

[16/03/2005]

## **Etapas para el desarrollo y registro de un biopesticida**

José Manuel Lara y Carolina Fernández.

Departamento de Investigación y Desarrollo, FuturEco, S.L., Barcelona, España (www.futureco.net)

### **Introducción**

Durante los últimos cinco años, un equipo formado por personal de FUTURECO y grupos de investigación de diferentes Centros Españoles (Universidad de Barcelona, Universidad Autónoma de Barcelona, Escuela de Agrónomos de Barcelona y el Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, entre otros) ha coordinado esfuerzos para desarrollar, evaluar y registrar a nivel europeo un nuevo bio-insecticida para el control de la mosca blanca en cultivos de tomate en invernadero. Este ha sido un largo y complejo proceso, que para FuturEco, al igual que la mayoría de empresas involucradas en el desarrollo y comercialización de biopesticidas (PYMES), supone un reto difícil de asumir no sólo por la inversión inicial, sino por la incertidumbre y largo tiempo de amortización.

El estricto control sobre la utilización de productos fitosanitarios convencionales, generado por la aplicación de la Directiva 91/414/EC, ha generado una urgente necesidad de oferta de medios para protección vegetal de bajo impacto ambiental. Como consecuencia de esto y la complejidad y coste del registro, han aparecido en los últimos años numerosos productos, que con la etiqueta de "biológico", se ofrecen como alternativas para el control de plagas y enfermedades, pero que en la mayoría de los casos no cuentan con la debida autorización de venta, ni han sido suficientemente estudiados.

El uso de Agentes de Control Biológico (ACB) como macroorganismos (nematodos, depredadores y parasitoides), microorganismos (formulaciones en base a bacterias, virus y hongos), semioquímicos (feromonas), y productos naturales (a base de extractos vegetales) o inductores resistencia (ISR), gana cada vez más terreno en el ámbito europeo y mundial. Sin embargo, el estudio y desarrollo de biopesticidas basados en estos ACBs, se ve seriamente limitado por la falta de una reglamentación específica que reconozca plenamente sus diferencias fundamentales respecto a los productos fitosanitarios basados en moléculas químicas sintéticas. En el caso concreto de los biopesticidas, actualmente las autoridades europeas únicamente autorizan un producto de protección vegetal basado en un microorganismo si:

1. No tiene efectos sobre la salud humana y animal
2. No tiene una influencia negativa sobre el medio ambiente
3. Es suficientemente efectivo para los usos propuestos.

La información que ha de generarse para sustentar estas características se hace con base en la Directiva 2001/36/EC, que es una normativa específica para microorganismos derivada de la Directiva 91/414/EC. Sin embargo, el consenso general entre los investigadores y empresas relacionadas con el control biológico, es que esta directiva toma como base la de los pesticidas sintéticos y muchos de los requisitos exigidos para un producto formulado con un ACB son exagerados o fuera de contexto.

Cuando se ha recogido la información, la empresa debe elaborar un Dossier que se entrega a las autoridades de uno de los países miembros de la UE, Rappourter Member State (RMS), quienes realizan una primera evaluación y solicitan los datos que a su juicio pueden faltar. Una vez el RMS junto con la empresa, consideran que el dossier está completo, éste se somete a la evaluación de una comisión de la UE compuesta por miembros de cada uno de los países de la Unión. Siguiendo este proceso en 2001 se autorizó (inclusión en el anejo I de

la directiva 91/414/EC) el primer ACB (*Paecilomyces fumosoroseus* cepa Apopka 97) y en 2004 se han autorizado 2 más: *Coniothyrium minitans* cepa CON/M/91-08 (DSM 9660) y *Pseudomonas chlororaphis* cepa MA 42.

