

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

**UMA PROPOSTA PARA OS ÓRGÃOS FEDERAIS REGISTRANTES**

**Testes Toxicopatológicos em Aves, Artrópodos Benéficos,  
Organismos de Solo e Plantas**

**VOLUME IV**

**Elizabeth A.B. De Nardo, Luiz Alexandre Nogueira de Sá, Deise M.F. Capalbo,  
Gilberto J. de Moraes, Mário Cesar B. De Oliveira,  
Vera L.S.S. Castro, Maria Aico Watanabe.**

**Embrapa**

**Meio Ambiente**

**PROTÓCOLO**

## **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**

**TESTES TOXICOPATOLÓGICOS EM AVES, ARTRÓPODOS  
BENÉFICOS, ORGANISMOS DE SOLO E PLANTAS**

**VOLUME IV**

Elizabeth A.B. De Nardo, Luiz Alexandre Nogueira de Sá,  
Deise M.F. Capalbo, Gilberto J. de Moraes, Mário C.B. de Oliveira,  
Vera L.S.S. Castro, Maria Aico Watanabe.

EMBRAPA MEIO AMBIENTE – Documentos 12.

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

DE NARDO, E. A. B.; SÁ, L.A.N.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, G. J.; OLIVEIRA, M. C. B.; CASTRO, V.L.S.S.; WATANABE, M.A. **Protocolo avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas. IV. Testes toxicopatológicos em aves, artrópodos benéficos, organismos de solo e plantas.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 67p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 12).

CDD. 632.96

©EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 1999

# PROTOCOLO

## AVALIAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE DE PRAGAS PARA REGISTRO COMO BIOPESTICIDAS<sup>1</sup>

---

UMA PROPOSTA PARA OS ÓRGÃOS FEDERAIS REGISTRANTES

### TESTES TOXICOPATOLÓGICOS EM AVES, ARTRÓPODOS BENÉFICOS, ORGANISMOS DE SOLO E PLANTAS

#### VOLUME IV

Elizabeth A.B. De Nardo<sup>2</sup>, Luiz Alexandre Nogueira de Sá<sup>3</sup>, Deise M.F. Capalbo<sup>4</sup>,  
Gilberto J. de Moraes<sup>5</sup>, Mário C.B. de Oliveira<sup>6</sup>,  
Vera L.S.S. Castro<sup>7</sup>, Maria Aico Watanabe<sup>8</sup>

---

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

<sup>2</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente. Caixa Postal 69, CEP 13820-000 Jaguariúna, SP.

<sup>3</sup> Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente.

<sup>4</sup> Engenheira de Alimentos, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente.

<sup>5</sup> Engenheiro Agrônomo, Ph.D., ESALQ-USP/Depto. de Zoologia, CEP 13.418-900, Piracicaba, SP.

<sup>6</sup> Engenheiro Agrônomo, IBAMA/Diretoria de Controle Ambiental - SAIN, Via L4 Norte, ED. Sede, Bloco C, CEP 70.800-200, BRASILIA, DF

<sup>7</sup> Veterinária, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente

<sup>8</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Meio Ambiente.

## SUMÁRIO

---

<b>Apresentação</b> .....	07
<b>Introdução</b> .....	09
<b>Informações Gerais</b>	
Principais aspectos .....	11
<b>Providências</b>	
Padrões Básicos Para os Testes .....	12
(1) Substância-teste para estudos biológicos e ambientais.....	12
(2) Administração ou aplicação da substância-teste dos diluentes.....	14
(3) Controles para estudos biológicos e ambientais.....	14
(4) Exigência de testes especiais .....	15
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	17
<b>Protocolo de Avaliação Toxicopatológica em Aves</b>	
Parte I - Principais aspectos.....	19
I - Testes da fase I .....	20
I - Progressão da fase .....	26
II - Testes da Fase II.....	26
III - Testes da fase III.....	26
IV - Testes da fase IV.....	28
Referências Bibliográficas.....	29
<b>Protocolos Adicionais</b>	
1. Alojamentos e condições ambientais das aves em teste .....	31
2. Observações clínicas das aves .....	31
3. Peso da ave/alimento consumido .....	31
3.1. Determinação do peso do corpo da ave .....	31
3.2. Alimentação e consumo de alimento.....	32
4. Identificação de aves/gaiolas.....	33
4.1. Identificação individual de aves.....	33
4.2. Identificação das gaiolas.....	33
5. Necrópsia das aves .....	34
6. Destino final das aves utilizadas.....	34

<b>Protocolo de Avaliação Toxicopatológica em Artrópodos benéficos: predadores, parasitóides e polinizadores</b>	
Parte II - Principais aspectos .....	35
Procedimentos Gerais .....	35
Testes de patogenicidade/toxicidade da fase I .....	37
Testes da fase II .....	39
Testes da fase III .....	40
Testes da fase IV .....	40
Referências Bibliográficas.....	41
<b>Protocolo de Avaliação Toxicopatológica em Organismos benéficos do solo: minhocas</b>	
Parte III - Principais aspectos.....	47
Testes de patogenicidade/toxicidade da fase I .....	48
Referências Bibliográficas.....	50
<b>Protocolo de Avaliação Toxicopatológica em Plantas</b>	
Parte IV - Principais aspectos .....	51
Testes de patogenicidade/toxicidade da fase I .....	51
Referências Bibliográficas.....	54
<b>Protocolo de Avaliação do Comportamento do Agente Microbiano de Controle no Ambiente</b>	
Parte V - Principais aspectos.....	55
Testes da Fase II.....	55
Referências Bibliográficas.....	57
<b>Aspectos do Planejamento, Experimentação e Análise estatística de bioensaios</b>	
Parte VI - Apêndice .....	61
1. Introdução .....	61
2. Estimção de parâmetros .....	62
2.1. Estimção por intervalos de confiança .....	62
2.2. Estimção por testes de hipótese .....	62
3. Planejamento Experimental .....	63
3.1. Planejamento visando precisão de estimativas .....	64
3.2. Planejamento visando poder de testes de hipóteses .....	64
4. Análise Estatística de bioensaios .....	65
Referências Bibliográficas.....	66
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>67</b>

# 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 quantia 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

A concessão de registro de biopesticidas pelos órgãos federais registrantes está sujeita à prévia apresentação de dados que indiquem conclusivamente que o produto, quando usado de acordo com as prescrições, não causará efeitos significativamente adversos a seres humanos ou ao ambiente. No Brasil, os documentos básicos relativos a esse 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 de biopesticidas.

Este protocolo foi desenvolvido especialmente com o objetivo de obtenção de dados necessários à avaliação do potencial dos Agentes Microbianos de Controle (AMC) em causar danos a organismos presentes no ecossistema terrestre, diferentes do organismo que se deseja controlar (alvo).

Informações sobre o efeito dos AMC'S em organismos terrestres não-visados devem ser obtidas independentemente do local de aplicação do pesticida biológico e do potencial aparente de exposição. Esses dados são necessários pelas seguintes razões: quando um microrganismo é aplicado como um pesticida, grandes quantidades dele não atingem o organismo-alvo e caem sobre outras partes do ambiente, podendo se espalhar para áreas adjacentes, devido à deriva ou à disseminação natural. Dessa forma, o número de organismos não-visados expostos, o número de diferentes espécies expostas e o grau de exposição (número de microrganismos por organismo não-visado) podem ser maiores que sob condições naturais.

Patogenicidade e toxicidade são os maiores efeitos a serem avaliados em relação à exposição de organismos não-visados a pesticidas microbianos. Dessa forma, este protocolo foi desenvolvido para permitir a avaliação de risco de patogenicidade e toxicidade. Em sua elaboração, 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".

O Protocolo se aplica a todos os microrganismos de ocorrência natural e àqueles que são estirpes obtidas 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 (CNTBio) (Artigo V do Decreto 1752), de 20 de Dezembro de 1995.

A avaliação dos AMC'S sobre os organismos não-visados do ambiente terrestre está esquematizada em quatro Fases hierárquicas. Os testes da Fase I refletem a máxima chance de dano. Resultados negativos obtidos nesta Fase indicam um alto grau de segurança de que efeitos adversos indesejáveis não deverão ocorrer com o uso do AMC e nenhum outro tipo de teste será exigido.

Se efeitos adversos inaceitáveis forem identificados na Fase I, então os testes da Fase II serão realizados para quantificar níveis do AMC, aos quais as espécies não-visadas suscetíveis possam estar expostas. Nesta Fase se trabalha com o AMC isoladamente, tentando verificar a sobrevivência, persistência e multiplicação no ambiente terrestre. Testes da Fase II podem também ser exigidos, de acordo com a avaliação caso-a-caso para certos AMC'S que representam preocupações especiais. Por outro lado, dados

conclusivos da Fase II, mostrando que o AMC não sobrevive, se replica ou persiste no ambiente em que é utilizado, podem ser submetidos para se solicitar isenção de alguns ou de todos os testes exigidos pela Fase

Se efeitos adversos inaceitáveis forem identificados na Fase I, então os testes da Fase II serão realizados para quantificar níveis do AMC, aos quais as espécies não-visadas suscetíveis possam estar expostas. Nesta Fase se trabalha com o AMC isoladamente, tentando verificar a sobrevivência, persistência e multiplicação no ambiente terrestre. Testes da Fase II podem também ser exigidos, de acordo com a avaliação caso-a-caso para certos AMC'S que representam preocupações especiais. Por outro lado, dados conclusivos da Fase II, mostrando que o AMC não sobrevive, se replica ou persiste no ambiente em que é utilizado, podem ser submetidos para se solicitar isenção de alguns ou de todos os testes exigidos pela Fase I.

Se for determinado pelos testes da Fase II que o AMC persiste ou sobrevive no ambiente em níveis significativos, estudos da Fase III devem ser conduzidos para mostrar efeitos de exposição crônica em organismos terrestres. Se os dados obtidos nessa Fase ainda indicarem a ocorrência de problemas, estudos da Fase IV (Testes Simulados ou Reais de Campo) serão solicitados para verificar a existência de risco sob condições reais de uso.

É sugerido que o solicitante consulte o órgão federal registrante para a decisão dos testes a serem exigidos para cada registro de um AMC, nas diferentes Fases de avaliação.

Este protocolo está dividido em 6 partes, de acordo com o organismo não visado estudado ou o assunto tratado:

- Protocolo de Avaliação Toxicopatológica em Aves;
- Protocolo de Avaliação Toxicopatológica em Artrópodos Benéficos: Predadores, Parasitóides e Polinizadores;
- Protocolo de Avaliação Toxicopatológica em Organismo do Solo;
- Protocolo de Avaliação Toxicopatológica em Plantas;
- Protocolo de Avaliação do Comportamento do Agente Microbiano no Ambiente Terrestre - Testes da Fase II;
- Aspectos de Planejamento, Experimentação e Análise Estatística de Bioensaios.

No final de cada protocolo existem referências bibliográficas, cujo objetivo principal é auxiliar a elaboração dos testes, sempre que se fizer necessário .

# INFORMAÇÕES GERAIS

---

## PRINCIPAIS ASPECTOS

### Dose de Risco Máximo

Diferentemente dos pesticidas químicos, que geralmente decrescem após a aplicação, os AMC'S e as toxinas associadas podem, pelo menos temporariamente, aumentar ou mesmo permanecer indefinidamente, se encontrarem condições propícias no campo. Dessa forma, a dose de risco máximo a ser utilizada na Fase I será baseada em um fator de segurança multiplicado pela quantidade máxima de ingrediente ativo (AMC ou sua toxina) que se espera estar disponível a organismos terrestres do ambiente. No geral, utilizam-se doses de 10 a 100 vezes maiores que aquela a ser recomendada no uso prático.

### Determinação de um DL 50 ou DI 50

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

Seria muito difícil se estabelecerem valores específicos para LC, ED ou LD e intervalos de confiança de 95% para a maior parte dos AMC'S, cujo mecanismo de ação é a patogenicidade, tendo em vista que os resultados dos testes provavelmente não exibirão um padrão de resposta do tipo log-probit, característico dos pesticidas químicos;

### Vias de administração de máximo risco

Várias vias de administração são tratadas neste documento, sendo selecionadas de forma a refletir as vias naturais de exposição e também as vias de penetração dos AMC'S nos organismos. São elas: oral (gavage) ou respiratória, para pássaros: exposições em alimentos e contato, para artrópodos, podem simular o risco para organismos não-visados no ambiente terrestre;

A administração via parenteral (como injeções intravenosa e intraperitoneal) para aves e a injeção na hemocele para insetos, forneceriam um alto grau de confiabilidade ao indicar que um AMC particular não causaria efeitos adversos quando os resultados dos testes forem negativos. A injeção de AMC no organismo teste, embora ambientalmente não realista, propicia uma possibilidade de máximo risco ao ultrapassar os mecanismos de defesa primária dos animais. Se esta via for utilizada, uma única administração é aceitável ao invés de múltiplas administrações orais;

Por outro lado, considerando os componentes indefinidos das preparações de pesticidas microbianos (proteínas exógenas, subproduto metabólico e outros) e a natureza não realista da via de administração, os resultados positivos nem sempre indicam os efeitos reais sobre a espécie testada em condições de campo. Entretanto, devido ao alto grau de confiabilidade em testes em que o AMC é injetado, essa via é sugerida como uma alternativa no teste de exposição Oral Aguda para Aves, sempre que a preparação a ser administrada for suficientemente livre de proteínas exógenas e outras substâncias contaminantes;

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

#### **Idade dos animais-teste**

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

#### **Métodos para detecção dos AMC'S**

Diferentemente dos testes de toxicidade em que a mortalidade pode ser usualmente determinada por observação, os testes de infectividade freqüentemente exigem métodos sofisticados de avaliação para se detectarem em efeitos patogênicos subletais. Estes métodos podem incluir tecnologia sorológica e de ácido nucléico, porém, normalmente, o que se usa é a necrópsia e, no caso de manifestação de sintomas, o isolamento, o plaqueamento e a identificação do AMC são realizados.

#### **Duração dos testes**

A duração de cada teste da Fase I é cerca de 30 dias. Este período é geralmente suficiente para permitir a incubação, infecção e manifestação de efeitos do AMC nos organismos-teste. No caso de espécies de difícil criação, a duração dos testes tem que ser ajustada adequadamente. Vários autores propõem que os testes tenham uma duração de 14 a 35 dias (Ignoffo 1973; Ignoffo et al. 1975; Summers 1975), dependendo do tipo do AMC em estudo.

## **PROVIDÊNCIAS**

### **Padrões Básicos Para os Testes**

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

É aconselhável que representantes apropriados dos órgãos federais registrantes sejam consultados antes de serem feitos os testes, tanto com o agente microbiano em estudo como também para determinar a forma/pureza de cada AMC e de cada produto de uso final (PF) que será utilizado nos testes.

#### **(1) Substância-teste para estudos biológicos e ambientais**

É sabido que certas formas do AMC podem ser mais apropriadas para certos testes. Em geral, a forma, (ex.: célula vegetativa, esporo, cisto, vírion) de um microrganismo a ser testado deverá ser equiva-

lente àquela presente no produto a ser registrado. O microrganismo teste também deverá ser equivalente àquele que se pretende registrar com respeito ao 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 na forma do microrganismo ocorrerem ou puderem ocorrer em espécies visadas ou não visadas, então estas formas também deverão ser testadas. No geral, os seguintes princípios serão seguidos:

- (i) Testes exigindo o uso do ingrediente ativo (ia) do produto técnico (PT) poderão ser conduzidos com o produto formulado (PF), se o PT e o PF forem idênticos;
- (ii) O lote das substâncias testadas deverá ser o mesmo durante todo o estudo, e as amostras-teste 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 subsequentes da substância-teste deverão ser selecionados para que sejam tão idênticos quanto possível ao lote original. Ensaios químicos ou biológicos deverão ser realizados para assegurar a composição, identidade e consistência;
- (iii) Cada lote da substância-teste deverá ser analisado dentro dos limites de praticabilidade técnica, e o nome e a quantidade de ingredientes, contaminantes e impurezas deverão ser listados. A determinação deverá incluir a quantidade de material desconhecido, se houver, até se completar 100% da amostra a ser testada. A substância-teste deve estar dentro dos limites de certificação de pureza, de acordo com a seção correspondente do protocolo (Informações Sobre o Produto e Análise de Resultados - volume I);
- (iv) Se a substância-teste ou controle se destinar à incorporação na alimentação dos organismos-teste ou outro veículo, o período durante o qual ela é estável ou viável em tal mistura deverá ser determinado antes do início do estudo. Nenhuma mistura de substância-teste ou controle com o alimento ou o veículo deverá ser mantida ou usada durante o período excedente da estabilidade ou viabilidade conhecida da substância-teste ou controle na mistura.
- (v) Se a substância-teste ou controle estiver incorporada na alimentação ou outro veículo, sua homogeneidade e concentração na dieta deverão ser determinadas antes do início do estudo e a cada vez que a nova mistura for preparada. Amostras ao acaso da mistura deverão ser analisadas no mínimo uma vez ao mês, para assegurar que procedimentos de estocagem, formulação e mistura apropriada estão sendo seguidos, e que a concentração apropriada da substância-teste está contida na mistura;
- (vi) Em adição ou em substituição aos dados exigidos por este documento, o órgão federal registrante poderá exigir dados derivados de testes conduzidos com:
  - (a) um grau puro (analítico ou microbiano) do ingrediente ativo (ex.: forma infectiva mais pura para vírus);
  - (b) a forma instável de um material infeccioso (ex: vírus não incluído);
  - (c) um ingrediente inerte de uma formulação de um pesticida;
  - (d) um contaminante ou impureza;
  - (e) um metabólito (de animal ou planta) ou produto de degradação de um ingrediente ativo ou inerte;
  - (f) o produto formulado para uso final;
  - (g) qualquer substância adicional que aumente a virulência ou a toxicidade do produto;
  - (h) qualquer combinação das substâncias mencionadas acima.

