

AVALIAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE DE PRAGAS PARA REGISTRO COMO BIOPESTICIDAS

UMA PROPOSTA PARA OS ÓRGÃOS FEDERAIS REGISTRANTES

Informações sobre o produto e análise de resíduos

VOLUME I

***Deise M.F. Capalbo, Elizabeth A.B. De Nardo, Gilberto J. de Moraes,
Mário Cesar B. De Oliveira e Vera L.S.S. Castro***

Embrapa

Meio Ambiente

PROTÓTIPO

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura e do Abastecimento: Marcus Vinícius Pratini de Moraes

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Presidente: Alberto Duque Portugal

Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

Embrapa Meio Ambiente

Chefe Geral: Bernardo van Raij

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento: Deise M. Fontana Capalbo

Chefe Adjunto Administrativo: Vander Roberto Bisinoto



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio Ambiente
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

PROTOCOLO

AVALIAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE DE PRAGAS PARA REGISTRO COMO BIOPESTICIDAS

UMA PROPOSTA PARA OS ÓRGÃOS FEDERAIS REGISTRANTES

Informações sobre o Produto e Análise de Resíduos

VOLUME I

Deise M.F. Capalbo, Elizabeth A.B. De Nardo, Gilberto J. de Moraes,
Mário C.B. de Oliveira e Vera L.S.S. Castro

Jaguariúna, SP
1999

EMBRAPA MEIO AMBIENTE – Documentos 9.

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP-340 - km 127,5 - Bairro Tanquinho Velho

Caixa Postal 69 13820-000 - Jaguariúna, SP

Fone: (19) 867-8700 Fax: (19) 867-8740

e-mail:sac@cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicações: Aldemir Chaim, Célia M. M. de S. Silva, Franco Lucchini, Julio F. de Queiroz, Magda A. de Lima e Maria Cristina Tordin

Revisão: Denise Moraes de Oliveira.

Normalização: Maria Amélia de Toledo Leme

Produção Gráfica: Regina L.Siewert Rodrigues e Franco Ferreira de Moraes

Tiragem: 500 exemplares

CAPALBO, D. M. F.; DE NARDO, E. A. B.; MORAES, G. J.; OLIVEIRA, M. C. B.;
CASTRO, V.L.S.S. **Protocolo avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas. I. Informações sobre o produto e análise de resíduos.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 24p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 09).

CDD. 632.96

©EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 1999

PROTOCOLO
**AVALIAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE
DE PRAGAS PARA REGISTRO COMO BIOPESTICIDAS¹**

UMA PROPOSTA PARA OS ÓRGÃOS FEDERAIS REGISTRANTES

Informações sobre o Produto e Análise de Resíduos

VOLUME I

Deise M.F. Capalbo², Elizabeth A.B. De Nardo³, Gilberto J. de Moraes⁴,
Mário C.B. de Oliveira⁵ e Vera L.S.S. Castro⁶

¹ Documento elaborado e financiado através dos projetos 11.0.94.225 (Embrapa) e 620556/94-3 (CIAMB-PADCT/CNPq)

² Engenheira de Alimentos, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente. Caixa Postal 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP.

³ Bióloga, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente.

⁴ Engenheiro Agrônomo, Ph.D., ESALQ-USP/Depto. de Zoologia, CEP 13.418-900, Piracicaba, SP.

⁵ Engenheiro Agrônomo, IBAMA/Diretoria de Controle Ambiental - SAIN, Via L4 Norte, ED. Sede, Bloco C, CEP 70.800-200, BRASÍLIA, DF.

⁶ Veterinária, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente.

SUMÁRIO

Apresentação	07
Introdução	09
Informações Gerais	
Informações Básicas.....	10
Elaboração do relatório.....	10
Exigências Gerais.....	11
Conteúdo do Relatório Final	11
Informações sobre a Unidade Operacional.....	11
Informações sobre o Produto	
Identificação do Produto.....	13
Informações sobre outros Ingredientes Presentes.....	14
Informações sobre outros Ingredientes Ativos.....	14
Informações sobre o Processo de Produção.....	15
Propriedades Físico-Químicas	16
Outras Informações	16
Análise de Resíduos	
Natureza do Resíduo em Plantas.....	17
Natureza do Resíduo em Animais.....	18
Métodos de Análise de Resíduos - Orientações	19
Estabilidade do Resíduo durante Estocagem	20
Magnitude dos Resíduos em Plantas.....	20
Magnitude dos Resíduos em Animais.....	21
Comportamento do resíduos no Ambiente	22
Outras Informações.....	22
Dados exigidos para Culturas Alimentares e Não-Alimentares.....	22
Agradecimentos	23
Referências Bibliográficas	24

APRESENTAÇÃO

O Brasil é um país eminentemente agrícola. Esta afirmativa vem sendo feita há muitos anos, e ainda hoje é válida, apesar do significativo desenvolvimento nacional em outras atividades, especialmente no que se refere à industrialização. A importância da agricultura para o Brasil talvez se mantenha em altos níveis ainda por muito tempo, tendo em vista as características do país ou seja, um vasto território constituído por áreas agricultáveis que podem suprir as necessidades nacionais e ainda permitir a produção de um quantum extra que permita a arrecadação de divisas com a exportação.

Entretanto, para muitos a produção agrícola implica o uso de produtos químicos para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas, o que muitas vezes pode conduzir à poluição ambiental, reduzindo a qualidade de vida da população que vive próxima às áreas agrícolas e daqueles que consomem os alimentos ali produzidos. Um dos maiores desafios da agricultura moderna é permitir o aumento da produção agrícola sem o comprometimento da qualidade dos alimentos, de outros produtos agrícolas e da água, e sem reduzir a diversidade local de plantas, animais e microrganismos.

Um dos empreendimentos mais promissores neste sentido se refere à busca de alternativas às formas convencionais de controle de pragas, através do uso de produtos de ocorrência natural, elaborados com microrganismos patogênicos aos organismos indesejáveis, encontrados em áreas agrícolas. Eles são mais comumente fungos, bactérias e vírus e têm se mostrado seguros em relação a seus possíveis efeitos sobre o homem e outros organismos não-visados do ambiente. Seu uso pode resultar no controle satisfatório de organismos indesejáveis, sem que o ambiente seja afetado desfavoravelmente. Entretanto, não se deve esperar que apenas por serem de ocorrência natural, estes produtos sejam sempre totalmente inócuos a organismos não-alvo.

