para uma possível tomada de decisão.

Dados Físico-Químicos

Na fase inicial da avaliação, o IBAMA necessita de dados que caracterizem o produto que será aplicado à cultura e, para tanto, solicita alguns dados físico-químicos. Alguns exemplos de testes e informações solicitados são detalhados abaixo:

Estado físico, aspecto, cor e odor – A metodologia não requer equipamento especial, além das habilidades do técnico executante. Devem ser verificadas as condições favoráveis de iluminação e ventilação do ambiente. Deve-se verificar, também, o odor desde que haja segurança e conhecimento de que a substância

não apresenta toxicidade por inalação. Aconselha-se associar a descrição do produto com substâncias notoriamente conhecidas. A finalidade desse parâmetro é controlar a fiscalização e o reconhecimento primário de um produto. Não se exige teste para esses parâmetros, apenas a informação do interessado no registro.

Grau de pureza – efetuado por meio de técnicas analíticas ligadas à identificação molecular, capazes de caracterizar e quantificar a amostra. Verifica a necessidade de que sejam aprofundadas as abordagens dos testes, direcionando-os para identificação de impurezas significativas, dentro do limite de detecção preestabelecido (menor do que os valores de concentrações apresentados).

pH - o valor do pH pode auxiliar a avaliação da adequação do método de desativação proposto (neutralização, saponificação), bem como a avaliação de parâmetros com potenciais de corrosão e irritabilidade. Para irritação ocular, por exemplo, caso o valor do pH seja ≤ 2 , não é necessária realização de testes.

Densidade – esse parâmetro é utilizado para estimar a distribuição da substância ou formulação dentro e entre os compartimentos ambientais: água, solo e ar.

Distribuição de partículas por tamanho – partículas menores que $5\mu\text{m}$ atingem os alvéolos. Partículas com tamanho entre 10 e $50\mu\text{m}$ permanecem na região nasal.

Corrosividade – exigida principalmente para avaliar os efeitos da formulação do produto sobre os aplicadores e sobre a embalagem na qual ele será armazenado.

Estabilidade térmica e ao ar – tem como objetivo determinar a estabilidade do produto formulado em variações de tempo e temperatura.

Solubilidade – substâncias muito solúveis têm baixa absorção nos solos e são rapidamente transportadas desde a fonte até os corpos de água. A temperatura e o

pH influem na solubilidade. Substâncias mais solúveis, em geral, são menos voláteis e mais facilmente biodegradadas. Substâncias pouco solúveis, dependendo da densidade, precipitam para os sedimentos ou base dos aquíferos ou flutuam na superfície dos corpos hídricos.

Volatilidade – é a medida da tendência para evaporar ou deixar o estado líquido. É um tópico de grande importância em vários aspectos, tanto relacionados à exposição dos usuários quanto ao armazenamento dos produtos.

Feita a caracterização do produto, mediante determinação dos parâmetros apresentados, devem ser realizados ensaios e provas biológicas envolvendo estudos toxicológicos (incluindo ecotoxicidade) com o produto.

Dados Biológicos

A ecotoxicologia é uma extensão natural da toxicologia e tem como objetivo estudar o destino e os efeitos das substâncias químicas sobre um ecossistema, utilizando-se de métodos de laboratório e de campo (KENDALL et al., 1996). Deve-se ressaltar que, diferentemente da toxicologia ambiental, a ecotoxicologia não tem como objetivo determinar os efeitos sobre a espécie humana, contudo, animais mamíferos também são testados com a finalidade, sobretudo, de preservar espécies silvestres. Visa-se com essa avaliação estimar qual seria a exposição máxima segura para os seres vivos não-alvo do agente. Essa estimativa é complexa, mas se baseia em um processo de avaliação de risco que irá subsidiar a tomada de decisão dos órgãos reguladores.

Os estudos toxicológicos com mamíferos, solicitados para a avaliação da segurança de um produto, envolvem a determinação da toxicidade aguda, subcrônica e crônica.

Nos estudos de toxicidade aguda, frequentemente, determina-se uma dose letal média (DL_{50}) ou uma concentração letal média (CL_{50}), para os casos de

inalação, absorção dérmica ou ambiente aquático. Esses estudos são realizados para verificação da letalidade nas 24 horas subseqüentes à exposição ao produto a ser testado e no acompanhamento dos sobreviventes por no máximo 96 horas. Nos casos de testes com mamíferos, esse acompanhamento pode durar até 14 dias. Recomenda-se que a exposição ocorra por duas vias, sendo uma delas, uma potencial via de exposição humana.

Segundo Eaton e Klaassen (1996), os estudos subcrônicos têm como finalidade estabelecer doses e observar sinais indicativos de um possível efeito crônico e definir doses para a execução desse efeito. A exposição pode ocorrer em diferentes períodos de tempo, mas a duração mais comum é de 90 dias. Em geral, esses estudos são realizados com duas espécies, normalmente, rato e cachorro.