## **(2) Administração ou aplicação da substância-teste dos diluentes**

- (i) O modo de administração ou aplicação da substância-teste ou controle para testes biológicos ou ambientais deve ser selecionado de forma a manter a precisão da dosagem do tratamento;
- (ii) Um diluente diferente de água ou solução salina, usado para diluir ou dissolver a substância-teste ou a substância-controle positiva, deve possuir as seguintes características, na medida do possível:
  - (a) Não alterar a absorção, distribuição, metabolismo ou retenção da substância-teste;
  - (b) Não alterar as propriedades químicas ou biológicas da substância-teste, nem aumentar, reduzir, ou alterar as características patogênicas ou tóxicas dessa substância;
  - (c) No nível usado no estudo, ela não deve produzir efeitos fisiológicos e não deve ser tóxica.

## **(3) Controles para estudos biológicos e ambientais**

Os controles para estudos biológicos e ambientais são usados para assegurar que os efeitos observados estejam associados com a exposição à substância-teste. Os grupos de controle apropriados devem ser idênticos, em todos os aspectos, aos grupos tratados, exceto com relação à exposição à substância-teste;

Em estudos envolvendo animais ou plantas, todos os controles deverão, dentro do possível, ser da mesma origem, da mesma idade, receber os mesmos cuidados e os mesmos nutrientes que os animais ou plantas que recebem a substância-teste;

Para evitar tendências, o grupo tratado e o controle devem ser escolhidos aleatoriamente.

(i) Controle negativo (não-tratado):

Grupos de controle não-tratado são usualmente exigidos. Controles não-tratados não recebem substância-teste nem qualquer material auxiliar (veículo);

(ii) Controle tratado com AMC inativado:

Em certas circunstâncias, efeitos deletérios podem ser produzidos nos animais-teste por outros mecanismos diferentes da infecção ativa (ex.: anafilaxia). Este grupo controle pode gerar informações úteis na determinação do mecanismo de patogênese;

(iii) Controle do diluente

(a) Se um diluente, diferente de água ou solução salina, for usado para administrar a substância-teste, um grupo controle daquele diluente usado pode ser exigido. Os grupos-controle recebem como tratamento somente o diluente, e este é usualmente administrado na mais alta dose utilizada em qualquer grupo-teste no estudo;

(b) Como visto no parágrafo anterior, o diluente deveria ser selecionado de forma a não apresentar toxicidade nos níveis usados neste estudo, não ter efeito fisiológico e não alterar a química, patogenicidade ou toxicidade da substância-teste. Se, entretanto, os dados existentes sobre os efeitos do diluente forem insuficientes, testes com o diluente serão exigidos.

(iv) Controle positivo:

Geralmente não são exigidos. Eles servem como controle de qualidade interna, e demonstram sensibilidade e resposta conhecida do organismo-teste a agentes infectivos ou tóxicos. São também usados para verificar se uma estirpe ou espécie reage similarmente a outra estirpe ou espécie, quando exposta a um agente infectivo ou tóxico conhecido ou padrão;

(v) Histórico do Controle:

Dados do histórico de controle são exigidos quando o órgão registrante deseja informações sobre longevidade, doenças espontâneas ou outras características de uma espécie ou estirpe selecionada para estudo e para certos fins comparativos ou estatísticos.

#### **(4) Exigência de testes especiais**

Em adição aos dados exigidos neste documento, dados derivados de outros testes poderão, em algumas circunstâncias, ser exigidos pelo órgão federal registrante. Tais dados serão exigidos quando surgirem problemas especiais. Os métodos a serem utilizados deverão já estar disponíveis na literatura ou descritos em outros protocolos. Os dados exigidos poderão estar relacionados ao padrão de uso proposto, ao modo de ação toxicológica ou a uma propriedade química ou microbiológica única.

**Procedimentos estatísticos:** 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-padrão 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, podem também ser usadas no lugar da determinação do erro-padrão. Outros métodos de expressão de dados podem também ser usados quando necessários. 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 são apresentados aspectos básicos a serem considerados no planejamento experimental e na análise de dados (APÊNDICE 1).

**Elaboração de Relatórios:** Deverá seguir os Princípios das Boas Práticas de Laboratório, de acordo com documento emitido pelo INMETRO-CTLE06, 1995.

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 de Estudo;
- os relatórios de outras áreas anexados ao relatório final devem ser datados e assinados pelo Pesquisador Principal, responsável pelo estudo;
- 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.

### ***Conteúdo do relatório final***

O relatório final deve incluir, sem se limitar, as seguintes informações:

- 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 em que os estudos foram iniciados e finalizados;
- Uma declaração da Unidade de Garantia da Qualidade certificando em que datas foram realizadas inspeções e quando 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 constando do protocolo de estudo;
- Apresentação dos resultados, incluindo cálculos e métodos estatísticos;
- Avaliação, discussão dos resultados e conclusões.

#### Arquivos e armazenamento

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

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- IGNOFFO, C. M. Effects of entomopathogens on vertebrates. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 217, p.141-164, 1973.
- IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C.; KAPP, R. W.; COSTA, W. B. An evaluation of the risks to mammals or the use of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, as a microbial insecticide. In: SUMMERS, M.; ENGLER, R.; FALCON, L.; VAIL, P., ed. **Baculoviruses for insect pest control: safety considerations – selected papers from EPA-USDA working symposium**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1975. p.354-359.
- INMETRO. **Princípios das boas práticas de laboratório**. Rio de Janeiro: SENAI-DN-NID/INMETRO, 1995. 48p. (INMETRO - CTLE06).
- SUMMERS, M.; ENGLER, R.; FALCON, L. A.; VAIL, P., ed. Guidelines for safety testing of baculoviruses. In: SUMMERS, M.; ENGLER, R.; FALCON, L.A., VAIL, P., ed. **Baculoviruses for insect pest control: safety considerations – selected papers from EPA-USDA working symposium**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1975. p.179-184.
- USEPA. **Microbial and biochemical pest control agents**. Subdivision M of the pesticide testing guidelines. Washington, D.C., 1989.

# PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO TOXICOPATOLÓGICA EM AVES

## PARTE I PRINCIPAIS ASPECTOS

Este protocolo estabelece a necessidade para dois testes da Fase I em aves, para todos AMC'S: (1) teste de patogenicidade/toxicidade oral aguda e (2) teste de patogenicidade/toxicidade respiratória;

O primeiro teste fornece dados sobre efeitos tóxicos em aves silvestres, perante a exposição ao AMC ou a qualquer toxina por ele produzida. Também fornece dados sobre efeitos patogênicos resultantes de uma exposição aguda via oral (ou injetável) e de efeitos patogênicos dos AMC'S em aves, mediante a exposição devido à deriva ou volatilização.

Todos os testes da Fase I, necrópsia, exame histopatológico, cultura e isolamento do AMC, devem ser realizados em tecidos que foram expostos e outros órgãos que mostrem anormalidades anatômicas ou fisiológicas. Em alguns casos, como as viroses, há uma preferência para certas células ou tipos de tecidos. Nestes casos, estes tecidos devem ser examinados independente de mostrarem ou não mudanças anatômicas ou fisiológicas.

**Progressão das Fases:** se efeitos adversos forem observados nos testes da Fase I e os testês da Fase II indicarem exposição, testes da Fase III serão exigidos. Se efeitos sobre reprodução ou fertilidade, ou oncogenicidade forem observados nos testes da Fase III do Protocolo de Avaliação Tóxicopatológica em Mamíferos, um teste de longo prazo de patogenicidade e efeito sobre reprodução em aves será exigido. Este teste fornecerá dados sobre efeitos de patogenicidade do AMC sobre aves, durante um período crítico de sua vida, procriação e reprodução.

A critério do órgão federal registrante, os testes de patogenicidade/toxicidade oral aguda e pulmonar poderão ser dispensados se os testes com mamíferos não apresentarem resultados de efeitos adversos significativos ou se o AMC não crescer à temperatura de 37°C, visto que a temperatura corporal das aves é, no geral, superior à dos mamíferos.

Efeitos patogênicos observados na Fase III e IV podem comprometer seriamente o registro do AMC. Além do mais, a realização de testes da Fase IV pode ser inviável, devido à impossibilidade de se confinar o AMC para a sua realização, de forma a evitar a contaminação de áreas adjacentes. Neste caso, um teste simulado de campo seria possível, mas exigiria um modelo muito complexo.

**Testes "in vivo":** o protocolo estabelece que os testes sobre organismos não-visados (aves e mamíferos) deve ser "in vivo". Wolf (1975) sugeriu um procedimento misto na avaliação da segurança de *Baculovirus*, usando testes "in vivo" e testes em cultura de tecidos. Ignoffo (1973) relatou que pelo menos 12 vírus, incluindo todos os principais grupos virais, têm sido testados "in vitro", em fibroblastos de embriões de aves, peixe ou células de mamíferos. Brusca et al. (1986) mostraram que o VPN de *Autographia californica* pode penetrar os núcleos de 3 linhagens de células de vertebrados poecilotérmicos.

**Substância-teste:** deve-se preferir utilizar a forma mais infectiva do AMC sempre que a infectividade represente o risco de maior importância. Da mesma forma, quando a toxicidade representar esse mesmo risco, o organismo teste deve ser exposto a uma forma do AMC que produz as maiores quantidades de toxina. A via de administração pode também ser importante na determinação da forma a ser testada.

Neste protocolo, o grau técnico do ingrediente ativo poderá ser empregado em todos os testes, exceto naqueles de campo real ou simulado, quando o produto formulado deverá ser utilizado para simular ou reproduzir uso real de campo. Qualquer substância utilizada na formulação para aumentar a virulência ou toxicidade também deverá ser testada.

**Doses de Máximo Risco:** As aves silvestres estarão expostas mais provavelmente através de sua dieta (insetos infectados e outros tipos de alimentos contaminados) ou através do produto em suspensão no ar (por deriva ou volatilização). É difícil se determinar teoricamente a quantidade máxima de AMC que uma ave silvestre pode consumir, mas uma quantidade de  $10^9$  é possível. Devido às restrições anatômicas, entende-se que esta dose nem sempre possa ser administrada. Desta forma, as doses orais ou injetáveis diárias recomendadas devem ser calculadas como se segue:

Portanto, para um produto cujo PT contém  $10^9$  unidades/ml, e considerando-se uma ave de 25 gramas, a máxima dose diária seria:

$$(10^9 \text{ unid/ml}) \times (5 \text{ ml/Kg}) \times (0,025 \text{ Kg}) = 1,25 \times 10^8 \text{ unid. de AMC}$$

OBS : A DOSE DEVE SER ADMINISTRADA EM ATÉ 5ml/Kg

Esta dose deve ser administrada por um período de 5 dias, de forma que a dose total que a ave receba oralmente, durante este período, seja de  $6,25 \times 10^8$  unidades;

Doses máximas para administração respiratória devem ser calculadas de forma semelhante, com exceção do volume administrado, que deverá ser reduzido de 5ml/kg para 0,2 ml/Kg;

Quando o AMC for usado por via injetável, ao invés de "5ml/kg de peso corporal", deve-se utilizar 0,5ml/kg de peso corporal para injeção intravenosa ou 2ml/kg de peso corporal para injeção intraperitoneal; Para AMC'S que produzem toxinas, frações desta dose devem ser calculadas para serem utilizadas diariamente por 5 dias. Deve-se apresentar uma justificativa convincente no caso de se reduzir o nível da dose de máximo risco.

## **I - TESTES DA FASE I**

Testes desta Fase são exigidos para o registro de PF'S (Produtos Formulados) a serem utilizados em aplicações externas e CF'S (Componentes de Formulação) a serem utilizados para formular PF'S.

**Condições gerais:** Toda ave testada deverá estar aparentemente saudável para o início dos testes, sendo aclimatada em gaiolas com facilidades de alimentação, antes do início do teste. A ave em cada gaiola será identificada por uma anilha colorida colocada no tarso;

**Espécies de aves testadas:** deverão ser utilizadas nestes testes: as espécies *Coturnix coturnix japonica* (codorna japonesa) e *Gallus gallus domesticus* (galinha doméstica).

A codorna tem sido recomendada como a ave teste na harmonização internacional de protocolos, como também tem sido usada com sucesso, demonstrando sensibilidade aos efeitos produzidos pelos produtos químicos tóxicos conhecidos. Também tem servido como uma boa espécie para laboratório, com a qual tem-se reunido um grande número de dados básicos (LYNCH, 1995).

Galinhas jovens também têm demonstrado sensibilidade aos efeitos produzidos por produtos químicos e agentes de controle microbiano de pragas, demonstrando ser boa espécie de laboratório.

**Idade:** as aves usadas devem ter idade de 14 a 24 dias, no início do período do teste. Dentro de um mesmo teste, todas as aves devem ter idades muito próximas.

**Grupo teste:** será formado por 15 aves. A via de administração do AMC dependerá do tipo de teste realizado. A dosagem será calculada pela dose de risco máximo, se possível. A dose diária não deverá exceder 1% do peso do corpo. A dose de máximo risco foi definida no início deste protocolo e deverá ser utilizada a mesma fórmula para cálculo.

**Grupo controle:** três grupos de testemunhas devem ser utilizados: (1) testemunha negativa (não tratada); (2) testemunha tratada com AMC inativado (de forma a manter a integridade das células do AMC); (3) testemunha em que as aves são tratadas com filtrados esterilizados, obtidos de culturas do AMC. Todas as aves deverão ser manipuladas de maneira idêntica ao grupo teste.

**Número de aves por dosagem:** cada tratamento e cada tipo de testemunha deve conter pelo menos 10 aves. Quando apenas um tipo de tratamento for testado, pelo menos 30 aves devem ser utilizadas para aquele teste.

**Concentrações dos tratamentos:** se o AMC produz uma toxina, um número suficiente de concentrações do mesmo deve ser testado para determinar a toxicidade. Se o AMC não produz uma toxina, ou não foi identificada nenhuma toxina, apenas um grupo de aves precisa ser testado na dose de máximo risco. Se forem observados sintomas devido à toxicidade ou patogenicidade, doses seqüencialmente mais baixas devem ser testadas.

**Preparação da dose:** a substância-teste será dosada sem o uso de um carreador, quando possível. Se necessário, a substância-teste será dissolvida ou suspensa em água destilada ou solução salina estéril.

**Duração do teste:** grupos controle e tratados devem ser observados por, pelo menos, 30 dias após o início do teste. Se forem manifestadas sintomatologias e sinais de intoxicação no final deste período, as observações devem continuar para se constatar a recuperação, mortalidade ou coma inequívoca. No geral, recomenda-se o seguinte esquema para a primeira Fase do teste e suas durações:

- aclimatação: até 15 dias;
- jejum: até 15 horas antes da aplicação;
- aplicação: no dia do início dos testes
- observação: até 14 dias após a aplicação.

**Dieta durante o teste:** todas as aves serão alimentadas com uma ração inicial, cuja formulação deve ser especificada. Alimento e água serão colocados nas gaiolas durante a aclimação e o teste. O alimento e a água serão analisados periodicamente de acordo com procedimentos específicos do laboratório. As aves não receberão nenhuma forma de medicação antibiótica na dieta durante o estudo.

**Manutenção e alojamento:** Durante o teste, as aves serão alojadas em gaiolas (pequenos cercados) ou equivalentes e serão identificadas por um desenho diferenciado. Como sugestão, cada gaiola deve ter um teto de aproximadamente 25x51 cm. Os tetos deverão ter inclinação média de 20 a 26 cm. As paredes externas, o piso e o teto de cada incubatório (= unidade reprodutora) deverão ser construídos de tela de arame, enquanto as paredes laterais serão construídas de ferro galvanizado. As aves serão mantidas numa temperatura de aproximadamente 15-30°C. A umidade relativa ambiente será registrada e a fotofase de 16 h luz por 8h escuro será mantida. As gaiolas e as práticas de manejo serão seguidas através de procedimentos-padrão preestabelecidos nas BPL.

**Eliminação da substância:** amostras de fezes das aves-testes serão coletadas logo após a administração inicial e diariamente durante os primeiros 7 dias após o tratamento, sendo também coletadas nos dias 14, 21 e 28 do teste. As fezes por grupo serão examinadas quanto à presença da substância-teste (AMC) para estimar "clearance" (eliminação) do AMC, após a administração por gavagem.

**Necropsia:** as aves encontradas mortas durante o estudo serão necropsiadas por cortes patológicos finos. Quaisquer sinais de multiplicação do AMC, como a formação de plaquetas, serão registrados. Atenção particular será dada no exame do fígado, coração, pulmão, dos sacos aéreos e do trato gastrointestinal. Qualquer evidência de multiplicação do AMC será confirmada pela coleta dos tecidos, e estes serão submetidos a culturas para isolamento do AMC.

Todas as aves sacrificadas no final do estudo serão necropsiadas. Infectividade ou persistência serão avaliadas pelo uso de técnicas para determinação da presença do AMC no tecido ou órgãos das aves mortas. O AMC teste será quantificado no rim, cérebro, fígado, pulmão, baço, sangue, nódulos linfáticos e diretamente em alguma lesão observada.

**Avaliação dos testes:** todas as aves serão observadas pelo menos diariamente para se verificar as respostas toxicológicas ou patológicas e a mortalidade. Se os sintomas de toxicidade e mortalidade persistirem por 28 dias, o período de observação será estendido. Os seguintes dados devem ser observados/realizados:

- (1) obter o peso médio para cada grupo teste e testemunha no início do teste e semanalmente a partir de então;
- (2) pesar o total de alimento para cada grupo teste e testemunha a intervalos semanais;
- (3) anotar hora e data das mortalidades;
- (4) anotar qualquer sinal de intoxicação, comportamento anormal e regurgitação (se ocorrer alguma);
- (5) anotar qualquer sintomatologia patogênica ou modificações patológicas;
- (6) realizar necropsias e achados histopatológicos em todas as aves que morrerem antes do término do teste e em uma amostra representativa das que sobreviverem. A necropsia deve incluir diferentes órgãos: fígado, trato gastro-intestinal, rins, baço, sistema cérebro-espinhal. Amostras de sangue também devem ser analisadas. Incluir as técnicas apropriadas de isolamento do AMC dos tecidos examinados;

- (7) anotar achados histopatológicos e das lesões observadas;
- (8) isolar os AMC dos tecidos (plaqueamento ou outros testes).