É sempre possível que um determinado microrganismo eficiente no controle de uma praga possa também afetar outros componentes biológicos do ecossistema. Como forma de defesa do ambiente e dos consumidores, compete aos órgãos públicos controlar o uso desses produtos, requerendo sua avaliação adequada previamente ao seu registro para uso comercial. Compete ainda, aos mesmos, estabelecer os critérios para a avaliação dos produtos, dentro de normas específicas compatíveis com os padrões internacionais que regulamentam o mesmo assunto. Essas normas devem levar em consideração as diferenças fundamentais entre produtos químicos e biológicos, no que se refere à composição, à forma de ação e ao comportamento no ambiente.

Com o objetivo de estabelecer os critérios de avaliação da segurança dos produtos biológicos, o Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (Embrapa Meio

Ambiente) iniciou uma parceria com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Diretoria de Controle e Fiscalização, no final de 1994, através do projeto de pesquisa "Análise de Risco e Impacto Ambiental do Uso de Agentes de Controle Biológico". Um dos principais objetivos daquele projeto foi o de resgatar os esforços anteriores de diferentes instituições nacionais, retomar suas colaborações e, em conjunto, concretizar uma proposta de avaliação de produtos biológicos para fins de registro junto aos órgãos federais competentes.

Como primeiro resultado deste esforço foi publicado em 1995 o documento "Requisitos para a análise de risco de produtos contendo agentes microbianos de controle de organismos nocivos — Uma proposta para os órgãos federais registrantes". Esse documento sugeriu detalhadamente as informações a serem exigidas pelos órgãos registrantes, de forma a permitir uma avaliação de sua segurança de uso. Também foi utilizado pelo Comitê de Sanidade Vegetal do Cone Sul (COSAVE) através do Grupo de Trabalho Permanente em Controle Biológico (GTP-CB), como modelo para harmonização da Regulamentação para Registro de Produtos Microbianos de Controle de Pragas entre os países do Cone Sul: Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, tendo sido este último implementado na região em janeiro de 1998.

O documento proposto foi adequado na forma de uma portaria publicada recentemente pelo IBAMA (Portaria 131, de 3 de Novembro de 1997), estabelecendo os critérios e procedimentos a serem adotados junto àquele Instituto para efeito de registro e avaliação ambiental de agentes microbianos empregados na defesa fitossanitária.

No momento, se faz necessário o estabelecimento de protocolos que sugiram de forma detalhada meios de se obter os dados requeridos na citada portaria.

Os protocolos foram elaborados com o objetivo de viabilizar o registro dos produtos contendo agentes microbianos de controle de pragas no Brasil e são compostos por quatro volumes, cada um correspondendo a uma avaliação específica, como segue:

- Informações sobre o produto e análise de resíduos
- Testes toxicopatológicos em mamíferos
- Testes toxicopatológicos em organismos aquáticos
- Testes toxicopatológicos em organismos não-alvos do ambiente terrestre

Espera-se que este documento seja adotado pelos órgãos federais registrantes, de maneira que seja promovido o interesse por esta forma alternativa de controle de organismos nocivos, reduzindo os impactos ambientais indesejáveis e melhorando a qualidade de vida dos agricultores e consumidores.

Gilberto de Moraes - ESALQ/USP
Elizabeth A.B. De Nardo - Embrapa Meio Ambiente

INTRODUÇÃO

O uso de microrganismos, seus produtos ou metabólitos para o controle de organismos indesejáveis na agricultura tem se tornado cada vez mais comum em diversos países. Esses produtos, na forma pura ou formulada, são normalmente conhecidos como biopesticidas.

A concessão de registro desses produtos pelos órgãos federais registrantes no Brasil está sujeita à prévia apresentação de dados que indiquem conclusivamente que o produto, quando usado de acordo com as prescrições, não causará efeitos significativamente adversos a seres humanos ou ao ambiente. Os documentos básicos relativos a este assunto são a Lei nº 7.802 de 11/07/89, o Decreto nº 98.816 de 11/01/90 e a Portaria 131 de 03/11/97, específica para o registro dos biopesticidas.

Este Protocolo apresenta formas de obtenção das informações sobre as características gerais do produto a ser registrado e sobre a análise de resíduos do mesmo. Informações sobre a identificação do produto se referem basicamente à composição, propriedades físico-químicas e metodologia de análise proposta pelo fabricante. Informações sobre a análise de resíduos do produto se destinam ao detalhamento da natureza dos resíduos do produto, formas de redução de seu teor no produto final, estabilidade e níveis esperados no mesmo.

Na elaboração deste documento foram consultados documentos similares elaborados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos da América, pela Comunidade Econômica Européia (CEE) e pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). De forma particular, deve-se destacar o documento da EPA denominado "Subdivision M" que serviu como base na elaboração deste Protocolo.

O Protocolo se aplica a todos os microrganismos de ocorrência natural e àqueles que são estirpes obtidas através de seleção por métodos convencionais. O registro de microrganismos geneticamente modificados por processos biotecnológicos pode requerer testes adicionais aos estabelecidos neste Protocolo, de acordo com a avaliação caso-a-caso feita pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança do Ministério de Ciência e Tecnologia – CTNBio (Decreto nº 1.752, de 20 de dezembro de 1995 que regulamenta a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995).

INFORMAÇÕES GERAIS

Informações Básicas

Todos os testes mencionados neste Protocolo deverão ser realizados seguindo-se os princípios de Boas Práticas de Laboratório, de acordo com o documento INMETRO-CTLE 06 (1995) elaborado pelo Instituto Brasileiro de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.