Os estudos relativos à toxicidade crônica ocorrem durante boa parte da vida do animal. Durante esses ensaios, os animais devem ser observados clinicamente e também são realizadas determinações bioquímicas no sangue e na urina, bem como exames hematológicos e provas funcionais, em todos os animais, em intervalos de três a seis meses. Ao final dos testes, faz-se a necropsia em todos os animais, incluindo histologia dos órgãos para identificar anormalidades e doenças que podem ser produzidas pelos agentes, além da observação das condições de exposição e das doses/concentrações capazes de produzir formas específicas de doenças ou danos.

Alguns ensaios crônicos têm a finalidade de detectar efeitos específicos, tais como:

Reprodução e prole – a proposta desse ensaio, em duas gerações, é fornecer informações acerca dos efeitos adversos de uma substância ou microrganismo sobre a integridade e o desempenho dos sistemas reprodutivos masculino e feminino.

Teratogenicidade – a finalidade desse ensaio é avaliar os efeitos da exposição da fêmea gestante sobre o desenvolvimento embrionário, incluindo morte, anomalias estruturais e retardo de crescimento.

Carcinogenicidade – o objetivo desse estudo de dois anos de duração é avaliar se a exposição à substância-teste ou ao agente biológico pode causar o desenvolvimento de lesões neoplásicas (câncer).

Entre os parâmetros fundamentalmente ecotoxicológicos, são avaliados os efeitos sobre organismos do solo, organismos aquáticos, aves e abelhas.

Em geral, são exigidos ensaios com organismos do solo, para produtos que serão incorporados nele; testes com organismos aquáticos, para produtos aplicados na água, ou que possam atingir ambientes aquáticos devido a sua aplicação; testes com aves para produtos granulados e testes com abelhas para produtos aplicados durante os horários de visitação desses insetos à cultura.

Os testes solicitados pelo IBAMA aos interessados no registro de produtos biológicos dependem de cada tipo de produto, bem como de seu modo de aplicação e formulação.

Tanto a regulamentação aplicada aos produtos semioquímicos, Instrução Normativa Conjunta nº 01/06 (BRASIL, 2006a) como àquela aplicada aos agentes microbiológicos, em vigor, Portaria IBAMA nº 167 131/97 (IBAMA, 1997), propõem a análise dos produtos em três fases distintas para apresentação de testes. Fase I consiste em uma bateria de testes de curta duração. Caso nenhum efeito adverso seja observado nessa primeira fase, não há necessidade da realização dos demais testes das Fases II e III. Fase II avalia uma situação particular, quando são encontrados indícios de toxicidade ou efeitos adversos na Fase I. Quando forem observados danos nos estudos da fase II, devem ser realizados diretamente os estudos da Fase III. O sistema de fases foi elaborado para facilitar o registro e valorizar ainda mais os produtos considerados de baixa toxicidade e periculosidade.

Alguns exemplos de testes ecotoxicológicos solicitados pelo IBAMA:

Toxicidade aguda com algas, microcrustáceos e peixes de água doce – os testes de toxicidade com organismos de água doce têm como objetivo avaliar os possíveis impactos da substância ou do agente biológico sobre as comunidades presentes nesses ambientes. O teste com algas, em geral, avalia a inibição do crescimento de microalgas. As espécies *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*) e *Scenedesmus subspicatus* são as mais utilizadas. Entre os microcrustáceos, a pulga-da-água do gênero *Daphnia* é a mais utilizada. Esse teste avalia a inibição da mobilidade do organismo e dura de 24 a 48 horas. Os testes com peixes têm na letalidade seu principal desfecho. O ensaio dura de 48 a 96 horas, sendo *Danio rerio* (paulistinha) a espécie mais utilizada.

Toxicidade aguda contato/oral com abelhas – Esse teste foi desenvolvido visando à determinação da toxicidade aguda de substâncias ou microrganismos para abelhas, um inseto não-alvo considerado útil. A exposição às diferentes doses ou concentrações pode ser via oral ou pela exposição em ambiente fechado onde a substância tenha sido lançada na forma de aerossol. As abelhas são monitoradas por 48 horas, e a mortalidade é registrada ao final do ensaio.

Toxicidade com minhocas – as minhocas são organismos presentes no solo e, por isso, esse ensaio foi delineado para fornecer informações acerca da toxicidade aguda de substâncias químicas ou de agentes biológicos sobre organismos do solo durante o período de exposição. O ensaio dura de 14 a 28 dias e a espécie *Eisenia fetida* é a mais utilizada.

Toxicidade aguda oral com aves – Baseado no teste de toxicidade oral aguda, esse ensaio objetiva a determinação de efeitos agudos em aves. O grupo de aves mais utilizado é o das codornas. Os animais são dosados pela via oral e observados por aproximadamente duas horas para a detecção de sinais e sintomas da intoxicação, incluindo a letalidade.