**Elaboração do relatório:** além das informações especificadas no item *Elaboração dos Relatórios*, na Seção “Informações Gerais”, os seguintes dados devem ser registrados:

- (1) Espécies testadas;
- (2) Idade das aves testadas;
- (3) Peso de cada grupo teste e testemunha no início do teste e semanalmente a partir de então;
- (4) Análise de dieta (especialmente antibióticos);
- (5) Dimensões da gaiola;
- (6) Temperatura ambiente e umidade;
- (7) Fotoperíodo e iluminação;
- (8) Consumo total de alimento para cada grupo teste e testemunha a intervalos semanais;
- (9) Método de preparação do material teste, concentração do AMC e total administrado;
- (10) Identificação do veículo usado para dispersar o agente e quantidade média do veículo administrado a cada ave, se o veículo não for água;
- (11) Número de aves por grupo;
- (12) DL<sub>50</sub> ou DI<sub>50</sub> em unidades apropriadas com intervalo de confiança de 95%, se apropriado;
- (13) Métodos usados para cálculo da DL<sub>50</sub> ou DI<sub>50</sub>;
- (14) Ângulo da linha dose-resposta, se apropriado;
- (15) Hora e data das mortalidades;
- (16) Qualquer sinal de intoxicação, comportamento anormal e regurgitação (se ocorrer alguma);
- (17) Qualquer sintomatologia patogênica ou modificações patológicas;
- (18) Resultados de necrópsias e achados histopatológicos conduzidos em todas as aves que morrerem antes do término do teste e em uma amostra representativa das que sobreviverem. O relato da necrópsia deve incluir qualquer evidência de efeitos sobre os diferentes órgãos, incluindo fígado, trato gastro-intestinal, rins, baço, sistema cérebro-espinhal. Amostras de sangue também devem ser analisadas. Os resultados também devem incluir tentativas, usando técnicas apropriadas de reisolamento do AMC dos tecidos examinados;
- (19) Resultado de avaliação clínica dos achados histopatológicos e das lesões observadas;
- (20) Resultados do significado clínico do isolamento de AMC nos tecidos.

#### **Teste de Patogenicidade e Toxicidade Oral (Fase I)**

O objetivo deste teste é avaliar a patogenicidade/toxicidade de uma substância-teste administrada oralmente para aves.

A substância-teste será administrada por “gavage”. Esta via de administração é selecionada porque permite que uma quantidade precisa da substância seja administrada para um peso de corpo específico. Essa via também se correlaciona à exposição oral aguda usada em mamíferos.

**Aves teste:** galinhas domésticas jovens (7 a 10 dias). No mínimo 30 aves, sendo 15 para o tratamento e 15 para o controle. Durante o teste as aves deverão ser mantidas em gaiolas individuais. O peso das aves no

início dos testes deverá ser de 50 a 150g. Todas as aves serão aclimatadas em gaiolas que serão usadas nos testes, no mínimo 3 dias antes deles. A identificação de cada ave será por etiquetas coloridas nas pernas.

**Dieta durante o teste:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

**Manutenção e Alojamento:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

**Grupo teste:** será formado de 15 aves. Cada ave receberá o AMC por “gavage” diretamente no proventrículo ou papo, utilizando-se de uma canula de aço inox. A dosagem será calculada pela dose de máximo risco, se possível. A dose diária não deverá exceder 1% do peso do corpo. A dose de máximo risco foi definida no início deste protocolo e deverá ser utilizada a mesma fórmula para cálculo.

**Grupo controle:** as aves deverão ser manipuladas de maneira idêntica às do grupo teste, recebendo doses do diluente utilizado ou solução salina estéril, na dose volume máximo administrada às aves do grupo teste.

**Preparação da dose:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

**Avaliações:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

**Eliminação da substância:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

**Necrópsia:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

#### **Teste de Patogenicidade/Toxicidade Pulmonar (Fase I)**

Dados sobre a patogenicidade inalatória aguda do AMC são exigidos para fins de registro do ia/PF a ser utilizado em aplicações externas, para cada CF a ser utilizado legalmente para a formulação de PF. Uma exposição inalatória pode ser aceitável em lugar de instilação e, para alguns AMC'S, o solicitante poderá conceder uma isenção deste teste, perante uma justificativa apropriada.

**Via de exposição:** O material a ser testado deve ser administrado por instilação intranasal ou intratraqueal. Dependendo das propriedades físicas do agente em teste, uma via alternativa, tal como um aerosol, envolvendo os tecidos respiratórios pode ser utilizada. Contudo, o uso de via alternativa precisa ser justificado.

#### **a) teste via instilação traqueal**

Nos testes de administração do AMC via instilação traqueal, 15 galinhas domésticas de 7 a 10 dias de idade serão utilizadas. A dose testada será a de máximo risco, se possível. Cada dose não deverá exceder 0,05ml, e devendo conter no mínimo  $10^6$  unidades formadoras de colônias (CFU). Um grupo de 15 aves deverá ser mantido como controle. As aves em teste deverão ser observadas por um período mínimo de 28 dias, para avaliação de respostas patológicas/toxicológicas.

A instilação traqueal é via de administração preferida, porque permite que uma quantidade precisa da substância-teste seja administrada em um peso de corpo específico. Esta via de administração é também uma via potencial de exposição do AMC no ambiente.

**Grupo teste:** cada ave do grupo-teste receberá o AMC por “gavage” diretamente dentro da traquéia, utilizando-se uma cânula de aço inox.

**Grupo controle:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

**Preparação da dose:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

**Avaliações:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes de Patogenicidade/Toxicidade (Fase I).

**Eliminação da substância:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes de Patogenicidade/Toxicidade (Fase I).

**Necrópsia:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes de Patogenicidade/Toxicidade (Fase I).

## **b) teste via instilação intranasal**

Seguir os mesmos procedimentos descritos para a instilação traqueal. A única diferença é que o grupo teste receberá o AMC diretamente nas fossas nasais.

### **Teste de Patogenicidade/Toxicidade Intravenosa (Fase I)**

Dados sobre a patogenicidade/toxicidade intravenosa são exigidos para avaliar a toxicidade e patogenicidade de uma substância-teste (AMC) administrada por injeção intravenosa, em formas jovens de galinha doméstica. Esta via de inoculação permite que uma quantidade precisa da substância-teste possa ser administrada. Ela também maximiza a exposição das aves à substância-teste, uma vez que ultrapassa todas as barreiras naturais de defesa do organismo.

Quinze galinhas jovens (7 a 10 dias de idade) e com peso de 50 a 150g serão injetadas com a substância-teste para o teste inicial. A dose será a de máximo risco, se possível. Cada dose não excederá 0,1ml, contendo pelo menos  $10^7$  unidades formadoras de colônias (CFU) por ave. As aves terão peso de 50 a 150g para o início do teste. Todas as aves testes serão aclimatadas em gaiolas que serão utilizadas no estudo, pelo menos 3 dias antes ao início do teste. As aves serão somente identificados pela coloração das etiquetas das pernas.

**Grupo controle:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

**Dieta durante o teste:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

**Manutenção e Alojamento:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

**Peso do corpo do animal/Composição do alimento:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

**Avaliações:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

**Necrópsia:** seguir a metodologia descrita nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

**Registros a serem armazenados:** seguir a metodologia descritas nas Condições Gerais dos Testes da Fase I.

## **I PROGRESSÃO DA FASE:**

Se quaisquer sinais de patogenicidade ou de toxicidade forem observados em quaisquer das doses utilizadas, testes da Fase II serão exigidos. Em alguns casos, um teste subcrônico pode servir para um melhor entendimento dos efeitos observados na Fase I, eliminando a necessidade de desenvolvimento de testes da Fase II. Se efeitos de toxicidade ou de patogenicidade não forem observados na Fase I, testes das Fases seguintes não são exigidos. Entretanto, a critério do órgão federal registrante, testes adicionais poderão ser requisitados se for determinada a existência de um risco potencial a aves, apesar dos resultados negativos da Fase I.

Dados obtidos na Fase I serão utilizados em conjunto com informações disponíveis sobre a forma de uso, especificidade e outros fatores para avaliar o potencial de efeitos adversos.

## **II - TESTES DA FASE II:**

Esta Fase está descrita de forma detalhada na Seção deste documento denominada "Protocolo de Avaliação do Comportamento do Agente Microbiano de Controle no Ambiente Terrestre", uma vez que se aplica a qualquer organismo não-visado.

## **III - TESTES DA FASE III:**

Os testes da Fase III são exigidos para o registro de cada PF e CF a serem usados para formular um PF, quando efeitos patogênicos ou tóxicos sobre aves forem observados em um ou mais testes da Fase I e os resultados dos testes da Fase II indicarem a exposição, a longo prazo daqueles organismos terrestres, em níveis baixos de resíduos do AMC no campo.

### **Teste de Patogenicidade Crônica e Reprodução em Aves**

Estes testes têm o objetivo de determinar efeitos crônicos que poderiam ocorrer quando as aves são expostas a níveis baixos do AMC, por um longo período de tempo.

**Espécies Teste:** A espécie selecionada deve ser a mesma utilizada para os testes da Fase I ou uma espécie de ave sugerida pelo órgão federal registrante. Outras espécies podem ser utilizadas, contanto que o requerente tenha justificativas convincentes para tal fato, baseadas em uma maior susceptibilidade da espécie selecionada ao AMC ou em considerações ecológicas que impeçam o uso das espécies recomendadas.

**Idade:** As aves utilizadas devem estar se aproximando de sua primeira estação de reprodução.

**Controle:** Um grupo testemunha é exigido e deve ser tratado com AMC inativado.

**Tipos de tratamento:** Pelo menos duas concentrações do AMC devem ser utilizadas. Dentre elas, uma deve corresponder à concentração de resíduo real, ou esperada no campo, e um múltiplo deste.

**Métodos de administração do AMC:** sempre que possível, o AMC deve ser incorporado à alimentação. A viabilidade do AMC na alimentação deve ser analisada e uma nova alimentação deve ser preparada com uma frequência suficiente para assegurar que os animais testados recebam uma dose constante durante todo o estudo. Vias alternativas de administração podem ser sugeridas com antecedência ao órgão registrante para um AMC particular.

**Número de aves por grupo:** cada grupo tratado ou controle deve ter pelo menos 12 repetições, devendo haver um número mínimo de 12 aves por repetição.

**Duração da exposição:** as aves devem ser expostas aos alimentos tratados pelo menos 10 semanas antes da data prevista para oviposição, permanecendo expostas através de toda a estação de oviposição.

**Duração do teste:** o teste não deve terminar antes de 14 dias após a eclosão dos últimos filhotes.

**Avaliação dos testes:** além das avaliações exigidas, descritas nas "Condições Gerais dos Testes de Aves", outras avaliações deverão ser conduzidas nos testes da Fase III:

(1) Dados sobre os ovos e eclosão dos filhotes:

- Ovos postos por ave, por dia e por estação;
- Condições de incubação dos ovos: temperatura, umidade, número de ovos na incubadora, frequência de rotação dos ovos;
- Número de ovos fecundados;
- Número de eclosões;
- Porcentagem de eclosão;
- Número de embriões mortos;
- Anomalias físicas dos filhotes;
- Todos os sinais e sintomas clínicos observados;
- Mortalidade pós-eclosão;
- Peso de sobreviventes após 14 dias da eclosão.

(2) Monitoramento do AMC: a concentração do AMC na ração deve ser monitorada semanalmente (ou mais freqüentemente, se a viabilidade do AMC for curta). Para grandes quantidades de ração tratada, um método de amostragem estatisticamente aceitável deve ser empregado.

### **Análise dos resultados e relatório:**

Além das informações especificadas em "Elaboração de Relatórios", na Seção "Informações Gerais" deste documento, os seguintes dados devem ser apresentados:

- (1) Métodos utilizados na condução dos testes descritos em detalhes ou referenciados adequadamente, no caso de se utilizar metodologia já publicada;
- (2) Idade;
- (3) Número e sexo das aves em cada grupo;
- (4) Identificação individual das aves;
- (5) Composição da dieta e aditivos (principalmente antibióticos);
- (6) Condições de armazenamento da dieta e resultados de avaliações periódicas do conteúdo de AMC;
- (7) Consumo diário de alimento (peso);
- (8) Observações sobre a palatabilidade e a rejeição;
- (9) Condições de abrigo das aves: espaço disponível para acasalamento e nidificação, ações tomadas para assegurar que as aves estariam protegidas de injúrias e programa de iluminação, incluindo fotoperíodo e intensidade luminosa em nível das aves;
- (10) Diagrama da disposição dos tratamentos;
- (11) Temperatura, origem da água e sua caracterização microbiológica e química, caso não tenha se utilizado água destilada;
- (12) Pré-teste e histórico dos organismos testados com respeito a tratamentos médicos e químicos;
- (13) Dados sobre os ovos e eclosão dos filhotes: usar as mesmas informações obtidas na Avaliação dos Testes da Fase III;
- (14) Monitoramento do AMC: usar as mesmas informações obtidas na Avaliação dos Testes.

**Progressão da Fase:** Se nenhum efeito patogênico for observado em níveis de exposição de resíduos reais ou esperados no campo, normalmente nenhum teste adicional será exigido.

Se efeitos patogênicos e/ou outros efeitos na reprodução forem observados em níveis reais ou esperados de exposição ao AMC, as seguintes situações são esperadas:

- (i) O requerente reconsiderará a solicitação de registro do produto;
- (ii) O órgão federal registrante irá rever todos os dados para uma tomada de decisão e exigir os testes da Fase IV.

## **IV - TESTES DA FASE IV**

Os testes da Fase IV, que são conduzidos em ambientes simulados ou reais de campo, podem não ser exequíveis se não existirem métodos adequados de contenção ou quarentena do AMC. Se esses métodos forem disponíveis, então os testes da Fase IV serão exigidos.

A exigência destes estudos será determinada caso-a-caso, quando efeitos adversos forem observados na Fase III. O requerente deve consultar o órgão federal com relação à necessidade e à metodologia específica a serem utilizadas

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- BRUSCA, J.; SUMMERS, M.; COUCH, J.; COURTNEY, L. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus efficiently enters but does not replicate on poikilothermic vertebrate cells. **Intervirology**, v.26, p. 207-222, 1986.
- ENTWISTLE, P.F.; ADAMS, P. H. W.; EVANS, H. F. Epizootiology of a nuclear polyhedrosis virus in European spruce sawfly (*Gilpina hercyniae*): the rate of passage infective virus through the gut of birds during cage tests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.31, p.307-312, 1977a.
- ENTWISTLE, P.F.; ADAMS, P.H.W.; EVANS, H.F. Epizootiology of a nuclear polyhedrosis virus in European spruce sawfly (*Gilpina hercyniae*): the status of birds as dispersal agents of the virus during the larval season. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.29, p.354-360, 1977b.
- FENNER, F.; MCAUSLON, B.R.; MIMS, C.A.; SANBROOK, J.; WHITE, D.O. **The biology of animal viruses**. 2.ed. New York: Academic Press, 1974.
- FRIEND, M. Duck hepatitis virus interaction with DDT and Dieldrin in adult mallards. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.7, n.4, p.202-206, 1972.
- FRIEND, M. Experimental duck virus hepatitis in the mallard. **Avian Disease**, v.16, n.4, p.692-699, 1971.
- FRIEND, M. Experimental DDT-Duck hepatitis virus interaction studies. **Journal of Wildlife Management**, v.38, n.4, p.887-895, 1974a.
- FRIEND, M. Experimental Dieldrin-Duck hepatitis virus interaction studies. **Journal of Wildlife Management**, v.38, n.4, p.896-904, 1974b.
- FRIEND, M.; TRAINER, D.O. Polychlorinated biphenyl: interaction with duck hepatitis virus. **Science**, v.170, n.3964, p.1314-1316, 1970.
- FRIEND, M.; TRAINER, D.O. Experimental duck virus hepatitis in the mallard. **Avian Disease**, v.16, n.4, p. 692-699, 1971.
- FRIEND, M; TRAINER, D.O. Experimental DDT-Duck hepatitis virus interaction studies. **Journal fo Wildlife Management**, v.38, n.4, p.890-895, 1974a.
- FRIEND, M.; TRAINER, D.O. Experimental Dieldrin-Duck hepatitis virus interaction studies. **Journal fo Wildlife Management**, v.38, n.4, p.896-902, 1974b FRIEND, M.; TRAINER, D.O. Experimental Dieldrin-Duck hepatitis virus interaction studies. **Journal fo Wildlife Management**, v.38, n.4, p.896-902, 1974b.
- HARTMANN, G.C.; WASTI, S.S. Avian safety of three species of entomogenous fungi. **Comparative Physiology Ecology**, v.5, n.4, p.242-245, 1980.
- HEINZ, G.H.. Methylmercury: Second year feeding effects on mallard reproduction and duckling behavior. **Journal of Wildlife Management**, v. 40, n.1, p. 82-90, 1976.