É aconselhável que o órgão federal competente seja consultado antes de se fazer os testes, no sentido de determinar a forma/pureza de cada agente microbiano de controle (AMC) e de cada produto formulado (PF). Certas formas do AMC podem ser mais apropriadas para certos testes. Em geral, a forma de um microrganismo a ser testado (ex.: célula vegetativa, esporo, cisto, vírion) deverá ser equivalente àquela presente no produto a ser registrado. O microrganismo teste também deverá equivaler àquele que se pretende registrar com respeito a estágio de crescimento, posse de organelas e apêndices e expressão de traços fenotípicos (incluindo produtos de genes que tenham sido intencionalmente introduzidos no microrganismo). Se alguma exposição significativa a outras formas do microrganismo for esperada, ou se mudanças em sua forma ocorrerem, ou puderem ocorrer, em espécies visadas ou não-visadas, estas formas também deverão ser testadas.

Testes exigindo o uso do produto técnico (PT) poderão ser conduzidos com o produto formulado (PF), se ambos forem idênticos.

O lote das substâncias testadas deverá ser o mesmo durante todo o estudo e as amostras testes deverão ser guardadas sob condições que mantenham sua pureza e estabilidade. Se a estabilidade da substância-teste não puder ser mantida durante os estudos, ou se por outras razões não for possível usar o mesmo lote durante o teste, lotes subseqüentes da substância-teste deverão ser selecionados para que sejam tão idênticos quanto possível ao lote original.

Métodos estatísticos apropriados devem ser utilizados para expressar tendências e avaliar diferenças entre os dados obtidos. Todas as médias de dados devem ser acompanhadas pelo respectivo desvio padrão, para indicar a variabilidade dos dados. Além disso, os erros-padrão das médias devem ser calculados, por serem úteis para comparar as médias entre si. Níveis de significância de diferenças e graus de liberdade de resíduo também devem ser fornecidos nas comparações de médias. Dada a importância da adequada análise a ser realizada, ao final deste protocolo apresentam-se os aspectos básicos a serem considerados no planejamento experimental e na análise de dados.

Elaboração de Relatórios

A elaboração dos relatórios deverá seguir os Princípios das Boas Práticas de Laboratório, de acordo com a terminologia do documento emitido pelo INMETRO- CTLE 06 (1.995).

Cada teste descrito neste documento deverá satisfazer os requisitos listados a seguir, a menos que algum protocolo específico aconselhe outra apresentação.

Exigências Gerais

Deve ser redigido um relatório final do estudo.

Recomenda-se o uso do Sistema Internacional de Medidas.

O relatório final deve ser assinado e datado pelo Diretor do estudo

Os relatórios de outras áreas anexados ao relatório final devem ser datados e assinados pelo Pesquisador Principal responsável por essas áreas.

Correções e aditamentos ao relatório final devem ser feitos em forma de adendo. O anexo deve especificar claramente o motivo da correção ou aditamento e deve ser assinado e datado pelo Diretor de Estudos e pelo Pesquisador Principal de cada área envolvida.

Conteúdo do Relatório Final

O relatório final deve incluir as seguintes informações (contudo, não deve limitar-se a elas):

- Identificação do estudo, do sistema-teste, da substância de referência e da substância de controle;
- Um título descritivo;
- Identificação da substância-teste por código ou nome (nomenclatura internacional);
- Identificação da substância de referência por código ou nome (nomenclatura internacional);
- Identificação da substância de controle por código ou nome (nomenclatura internacional);
- Caracterização da substância-teste, incluindo pureza, estabilidade e homogeneidade;
- Identificação e caracterização do sistema-teste.

Informações sobre a Unidade Operacional

Nome e endereço

Nome do Diretor de estudo;

Nome de outras pessoas envolvidas significativamente no relatório final.

Datas

Datas nas quais os estudos foram iniciados e finalizados;

Uma declaração da Unidade de Garantia da Qualidade, certificando em que datas foram realizadas inspeções e em que datas os resultados auditoriais foram relatados ao Gerente e ao Diretor de estudo.

Materiais e métodos

Descrição dos materiais e métodos utilizados;

Referência aos procedimentos oficiais ou oficialmente reconhecidos.

Resultados

Sumário dos resultados;

Todas as informações e dados constantes do protocolo de estudo;

Apresentação dos resultados incluindo cálculos e, quando pertinente, métodos estatísticos;

Avaliação e discussão dos resultados e, quando apropriado, conclusões.

Arquivos e Armazenamento

Local onde todos os espécimes, dados brutos e o relatório final estão arquivados ou armazenados.

Procedimentos estatísticos

Geral

Métodos estatísticos apropriados devem ser utilizados para analisar os dados experimentais, expressar tendências e avaliar diferenças significativas entre os dados obtidos nos diferentes grupos em teste. Os métodos usados devem refletir o atual estado da arte.

Desvio padrão e erro padrão

Todas as médias dos dados devem ser acompanhadas por desvio padrão, para indicar a variabilidade dos dados. Em adição, os erros padrões das médias devem também ser calculados, uma vez que eles são úteis para comparar médias de diferentes grupos de testes. Entretanto, diferenças estatísticas significativas, acompanhadas pelo nível de confiança ou probabilidade, devem também ser usadas no lugar da determinação do erro-padrão. Outros métodos de expressão de dados podem também ser usados quando forem apropriados.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO

Este protocolo oferece diretrizes para a apresentação de dados e informações sobre o produto agrupadas em:

- Identificação do produto;
- Informações sobre o ingrediente ativo;
- Informações sobre o processo de produção;
- Propriedades físico-químicas;
- Outras informações.

Os dados exigidos para análise de produtos contendo AMC de alguma forma se assemelham aos exigidos para produtos químicos convencionais. Entretanto, devido à natureza particular, à composição e ao modo de ação dos AMC's, algumas diferenças existem. Por exemplo, protozoários, bactérias, fungos e vírus devem ser identificados o máximo possível quanto à sua taxonomia, sorotipo, composição e estirpe, ou por outros meios específicos apropriados.

Identificação do Produto

Cada solicitação de registro de AMC deve conter as seguintes informações: identificação do registrante e do fabricante e nome comercial do produto.

Composição qualitativa/quantitativa do produto:

Essa informação deve incluir a natureza e a quantidade do ingrediente ativo e de diluentes e a identidade e o propósito dos ingredientes inertes (protetor solar, adesivos, espalhantes e outros). O nome de cada ingrediente para o qual se requer o estabelecimento de limites deve ser listado. Declarações separadas devem ser apresentadas para cada composição alternativa.