El pasado mes de enero, Bélgica, actuando como RMS, aceptó el Dossier Técnico de una nueva formulación (biopesticida), basada en un hongo entomopatógeno (ACB), desarrollado por la empresa FUTURECO S.L. (España) para control biológico de mosca blanca: FuturEco NOFLY™ (*Paecilomyces fumosoroseus* cepa FE 9901). Las autoridades belgas han iniciado la revisión y evaluación del Dossier presentado a fin de determinar la inclusión en el Anejo I de la Directiva 91/414/EC tanto de la materia activa y como del producto formulado.

Con base en la experiencia adquirida con FuturEco NOFLY™ (formulado a partir de un hongo entomopatógeno, Tabla 1) presentamos aquí una guía de las etapas que comprende el desarrollo y autorización de un nuevo producto biológico para protección vegetal. Es necesario aclarar que las etapas aquí presentadas corresponden a un microorganismo, específicamente un hongo entomopatógeno, y éstas pueden ser sustancialmente diferentes para otros ACBs (virus, feromonas, macroorganismos, etc).

### **Etapas I: Selección del ACB:**

El primer punto es la identificación de una especie plaga o enfermedad susceptible de ser controlada con un ACB. Una vez identificada la especie diana, a través de referencias bibliográficas y de la experiencia particular de diferentes grupos de investigación, se selecciona el teórico mejor agente de control biológico (ACB). Una vez seleccionada la especie de ACB, la búsqueda se debe dirigir hacia la selección del mejor aislamiento (cepa) del microorganismo con base en tres parámetros fundamentales:

- Facilidad de multiplicación
- Alta virulencia y patogenicidad
- Amplio rango de hospederos

La cepa o cepas seleccionadas en el laboratorio, se cultivan en medio de cultivo sintéticos apropiados y después de un tiempo de incubación se separan las unidades infectivas del ACB. Éstas se ponen en contacto con los diferentes ciclos de vida de la plaga objetivo. Para cada aislamiento se determinan los siguientes parámetros:

- Grado de patogenicidad
- Grado de virulencia
- Esporulación / colonización
- Etapas del ciclo de vida afectadas

Posteriormente se realiza una caracterización morfológica, fisiológica, bioquímica y molecular de los distintos aislados.

Con base en el análisis de estos datos se seleccionan cierto número de aislamientos, para abordar la siguiente etapa en el desarrollo del biopesticida: la producción de una cantidad importante de propágulos infectivos para la realización de ensayos de eficacia en laboratorio y campo.

### **Etapas II: Multiplicación del ACB (generación de una nueva formulación):**

De acuerdo con el ACB finalmente seleccionado, la bibliografía y la experiencia particular del grupo de investigadores que participan en el desarrollo del biopesticida, se estudian los métodos más económicos y rápidos para producir cantidades importantes del ACB.

El producto final idealmente debe ser una formulación que le resulte habitual al agricultor

(suspensión concentrada, emulsionado soluble, polvo mojable, gránulos, etc), cuyo papel fundamental es facilitar la aplicación y proteger las esporas de los factores adversos del medio ambiente (baja humedad relativa, sequedad, temperaturas extremas).

El desarrollo de este proceso de multiplicación comprende las siguientes etapas:

Optimización de un medio de cultivo conciliando la facilidad de multiplicación del ACB, la disponibilidad de materias primas y el coste general del proceso.

Estabilización de las esporas producidas, y caracterización de las etapas de separación de biomasa, estabilización y formulación.

### **Etapas III: evaluación de la eficacia de la formulación:**

#### **Ensayos de laboratorio**

Los propósitos de estos ensayos son:

- Verificar el rango de hospederos del microorganismo, el tiempo y la concentración letal
- Estudiar los mecanismos de acción del ACB sobre las diferentes etapas del ciclo de vida de los microorganismos
- Estudiar la acción sobre un rango más amplio de huéspedes
- Determinar la influencia de los factores bióticos y abióticos sobre la eficacia del producto para producir infecciones sobre el huésped (plaga objetivo)

#### **Ensayos de campo:**

Los estudios deben planificarse en función del cultivo y de la plaga objetivo, seleccionando la mejor época del año y la extensión de la evaluación. El registro de la actividad insecticida / fungicida, se hace a través de la monitorización de las poblaciones de los insectos plaga.