- HEINZ, G.H.; LOCKE, L.N. Brain lesions in mallard ducklings from parents fed methylmercury. **Avian Diseases**, v.20, n.1, p.9-17, 1976.
- IGNOFFO, C.M.. Effects of entomopathogens on vertebrates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.217, p.141-164, 1973.
- LAUTENSCHLAGER, R.A.; PODGWAITE, J. D. Passage of nucleopolyhedrosis virus by avian and mammalian predators of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Environmental Entomology**, v.8, n.2, p.210-214, 1979.
- LYNCH, M.R., ed. **Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicology of pesticides**. Brussels: Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 1995. 54p.
- NARAYANAN, K.; SANTHARAM, G.; EASWARAMOORTHY, S.; JAYARAJ, S. Lack of susceptibility of poultry birds to nuclear polyhedrosis virus of groundnut red-hairy caterpillar, *Amsacta albistriga* (W.). **Indian Journal of Experimental Biology**, v.16, n.12, p.1322-1324, 1978.
- NORDLUND, D.A.; LEWIS, W.J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Chemical Ecology**, v.2, n.2, p.211-220, 1976.
- PODGWAITE, J.D. GALIPEAU, R.R.. **Effects of nucleopolyhedrosis virus on two avian predators of the gypsy moth**. Washington. D.C.:USDA, 1978. 2p. (USDA Forest Service Research Note, NE- 251).
- SLESIN, L.; SANDLER, R. Categorization of chemicals under the Toxic Substances Control Act. **Ecology Law Quarterly**, v.7, p.359-396, 1978.
- SUMMERS, M.; ENGLER, R.; FALCON, L.A.; VAIL, P., ed. Guidelines for safety testing of baculoviruses. In: SUMMERS, M.; ENGLER, R.; FALCON, L.A.; VAIL, P., ed. **Baculoviruses for insect pest control: safety considerations - selected papers from EPA-USDA Working Symposium**. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1975. p.179-184.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Registration of pesticides in the United States: proposed guidelines, Subdivision E.Hazard Evaluation: wildlife and aquatic organisms. **Federal Register**, v.43, n.132, p.29724-29737, 1978.
- U.S. Environmental Protection Agency. Registration of pesticides in the United States: proposed guidelines. Subdivision E-Hazard evaluation: wildlife and aquatic organisms. **Federal Register**, v.43, n.132, p.29729-29731, 1978.
- WEISS, B.; LATIES, V.G. Assays for behavioral toxicity: a strategy for the environmental Protection Agency. In: TEST methods for definition of effects of toxic substances on behavior and neuromotor function, neuro-behavioral toxicology. Washington, D.C.: ANKHO International, 1979. v.1, suppl.1, p. 213-215. (Report EPA 560/11-79-016).
- WOLF, K. Evaluation of the exposure of fish and wildlife to nuclear polyhedrosis and granulosis viruses. In: SUMMERS, M.; ENGLER, R.; FALCON, L.A.; VAIL, P., ed. **Baculoviruses for insect pest control: safety considerations**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1975. p. 109-111.

## **PROCOLOS ADICIONAIS**

Nesta parte do protocolo foram incluídas algumas metodologias utilizadas para a realização dos testes de patogenicidade/toxicidade em aves.

Os procedimentos descritos foram elaborados pelo WILDLIFE International Laboratories Ltda - Easton, Maryland, Estados Unidos e fornecidos durante um curso organizado pelos autores deste volume, os quais foram autorizados a publicá-los.

### **1. Alojamentos e condições ambientais das aves em teste**

As aves para os testes deverão ser confinadas em baterias de gaiolas especiais. Como sugestão, recomenda-se o uso de gaiolas com um fundo medindo aproximadamente 78 x 51 cm. A distribuição das aves por gaiola será por meio de sorteio indiscriminado. Cada gaiola deverá acomodar 5 machos e 5 fêmeas. Cada grupo será identificado por um número da gaiola e as aves deverão ser mantidas em ambiente com temperatura de aproximadamente 20-30°C. A umidade relativa do ambiente deverá ser de 40-80% e será mantido o fotoperíodo de 8 horas de claridade/16 horas de escuridão.

### **2. Observações clínicas das aves**

Observações clínicas das aves serão feitas nas gaiolas. A frequência das observações durante o estudo será especificada no protocolo, entretanto as observações das aves em aclimação e os testes de verificação de patogenicidade/toxicidade geralmente são feitos diariamente. Observações clínicas incluem anotação da aparência física de cada ave; seu comportamento geral; sua plumagem; locomoção e reação para a presença do observador. Se as aves forem mantidas em grupos ou casais, deve-se dispensar atenção para as interações com as outras aves da gaiola.

As anotações das observações das aves em aclimação serão mantidas na folha de dados sobre aclimação, enquanto aquelas dos testes definitivos serão mantidas nas folhas de observação, no conjunto de dados da autópsia. Se sinais de toxicidade/patogenicidade ou mortalidade persistirem por um período de 14 dias, o período de observação deverá ser prolongado.

### **3. Peso da ave/alimento consumido**

O peso de cada animal será tomado no início do teste e nos dias 3, 7 e 14 do mesmo. O cálculo estimado de alimento consumido será determinado para cada grupo de dosagem e controlado para os períodos 0-3, 4-7 e 8-14. Se o teste é prolongado, o peso da ave e o alimento consumido serão calculados no término. Se o teste se prolongar para mais 7 dias, o peso da ave e o consumo de alimento serão medidos pelo desempenho semanal e no final do teste. A exatidão do valor do alimento consumido poderá ser afetada pela perda inevitável de alimento pela ave. Nenhuma tentativa deverá ser feita para quantificar a quantia de perda de alimento, pelo fato dela estar normalmente espalhada e misturada com a água e as fezes.

#### **3.1. Determinação do peso do corpo da ave**

As aves serão pesadas em balanças elétricas de prato superior ou outro instrumento apropriado.

Aves designadas para medição e pesagem corporal deverão ser cuidadosamente removidas de suas gaiolas e colocadas em recipientes de pesagem apropriados, construídos em plástico, papelão ou outros materiais. Os recipientes deverão ter forma e tamanho apropriados para reter as aves sem sofrimentos.

Geralmente o peso é medido arredondando-o para o grama mais próximo. Entre cada pesagem, a balança deverá ser checada para assegurar se está zerada. O recipiente de pesagem será pesado na balança antes da adição da ave; o peso líquido de cada ave ou grupo delas será anotado na coluna apropriada do formulário de controle de peso.

Se os pesos individuais não forem determinados, o número de aves pesadas será anotado no local apropriado do formulário de controle de peso. Se os pesos individuais forem determinados, cada identificação da ave e seu peso serão anotados. Após pesagem, as aves deverão ser cuidadosamente recolocadas nas gaiolas apropriadas. No término da fase do estudo em vida, as aves deverão ser pesadas antes da eutanásia ou logo em seguida.

### **3.2. Alimentação e Consumo de Alimento**

Durante a alimentação das aves, a pessoa responsável pelo procedimento deverá sempre utilizar equipamento individual de segurança, incluindo luvas descartáveis, máscara ou respirador, roupa de laboratório ou avental;

A alimentação dos controles (testemunha) deverá ser manipulada primeiro, sendo seguida pelo aumento da concentração de alimentação tratada (Se este procedimento não for seguido, as vasilhas devem ser esvaziadas e as luvas trocadas entre cada concentração e dieta do controle);

Antes de colocar cada vasilha de alimento para as aves, o peso de cada comedouro somado com o peso da comida será determinado em balança apropriada, calibrada antes do uso. Alternativamente, somente o peso da comida será pesado, mas deverá ser anotado no formulário;

Quando uma série de comedouros for pesada, a balança deverá ser checada entre cada pesagem, para se certificar que ela esteja zerada;

Se alimentação adicional for exigida entre as medidas de consumo de alimento agendadas, ela será pesada e adicionada aos comedouros, usando os métodos descritos acima. A quantidade de alimento adicional deverá ser anotada e colocada no espaço apropriado;

No final de cada intervalo de pesagem da comida (especificado no protocolo), o peso do comedouro mais o peso do alimento restante no comedouro serão determinados. Se somente o alimento (sem o comedouro) foi pesado no início do intervalo de pesagem da comida, então apenas o alimento restante será pesado no final do intervalo. Esta medida será anotada devidamente na seção alimento consumido do formulário;

O consumo de comida será determinado pela diferença entre o fornecido e o recolhido. A certeza do nível de consumo do alimento poderá ser afetada pelo desperdício de comida pelas aves;

A média de alimento consumido por ave por dia poderá ser determinada dividindo-se o valor do alimento consumido pelo número de aves. Dia da Ave é definido como o número de aves vivas em uma gaiola experimental, durante um período de 24 horas multiplicado pelo número de períodos de 24 horas;

Se todas as aves morrerem antes do último dia do intervalo de medida de consumo de alimento especificado no protocolo, o alimento restante será pesado, mas o valor do consumo de alimento não será calculado para este intervalo de tempo. O alimento poderá ser pesado a qualquer hora durante o restante do

intervalo. O valor para o consumo de alimento não calculado será representado como um “-” no relatório da autópsia e anotado como um valor que não foi calculado, por ocasião da mortalidade total;

Se o consumo de alimento é calculado diariamente em um período curto de estudo (ex.: 14 dias), a data em que o alimento é trocado deve ser anotada, assim como o número de dias da ave;

Na ocasião em que o alimento de um comedouro aparecer inadvertidamente molhado, o comedouro será removido oferecendo-se um alimento fresco, com a apropriada concentração da substância-teste. O diretor do estudo ou pesquisador principal irá determinar se os dados estão em risco e em qual caso se secará o alimento. O método de secagem será escolhido pelo diretor do estudo e será documentado no relatório da autópsia.

#### **4. Identificação de aves/gaiolas**

##### **4.1. Identificação Individual de Aves**

- 1 - O protocolo de estudo irá indicar se a identificação individual da ave é necessária.
- 2 - Indivíduos deverão ser identificados por anilhas atadas à perna, à asa, ao pé ou ao pescoço. Números aplicados e cores das anilhas serão anotados. Se a cor for marcada, o seguinte código poderá ser usado:  
V - vermelho      Az - azul      Am - amarelo  
Vd - verde      A ou Al - alumínio
- 3 - Alternativamente, as aves poderão ser identificadas por um dedo cortado e/ou membrana interdigital cortados. A tesoura ou outro instrumento adequado é usada para remover completamente a unha do dedo designado ou para fazer um corte de aproximadamente 1 cm na membrana interdigital correndo paralelamente ao dedo. Dedos e/ou membranas cortados deverão ser anotados no relatório da autópsia. Membranas cortadas normalmente são representadas diagramalmente, enquanto dedos cortados são designados por uma letra (E para pé esquerdo e D para pé direito) e um número representando o dígito (contando do 1º dedo ou hálux). Dedos e membranas cortados são representados como se segue:  
ex: E4 = quarto dedo do pé esquerdo

##### **4.2. Identificação das gaiolas**

- 1 - Cada gaiola será identificada por uma letra única e/ou um número. A etiqueta com a identificação será afixada em cada gaiola ou a identificação deverá ser feita diretamente na gaiola com um marcador permanente. Conjuntos de gaiolas (ex.: baterias de criadouros) deverão receber uma letra designando o conjunto com um número para as gaiolas, individualmente. A numeração da gaiola deverá ser feita no topo ou no topo esquerdo da mesma.
- 2 - Identificadores das gaiolas deverão ser anotados no relatório da autópsia ou, se as aves estiverem em aclimatação, na folha de observação diária para o registro de aclimatação.
- 3 - No início do teste, uma etiqueta contendo o número do projeto e a dosagem aplicada ou a concentração da dieta deverá ser afixada em cada gaiola ou na primeira gaiola de um conjunto.
- 4 - Comedouros serão etiquetados com o correspondente número da gaiola para que durante os estudos, quando a ração for removida dos comedouros e os mesmos reenchidos, eles sejam recolocados nas gaiolas das quais foram removidos, em ordem, para minimizar a contaminação cruzada entre tratamentos.

## 5. Necrópsia das aves

Quando uma necrópsia menos detalhada (grosseira) for requerida no protocolo aprovado, ela deverá ser executada tão logo possível após a ave ser encontrada morta ou eutanizada. Se as aves não puderem ser necropsiadas imediatamente (ex.: quando as aves são encontradas mortas ou eutanizadas no fim do dia, em fins-de-semana ou em feriados) elas deverão ser guardadas em refrigerador ou câmara fria até a necrópsia. Nesses casos, a necrópsia deverá ser executada tão logo quanto possível, normalmente no primeiro dia regular de trabalho.

Este tipo de necrópsia inclui: uma inspeção geral da aparência externa da ave, o trato digestivo, o fígado, os rins, o coração, os pulmões, o baço e o sistema reprodutor. Todas as observações patológicas feitas, bem como outras informações necessárias, serão anotadas no formulário de necrópsia não detalhada.

As seguintes abreviações poderão ser usadas para descrever as observações:

NE - não encontrado

LC - lesão na cabeça

LP - lesão no pé

AN - aparência normal

PO - peritonite por rompimento do ovo

Códigos adicionais poderão ser utilizados e deverão ser anotados na folha de interpretação dos códigos.

A carcaça e alguns tecidos que restam no término do exame patológico serão eliminados por incineração, ou por outro método especificado pelo protocolo ou pelo coordenador.

O descarte/eliminação das aves será feito em concordância com as regulamentações locais, estaduais ou federais.

As aves que requerirem uma avaliação mais apurada que aquela obtida pela necrópsia menos detalhada, deverão ser enviadas para o Laboratório de Patologia ou outra organização capaz de realizar a avaliação necessária. Aves submetidas a uma avaliação de outro laboratório devem ser congeladas, refrigeradas ou mantidas em temperatura ambiente, dependendo do tipo de avaliação patológica que será executada e de quão rápida será feita. O diretor do estudo e os patologistas irão determinar o melhor método de armazenamento das carcaças.

## 6. Destino final das aves utilizadas

Em cada término de teste, a ave utilizada será sacrificada por meio de dióxido de carbono, deslocação cervical ou outro método apropriado. O método utilizado será documentado. Toda ave será conduzida ao incinerador ou outro local apropriado.

# PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO TOXICOPATOLÓGICA EM ARTRÓPODOS BENÉFICOS: PREDADORES, PARASITÓIDES E POLINIZADORES

---

## PARTE II PRINCIPAIS ASPECTOS

Muitos AMC'S são selecionados e/ou desenvolvidos com base em sua capacidade de controlar insetos. Desta forma, insetos não-visados representam um grupo de alto risco, sendo, em muitos casos, muito próximos dos organismos visados. Se por um lado existem poucos insetos não-visados de importância econômica, por outro existem muitos insetos não-visados que desempenham papel importante nos processos ecológicos e podem beneficiar o ser humano indiretamente.

O círculo de hospedeiros de um AMC é um fator de risco importante na avaliação de um biopesticida. Normalmente, ele é determinado sob condições de laboratório (círculo de hospedeiros fisiológicos), o que nem sempre corresponde ao círculo de hospedeiros ecológicos que ocorre em condições de campo. Extrapolações de resultados de laboratório para campo nem sempre são reais e devem ser cuidadosamente avaliadas, no sentido de não serem eliminados os candidatos promissores ao controle biológico de artrópodos.

Cada experimento para se determinar o círculo de hospedeiros de laboratório deve ser delineado para cada tipo específico de AMC e hospedeiro, sendo impossível desenvolver um protocolo geral do tipo "receitas de bolo".

Por motivos de ordem prática, este documento determina e aceita o uso de representantes de alguns artrópodos benéficos para a realização dos testes exigidos pelos órgãos federais registrantes. As informações desses testes serão utilizadas, conjuntamente com os dados do círculo de hospedeiros (conhecidos durante o desenvolvimento do produto), para o conhecimento mais preciso da gama total de hospedeiros do AMC.

Testes de toxicidade e patogenicidade em artrópodos predadores ou parasitas e polinizadores são indicados para todos os AMC'S. A escolha dos artrópodos benéficos é feita pelo solicitante, o qual deverá utilizar representantes dos grupos que mais provavelmente estarão expostos, sob as condições de uso do AMC, apresentando algum relacionamento importante com a praga a ser controlada. O requerente deverá justificar a razão da escolha das espécies feita por ele.

### **Procedimentos Gerais**

#### ***1- Vias de Administração do AMC***

A melhor via de exposição dependerá do tipo de AMC utilizado, da exposição do artrópodo benéfico aos agentes microbianos e da forma de parasitismo/predação do organismo não visado. As vias de exposição devem simular, sempre que possível, as encontradas no campo.

- (1) **Vírus ou Bactérias:** Quando esses AMC'S tiverem um parasitismo de desenvolvimento interno, os artrópodos não-visados poderão ser alimentados com hospedeiros infectados pelo vírus ou pela bactéria. Entretanto, se forem mantidos "in vitro", o vírus ou a bactéria poderão ser adicionados à dieta. Deve ser lembrado que, no geral, para vírus e bactéria, a melhor via de infecção é a oral por ingestão.
- (2) **Protozoários:** adultos e estágios imaturos de parasitóides e predadores devem ser expostos aos protozoários. No caso de predadores, os estágios imaturos podem ser alimentados com hospedeiros infectados com o protozoário por um período de tempo e então analisados para verificar se foram infectados. Neste caso, a melhor forma de administração é a oral e por contato. No caso de parasitóides, hospedeiros previamente infectados podem ser expostos ao parasito, como também hospedeiros previamente parasitados podem ser alimentados com protozoários. Parasitóides de hospedeiros infectados devem ser examinados para verificar se estão infectados pelo protozoário. Se possível, um parasitóide primário, díptero ou himenóptero deve ser testado. A melhor via de infecção para adultos de himenópteros e dípteros é a administração oral de esporos de protozoários. Insetos predadores também podem ser alimentados desta maneira. Entretanto, alimentá-los com hospedeiros vivos de idade conhecida, previamente infectados, é mais apropriado. Em ambos os casos, é difícil se determinar a quantidade de esporos consumidos. Caso ocorra infecção do adulto do parasitóide ou predador, deve-se examinar a possibilidade de transmissão transovariana ou transovular.
- (3) **Fungos:** no caso de fungos entomopatogênicos, as condições ambientais no momento da exposição são da maior relevância. A melhor via de administração é por contato; de forma alternativa, pode-se usar a ingestão oral através do alimento e a injeção contendo a suspensão do AMC, diretamente no hemocele do artrópodo.

**Controle:** Um grupo testemunha deve ser utilizado, sendo tratado com o material de cultivo ou propagação do AMC, contendo ou não o AMC em uma forma não viável (inativado).