As diretrizes empregadas para certificação de limites dos produtos químicos podem ser utilizadas para os produtos biológicos. Os limites para agentes microbianos (AMC's e contaminantes) devem ser expressos em: (i) unidades de AMC por unidade de peso ou volume; (ii) unidades internacionais de potência por unidade de peso; e (iii) porcentagem de peso do produto. Os itens (i) e (ii) podem ser determinados usando testes apropriados biológicos, genéticos, bioquímicos, sorológicos ou outros.

Dois ou mais métodos para se verificar os limites certificados do AMC e quaisquer impurezas microbianas podem ser exigidos. Contagens em placas (unidades formadoras de colônias ou de placas por unidade de peso ou volume) ou ensaios de infectividade podem ser necessários para codificação e para permitir a identificação preliminar. Bioensaios sobre a resistência a antibióticos podem eliminar algumas contaminações, assim como confirmar identificações feitas. Em alguns casos, a identificação absoluta pode ser conseguida apenas através do uso de um ou mais dos vários métodos imunológicos

(como ELISA) ou de sonda molecular. Eles devem ser suficientemente específicos para determinar o AMC na presença de mutantes e contaminantes que podem ter se formado ou ter sido introduzidos durante o processo de fabricação ou replicação.

Informações sobre outros ingredientes presentes:

Uma solicitação de registro deve conter as seguintes informações sobre cada ingrediente, que não o(s) AMC(s), reconhecidamente existente no produto ou que pode ser razoavelmente identificado:

- (i) Composição percentual (por peso) de cada ingrediente; o número de unidades por unidade de volume ou peso é necessário para impurezas microbianas;
- (ii) Se o ingrediente é ativo (um ingrediente adicionado intencionalmente) ou uma impureza;
- (iii) O nome químico conforme o "Chemical Abstracts 1972-1976 Index of Nomenclature" ou edição subsequente, ou outro nome bem definido. Se uma ou outra impureza for microbiana, ela deve ser identificada de acordo com sistemas de nomenclatura aceitos;
- (iv) O número de registro do "Chemical Abstracts (CAS) Registry";
- (v) O nome do produto, o nome comercial e o nome comum;
- (vi) O código experimental ou interno do requerente;
- (vii) Para cada ingrediente ativo, além do AMC, a fórmula empírica e o peso molecular ou a amplitude de peso molecular;
- (viii) A fórmula estrutural (quando conhecida);
- (ix) Os limites de composição de cada ingrediente para o qual esses níveis são exigidos (de acordo com o protocolo de pesticidas químicos).

Informações sobre o Ingrediente Ativo (AMC):

A identificação do AMC no produto deve incluir o seguinte:

- (i) Taxonomia, sorotipo, biótipo, ou qualquer outra categoria apropriada. Amostras dos AMC's registrados devem ser depositadas em coleções de culturas nacionais, credenciadas por órgão federal. Os testes específicos e critérios usados na identificação (isto é, morfológicos, bioquímicos, analíticos, sorológicos ou outros meios de identificação) e os resultados desses testes ou critérios devem ser apresentados. Se o AMC contém plasmídeos ou outros elementos genéticos extracromossômicos envolvidos na atividade pesticida, patogênica ou tóxica, eles devem ser identificados, assim como quaisquer caracteres fenotípicos codificados por tais elementos e sua estabilidade. Será decidido caso-a-caso se um organismo de ocorrência natural ou geneticamente modificado deverá ser considerado um novo ingrediente ativo, através de comparações com biótipos relacionados existentes;
- (ii) O nome comum e/ou alternativo e sinônimo;
- (iii) A ocorrência natural do organismo, sua relação com outras espécies (principalmente as patogênicas) e seu histórico;

- (iv) A descrição dos tipos morfológicos do AMC e quaisquer características morfológicas, bioquímicas ou de resistência não usuais se tais características forem diferentes da descrição clássica do organismo;
- (v) As propriedades biológicas do ingrediente ativo com respeito ao organismo-alvo, gama de hospedeiros, ciclo biológico e modo de ação. Com respeito às propriedades do AMC, qualquer risco conhecido ou potencial a mamíferos (incluindo seres humanos), ao ambiente e a espécies não-alvo deve ser discutido;
- (vi) Se o AMC foi modificado geneticamente, além dos itens anteriores, os métodos utilizados para a modificação genética devem ser apresentados. Além disto, a identidade do material genético inserido ou retirado (origem, natureza, tamanho, seqüência de bases e/ou mapas de restrição de endonucleases), informações da região de controle do gene, descrições de aspectos fenotípicos a serem ganhos ou perdidos e informações sobre a estabilidade genética (tendência de reversão ou freqüência de troca/transferência com outros organismos) da região cromossômica modificada ou de entidades extracromossômicas devem ser discutidas. Material genético adjacente ao(s) gene (s) inserido intencionalmente que pode ter sido engenheirado no receptor deve ser adequadamente caracterizado e a probabilidade de expressão deve ser apresentada;
- (vii) A susceptibilidade a biocidas e agrotóxicos.

Informações sobre o Processo de Produção

Os materiais inicial e intermediário devem ser descritos juntamente com os procedimentos para se assegurar a integridade dos mesmos e os procedimentos para limitar a contaminação química e/ou biológica em preparações não-formuladas do AMC. Essa descrição deve incluir os procedimentos usados pelo fabricante para estabelecer a identidade e pureza da cultura na qual o AMC não-formulado é produzido, o método de fabricação e as técnicas utilizadas para assegurar um produto uniforme e padronizado. A integridade do produto determinada por testes químicos específicos e sensíveis, testes sorológicos e biológicos deve ser demonstrada. Se o teste não é um teste padrão reconhecido, sua descrição detalhada devem ser apresentada, juntamente com informações sobre precisão, especificidade, substâncias interferentes, acuidade e sensibilidade.

Se o AMC produz toxinas, pode ser exigido o monitoramento destas durante a sua produção, como uma forma de controle de qualidade.