Cabe ressaltar que o IBAMA dá preferência a testes realizados com espécies encontradas no Brasil, porém, são aceitos estudos com organismos reconhecidos internacionalmente como padrões de suscetibilidade.

A análise ambiental dos agentes biológicos de controle (inimigos naturais), tais como os parasitóides, predadores e nematóides, é bastante simplificada em relação aos produtos citados até o momento. Apesar de o registro desses produtos ocorrer também de conformidade com a Lei Nº 7.802/89 e com Decreto Nº 4.074/02, a regulamentação específica para esses produtos, Instrução Normativa Conjunta nº 02/06 (BRASIL, 2006b) não exige a realização de testes para análises de parâmetros físico-químicos e toxicológicos. Os dados solicitados para a análise desses produtos são essencialmente informações sobre a caracterização biológica dos organismos, dos possíveis riscos à saúde, quando de sua introdução nas áreas de controle como irritações, quadros alérgicos, informações de potenciais riscos ao meio ambiente como efeitos da introdução em organismos não-alvo, procedimentos em casos de contaminação, dados sobre eficiência e praticabilidade, além de informações do controle de qualidade das criações.

Considerações Finais

Provavelmente, o sistema de avaliação em três fases, já bastante empregado em países desenvolvidos, traga grande avanço na demanda pelo registro de produtos biológicos para controle de pragas agrícolas no Brasil. Esse sistema além de ser bem estruturado segue uma linha de raciocínio lógica e de bom-senso. Brevemente, deve estar sendo publicada a Instrução Normativa Conjunta para agentes microbiológicos de controle que, além de seguir basicamente esses mesmos preceitos, harmonizará as exigências advindas dos órgãos responsáveis pelo registro: MAPA, ANVISA e IBAMA.

Apesar de essa nova proposta de avaliação apresentar um modelo diferenciado daquele utilizado na Avaliação da Periculosidade Ambiental dos

agrotóxicos convencionais, o IBAMA exige, também, para os produtos biológicos, que todos os testes sejam realizados em laboratórios acreditados pelo Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO, de acordo com as Boas Práticas de Laboratório – BPL. Além disso, o IBAMA somente aceita testes provenientes de laboratórios estrangeiros se estiverem devidamente traduzidos e acompanhados de documento emitido pela autoridade de monitoramento em BPL do país onde foi conduzido o estudo.

Deve-se ressaltar que, devido às características próprias dos produtos biológicos discutidos neste capítulo, quaisquer testes e/ou informações que não sejam pertinentes devem ser tecnicamente justificados ao IBAMA que, após avaliação, poderá dispensá-lo.

Referências

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 jul. 1989. Seção 1, p. 11459-11460.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802/89. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 8 jan. 2002. Seção 1, p. 1-12.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta nº 01, de 23 de janeiro de 2006. Estabelece procedimentos para obtenção de registro de produtos semioquímicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 jan. 2006a. Seção 1, p. 7-8.

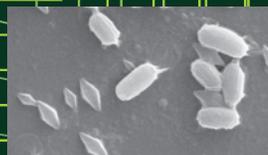
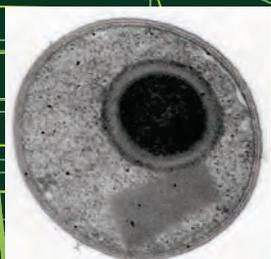
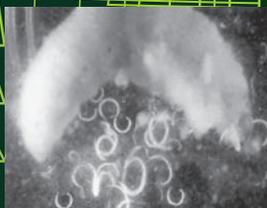
BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta nº 02, de 23 de janeiro de 2006. Estabelece procedimentos para obtenção de registro de agentes biológicos de controle. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 jan. 2006b. Seção 1, p. 4.

EATON, D. L.; KLAASSEN, C. D. Principles of toxicology. In: KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. O.; DOULL, J. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill, 1996. p.13-33.

IBAMA. Portaria Normativa nº 131, de 3 de novembro de 1997. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 nov. 1997. p. 24988-24991.

KENDALL, R. J.; BENS, C. M.; COBB III, G. P.; DICKERSON, R. L.; DIXON, K. R.; KLAINE, S. J.; LACHER JR., T. E.; LAPOINT, T. W.; McCURRY, S. T.; NOBLET, R.; SMITH, E. E. Aquatic and terrestrial ecotoxicology. In: KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. O.; DOULL, J. **Casarett and doull's toxicology: the basic science of poisons**. New York: MacGraw-Hill, 1996. p. 883-905.

Fundamentos para a Regulação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas



Editores Técnicos

Eduardo Cyrino Oliveira-Filho

Rose Gomes Monnerat