## ***II - Duração do Teste***

- (1) **Vírus:** insetos testemunhas e tratados devem ser observados por pelo menos 30 dias após a administração do AMC. Quando um artrópodo não puder ser mantido durante todo este período, o teste deverá continuar até que a mortalidade do grupo testemunha atinja 20%. Em casos em que sinais, sintomas e patologias sejam detectadas, os artrópodos tratados devem ser examinados em detalhe nos estágios finais de infecção, quando moribundos. Quando morrerem, é essencial que a etiologia da infecção seja estabelecida.
- (2) **Protozoários:** A duração do teste deve ser determinada caso-a-caso. O estágio mais apropriado para a conclusão do teste é a presença dos estágios vegetativos do protozoário nos tecidos dos artrópodos teste. Os esquistos podem ser detectados no interior de tecidos suspeitos, fazendo-se um esfregaço corado com Giemsa e examinando-se a lâmina em microscópio óptico sob imersão. Os artrópodos não-visados devem estar vivos quando os tecidos forem removidos para se fazer o esfregaço, porque os esquistos são frágeis e usualmente destruídos por outros microrganismos ou deformados após a morte do hospedeiro. Esporos de protozoários podem ser utilizados como indicadores da infecção. Entretanto, se essa não for intensa, os poucos esporos por ventura detectados podem ter vindo com o inóculo. Mas se os esporos forem abundantes nos tecidos dos insetos não-visados, é provável que realmente se trate de infecção.

Uma outra forma de confirmar infecção é através de histologia, usando métodos padrão e procurando esporos e efeitos patogênicos. O ponto final do estudo deve ser imediatamente antes da morte do organismo ou após o período de tempo determinado.

A morte do artrópodo teste se constitui num bom marco para o término de estudos, se o protozoário for virulento. Entretanto, desde que a maioria dos protozoários tenha um efeito crônico, mudanças de comportamento, tamanho ou cor podem ser utilizados para se determinar o final da observação. Em qualquer caso, um exame microscópico para se procurar esquistosomas ou esporos é essencial para se confirmar a

**(3) Fungos:** A duração dos testes deve ser limitada a 8-10 dias ou mais, dependendo do AMC em uso. O Tempo de Mortalidade 50 (TM50) é considerado o parâmetro mais confiável para bioensaios com fungos no laboratório. A patogenicidade deve ser confirmada pela identificação do agente no artrópodo inoculado e através do plaqueamento em meio de cultura apropriado.

**(4) Bactérias:** Artrópodos testemunha e tratados devem ser observados por 21-30 dias após a administração do AMC, se possível. Nos casos em que o inseto não puder ser mantido por este período, as observações devem continuar até que a mortalidade do grupo testemunha atinja 20%. A patogenicidade deve ser confirmada pela identificação do AMC no inseto inoculado e pelo plaqueamento em meios de cultura apropriados.

## **TESTES DE PATOGENICIDADE/TOXICIDADE DA FASE I**

### **Predadores e Parasitóides**

Testes da Fase I são exigidos para o registro de PF'S a serem utilizados em aplicações externas, quando a forma de uso proposto indicar que artrópodos predadores e/ou parasitóides podem estar expostos ao AMC (ia/PT) e CF'S a serem utilizadas para formular PF'S.

**Substância-teste:** Sempre que possível, devem ser utilizadas diversas doses, até o máximo de 1000 vezes a dose correspondente a DL<sub>50</sub> ou CL<sub>50</sub> do patógeno em seu hospedeiro natural, ou 10 a 1000 vezes a dose recomendada para aplicação no campo.

**Espécies a serem Testadas:** Os testes devem ser conduzidos com três espécies de artrópodos, representando pelo menos dois dos seguintes grupos: ácaros predadores da família Phytoseiidae, insetos predadores das ordens Coleoptera, Hemiptera e Neuroptera e insetos parasitos das ordens Diptera e Hymenoptera.

Devem ser considerados na escolha os critérios descritos anteriormente e a etiologia de agente microbiano a ser testado:

**(1) vírus, bactérias e fungos:** Os testes devem ser conduzidos com 3 espécies de artrópodos representativas dos parasitóides e predadores conhecidos ou suspeitos de atacarem o organismo visado, ou que ocupem o mesmo habitat ecológico e sejam importantes agentes de controle no ecossistema em que o AMC será utilizado.

**(2) protozoários:** Ao se selecionarem as três espécies de artrópodos não-visados, pelo menos uma deve ser um parasito importante do organismo visado. Muitos protozoários têm uma ampla gama de hospedeiros. Por esta razão, recomenda-se que mais de três espécies de organismos não-visados sejam testadas.

A despeito de não haver no Brasil tradição na área de criação de insetos, incluindo insetos prejudiciais e benéficos, nos últimos anos tem ocorrido um interesse crescente pela área e vários laboratórios em nosso país já têm infra-estrutura e conhecimentos básicos suficientes para produzirem tais insetos.

A relação abaixo sugere os insetos benéficos que poderiam ser usados como organismos teste e que estão disponíveis em criações de laboratório no Brasil ( Parra, 1995).

#### I . Parasitóide: Ordem Hymenoptera

ovos:

*Trichogramma pretiosum* Riley (Trichogrammatidae)

*Trichogramma galloi* Zucchi (Trichogrammatidae)

*Trissolcus basalis* (Wallaston) (Scelionidae)

larvas:

Endoparasitóide: *Cotesia flavipes* (Cameron) (Braconidae)

Ectoparasitóide: *Habrobracon hebetor* (Say) (Braconidae)

pupas:

*Spalangia gemina* Boucek (Pteromalidae)

Ordem Diptera

*Metagonistylum minense* Town. (Tachinidae)

*Paratheresia claripalpis* Wulp. (Tachinidae)

#### II. Predadores: Ordem Coleoptera

*Calosoma* spp. (Carabidae)

*Olla v-nigrum* (Mulsant)(Coccinellidae)

*Cycloneda sanguinea* (L.)(Coccinellidae)

Ordem Hemiptera

*Podisus* spp. (Pentatomidae)

Ordem Neuroptera

*Chrysoperla externa* (Hagen)(Chrysopidae)

### **Insetos Aquáticos**

Quando houver possibilidade de exposição de organismos aquáticos ao AMC, *Daphnia*, ou a uma espécie de inseto aquático, ou a ambas, dependendo da forma de uso do AMC, a identificação de toxicidade/ patogenicidade na Fase I automaticamente determinará a necessidade de testes adicionais

Os testes com organismos aquáticos estão descritos no "Protocolo de Avaliação Toxicopatológica em organismos não-visados do ambiente aquático" - Volume 3, da série "Protocolos de Avaliação de Agens Microbianos de Controle de Pragas para Fins de Registro".

### **Outros Artrópodos Benéficos: Abelhas**

**Organismos teste:** Este teste deve ser conduzido com abelhas (*Apis mellifera*), adultas operárias. Quando possível, são recomendados testes com espécies de abelhas nativas, que ocorrem no agroecossistema que o AMC irá ser utilizado.

**Metodologia de confinamento de abelhas:** A metodologia sugerida se baseia naquela desenvolvida pelo Departamento de Entomologia da ESALQ-USP (Marchini et al., comunicação pessoal), que tem permitido a sobrevivência de abelhas confinadas por mais de 30 dias, tendo sido utilizada com sucesso nos testes de especificidade de AMC.

Quadros contendo pupas de *Amellifera* são retirados das caixas de criação e colocados em estufas (BOD) a 34°C, até a emergência dos adultos. Os recém emergidos são marcados com tinta branca não-tóxica e liberados na colméia de origem, juntamente com os demais adultos. Ali permanecem, por uma semana, para o vôo de defecação, uma vez que esse inseto não defeca dentro da colméia. No final de uma semana, as abelhas marcadas são recapturadas com aspirador manual e colocadas em quadros com armação de madeira de 9,0cm de altura x 17,8cm de largura, recobertos com tela plástica e mantidos em estufa BOD a 34°C, por até 24h antes do início do teste. A alimentação oferecida é a pasta de "Candi" e água.

Dados obtidos em vários testes realizados permitiram obter longevidade média das abelhas por mais de 30 dias, a 34°C, em condições de estufa e escuro total (Marchini, comunicação pessoal).

### **Metodologia do teste de patogenicidade/toxicidade**

**Vias de administração:** vai depender do AMC em estudo:

**(1) bactérias e vírus:** a administração via alimento é a melhor maneira. Neste caso, o AMC poderá ser misturado em solução de sacarose 50% (p/v) e fornecido às abelhas.

**(2) fungos:** as abelhas poderão ser expostas por contato tópico ou caminhamento. Neste caso, permite-se à abelha caminhar por um período de tempo em uma superfície pré-tratada com a suspensão do fungo (becker, folha da planta) ou alternativamente uma gota da suspensão do fungo poderá ser aplicada topicamente em seu tórax.

**Protozoários:** seguir recomendações gerais para organismos benéficos descritas anteriormente.

No caso de vírus, bactérias e fungos, uma via de administração alternativa é a injeção do AMC diretamente na hemocele das abelhas. Este procedimento tem sido testado com sucesso em abelhas (comunicado pessoal).

**Testemunhas:** vide "Predadores e parasitóides".

**Duração do Teste:** vide "Predadores e parasitóides".

### **TESTES DA FASE II**

Os testes desta Fase estão descritos no Protocolo "Comportamento do Agente Microbiano de Controle no Ambiente Terrestre" deste documento. Têm como objetivo estudar a capacidade de replicação, sobrevivência e persistência do AMC no ambiente onde vive o organismo não visado, afetado adversamente pelo AMC na Fase I.

No caso dos dados obtidos nesta Fase indicarem que insetos não-visados estarão expostos ao AMC, o requerente deverá consultar o órgão federal de registro sobre a necessidade de conduzir testes da Fase III.

### **TESTES DA FASE III**

Para todos os AMC'S, a Fase III consiste de testes avançados que buscam detalhar especificamente os efeitos adversos identificados nas fases anteriores. Tais testes poderão ser conduzidos em condições simuladas ou reais de campo, devendo sempre ser elaborados em comum acordo com o órgão federal registrante.

### **TESTES DA FASE IV**

Compreende testes simulados ou reais de campo determinados caso-a-caso, quando efeitos adversos forem observados na Fase III. O requerente deverá consultar o órgão federal registrante com relação à metodologia específica a ser utilizada.

- floridana* in *Mononychellus tanajoa*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu. **Anais: sessão de posters**. Curitiba: EMBRAPA-CNPMS, COBRAFI, 1996. p.411.
- 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- CNPMS, Brasília: IBAMA, 1995. Encaminhado para publicação na revista Entomophaga.
- FUXA, J.R.; RICHTER, A.R.; STROTHER, M.S. Detection of *Anticarsia gemmatalis* Nuclear Polyhedrosis Virus After Viral Release in Louisiana Soybean. **Journal of Entomological Science**, v.28, n.1, p. 51-60, 1993.
- GABRIEL, B.P. Fungus infection of insects via the alimentary tract. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.1, p.319-330, 1959.
- GARDNER, W.A.; OETTING, R.D.; STOREY, G.K. Susceptibility of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, to the fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* Fisher. **Florida Entomologist**, v.65, n.4, p.458-465, 1982.
- HITCHCOCK, J.D.; STONER, A.; WILSON, W.T.; MENAPACE, D.M. Pathogenicity of *Bacillus pulvifaciens* to honey bee larvae of various ages (Hymenoptera: Apidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 52, n.2, p.238-246, 1979.
- HOKKANEN, H.M.T.; LIPA, J. J. Safety of *M Nosema meligettri* l. and R. (Microsporida) to *Apis mellifera* L. and *Coccinella septempunctata* L. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, p. 310-311, 1972.
- HOUNTONJI, F.C.C.; DE NARDO, E.A.B.; TAMAI, M.A. Não suscetibilidade de abelhas à infecção pelo fungo *Neozygites* sp., agente de controle do ácaro verde da mandioca. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15., 1995, Caxambu, MG. **Resumos...** Lavras: SEB, 1995.
- INMETRO. **Princípios de boas práticas de laboratório**. Rio de Janeiro: SENAI. DN-NID/INMETRO, 1995. 48p. (INMETRO-CTLE, 06)
- LAMAS, C.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; ANGELI, L.F.A. Efeito de *Baculovirus anticarsia* sobre *Trichogramma pretiosum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.64, 1997. Suplemento. Resumos da 10 Reunião Anual do Instituto Biológico. p.76, resumo 112.
- LAMAS, C.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; ALVES, L.F.A. Efeito de *Baculovirus anticarsia* sobre o desenvolvimento de *Chrysoperla externa* (HAGEN, 1861) (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador : SEB/EMBRAPA-CNPMS, 1997. p.137.
- LEITE, L.G.; ROBERTS, D.W.; MORAES, G.J. DE; SMITH, A.; BATISTA FILHO, A.; MACHADO, L.A. Germinação e penetração do fungo *Neozygites* spp. Em diferentes hospedeiros In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador : SEB/EMBRAPA-CNPMS, 1997. p.135.
- MAGALHÃES, B.P.; LORD, J.C.; WRIGHT, S.P.; DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Zoophthora radicans* to the coccinellid predators *Coleomegilla maculata* and *Friopsis connexa*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, p.471-473, 1988.

- MAIA, A. de H. N. M. O método de quadrados mínimos ponderados para comparar esporulação de fungos em diferentes meios de cultura. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA, 12., 1996, Caxambu, MG. **Anais...** Caxambu: SINAPE, 1996. p.241-42.
- MAIA, A. de H. N. M; LUIZ, A. J. B. Avaliação de risco do uso de biopesticidas; como testar a hipótese de ausência de efeitos adversos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, COBRAFI, 1996. p.9.
- MAIA, A. de H. N. O método de quadrados mínimos ponderados na análise de preferências alimentar em insetos. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 41., 1996, São José do Rio Preto, SP. **Anais...** São José do Rio Preto: RBRAS, 1996, p.34.
- MAIA, A. de H.N. Métodos estatísticos para comparação de parâmetros associados às tabelas de vida de fertilidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador : SEB/EMBRAPA-CNPMS, 1997. p.19.
- MAIA, A. de H.N.; LUIZ, A.I.B.; NASCIMENTO, M.L. Planejamento e análise de testes para avaliar efeito de biopesticidas na biologia de *Podisus nigrispinus* ao longo de várias gerações. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador : SEB/EMBRAPA-CNPMS, 1997. p.148.
- MAIA, A. De H.N.; NARDO, E.A.B. de Avaliação do efeito de biopesticidas na duração da fase imatura de predadores da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) utilizando análise de sobrevivência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador: SEB/EMBRAPA-CNPMS, 1997. p.149.
- MENAPACE, D.M.; SACKETT, R.; WILSON, W.T. Adult honey bees are not susceptible to infection by *Nosema locustae*. **Journal of Economic Entomology**, v.71, p.304-306, 1978.
- MORAES, G. J. DE; DELALIBERA JUNIOR., I. Specificity of a strain of *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) to *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae). **Experimental & Applied Acarology**, v.14, p.89-94, 1992.
- MORAES, G.J. DE; DELIBERA JR, I.; ELLIOT, S.L.; SILVA, C.A.D. DA Natural fluctuations of populations of *Neozygites* cf. *floridana* and *Amblyseius idaeus*, natural enemies of *Mononychellus tanajoa*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu. **Anais: sessão de posters**. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, COBRAFI, 1996. p.143
- MORAES, G. J. DE; DELALIBERA JUNIOR., I. Specificity of a strain of *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) to *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae). **Experimental & Applied Acarology**, v.14, p.89-94, 1992.
- MORAES, G.J. DE; DELIBERA JR, I.; ELLIOT, S.L.; SILVA, C.A.D. DA Natural fluctuations of populations of *Neozygites* cf. *floridana* and *Amblyseius idaeus*, natural enemies of *Mononychellus tanajoa*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu. **Anais: sessão de posters**. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, COBRAFI, 1996. p.143
- MORTON, H.L.; MOFFETT, J.O.; STEWART, F.D. Effect of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus in honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.24, p.139-140, 1975.