Las evaluaciones de eficacia se deben realizar sobre el ámbito de aplicación para el cual se tiene previsto solicitar la autorización de comercialización (registro): campo abierto, invernadero, poscosecha, ornamentales, espacios públicos etc. El número de ensayos ha de ser suficiente para demostrar que el producto no tiene un impacto negativo sobre el medio ambiente y es suficientemente efectivo. Es importante verificar que los ensayos se realicen siguiendo pautas establecidas por las reglamentaciones internacionales para que puedan ser oficialmente reconocidos.

### **Etapas IV: Evaluación sobre la salud humana e impacto sobre el medio ambiente**

#### **- Pruebas toxicológicas**

Una vez se ha demostrado que el producto realmente funciona bien en campo y que no representa un riesgo significativo para el medio ambiente, se ha de cumplir satisfactoriamente con la tercera condición para que el producto pueda ser autorizado: el carácter inocuo para el hombre y fauna en general.

La temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos entomopatógenos está generalmente entre 25-30°C, siendo incapaces de crecer por encima de 35°C. Esto implica, que a diferencia de las sustancias químicas convencionales, la mayoría de pruebas del Tier I de toxicidad demuestran que estos productos son totalmente inocuos, por lo que la realización de ensayos de toxicidad crónica y subcrónica es innecesaria.

Los protocolos aplicados para la evaluación del potencial toxicológico de sustancias químicas no son aplicables para los ACBs. En Europa no se han desarrollado procedimientos

específicos, pero la EPA (en EEUU, donde se han registrado más de 100 productos basados en ACBs) publicó en 1996 una serie de métodos conocidos como "Microbial Pesticide Test Guidelines OPPTS serie 885". Estos métodos que comprenden procedimientos específicos para valorar la toxicidad aguda por vía oral, pulmonar, intraperitoneal así como la evaluación del potencial mutagénico de una cepa particular de un ACB, son reconocidos y recomendados por las autoridades comunitarias para las empresas interesadas en el desarrollo de biopesticidas.

De acuerdo con esto, y con la investigación bibliográfica fundamentada que se pueda completar, se puede argumentar científicamente la renuncia a desarrollar algunos de las pruebas exigidas. La información toxicológica es un factor crítico ya que normalmente representa la mayor parte de la inversión cuando se desarrolla un nuevo producto para protección vegetal.

#### **- Producción de metabolitos y toxinas:**

La evaluación del potencial del microorganismo utilizado como ACB para generar metabolitos o toxinas que puedan ser peligrosos para la salud y el medio ambiente, es uno de los aspectos más importantes evaluados por las autoridades. Estos análisis deben realizarse en laboratorios certificados.

#### **- Evaluación sobre el impacto medio ambiental**

Es aquí donde probablemente surgen las mayores diferencias (y ventajas) para un ACB frente a una sustancia sintética. Al ser microorganismos que normalmente se encuentran en el medio ambiente, los estudios de residuos en suelo, agua o aire son normalmente innecesarios. Pero para poder argumentar con la suficiente calidad científica la inviabilidad de estos estudios es necesario demostrar ampliamente (normalmente a través de artículos en revistas científicas) que el microorganismo en cuestión es un componente habitual de ecosistemas similares al que se pretende aplicar.

Los estudios de ecotoxicidad (sobre organismos diferentes al que se pretende controlar) normalmente se circunscriben solamente a la evaluación del poder patogénico sobre abejas e insectos beneficiosos presentes en los cultivos y ámbitos geográficos donde se propone la utilización del nuevo ACB. Los estudios sobre organismos acuáticos y aves normalmente son evitables siempre y cuando existan en la literatura abierta referencias de pruebas del microorganismo (otras cepas).