Deve ser relatada a presença de substâncias alergênicas, toxinas microbianas, outros produtos metabólicos, biótipos mutantes, contaminantes microbianos (particularmente aqueles com potencial infectivo ou antagônico), produtos secundários de reações químicas empregadas no processo de manufatura, resíduos de fermentação da produção de bactérias e fungos, resíduos de hospedeiro associados a vírus produzidos em culturas de células, organismos inteiros, outras formas vivas, resíduos de contaminantes após o processo de purificação e extração de impurezas de químicos usados no processo de manufatura. O relatório deve incluir os procedimentos usados para assegurar a pureza das preparações de AMC não-formuladas. Se a pureza (dentro de limites razoáveis) não pode ser conseguida, os meios de se controlar os níveis de contaminação dentro de limites aceitáveis devem ser delineados.

Patógenos que afetam seres humanos ou outros animais não-alvo, como por exemplo *Shigella*, *Salmonella* e *Vibrio* não devem estar presentes em níveis significativos no grau técnico do ingrediente ativo. Se o método de produção puder propiciar o crescimento de patógenos de seres humanos e animais, cada partida produzida deve ser testada para se constatar a ausência desses organismos. Cada solicitação de registro de um Componente da Formulação (CF) ou Produto Formulado (PF) deve conter uma análise de todos os patógenos humanos e animais que podem estar presentes em níveis potencialmente danosos no produto antes da formulação. A solicitação de registro deve propor uma metodologia para a detecção e eliminação destes patógenos.

Propriedades Físico-Químicas

Dados sobre as propriedades físicas e químicas são exigidos para o registros de cada PT, CF e PF. A Tabela 1 mostra os dados relevantes relativos às propriedades físicas e químicas das preparações de AMC's.

Outras Informações

Outras informações, tais como: classe do produto, finalidade de uso, restrição de uso, métodos/precauções na manipulação, método detalhado de desativação e estratégia de uso deverão ser apresentadas.

Tabela 1. Resumo dos dados físico-químicos de AMC.

PROPRIEDADE	SUBSTÂNCIA-TESTE	
	PT	CF
Cor	Sim	Sim
Estado Físico	Sim	Sim
Odor	Sim	Sim
Densidade ou gravidade específica	Sim	Sim
pH	Sim	Sim
Estabilidade*	Sim	Sim
Estabilidade em Armazenamento	Sim	Sim
Viscosidade (só para líquidos)	Não	Sim
Miscibilidade (só líquidos emulsionáveis)	Não	Sim
Características corrosivas	Não	Sim

* Refere-se à estabilidade do AMC à luz solar, à água (pH 5, 7 e 9), ao ar, às temperaturas normais e elevadas e aos metais e seus íons).

ANÁLISE DE RESÍDUOS

Os dados sobre resíduo se destinam a fornecer informações necessárias para determinar o local, a natureza e a magnitude da presença desses em alimentos. Essas informações incluem dados de metabolismo de planta, dados de resíduos, metodologia analítica e, quando indicado, de metabolismo animal e estudos de alimentação animal para determinar o alcance de resíduos em carne, leite e ovos.

Resultados de análise de resíduo serão exigidos sempre que forem observados riscos significativos nos testes da Fase I do Protocolo de Testes Toxicopatológicos em mamíferos e quando pelo menos uma das seguintes situações ocorrer: (1) quando o produto for indicado para uso em culturas para fins de alimento humano ou animal; (2) quando o uso do produto puder resultar na presença de resíduos em alimento humano ou animal. Nos demais casos, o solicitante deverá requerer a Isenção de Tolerância para o produto.

Resíduos com potencial toxicopatológico podem ser (mas não se limitam a) os seguintes:

- (i) todos os tipos de propágulos do AMC, tais como células vegetativas, esporos sexuais e assexuais ou vírions;
- (ii) mutantes do AMC em questão;
- (iii) material genético do AMC;
- (iv) substâncias antigênica/alergênica, tóxica e/ou mutagênica associadas com o AMC, incluindo as impurezas na formulação, ou componentes ou produtos metabólicos do AMC gerados durante a produção ou estocagem do produto ou no local de aplicação;
- (v) quaisquer outras entidades replicativas que funcionem como receptoras de material genético (cromossômico ou extracromossômico) de interesse potencial. Tais receptores podem ser vírus ou células de animal, plantas, ou bactéria. A estabilidade genética (facilidade de troca ou transferência genética) é então importante na determinação de resíduos de interesse potencial, especialmente nos casos de AMC não-indígenos ou geneticamente modificados.

Os procedimentos gerais a serem adotados na avaliação de resíduos de AMC's são os mesmos aplicáveis para os produtos químicos, em adição às seguintes particularidades citadas neste documento.

Natureza do Resíduo em Plantas

Estudos de metabolismo de plantas serão exigidos para determinar a natureza de resíduos de AMC sempre que este se destinar a uso em culturas alimentares.

Procedimentos e relatório

A absorção, o metabolismo e a translocação de AMC devem ser determinados em plantas da cultura em estudo e em representantes de outros grupos de plantas não-relacionadas e de interesse econômico. Para AMC's com potencial de fitopatogenicidade, são exigidos testes mais extensos,

especialmente se a replicação do AMC ocorrer em espécies de cultura não-alvo. Se possível, plantas tratadas devem crescer até a maturidade normal da cultura para que os resíduos possam ser caracterizados em, ou sobre, produtos agrícolas brutos derivados da cultura em questão.

As plantas devem ser tratadas pela via proposta (tratamento de semente, tratamento de solo, tratamento foliar mais o solo, etc.). Como os ingredientes inertes intencionalmente adicionados podem influenciar significativamente na deposição, viabilidade, estabilidade, absorção, e mesmo na replicação do AMC no local de tratamento, a substância-teste deve ser o PF. Em alguns casos, o AMC radiomarcado pode ser útil mas, normalmente, outras alternativas devem ser empregadas para determinar o resíduo total e, subseqüentemente, aqueles resíduos de interesse toxicopatológico. A concentração a ser aplicada deve ser a máxima proposta ou concentrações exageradas, para permitir identificação de resíduo.