- MOSCARDI, F.; CORSO, I.C. Ação de *Baculovirus anticarsia* sobre a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*, Hübner, 1818) e outros lepidopteros. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., 1981, Londrina, PR. **Anais...** Londrina: EMBRAPA-CNPQ, 1981. p.51-57.
- NARDO, E.A.B. DE; NASCIMENTO, R. DOS S.; MARIGO, A.L.S. Efeito de *Baculovirus anticarsia* na aceitação de *Anticarsia gemmatalis* (Lep.: Noctuidae) por diferentes predadores. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu. **Anais:** sessão de posters. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, COBRAFI, 1996. p.102
- NARDO, E.A.B. DE; WATANABE, M.A.; MAIA, A. DE H.N.; MARIGO, A.L.S. Efeito de *Baculovirus anticarsia* na biologia de *Nabis* sp. (Hemiptera: Nabidae). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu. **Anais:** sessão de posters. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, COBRAFI, 1996. p.101
- NARDO, E.A.B. DE; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, G.J. DE ; OLIVEIRA, M.C.B. Regulamentação e registro de produtos contendo agentes microbianos de controle de pragas: resultado de parceria Ibama e comunidade científica. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu. **Anais:** sessão de posters. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, COBRAFI, 1996. p.193
- NARDO, E.A.B. DE; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, G.J. DE; 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. p.42. (EMBRAPA-CNPMA, Documentos, 2).
- NARDO, E.A.B. DE; CAPALBO, D.M.F.; OLIVEIRA, M.C.B.; MORAES, G.J. de, ed. **Análise de risco e avaliação do impacto ambiental do uso de agentes de controle biológico:** memória do Workshop. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995. 127p. (EMBRAPA-CNPMA. Documentos).
- NARDO, E.A.B.; WATANABE, M.A.; MARIGO, A.L.S.; NAKAMURA, V.V.; UCHINO, E.M. Efeito de formulações com *Baculovirus anticarsia* ativo e inativo sobre o predador *Podisus nigrispinus* In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador: SEB/EMBRAPA-CNPMS, 1997. p.148.
- NASCIMENTO, M. L.; MORAES, G.J. DE; MAIA, A. DE H.N.; OLIVEIRA, R.C.A.L. Efeito de *Bacillus thuringiensis* na biologia de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador, BA. **Resumos...** Salvador : SEB / EMBRAPA-CNPMS, 1997. p.236.
- NASCIMENTO, M.L.; CAPALBO, D.F.; MORAES, G. J. DE; NARDO, E.A.B. DE; LUIS, A. J. B. Avaliação do efeito de um produto à base de *Bacillus thuringiensis* sobre o predador *Podisus nigrispinus*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu. **Anais:** sessão de posters. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, COBRAFI, 1996. p.295
- PARRA, J.R. P. Escolha de indicadores biológicos: insetos. In: NARDO, E. A. B. DE; CAPALBO, D. M. F.; OLIVEIRA, M. C. B.; MORAES, G. J. de, ed. **Análise de risco e avaliação do impacto ambiental decorrente do uso de agentes de controle biológico: memória do workshop.** Jaguariúna: EMBRAPA- CNPMA, 1995. p. 59-60.
- POLLATO, S.L.B. Disseminação do vírus de poliedrose nuclear (VPNAg) *Baculovirus anticarsia*, através de predadores da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). Curitiba, 1990. 66p.
- SALAMA, H.S.; ZAKI, F.N. Impact of *Bacillus thuringiensis* Berl. on the predator complex of *Spodoptera littoralis*

- (Boisd.) in cotton fields. *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie*, v.97, p.485-490, 1984.
- SUMMERS, M.; ENGLER, R.; FALCON, L.A.; VAIL, P., ed. **Baculoviruses for insect pest control: safety considerations**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1975. p. 179-184.
- VAN ESSEN, F.W.; ANTHONY, D.W. Susceptibility of nontarget organisms to *Nosema algerae* (Microsporida: Nosematidae), a parasite of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.28, p.77-85, 1976.
- VANDEMBERG, J.D.; STREETT, D.M.; HERBERT Jr., E. W. Safety of Grasshopper Entomopoxviruses for caged adult Honey Bees (Hymenoptera:Apidae). *Journal of Economic Entomology*, v.3, p.784-787, 1990.
- WATANABE, M.A.; DE NARDO, E.A.B.; MORAES, G.J.; MARIGO, A.L.S. Effect of *Baculovirus anticarsia* on the biology of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera:Pentatomida). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7., 1995, Santos. **Abstracts...** Santos, 1995.
- WATANABE, M.A.; NARDO, E.A.B. DE; MAIA, A. DE H.N.; MARIGO, A.L.S. Avaliação de risco de biopesticidas sobre insetos benéficos: *Baculovirus anticarsia* x *Podisus nigrispinus*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu. **Anais: sessão de posters**. Curitiba: EMBRAPA-CNPSO, COBRAFI, 1996. p.270
- WATANABE, M. A.; NARDO, E. A. B. DE; MORAES, G. J. DE; MARIGO, A. L. S. **Avaliação do efeito do *Baculovirus anticarsia* sobre *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851), predador da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatilis* (Hubner, 1818)**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. 4p. (EMBRAPA-CNPMA. Pesquisa em Andamento, 1).

# PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO TOXICOPATOLÓGICA EM ORGANISMOS BENÉFICOS DO SOLO: MINHOCAS

---

## PARTE III PRINCIPAIS ASPECTOS

Sendo o solo o principal reservatório dos AMC'S aplicados, os anelídeos estarão sempre sujeitos à exposição aos AMC'S e, portanto, com potencial de serem afetados por esses.

**Sustância-teste:** A forma do material a ser tomado como substância-teste já foi discutida anteriormente neste protocolo. Em adição, outras substâncias usadas para aumentar a virulência ou toxicidade também devem ser testadas. Sempre que possível, deve-se utilizar 10 a 1000 vezes a dose recomendada para aplicação no campo.

**Espécies teste:** Os testes devem ser conduzidos com minhocas *Eisenia foetida* ou outra espécie representativa do solo, como a *Pontocolex* sp.

A seleção das espécies a serem testadas é de responsabilidade do requerente, devendo este justificar a escolha.

**Controles:** Um grupo de organismos deve ser testado, utilizando-se os líquidos usados na suspensão da substância-teste (água, solução salina, ou o meio de cultivo ou propagação do AMC) sem a adição da mesma. Além do grupo testemunha, um outro grupo denominado *Testemunha negativa* (ou controle inativado) também é indicado neste caso, os organismos serão testados utilizando-se os líquidos usados na suspensão da substância-teste e o microrganismo inativado. Neste último caso, o processo mais utilizado é a autoclavagem (120°C, por 20 minutos) do conjunto líquido-microrganismo.

**Vias de administração:** O AMC será adicionado a um solo artificial enriquecido com matéria orgânica, oferecendo a possibilidade de exposição dermal e oral.

**Duração do teste:** Os organismos testemunhas e tratados devem ser observados por, pelo menos, 14 dias após a administração do AMC.

**Confirmação:** Uma forma de se confirmar infecção é através de histologia, usando métodos padrões e procurando partículas do AMC através de análise microbiológica. Os testes serão apresentados com maior detalhamento nos itens seguintes.

## **TESTES DE PATOGENICIDADE/TOXICIDADE DA FASE I**

O seguinte procedimento operacional padrão descreve os métodos usados na condução de teste de toxicidade aguda com minhocas *Eisenia foetida* em um solo artificial como substrato.

**Resumo:** Cinco grupos de minhocas serão expostos a várias concentrações da substância-teste, por um período de 14 dias, em solo artificial. Serão feitas observações de mortalidade e sinais de toxicidade/patogenicidade.

**Procedimento:** Cinco grupos de minhocas serão expostos a um solo artificial, precisamente definido, ao qual uma série de concentrações da substância-teste foi previamente adicionada. Serão feitas observações de mortalidade e sinais de toxicidade/patogenicidade. A metodologia aplicada neste estudo foi baseada em procedimentos especificados nas diretrizes OECD 207 " Diretrizes para teste de produtos químicos em minhocas, teste de toxicidade aguda da Organização para Desenvolvimento e Cooperação Econômica" e nos protocolos do Wildlife International Lab. A mortalidade pré-teste será monitorada por 24 horas, antes do início do teste. As minhocas serão transferidas para placas de cultivo, com solo artificial. Uma contagem inicial e final das minhocas sendo aclimatadas determinará a mortalidade pré-teste. Qualquer grupo que exibir mais que 10% de mortalidade não será considerado para fins do teste proposto.

### **1. Preparo do solo artificial - Mistura inicial**

a. O solo artificial é preparado utilizando os seguintes materiais (base seca):

- 70% de areia ( 2mm de diâmetro)
- 20% de argila - caulim
- 10% de turfa

Após a pesagem dos materiais acima citados

b. Os três primeiros itens adicionados na proporção correta serão homogeneizados em um misturador tipo HOBART ou similar;

c. Três amostras de solo serão coletadas para determinação do pH do solo;

d. Se necessário, o pH será corrigido para 6,0 a 6,5, com carbonato de cálcio;

e. A umidade inicial desta mistura será determinada em três subamostras (aproximadamente 10g cada), que serão secas a 105°C e pesadas até atingir peso constante. A percentagem de umidade é determinada pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{peso inicial do solo} - \text{peso do solo após secagem}}{\text{peso do solo após secagem}} \times 100 = \% \text{ umidade}$$

f. A capacidade de retenção de água (CRA) da mistura inicial de solo é determinada pelo seguinte procedimento: papel de filtro (tipo padrão) é saturado com água destilada e o excesso de água é descartado. O papel de filtro molhado é então pesado. Aproximadamente 100g da mistura inicial de solo (base seca) é colocada sobre o papel e o conjunto é imerso em água destilada, até a saturação. Solo e papel são então removidos, cobertos com folha de papel alumínio e deixados para escorrer durante a noite. A CRA (volume de água por 100g de solo) é determinada pela seguinte fórmula:

$$\text{CRA} = \text{peso do papel e solo após drenagem (g)} - \text{peso do papel molhado (g)} - \text{peso solo inicial (g)}$$

g. O conteúdo de umidade requerido para os testes é de aproximadamente 35% da capacidade de retenção de água do solo artificial. Para determinar a umidade atual necessária por concentração, utiliza-se o seguinte cálculo: (E SE NÃO FOR MISCÍVEL)

$$\% \text{ umidade por CRA por concentração (ml)} \times \text{umidade desejada (0,35)}$$
  
concentração volume total (3500g) <P255>

## 2. Preparação do solo para teste

a. As concentrações-teste serão: tipicamente 0; dose máxima recomendada (DR) 100 x DR e 1000 x DR;  
b. Com base nos cálculos da concentração-teste desejada, uma quantidade apropriada da substância-teste será pesada utilizando-se uma balança analítica.

c. Para cada concentração-teste será pesada uma quantidade adequada de solo artificial em balança calibrada. Essa quantidade será colocada em tigela de mistura de misturador

A quantidade apropriada de água destilada para se obter a umidade desejada é então adicionada ao misturador, realizando em seguida duas homogeneizações. Se a substância-teste for miscível em água, ela será adicionada à quantidade de água destilada necessária para atingir a umidade desejada, e esta então adicionada ao solo até atingir uma mistura homogênea.

d. Controle negativo: uma quantidade equivalente de diluente é adicionada ao solo como controle negativo. O solo é revolvido no misturador, conforme o procedimento utilizado no tratamento dos solos com a substância-teste;

e. Controle inativado: uma concentração de 1000 x DR é preparada conforme descrito nos itens 2b e/ou 2c. Este material é então submetido a autoclavagem (120°C, por 20 minutos) para inativação do microrganismo (ingrediente ativo). Após resfriamento, este material denominado "inativado" é adicionado ao solo como controle inativado. O solo é revolvido no misturador, conforme o procedimento utilizado no tratamento dos solos com substância-teste;

f. Após a preparação do solo-teste, os conteúdos de umidade e pH serão determinados como descrito nas seções 1d e 1e;

g. Quatro repetições serão usadas para cada concentração-teste e para os controles. As câmaras-teste serão jarras de vidro de aproximadamente 1 litro de capacidade, devendo estar identificadas pela sigla e número do estudo, concentração-teste e número dentro da repetição;

h. Aproximadamente 750g de solo tratado serão colocados em cada câmara-teste.

## 3. Procedimentos do teste

a. Minhocas serão pesadas em frascos apropriados, antes do início do teste. Elas serão lavadas com água destilada por, aproximadamente, 5 segundos, secas sobre papel (tipo absorvente) e distribuídas ao acaso em frascos, sendo colocadas duas por vez, e continuando até atingir 10 minhocas por câmara. O conjunto frasco mais minhocas será pesado e a média de peso por minhoca, calculada;

b. Após pesagem, as minhocas serão colocadas sobre a superfície do solo em teste nas respectivas câmaras. Estas serão cobertas com um plástico transparente (tipo "Magipack") que evite a saída das minhocas, mas que contenha pequenos orifícios (feitos com um objeto pontiagudo) que permitam a troca gasosa. É muito importante que todos os tratamentos fiquem sob luz constante, a fim de evitar que as

minhocas subam a superfície da terra;

- c. Observações de mortalidade serão feitas 7 e 14 dias após o início do teste de toxicidade. Naquelas ocasiões, o solo de cada repetição será vertido sobre uma bandeja vazia. As minhocas serão observadas e as reações anotadas e todas as minhocas mortas serão removidas. Devido à decomposição rápida das minhocas após a morte, muitas vezes elas não poderão ser recuperadas. Por isso, a mortalidade é baseada no número de minhocas vivas presentes;
- d. No décimo quarto dia do teste, todas as minhocas vivas de cada repetição serão lavadas por, aproximadamente, 5 segundos, com água destilada, secas sobre papel e pesadas ( Seção 3a);
- e. No dia 0 (dia do teste), amostras de cada repetição deverão ser retiradas (aproximadamente 5g) e a contagem do microrganismo (ingrediente ativo) será realizada de acordo com os procedimentos adequados para cada microrganismo, descritos em procedimentos operacionais apropriados;
- f. Na conclusão do estudo, o conteúdo de umidade e o pH do solo-teste serão medidos para cada repetição (ver Seções 1d e 1e);
- g. Na conclusão do estudo, o conteúdo em ingrediente ativo será medido seguindo a mesma metodologia utilizada na Seção 3e.

#### 4. Análise de dados

- a. O valor LC<sub>50</sub> deve ser apresentado, se disponível;
- b. A concentração máxima, na qual não se observa nenhum efeito, deve ser determinada baseada na mortalidade;
- c. O teste poderá ser rejeitado se a mortalidade total nas repetições do controle exceder 10% ao final de seu período;
- d. O teste poderá ser rejeitado se a contagem de microrganismos no dia de seu início for inferior em 10% ao previamente calculado (Seção 2a).

#### Progressão de Fase

Dados obtidos na Fase I serão utilizados em conjunto com informações disponíveis sobre a forma de uso, especificidade e outros fatores, para avaliar o potencial de efeitos adversos e da necessidade de

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DASH, M.C.; MISHRA, P.C.; BEHERA, N. Fungal feeding by a tropical earthworm. **Tropical Ecology**, v.20, n.1, p. 9-12, 1979.
- HEIMBACH, F. Correlations between Tree methods for determining the toxicity of chemicals to earthworms. **Pesticide Science**, v.28, p. 69-80, 1957.
- KHAMBATA, S.R., BHAT, J.V. A contribution to the study of the intestinal microflora of indian earthworms. **Archives fur Mikrobiologie**, v. 28, p. 69-80, 1957.

# PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO TOXICOPATOLÓGICA EM PLANTAS

---

## PARTE IV PRINCIPAIS ASPECTOS

Não se espera que a maioria dos inseticidas microbianos tenha propriedades fitopatogênicas e, por esta razão, poucos testes são exigidos em plantas não visadas para esses organismos. Entretanto, no caso de AMC'S com função de herbicidas, utilizados com o fim de causar efeitos patogênicos ou tóxicos às plantas visadas, uma série de testes bem elaborados é exigida para assegurar que plantas não visadas não sejam afetadas significativamente.

### **Seleção das Plantas**

Para os AMC'S que não tenham qualquer semelhança taxonômica com fitopatógenos, o organismo deve ser testado para a(s) cultura(s) em que ele for utilizado, para aquelas que normalmente são cultivadas em rotação ou em áreas adjacentes, e para plantas de importância ecológica ou social que se encontrem na área de atuação e nos ambientes em que é possível a presença, sobrevivência e reprodução do AMC. Para aqueles AMC'S que tenham relação com fitopatógenos, os testes devem envolver também as plantas para as quais o organismo similar é fitopatogênico, bem como plantas da mesma família ou de famílias próximas que tenham importância econômica, ecológica ou social, nas regiões em que o AMC for utilizado ou estiver presente. Quando o AMC for semelhante a fitopatógenos com larga gama de hospedeiros, o rigor destes testes e a gama de plantas testadas deverão ser incrementados. Para o AMC utilizado para controle de plantas daninhas, os testes com vegetais deverão ser extremamente rigorosos, incluindo todas as plantas de interesse econômico, ecológico e social, na macrorregião que inclui a área em que o AMC será utilizado e os locais em que é possível sua sobrevivência e reprodução. Pelo exposto, pode-se concluir que a relação de plantas a serem incluídas nos testes dependerá de algumas particularidades relacionadas ao AMC em termos de fitopatogenicidade, disseminação e persistência no ambiente, como também deverão ser consideradas espécies normalmente muito suscetíveis a agentes fitopatogênicos e clones de elevado valor econômico.

### **TESTES DE PATOGENICIDADE/TOXICIDADE DA FASE I**

Testes de efeitos tóxicopatogênicos ou outros efeitos adversos de um AMC no crescimento e desenvolvimento de plantas são exigidos para o registro de PF'S a serem utilizados em aplicações externas e CF'S a serem utilizadas para formular PF'S.

**Doses a serem testadas:** Uma dose pelo menos igual à máxima recomendada para uso no campo deve ser testada.

**Organismos-teste:** O número de espécies testadas depende da semelhança entre o AMC e os patógenos de plantas conhecidos, conforme descrição abaixo. Uma justificativa para as espécies selecionadas deverá ser apresentada ao órgão federal registrante.

**(1) AMC para controle de artrópodes, sem relação com fitopatógenos:** quando o AMC se destinar ao controle de artrópodes, as plantas a serem testadas devem seguir a recomendação da seção “Seleção de Plantas” deste protocolo e incluir seis espécies de dicotiledôneas de, pelo menos, quatro famílias e quatro espécies de monocotiledôneas de pelo menos duas famílias. Estas espécies devem ser selecionadas dentre as plantas de maior valor comercial, social ou ecológico da região de aplicação do AMC.

Para os AMC’S destinados a uso aquático ou que muito provavelmente irão se disseminar ou sobreviver em ecossistemas aquáticos, espécies adicionais de plantas aquáticas e algas devem ser testadas, incluindo *Lemna sp.* (lentílica d’água), *Selenastrum capricornutum* (algas verdes clorofíceas), *Anabaena sp.* (alga azul esverdeada), *Scenedesmus sp.* e algumas diatomáceas de água doce, como *Navícola sp.*, *Symbela sp.* e *Diatoma sp.* Para água salgada, recomenda-se a diatomácea *Skeletonema costatum*.

**(2) AMC para o controle de plantas e AMC’S semelhantes a patógenos de plantas conhecidas:** além dos testes de especificidade em plantas, especificados no item (1) acima, também devem ser conduzidos testes sobre todas as plantas de importância econômica, social ou reconhecidamente benéficas à manutenção do ecossistema, apresentando qualquer probabilidade razoável de servir como hospedeiras. Esta seleção de espécie de plantas adicionais deve ser baseada em um levantamento daquelas relacionadas (mesmo gênero ou, se não disponível, mesma família) à planta alvo para controle e através de um levantamento de hospedeiros conhecidos dos patógenos relacionados ao herbicida microbiano.