Como os AMC's são muito mais complexos que os produtos químicos convencionais, observam-se problemas analíticos incomuns. Por exemplo, o resíduo final pode consistir de entidades diferentes (um microrganismo como um todo e uma toxina), cada qual exigindo procedimentos analíticos bastante diferenciados. Como todos ou quase todos os AMC's são organismos que se replicam, o resíduo final geralmente aumentará com o tempo, mas não em função da absorção contínua do resíduo e/ou transformação de um resíduo em outro, como é típico de pesticidas químicos. Em alguns casos, o AMC viável "per se" pode não ter potencial toxicopatológico e sua toxina pode ter este potencial. Neste caso, o AMC deverá ser analisado mesmo que ele seja somente fonte do resíduo que causa efeitos toxicopatológicos.

Alguns AMC's podem permanecer no solo e/ou externamente na parte aérea das plantas, enquanto outros podem entrar nas plantas ativa ou passivamente. Uma vez na planta, o AMC pode ser transportado para outras partes, se replicar e causar doença; em outros casos, a replicação pode ocorrer somente no ponto de entrada. Em alguns casos, o AMC pode ser restrito ao solo ou parte isolada da planta, mas exerce sua influência em toda a planta, tal como ocorre no caso de uma toxina translocável. Resíduos de AMC podem variar com os ciclos de crescimento da planta. É de responsabilidade do requerente demonstrar que partes da planta podem carregar resíduos de interesse, isto é, determinar a distribuição de resíduos. Se necessário, esses estudos deverão demonstrar quais os resíduos de maior importância a serem avaliados no campo e também proporcionar uma indicação da eficiência e sensibilidade dos métodos usados. Deve-se consultar as orientações sobre "Métodos de análise de resíduos" descritos neste protocolo para realização destes testes.

Natureza do Resíduo em Animais

Estudos de metabolismo animal serão exigidos para determinar a natureza e distribuição dos resíduos do AMC em animais, sob as seguintes condições:

- (1) Quando os resíduos de AMC apresentarem efeito toxicopatológico potencial e for necessária a condução das FASES II e III do protocolo de avaliação toxicopatológica (EMBRAPA, 1996);
- (2) Estes resíduos estiverem interna ou externamente presentes em alimentos (ou seus componentes) para animais; ou

(3) O AMC for indicado para tratamentos diretos do animal ou do local onde o animal é mantido.

Esses tipos de estudos podem ser exigidos mesmo que não ocorra nenhum resíduo com potencial toxicológico interno ou externo a alimentos para animais, porque metabolismo vegetal e animal podem ser diferentes.

Isenções das exigências da apresentação desses dados são possíveis se o requerente for capaz de demonstrar adequadamente que nenhum daqueles resíduos com potencial toxicopatológico, citados anteriormente neste protocolo, ocorrerá em produtos animais usados para alimento.

Procedimentos e relatório

Se uma ou mais das condições anteriores ocorrem, estudos de metabolismo animal devem ser conduzidos utilizando-se ruminantes e aves de corte. Se resíduos com potencial toxicopatológico ocorrem interna ou externamente em alimentos para animais, então os animais devem ser testados durante pelo menos três dias com o(s) resíduo(s) final do(s) AMC(s) oferecido(s) por via oral em rações. Teoricamente, um único propágulo de AMC pode causar infecção ou permitir replicação nos animais. Obviamente, esta única unidade viável seria um resíduo de interesse toxicopatológico, mas muito provavelmente não seria detectado em ração. Portanto, se existe algum potencial de patogenicidade em animal, estudos de metabolismo animal serão exigidos em todos os casos. Se o AMC for indicado para tratamento oral ou dermal de animais ou para tratamento dos locais onde os animais serão mantidos, então os animais ou estes locais deverão ser tratados de acordo com as orientações de uso propostas ou em concentrações exageradas (se necessário para caracterização de resíduo), usando um produto formulado.

Se nenhuma replicação de AMC ocorrer interna ou externamente ao animal, pelo menos músculos, gordura, rim e fígado deverão ser analisados dentro de 24 horas após a última administração do produto. Se ocorrer replicação do AMC no animal, intervalos muito mais longos podem ser exigidos e será necessária uma amostragem maior de tecidos. Alguns AMC's, principalmente os fungos, podem exigir semanas ou meses para estabelecer uma infecção detectável. Ovos e leite, quando aplicáveis, devem ser amostrados em intervalos regulares, preferivelmente diários. Se necessário, estudos de metabolismo animal e estudos da magnitude de resíduos em animais podem ser combinados. Estes estudos permitirão a determinação dos principais resíduos, para os quais devem ser desenvolvidas metodologias de análise, e daqueles que devem ser investigados em estudos de alimentação animal, se necessário. A eficiência e a sensibilidade dos métodos utilizados também serão determinadas a partir desses estudos de metabolismo animal.

Métodos de análise de resíduos – Orientações

Métodos de análise de resíduos são exigidos para coletas de dados com o fim de se determinarem os níveis de tolerância. O desenvolvimento de um método de monitoramento é exigido para todos os AMC's isentos das exigências de tolerância.

Cada método deve ser plenamente descrito ou uma cópia da publicação que traz este método deve ser submetida, juntamente com quaisquer modificações sugeridas. O método também deve ser validado, submetendo-se dados colhidos e análises de amostras controle de produtos animais e vegetais não-tratados. O limite da estimativa de sensibilidade/detecção deve ser fornecido para cada produto agrícola testado. É importante

também procurar determinar se os resíduos presentes interna ou externamente nos produtos agrícolas colhidos há algum tempo são extraídos com a mesma eficiência que aqueles de amostras normalmente tomadas para os testes de recuperação.

Diferentes métodos analíticos podem ser exigidos para identificar e quantificar todos os resíduos com potencial toxicopatológico derivado de um AMC. Se um produto microbiano biologicamente ativo é de interesse, então os procedimentos analíticos mais convencionais tais como cromatografia gasosa, espectrometria de massa ou cromatografia líquida de alta pressão são tipicamente utilizados. Se um AMC de ocorrência natural, um mutante ou um receptor viável de material genético de AMC é um resíduo com potencial toxicopatológico, vários métodos imunológicos (tais como ensaio imunossorvente de enzima-ligada, dot-imunoensaio) ou métodos de sonda molecular (tais como dot hibridização, procedimento de hibridização Southern, ou mapeamento restrito de endonuclease) podem ser usados para identificação e/ou quantificação. Como os procedimentos anteriores não necessariamente determinam AMC´s viáveis, a recuperação do AMC viável a partir dos tecidos (maceração seguida de diluição e plaqueamento) ou ensaios de infectividade serão freqüentemente necessários. Culturas ou bioensaios são também importantes como meios de detecção de AMC´s em níveis abaixo dos limites de detecção dos métodos acima.

Pode ser possível purificar certos AMC´s virais até o ponto de cristalização, enquanto outros podem não ser isoláveis das células hospedeiras ou membranas hospedeiras em uma forma viável. Alguns resíduos de AMC´s podem estar ligados (ativa ou passivamente) a estruturas/componentes celulares e suas liberações devem ser tentadas usando procedimentos tais como "ultra-som", detergentes ou procedimentos hidrolíticos (enzimático, ácido ou alcalino). Devem ser determinados os níveis básicos de reação-cruzada de AMC´s, já que algum nível de similaridade antigênica e/ou homologia de ácido nucléico pode existir em microrganismos de ocorrência natural. Em alguns casos, deve-se também procurar detectar diferentes formas viáveis do AMC em questão (como esporos vs. células vegetativas, encapsulados vs. não-encapsulados), já que determinantes antigênicos podem ser diferentes ou estar mascarados. No caso de AMC´s geneticamente modificados, os métodos devem ser suficientemente específicos para determinar o microrganismo na presença da linhagem parental, não-modificada, de ocorrência natural do mesmo microrganismo que, geralmente, difere apenas em uma porção relativamente pequena do ácido nucléico (cromossômico ou extracromossômico).

Estabilidade do Resíduo durante Estocagem

Dados de estabilidade durante a estocagem, como os adotados no caso de agroquímicos, devem ser submetidos. A obtenção desses dados depende de estudos envolvendo amostras representativas de plantas ou animais contendo cada resíduo de interesse, estocagem sob as condições normais de armazenamento e análise ao final do período. É indispensável que as amostras sejam estocadas em temperaturas suficientemente baixas, para prevenir a replicação do AMC ou a produção de bioquímicos de interesse. Deve-se observar que o congelamento pode ser prejudicial a alguns AMC´s. Nesse caso, intervalos muito curtos entre coleta e análise devem ser usados ou outras condições de estocagem devem ser planejadas.

Magnitude dos Resíduos em Plantas

Resíduos de AMC´s com potencial toxicopatológico devem ser determinados tanto na superfície quanto na polpa e/ou nas sementes de todas as culturas sobre as quais se pretende utilizar o AMC ou, se preferível, sobre produtos agrícolas de culturas representativas para possibilitar o estabelecimento de tolerâncias para grupos específicos de cultura. Se resíduos são detectáveis no interior ou sobre produtos agrícolas, ou se a concentração em produtos processados é possível, estudos de processamento também serão exigidos. Aumento e/ou declínio de resíduo no interior das culturas ou sobre estas será geralmente uma função dos ciclos de crescimento ou replicação do AMC que, por sua vez, é uma função da dinâmica populacional de outros organismos, tais como o hospedeiro, a planta, outros parasitos/patógenos do hospedeiro ou do próprio AMC, ou ocupantes competidores do mesmo habitat ou de um habitat similar. Espera-se que condições ambientais desempenhem um papel ainda maior na determinação da magnitude de resíduos de AMC no interior ou sobre plantas, que no caso dos pesticidas químicos convencionais. Portanto, a descrição georreferenciada adequada dos locais do teste é importante.

Em adição à informação acima e aos próprios dados de resíduos, os seguintes materiais e detalhes de procedimentos devem ser fornecidos: localização do teste, concentração de aplicação (peso ou volume do produto/ha, número de microrganismo viável/ha, etc.), formulação usada, parte da cultura analisada, número de amostras, procedimento de amostragem, época de plantio, data(s) de aplicação, data(s) de colheita/amostragem, método de aplicação, estágio da cultura durante a aplicação e colheita, método analítico usado, dados de controle não-tratado, dados de recuperação e duração do período e condições de estocagem da amostra.

Magnitude dos Resíduos em Animais

Deve-se seguir o protocolo de resíduos estabelecido para os produtos químicos (BRASIL, 1988). Se resíduos de potencial toxicopatológico ocorrerem em tecidos animais, leite, ou ovos após a administração oral nos estudos de metabolismo animal, estudos de alimentação são exigidos refletindo 1x, 3x e 10x o consumo máximo esperado de resíduos do AMC na forma de dieta que ocorrem nos alimentos animais. Se patogenicidade, toxicidade, ou crescimento muito lento e/ou desenvolvimento da doença é um problema, períodos de alimentação apropriadamente mais curtos ou mais longos, ou ainda intervalos mais longos de pré-abate podem ser usados. O primordial é o estabelecimento do tempo ideal para que a concentração máxima de resíduo/AMC nos tecidos, leite e ovos seja alcançada para estabelecer as tolerâncias e intervalos de pré-abate. Da mesma forma, se ocorrem resíduos em animais após o tratamento direto desses (sendo essa a forma de uso proposto para o AMC), demonstrado em estudo de metabolismo animal, estudos utilizando produtos formulados devem ser conduzidos de acordo com as indicações de uso propostas; tais tratamentos podem ser administrados através da ração, exposição dérmica, etc. Se duas ou mais vias de exposição são possíveis, um único estudo combinando ambas as vias é aceitável, caso a saúde do animal não seja afetada por outros fatores. Estudos de metabolismo animal e estudos de alimentação/tratamento direto do animal podem ser combinados.