**Controle:** tanto controle negativo como positivo devem ser incluídos nos testes.

**(1) Controle negativo:** as plantas devem estar livres ao máximo de ataque de pragas. Além disto, no caso de AMC’S que são prontamente disseminados, pode ser necessário conduzir testes de maneira que controles negativos e plantas tratadas sejam mantidos em locais diferentes ou em casas-de-vegetação separadas, sob condições ambientais idênticas, de forma que controles negativos confiáveis possam ser mantidos. Alternativamente, os controles negativos podem ser tratados com um pesticida químico não-fitotóxico que propicie o controle eficiente do pesticida microbiano. Considerando que às vezes é difícil se detectarem efeitos adversos, como maturação atrasada ou perda de vigor, crescimento, qualidade, produção ou estande, é importante analisar controles não-tratados, usando um método analítico sensível e específico para determinar se a infecção pelo AMC realmente ocorreu (teste sorológico, marcadores genéticos, etc.).

**(2) Controle positivo:** É requerido para AMC’S semelhantes a patógenos de plantas, para se assegurar que as condições ambientais são propícias para a penetração, infecção e desenvolvimento da doença em um hospedeiro suscetível. O controle positivo deve ser selecionado de forma a representar adequadamente o AMC em termos de taxonomia e condições para infecção e desenvolvimento da doença, caso isso seja conhecido. No caso de um AMC que não se destina ao uso como herbicida, a testemunha positiva deve consistir de um patógeno de planta conhecido, com características taxonômicas semelhantes ao AMC e seu hospedeiro suscetível. No caso de herbicidas microbianos, entretanto, a testemunha positiva deve consistir da espécie de planta a ser controlada e do herbicida microbiano.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- CHARUDATTAN, R.; WALKER, H.L. **Biological control of weeds with plant pathogens**. New York: John Wiley, 1982. 293p.
- HARRIS, P. Screening classical weed biocontrol projects and agents. In: COULSON, J.R.; SOPER, R.S.; WILLIAMS, D.W., ed. **Proceedings of a Workshop on Biological Control Quarantine: needs and procedures**. Baltimore: USDA-NTIS, 1991. p.24. (ARS-99).
- HARRIS, P.; ZWÖLFER, H. Screening of phytophagous insects for biological control of weeds. **Canadian Entomologist**, v.100, p.295-303, 1968.
- KLINGMAN, D.L.; COULSON, J.R. Guidelines for introducing foreign organisms into the United States for biological control of weeds. **Weed Science**, v.30, p. 661-667, 1982.
- WASPSHERE, A. J. A protocol for programmes for biological control of weeds. **PANS**, v.21, p.295-303, 1975.
- WASPSHERE, A. J. A testing sequence for reducing rejection of potential biological agents for weeds. **Annals of Applied Biology**, v.114, p.515-526, 1989.
- ZWÖLFER, H.; HARRIS, P. Host specificity determination of insects for biological control of weeds. **Annual Review of Entomology**. v.16, p. 159-178, 1971.

**Condições ambientais dos testes:** Quando as condições ótimas para a penetração, infecção e desenvolvimento do AMC são conhecidas ou suspeitas, é importante, particularmente para os herbicidas microbianos, simular estas condições para o ótimo crescimento e desenvolvimento da planta. Em muitos casos, entretanto, ambas as condições podem ser semelhantes.

**Métodos de administração dos AMC'S:** As plantas a serem testadas devem ser expostas ao AMC por qualquer via de exposição esperada, com base na forma de uso proposta. Essa via deve ser suplementada por outras vias indicadas pelo modo de transmissão de patógenos típicos da planta-teste. Em alguns casos, o ferimento de plantas, a simulação do efeito de insetos vetores ou seu efeito real, tratamento de sementes, aplicações no solo ou pulverização foliares podem ser mais apropriados.

**Período da aplicação:** As espécies a serem testadas devem ser tratadas no período de maior susceptibilidade (o que pode ser conhecido para os herbicidas microbianos), no estágio normal de maturidade ou quando se espera que a aplicação no campo seja iniciada em condições normais de uso.

**Avaliações dos Testes:** As plantas devem ser observadas com uma freqüência pelo menos semanal ou até a colheita ou morte das plantas, ou, no caso de plantas perenes, em intervalos regulares de pelo menos dois anos. Se nenhum efeito adverso for evidenciado após este período, as raízes, folhas, frutos, tecidos vasculares e outras partes das plantas devem ser analisados para se determinar a presença do AMC, usando-se métodos sensíveis e específicos. É importante realizar estas análises, porque o desenvolvimento de doenças em plantas perenes pode levar vários anos e porque plantas assintomáticas podem servir para a proliferação e sobrevivência do AMC, propiciando um reservatório do mesmo.

**Relatório:** Além das informações especificadas em "Elaboração de Relatórios", na Seção "Informações Gerais" deste documento, os seguintes dados devem ser reportados:

- (1) Justificativa para a seleção das espécies;
- (2) Descrição das câmaras de crescimento, casa-de-vegetação ou outras informações sobre o local de realização dos testes, incluindo forma de evitar a dispersão do AMC e sistemas de monitoramento;
- (3) A amplitude da temperatura e umidade no decorrer dos testes, incluindo quaisquer desvios significativos;
- (4) Fotoperíodo e luminosidade;
- (5) Quaisquer efeitos adversos ou benéficos anormais sobre os grupos tratados e testemunhas, incluindo data e horário de quando estes efeitos foram observados;
- (6) Métodos de análises estatísticas dos resultados.

**Progressão de Fase:** Se qualquer efeito adverso devido a infecções for observado ou se os testes indicarem que uma infecção assintomática pode ocorrer, testes da Fase II deverão ser conduzidos. Se for comprovada a persistência do AMC no ambiente terrestre, testes da Fase III e IV poderão ser requisitados a critério do órgão federal registrante.

# PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO AGENTE MICROBIANO DE CONTROLE NO AMBIENTE

---

## PARTE V PRINCIPAIS ASPECTOS

Os testes da Fase II têm o objetivo de demonstrar se um AMC é capaz de sobreviver e se multiplicar no ambiente, indicando, assim, exposição de organismos não-visados ao AMC e quais os níveis dessa exposição. Estes testes são requeridos quando efeitos tóxicos ou patogênicos forem observados em testes de máximo risco, conduzidos na Fase I, os quais definem a necessidade e o ambiente a serem estudados na Fase II. Deste modo, se o organismo afetado for do ambiente terrestre, os testes da Fase II deverão ser realizados com o AMC no ambiente terrestre, em aplicações simuladas.

### Testes da Fase II

Resultados positivos de sobrevivência e replicação do AMC, no ambiente estudado na Fase II, conduzem à necessidade de se realizar testes das Fases III e IV. Os dados da Fase II serão utilizados para se estabelecer as condições e doses a serem utilizadas em testes subseqüentes. Uma determinação do comportamento do AMC, em diferentes ambientes, inclui: (a) uma avaliação do crescimento do agente, quando introduzido em um novo ambiente; e (b) a forma como o agente pode alterar seu hábito de crescimento e se beneficiar das novas condições ambientais ou de mudanças, num equilíbrio existente entre espécies de microrganismos (por exemplo, em associações comensais, nas quais uma espécie é beneficiada e outra não é afetada).

Os valores selecionados para cada parâmetro ambiental a ser testado devem representar as condições esperadas no local de uso proposto.

Estudos de laboratório para determinar os requisitos de crescimento do AMC podem complementar os estudos de casa-de-vegetação. Eles podem, também demonstrar, que o AMC não poderá sobreviver no campo e, neste caso, o órgão registrante decidirá caso-a-caso a possibilidade de aceitar estes estudos ao invés daqueles feitos em ambientes simulados.

**Substância teste:** um PF tópico ou o PT serão testados.

**Duração do teste:** Os dados necessários para se estabelecer uma curva de declínio populacional devem ser coletados periodicamente, até que duas determinações de meia-vida sejam realizadas ou até que os dados estabeleçam que a população do AMC é capaz de se manter no ambiente, em níveis iguais ou superiores àquele imediatamente após o início do teste.

**Procedimentos:** Os testes devem ser conduzidos em casa-de-vegetação para se determinar o (comportamento, sobrevivência, e replicação) do AMC no solo e na vegetação representativa do ambiente de uso. Os seguintes parâmetros devem ser variados para se determinar o efeito na sobrevivência e crescimento da população do AMC: temperatura, umidade, precipitação (quantidade, frequência, pH), luz solar, pH do solo e das superfícies foliares e nutrientes no solo e na vegetação. Essa simulação do ambiente natural particular, refletindo a área de uso do AMC, é necessária para se atingir o objetivo geral dos testes da Fase II. proposto.

Os dados obtidos devem indicar a dinâmica da flutuação populacional do AMC, portanto o desenho experimental deve considerar parâmetros como tamanho do inóculo, potencial de ressurgência e parâmetros físico-ambientais.

**Análise dos resultados e relatório:** Os dados coletados para se determinar se um AMC é capaz de sobreviver, persistir ou se multiplicar no ambiente, sob as condições dos testes da Fase II, são melhor apresentados na forma de uma curva de crescimento ou declínio populacional do AMC, embora outros métodos possam ser utilizados.

O relatório deve conter também as informações indicadas a seguir, que devem ser apresentadas em detalhes suficientes para definir adequadamente o impacto potencial nas características de crescimento no organismo teste:

Os dados obtidos devem indicar a dinâmica da flutuação populacional do AMC, portanto o desenho experimental deve considerar parâmetros como tamanho do inóculo, potencial de ressurgência e parâmetros físico-ambientais.

**Análise dos resultados e relatório:** Os dados coletados para se determinar se um AMC é capaz de sobreviver, persistir ou se multiplicar no ambiente, sob as condições dos testes da Fase II, são melhor apresentados na forma de uma curva de crescimento ou declínio populacional do AMC, embora outros métodos possam ser utilizados.

O relatório deve conter também as informações indicadas a seguir, que devem ser apresentadas em detalhes suficientes para definir adequadamente o impacto potencial nas características de crescimento no organismo teste:

- (1) Tipo de sistema e componentes utilizados;
- (2) Origem dos componentes;
- (3) Período de equilíbrio antes da adição do AMC;
- (4) Temperatura, condições de luz, umidade do ar e do substrato, pH do meio, níveis de oxigênio;
- (5) Tipo de formulação (PF ou ia/PT);
- (6) Dose e frequência de aplicação;
- (7) Identificação da substância-teste e composição da formulação;
- (8) Tamanho da amostra, cronograma e sensibilidade do método utilizado na detecção;
- (9) Tabulação e gráficos da dinâmica populacional;
- (10) Discussão dos resultados.

**Progressão de Fase:** Se os resultados da Fase II mostrarem que o AMC é capaz de sobreviver, persistir e se multiplicar no ambiente em estudo, podendo afetar ao longo do tempo os organismos não-visados, testes da Fase III serão exigidos. Se os resultados forem negativos (o AMC não sobrevive ou persiste no ambiente), nenhum teste adicional será exigido. A determinação inequívoca de resultados negativos pode ser difícil de se provar. Todo o esforço deve ser feito para provar que os resultados são negativos e que a realização dos testes da Fase III não serão necessários.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTHONY, D.W.; SAVAGE, K.E.; HAZARD, E.I.; AVERY, S.W.; BOSTON, M.D.; OLDACRE, S.W. Field test with *Nosema algerae* Vavra and Undeen (Microsporida, Nosematidae) against *Anopheles albimanus* Wiedemann in Panama. **Miscellaneous Publications. Entomological Society of America**, v.11, p.17-28, 1978.
- ARMSTRONG, J.L.; KNUDSEN, G.R.; SEIDLER, R.L. A microcosm method to assess survival of recombinant bacteria associated with plants and herbivorous insects. **Current Microbiology**, 1987. In press.
- BATAGLIOLI, M.C.; MORAES, G.J. DE; ARELLANO, F.; NARDO, E.A.B. DE Persistência do fungo *Neozygites* sp., patógeno de *Mononychellus tanajoa*, em meio aquático. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu, PR. Anais: sessão de posters. Curitiba: EMBRAPA-CNPSO, COBRAFI, 1996. p.275
- CUNNINGHAM, J.C. . Persistence of the nuclear polydrosis virus of the eastern hemlock looper on balsam foliage. Insect Pathology Research Institute. Sault Ste. Marie, Ontario, Canada. **Bimonthly Research Notes**, v.26, p.24-25, 1970.
- ELGEE, E. Persistence of a virus of the white-marked tussock moth on balsam fir foliage. Maritime Forest Research Centre. Fredericton, New Brunswick, Canada. **Bimonthly Research Notes**, v.31, p.33-34, 1975.
- GRISON, P.; MARTOURET, D.; SERVAIS, B.; DEVRIENDT, M. Microbial pesticides and environment. **Annales de Zoologie et Ecologie Animale**, v.8, n.2, p.133-160, 1976.
- HARCOURT, D.J. Persistence of a granulosis virus of *Pieris rapae* in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.11, p.142-143, 1968.
- HUKUHARA, T.; MANURA, H. Distribution of a nuclear polyhedrosis virus of the fall webworm *Hyphantria cunea* in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.19, p. 308-316, 1972.
- IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C.; HOSTETTER, D.L.; PINELL, R.E. Stability of conidia of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* in and on soil. **Environmental Entomology**, v.7, n.5, p.724-727, '1978.
- IGNOFFO, C.M.; GARCIA, G.; HOSTETTER, D.L.; PINNELL, R.E. Vertical movement of conidia of *Nomuraea rileyi* through sand and loam soils. **Environmental Entomology**, v.7, n.2, p. 270-272, 1977.
- JAQUES, R.P. The persistence of a nuclear polyhedrosis virus in the host insect *Trichoplusia ni* 11. Polyhedra in

- soil. **Canadian Entomologist**, v.99, p. 820-829, 1976b.
- JAQUES, R.P. Leaching of the nuclear polyhedrosis virus of *Trichoplusia ni* from soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.13, p.256-263, 1969.
- JAQUES, R.P. Occurrence and accumulation of the granulosis virus of *Pieris rapae* in treated field plots. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.23, p.351-359, 1974.
- KERR, A. Soil microbiological studies on *Agrobacterium radiobacter* and biological control of crown gall. **Soil Science**, v.118, n.3, p.168-172, 1974.
- LADD, JR. T.L.; MCCAB, P.J. Persistence of spores of *Bacillus popilliae*, the causal organism of Type A milky disease of Japanese beetle larvae in New Jersey soils. **Journal of Economic Entomology**, v.60, n.2, p. 493-495, 1967.
- LIANG, L.N.; SINCLAIR, J.; MALLORY, L.; ALEXANDRE, M. Fate in model ecosystems of microbial species of potential use in genetic engineering. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, p. 708-714, 1982.
- LINGG, A.J.; MCMAHON, K.J. Survival of lyophilized *Bacillus popilliae* in soil. **Applied Microbiology**, v.17, p. 718-720, 1969.
- MILNER, R.J.; LUTTON, G.G. *Metarrhizium anisopliae*: Survival of Conidia in the soil. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY, 1. 1976,. Kingston. **Proceedings...** Kingston: Queen's University, 1976. p. 428-429.
- MORRIS, O.N. A method of visualizing and assessing deposits of aerially sprayed insect microbes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.22, p.115-121, 1972.
- MOSCARDI, F.; KARTELIC, J. G. Persistência de *Baculovirus anticarsia* em função da dose aplicada na superfície do solo. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). **Resultados de pesquisa de soja 1984/85**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1985a. p.73-75.
- MOSCARDI, F.; KARTELIC, J. G. Persistência de *Baculovirus anticarsia* no solo, em sistemas de cultivo convencional e direto. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). **Resultados de pesquisa de soja, 1984/85**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1985b. p.76.
- MOSCARDI, F.; KARTELIC, J. G. Persistência de *Baculovirus anticarsia* em função da dose aplicada na superfície do solo. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). **Resultados de pesquisas de soja 1985/86**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1987. p 68-69.
- MOSCARDI, F.; KARTELIC, J.G. Persistência de *Baculovirus anticarsia* em função da dose aplicada à superfície do solo. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). **Resultados de pesquisa de soja 1986/87**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1988. p.65-72.
- NARAYANAN, K.; GOVINDARAJAN, K.; JAYARAJ, S. Preliminary observations on the persistence of nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera litura* F. **Madras Agricultural Journal**, v.64, n.7, p.487-488, 1977.
- PINNOCK, D.E.; BRAND, R.J.; MILSTEAD, J.E.; JACKSON, K.L. Effect of three species on the coverage and field

- persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. Insect biological control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.25, n.2, p. 209-214, 1975.
- ROONE, R.E.; DAOUST, R.A. Survival of the nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis armigera* on crops and soil in Botswana. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 27, p. 7-12, 1976.
- SWIFT M.J. Microbial succession during the decay of organic matter. In: BURNS, R.G.; SLATER, J.H., ed. **Experimental microbial ecology**. Oxford: Blackwell, 1982. p.164-177.
- THOMAS, E.D.; REICHELDERFE, C.F.; HEIMPEL, A.M. The effect of soil pH of cabbage looper nuclear polyhedrosis virus in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.21, n.1, p. 21-25, 1973.
- WALTER, M.V.; BARBOUR, K.; SEIDLER, R.J. A method to evaluate survival of genetically engineered microorganisms in soil extracts. **Current Microbiology**, 1987.
- WALTER, M.V.; PORTOUS, A.; SEIDLER, R.J. Measuring genetic stability in bacteria of potential use in genetic engineering. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.105-109, 1987.
- WOYCIECHLOWSKA, M.; KMITOWA, K.; FEDORKO, A.; BAJAN, C. Duration of activity of entomopathogenic microorganisms introduced into the soil. **Polish Ecological Studies**, v.3, n.2, p.141-148, 1977.
- YOUNG, S.Y. Pre-and post-treatment assessment of virus levels. In: SUMMERS, M.; ENGLER, R.; FALCON, L.; VAIL, P., ed.. **Baculoviruses for insect pest control: safety considerations - selected papers from EPA-USDA working symposium**. Washington, D.C.: American Society of Microbiology, 1975. p.134-142.