A dosagem utilizada deve ser claramente especificada. No caso de estudo de alimentação, a concentração de resíduos não-viáveis (em ppm) e a enumeração de resíduos viáveis (unidades formadoras de colônia, formação de placa, unidades infectivas/unidade de peso da ração ou por unidade de peso por dia),

assim como os pesos dos animais, devem ser fornecidas. No caso de tratamentos diretos de animal (oral, dermal ou outro), o peso ou volume do PF e o número de AMC's (por unidade de peso, área da superfície do animal, etc.) devem ser fornecidos. Geralmente, estudos de ruminantes e de aves de corte são exigidos se resíduos com potencial toxicopatológico ocorrerem em rações ou se o AMC for proposto para tratamento direto de animais. Estudos com suínos podem ser exigidos se houver alguma razão para se esperar resíduos muito altos e/ou a replicação mais rápida do AMC em suíno que em aves de corte ou ruminantes. Se tratamentos de propriedades agrícolas são propostos, podem ser exigidos estudos que demonstrem a magnitude do resíduo em animais após o uso. Todos os tecidos usados como alimento humano devem ser amostrados; ovos e leite devem ser amostrados duas vezes ao dia. Tempo e condições de estocagem da amostra devem ser fornecidos, bem como a identidade dos métodos analíticos usados, dados de recuperação e dados de animal-testemunha. A formulação usada e o número de amostras também devem ser apresentados.

Comportamento do Resíduo no Ambiente

Deve-se seguir o protocolo estabelecido para os produtos químicos (BRASIL, 1988).

É importante observar que a replicação do AMC pode ocorrer em água de irrigação, corpos naturais de água, peixes, crustáceos, culturas irrigadas, resíduos pós-colheita e culturas subseqüentes. Portanto, em vez de se dissiparem ou tornarem-se diluídos, resíduos de AMC com potencial toxicopatológico podem, na verdade, aumentar no novo ambiente. Novos metabólitos de interesse podem também se formar.

Se AMC's permanecerem viáveis no solo por 18 meses ou mais, ou se o AMC em questão se replica em uma ou mais culturas de rotação ou em suas respectivas flora ou fauna associadas, dados de resíduo devem ser coletados como em Magnitude de Resíduos em Plantas, descrito anteriormente neste protocolo.

Outras informações

Os métodos práticos para remoção de resíduos que excedem o limite de tolerância (as propostas), isenção de estabelecimento de limites, uso em fumo, apresentação de padrões analíticos de referência e de dados de resíduo, e outras informações relevantes devem ser apresentados conforme estabelecido para os produtos químicos (BRASIL, 1988).

Dados Exigidos para Culturas Alimentares e Não-alimentares

De um modo geral, serão exigidos dados que demonstrem que um certo uso em cultura de importância alimentar (tratamento de semente, cultivo somente para fins de produção de sementes, ou cultivos em pré-produção) não se caracteriza como uso em alimento. Já que os AMC's são entidades replicáveis, poucas são as formas de uso que poderiam corresponder a esta situação.

AGRADECIMENTOS

Consignamos nossos agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na elaboração dessa publicação e em especial ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), United States Environmental Protection Agency (USEPA), e aos empregados da Embrapa Meio Ambiente pelo estímulo à execução desse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANON. **Guidance on registration: requirements for bacteria, protozoa, fungi and viruses used as pesticides.** Panel for the registration criteria for biological agents used as pesticides. London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food - Scientific Subcommittee on Pesticides, 1980. 15p.
- BIOPESTICIDES market-technology registration and IPR companies. London: CPL Scientific Limited, 1992. v.2. 396p. (Report 921/050)
- BRASIL. Secretaria do Meio Ambiente. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos.** Brasília, 1988. 351p.
- CODE of Federal Regulations. Protection of Environment, 40, parts 150 to 189. Revised as of July 1, 1993. Washington: Environmental Protection Agency, 1993.
- COUNCIL Directive 91/414/EEC. **Official Journal of the EC**, L230,1991, 1.
- COUNCIL Directive 90/219/EEC. **Official Journal of the EC**, L117,1990, 1.
- COUNCIL Directive 90/220/EEC. **Official Journal of the EC**, L117, 1990, 5.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (Jaguariúna, SP). **Minuta de portaria registro de agentes microbianos de controle de organismos nocivos- proposta final.**Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA; Brasília: IBAMA, 1995. 17p.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (Jaguariúna, SP). **Protocolos de avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas II. Testes toxicopatológicos em mamíferos.** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997.
- FINNEY, J. **Statistical methods in biological assay**, 3. ed. London: Griffin,, 1978.
- IMPACT analysis on proposed research permit and registration guidelines for microbial pest control agents. [s.l.]: Agriculture and Agri-Food Canada, 1993. 5p.
- INMETRO. **Princípios das boas práticas de laboratório.**Rio de Janeiro: SENAI: DN-NID/ INMETRO, 1995. 48 p. (INMETRO-CTLE 06).
- NARDO, E.A.B. De; CAPALBO, D.M.F., OLIVEIRA, M.C.B.; MORAES, G.J., eds. **Análise de risco e avaliação do impacto ambiental decorrente do uso de agentes de controle biológico. Memórias do workshop.** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995. 127p. (EMBRAPA-CNPMA, Documentos).
- NARDO, E.A.B. De; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, G.J.; OLIVEIRA, M.C.B. coords. **Requisitos para a análise de risco de produtos contendo agentes microbianos de controle de organismos nocivos: uma proposta para os órgãos federais registrantes.** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995. 42p. (EMBRAPA-CNPMA, Documentos, 2).
- OECD Environment Monograph. Draft - data requirements for registration of biopesticides in OECD member countries, survey results. Paris, 1995. 11p. Unpublished data.
- PESTICIDE Assessment Guidelines - Subdivision M. Microbial Pest Control Agents and Biochemical Pest Control Agents, Washington: U.S.Environmental Protection Agency Office of Pesticides and Toxic Substances, 1989. 192p.
- REGULATORY Proposal PRO 93-04: Registration guidelines for microbial pest control agents. [s.l.]: Agriculture and Agri-Food Canada, 1993. 55p.
- REGULATORY Proposal PRO 93-05:research permit guidelines for microbial pest control agents. [s.l.]: Agriculture and Agri-Food Canada, 1993. 22p.
- WORKSHOP SOBRE ANÁLISE DE RISCO E AVALIAÇÃO DE IMPACTO AMBIENTAL DECORRENTES DO USO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO, 1994. Jaguariúna. Resumo de mesas-redonda/Palestras. Jaguariúna:EMBRAPA-CNPMA,1994. 54p.

Embrapa

Meio Ambiente


Brasil
EM AÇÃO


**GOVERNO
FEDERAL**