# ASPECTOS DO PLANEJAMENTO, EXPERIMENTAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DE BIOENSAIOS

---

## PARTE VI

### APÊNDICE

#### 1. INTRODUÇÃO

Os órgãos governamentais responsáveis pela concessão de registro para *agentes microbianos de controle biológico* (AMC) exigem uma série de informações sobre o *risco* de ocorrência de efeitos adversos no ambiente, decorrentes do uso desses agentes. Parte da informação necessária para *avaliação de risco* consiste na *avaliação toxicopatológica de organismos não-visados*. Essa avaliação é feita através de testes com organismos representativos de diferentes *compartimentos ambientais* e diferentes *níveis tróficos*, dentro desses compartimentos, em condições de laboratório.

Testes dessa natureza são usualmente denominados *bioensaios*, designação geral de experimentos cujo objetivo é quantificar o efeito de drogas, pesticidas, hormônios, vitaminas, entre outros, em características de plantas e animais. De modo mais formal, FINNEY (1971) define *bioensaio* como um conjunto de técnicas utilizadas para avaliar a potência de estímulos químicos, físicos, biológicos ou psicológicos, através de suas reações em organismos vivos. Os termos *bioensaio* e *teste toxicológico* são muitas vezes empregados indistintamente. No entanto, os testes de toxicidade constituem uma classe restrita de bioensaios, onde os efeitos dos estímulos (quando existirem) serão sempre adversos (STEPHAN, 1979). Considerando essa definição, os testes para avaliação toxico-patológica de organismos não-alvo serão doravante referidos como *bioensaios*.

A metodologia para realização dos bioensaios é estabelecida em *protocolos* que buscam uniformizar os procedimentos em nível mundial, sem, no entanto, desconsiderar características específicas de cada país. GAD & WEIL (1982) consideram parte significativa do desenvolvimento de um protocolo a escolha dos métodos estatísticos a serem utilizados. Ressaltam que essa escolha deve ser feita *a priori*, pois constitui informação essencial para seleção eficiente de outros aspectos, tais como número de réplicas e número de animais por réplica, por exemplo. Entende-se por seleção eficiente aquela que considera critérios relacionados com a qualidade desejada para os resultados. Por exemplo, suponha que se deseja avaliar o efeito de um biopesticida na mortalidade de um organismo não-alvo: a informação sobre esse efeito é quantificada pela diferença entre as mortalidades observadas em organismos tratados e não-tratados e o número de organismos pode ser definido com base na precisão desejada para a informação sobre a diferença real. Muitas vezes, o protocolo estabelecido num país baseia-se em outros já internacionalmente aceitos nos quais, para a maioria dos testes, muitos aspectos experimentais já estão definidos. No entanto, dependendo das condições experimentais onde os testes serão executados, pode haver necessidade de redefinição de aspectos estatísticos do planejamento.

O objetivo dos bioensaios para avaliação tóxico-patológica é obter informação sobre *parâmetros biológicos*, como mortalidade, fertilidade, ganho de peso, mobilidade, manifestações patológicas, de *populações de organismos não alvo*, representadas pelos organismos testados. A informação obtida através dos dados experimentais sobre os parâmetros de interesse para avaliação de risco é utilizada no cálculo de *estimativas* desses parâmetros ou em *testes de hipóteses*.

## 2. ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS

### 2.1. Estimação por intervalos de confiança

A informação contida nos dados experimentais sobre um determinado parâmetro pode ser resumida através de *estatísticas descritivas*, como média, mediana, desvio padrão e variância.

Quando utilizadas para estimar parâmetros, as estatísticas são denominadas *estimadores*. Como envolvem dados sujeitos a *erro experimental*, os estimadores têm associado a eles um *grau de incerteza*, que pode ser expresso através do *erro padrão da estimativa* ou de *intervalos de confiança*.

O *erro padrão da estimativa* é uma medida da *variabilidade* dos possíveis valores da estimativa se o bioensaio fosse repetido infinitas vezes, sob condições idênticas. É evidente que o bioensaio não será repetido para esse fim; no entanto, um planejamento experimental adequado permite quantificar essa variabilidade, utilizando a informação sobre o erro experimental obtida em um único bioensaio.

O *intervalo de confiança* é um conjunto de valores plausíveis, segundo algum critério, para o parâmetro desconhecido e considera além do *erro padrão da estimativa*, o conceito de *grau de confiança*. A amplitude do intervalo de confiança reflete a *quantidade de informação* sobre o parâmetro que se deseja estimar: quanto menor essa amplitude, mais precisa será a estimativa. O grau de confiança é fixado pelo pesquisador e deve refletir, como o próprio nome indica, a confiabilidade desejada para aquela estimativa.

Os métodos estatísticos utilizados no cálculo de intervalos de confiança envolvem *pressupostos* relacionados à distribuição de probabilidade das estimativas. Esses pressupostos estão relacionados com a natureza da variável mensurada (se proporção ou contagem, por exemplo) e alguns aspectos da metodologia experimental, principalmente aleatorização, número de réplicas e número de indivíduos por réplica.

### 2.2. Estimação por testes de hipótese

Muitas vezes, além de estimar parâmetros, o objetivo de um bioensaio é compará-los em diferentes grupos como, por exemplo, comparar taxas de mortalidade de *organismos não alvo* tratados e não-tratados com uma *dieta contendo um biopesticida*. Comparar as mortalidades e decidir, por meio de algum critério, se elas diferem ou não, corresponde a testar uma *hipótese científica* subjacente, que, baseada no conhecimento científico sobre o problema estudado, prevê “provisoriamente” o comportamento das mortalidades.

No método científico tradicional, estabelecida a hipótese científica, são imaginadas ou deduzidas conseqüências lógicas dessa hipótese e definidas as regras para testá-las. Uma possível maneira é construir uma *hipótese nula* (negação da hipótese científica), uma *hipótese alternativa* (representação da hipótese científica) e buscar evidências contra a hipótese nula. Se as evidências observadas forem consideradas suficientes, a hipótese nula é rejeitada e a hipótese alternativa assumida como verdadeira.

Quando o objetivo de um bioensaio é testar hipóteses sobre parâmetros de interesse, os dados experimentais são utilizados para quantificar o *grau de evidência* contra a hipótese testada. A decisão sobre

se existe ou não evidência suficiente pode ser tomada com base em métodos estatísticos conhecidos como *testes (estatístico) de hipóteses*.

A decisão de rejeitar ou não a hipótese testada, qualquer que seja o *critério* utilizado, envolve vários tipos de *erros*. No exemplo anteriormente citado, ao se decidir se a mortalidade de organismos não-visitados em determinadas condições é afetada ou não por um biopesticida, podem ser cometidos dois *tipos de erro*. Suponha que a *hipótese nula* (hipótese que se busca rejeitar) é que *o biopesticida não afeta a mortalidade*. Essa hipótese (nula) pode ser verdadeira e ser rejeitada, ou ainda ser falsa e não ser rejeitada, com base na informação fornecida pelos dados experimentais. Na terminologia estatística, convencionou-se denominar o primeiro como *erro tipo I* e o segundo como *erro tipo II*. Outro conceito importante na teoria de testes de hipóteses é o *poder*, probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando ela é falsa. O poder e a probabilidade de erro tipo II são probabilidades de eventos complementares, isto é, sempre somam 100%.

Quando o pesquisador decide rejeitar ou não a hipótese, considerando apenas a *mortalidade média* observada em cada grupo, não há como quantificar a probabilidade de cometer os erros tipo I ou II, o que não implica a sua decisão esteja errada. Entretanto, dependendo da magnitude do *erro experimental* envolvido, pode haver alta probabilidade de observar num experimento “grandes” diferenças entre as mortalidades, sem que haja nenhum efeito do biopesticida. Os *métodos de análise estatística* quantificam de forma exata ou aproximada essa probabilidade denominada “*p-value*” algumas vezes traduzida como *valor p*. Pequenos valores de *p* indicam forte evidência contra a hipótese nula. A decisão sobre se um *valor p* é grande ou pequeno está associada à *máxima probabilidade de erro tipo I* admitida, denominada *nível de significância*.

### 3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento de um bioensaio compreende a definição de um protocolo, descrevendo técnicos e aspectos estatísticos. Apesar de não haver uma fronteira clara entre eles, os *aspectos técnicos* estão mais relacionados com o cultivo de organismos, preparo das formulações, escolha de métodos de mensuração, técnicas laboratoriais; já os *aspectos estatísticos*, estão associados à definição de *regras lógicas de decisão* e à *otimização* no emprego dos recursos, buscando reduzir os *custos* experimentais e aumentar a *precisão* dos resultados.

A teoria envolvida nos *aspectos estatísticos* do planejamento é uma área da Estatística denominada *planejamento de experimentos*. A aplicação dessa teoria busca assegurar o emprego de métodos estatísticos de análise de dados e contribuir para melhoria da qualidade dos resultados de pesquisa. MONTGOMERY (1991) afirma que quando os problemas estudados envolvem dados sujeitos a *erro experimental*, a única abordagem objetiva de análise é aquela baseada em *inferência estatística*. O mesmo autor define planejamento experimental como *o processo de planejar o experimento, de modo que os dados a serem coletados possam ser analisados utilizando métodos de inferência estatística, resultando em conclusões válidas e objetivas*.

Os três princípios básicos do planejamento experimental são *aleatorização*, *repetição* e *bloqueio*. Esse princípios estão descritos em textos básicos sobre planejamento experimental como COX (1958) e MONTGOMERY (1991). Aspectos de planejamento experimental para o caso específico de bioensaios são abordados em FINNEY (1978).

*Aleatorização* refere-se à alocação aleatória dos tratamentos ao material experimental. Os métodos de inferência estatística mais freqüentemente utilizados na análise de bioensaios requerem observações *independentes*; a aleatorização usualmente torna esse pressuposto menos questionável, além de contribuir para que as possíveis causas de erro experimental sejam igualmente distribuídas entre os tratamentos. Nos últimos anos, com a possibilidade do uso de métodos estatísticos com o uso de computadores, os testes teoricamente fundamentados na aleatorização, denominados *testes permutacionais*, tornaram-se uma importante alternativa para análise de dados (MANLY, 1991), justificando ainda mais a necessidade da aleatorização.

*Repetição* é o resultado da aplicação de um mesmo tratamento a várias unidades experimentais. A replicação torna possível obter uma *estimativa do erro experimental*, imprescindível na construção de *intervalos de confiança* e de *critérios de decisão* dos testes de hipóteses. O *número de repetições* a ser utilizado num experimento é uma das questões mais freqüentes com que se depara um consultor de estatística. Sua determinação depende do estabelecimento de um *alvo* a ser atingido, que pode ser definido como a *precisão* desejada para uma estimativa ou o *poder* exigido para um teste de hipóteses.

O princípio de *blocagem*, conhecido em experimentação agrícola como *controle local*, consiste na separação das unidades experimentais em grupos com a maior *homogeneidade interna* possível, para posterior alocação aleatória dos tratamentos nesse grupos. Uma blocagem adequada contribui para redução do erro experimental e, conseqüentemente, para um aumento na *precisão das estimativas* ou *poder dos testes de hipótese*.

FINNEY (1978) enumera diversos aspectos estatísticos envolvidos no planejamento de um bioensaio, como escolha de doses (no caso de tratamentos quantitativos), determinação do número de réplicas, definição de regras para alocação das unidades experimentais aos tratamentos, ordem na qual as medidas de interesse são feitas e outros relacionados com a estrutura lógica do experimento. Todos esses aspectos estão relacionados com os princípios básicos da experimentação.

### 3.1. Planejamento visando precisão de estimativas

Quando o objetivo do bioensaio é *estimar parâmetros* e construir *intervalos de confiança*, o planejamento experimental busca assegurar a *validade dos pressupostos* para o método de análise preestabelecido e a possibilidade de *quantificar o erro experimental* utilizado na construção dos intervalos. Outra importante meta do planejamento experimental, nesse caso, é garantir a *precisão* desejada para as estimativas dos parâmetros, com o mínimo custo possível.

O planejamento para obtenção de estimativas precisas exige a especificação do *limite máximo de erro* e *grau de confiança* desejado para as estimativas (BOLFARINE & BUSSAB, 1993) e algum conhecimento prévio sobre a *magnitude do erro experimental* (coeficiente de variação, erro padrão da diferença entre médias) que pode ser baseado em experimentos similares ou obtido através de um *ensaio piloto*. Na ausência de informações preliminares, o grau de precisão da estimativa pode ser simulado para supostas magnitudes de erro experimental.

### 3.2. Planejamento visando poder de testes de hipóteses

Num bioensaio, cujo objetivo é comparar tratamentos, o *poder* de um teste estatístico utilizado para esse fim é uma medida da sua capacidade de detectar efeitos dos tratamentos, quando eles existem. No caso da comparação das mortalidades em organismos não-visados, a *hipótese nula* estabelece que o

efeito do biopesticida (diferença entre as mortalidades) é nulo. Suponha que a *hipótese alternativa* é que o biopesticida aumenta a mortalidade. Dessa forma, a hipótese alternativa será verdadeira sempre que o efeito do biopesticida assumir qualquer valor no intervalo entre zero (exclusivo) e um. Portanto, nesse caso, o poder deve ser uma função crescente do verdadeiro valor do efeito, isto é, quanto maior a real diferença entre as mortalidades, maior a capacidade do teste em detectá-la. A definição formal de poder é a probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando ela é falsa.

É importante notar que apesar de o verdadeiro efeito do biopesticida ser desconhecido pode-se avaliar o poder do teste utilizado para detectá-lo. O poder de um teste depende da magnitude do erro experimental e, conseqüentemente, do número de repetições utilizadas no experimento. Por exemplo, no bioensaio anteriormente referido pode-se estabelecer o número de repetições de modo que a probabilidade de rejeitar a hipótese nula seja superior a 90%, quando a diferença de mortalidade for superior a 15%.

Quando o resultado de um teste estatístico para comparar as mortalidades resulta *não significativo*, isso não implica ausência de efeito do biopesticida, e sim, segundo o critério de decisão utilizado, as evidências contra a hipótese nula não terem sido consideradas suficientes. Quando o teste utilizado tem baixo poder, mesmo quando os efeitos dos tratamentos são consideráveis, é pouco provável que ele indique diferenças significativas.

Altos *coeficientes de variação* na análise de variância e altos valores de *DMS* (diferença mínima significativa) nos testes de comparação de médias indicam baixo poder dos testes estatísticos implícitos nesses procedimentos.

#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DE BIOENSAIOS

A análise estatística de um bioensaio geralmente refere-se ao uso de técnicas de estimação ou testes de hipóteses baseadas em *inferência estatística*. A análise estatística e o planejamento (estatístico) do bioensaio estão diretamente relacionados, já que o método de análise depende em grande parte do delineamento experimental empregado. O ideal é que os métodos de análise sejam planejados antes da realização do experimento. Muitas vezes, porém, esse procedimento é dificultado pela ausência de informação preliminar sobre as variáveis estudadas, com base no conhecimento científico sobre o objeto da pesquisa.

A natureza dos fatores que definem os tratamentos (variáveis independentes) e das variáveis sobre as quais os possíveis efeitos são observados (variáveis resposta) é fundamental na escolha do delineamento experimental e, conseqüentemente, no método de análise dos dados. Nos referimos à natureza, no sentido de escala de mensuração. GAD & WEIL (1982) definem como variável contínua aquela que, pelo menos teoricamente, pode assumir um número infinito de valores entre quaisquer dois pontos fixos. Por outro lado, uma variável é dita discreta se pode assumir apenas alguns valores numéricos fixos, sem valores intermediários possíveis. Como exemplo de variável contínua temos peso, densidade, pH, concentração de solutos; já variáveis como número de mortos, número de imóveis, número de células por unidade de área são discretas. Muitos outros fatores relacionados com as pressuposições específicas de cada método de análise influem na sua escolha. GAD & WEIL (1982) apresentam um diagrama orientando a seleção de procedimentos de testes de hipóteses.

Os métodos de inferência ditos clássicos, em oposição aos bayesianos, podem ser classificados em paramétricos e não-paramétricos, dependendo se é assumida ou não uma distribuição de probabilidade para a variável observada. A informação disponível *a priori* sobre a natureza do comportamento da variável resposta é decisiva na formulação de hipóteses, no planejamento experimental e na escolha do método de análise.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- BOLFARINE, H.; BUSSAB, W. O. Elementos de amostragem. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA, 2., 1994, Belo Horizonte, MG. **Minicurso**. Belo Horizonte: UFMG, 1994. p. 124-132.
- COX, D. R. **Planning of experiments**. New York: J. Wiley, 1958.
- FINNEY, J. **Probit analysis**. 3. ed. London: Cambridge University Press, 1971.
- FINNEY, J. **Statistical methods in biological assay**. 3. ed. London: Griffin, 1978.
- GAD, S.C.; WEIL, C.S. Statistics for toxicology. In: PRINCIPLES and methods of toxicology. New York: Raven Press, 1982.
- MANLY, B.F.J. **Randomization and Monte Carlo methods in biology**. London: Chapman and Hall, 1991.
- MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. New York: J. Wiley, 1991. p.8-9.
- STEPHAN, C.E. Methods for calculating an  $LC_{50}$ . In: MAYER, F.L.; HAMELICK, J.L., ed. **Aquatic toxicology and hazard evaluation**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1977. p.65-84. (ASTM-STP 634).

## **AGRADECIMENTOS**

---

Consignamos nossos agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na elaboração desta 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 deste trabalho.

Agradecimentos especiais ao professor Frederico Lencione da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, pela colaboração na execução deste protocolo.

**Embrapa**

---

*Meio Ambiente*

  
**Brasil**  
EM AÇÃO

**GOVERNO  
FEDERAL**