En este apartado, el estudio que tiene más relevancia es la evaluación del poder patogénico del ACB sobre la fauna benéfica asociada al cultivo objetivo. Es imprescindible que se identifiquen las principales especies de depredadores y parasitoides naturales de la plaga a controlar, y hacer ensayos in vitro, semi campo y campo, con las dosis de aplicación comerciales del nuevo biopesticida y superiores. La intención es que los biopesticidas basados en agentes microbianos sirvan de potenciadores del control biológico ejercido por los enemigos naturales y no constituyan una competencia o factor adverso para ellos.

#### **Etapas V: Registro**

Una vez elaborados todos los estudios correspondientes, y asegurado que se cumple con las tres condiciones básicas para la obtención de la autorización de registro, el paso final es preparar la presentación de toda la documentación. Este es un trabajo que demanda mucho tiempo, pero normalmente se va haciendo en forma paralela a la realización de los ensayos particulares. La OECD publica de manera periódica los formatos oficiales que han de seguir las empresas interesadas en hacer una solicitud para la autorización de biopesticidas.

Cuando se ha completado el Dossier, o se está a punto de finalizar, la empresa debe buscar un RMS que le represente en el proceso de evaluación en la Unión Europea. Lo lógico sería que dicho país fuera el mismo donde la empresa tiene su sede, pero no siempre es así. Para

una compañía pequeña o mediana, que son las que normalmente están detrás del desarrollo de este tipo de productos, supone un grandísimo esfuerzo, y debe asegurarse que el país que recibe su Dossier realmente se va a interesar por agilizar la evaluación de éste.

## CONCLUSION

El proceso de desarrollo y registro de un producto biológico para protección vegetal es largo y costoso. Mientras no exista un pleno reconocimiento de sus particularidades reflejado en una normativa específica, que los separe completamente de los productos fitosanitarios sintéticos, su desarrollo se verá limitado. Es imprescindible que todas las nuevas alternativas de control biológico de plagas, generadas en investigaciones cada vez más numerosas, trasciendan del ambiente académico y se traduzcan en herramientas concretas y efectivas al alcance del agricultor. Pero para que ello sea posible es urgente que los investigadores, autoridades y empresas del sector aúnen esfuerzos y generen un frente de presión efectivo para adecuar la reglamentación actual a la realidad del control biológico.

Tabla 1. Etapas específicas para el desarrollo de FUTURECO NOFLY™ (*Paecilomyces fumosoroseus* cepa FE 9901)

ETAPA	EVALUACIONES / ACTUACIONES	RESULTADOS
I - Selección ACB	<p><b>Antecedentes bibliográficos:</b></p> <p>Patógeno= cosmopolita. Presenta numerosas resistencias a pesticidas químicos</p> <p>ACB = produce mortalidades en todas las etapas del ciclo, incluyendo huevos. Ampliamente estudiado, confirmando su inocuidad para los seres humanos y el medio ambiente</p> <p><b>Antecedentes comerciales</b></p> <p>Existe en el mercado una cepa de la misma especie registrada en EEUU y en Europa. Esto garantiza de alguna manera su efectividad y que no posee ningún riesgo para la salud humana y el medio ambiente.</p>	<p>Selección de la cepa FE9901 de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> para el control de mosca blanca</p> <p>Caracterización de la cepa seleccionada a nivel:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Morfológico (Microscopio óptico y scanning)</li> <li>- Fisiológico (Biolog-Microplate)</li> <li>- Molecular (RAPID-PCR)</li> </ul>
II Multiplicación ACB	<p><b>Diseño de l Proceso de Fabricación:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Selección y aplicación del medio de cultivo</li> <li>- Caracterización de los parámetros del proceso</li> </ul>	<p>Optimización del medio de cultivo</p> <p>Estabilización de las esporas producidas</p> <p>Formulación: polvo mojable (WP)</p> <p>Desarrollo del proceso de producción hasta escala piloto</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Caracterización de las etapas de separación y secado</li> <li>- Formulación del ingrediente activo</li> <li>- Estudios de estabilidad</li> </ul>	
III - Evaluación de la eficacia de la formulación	<p><b>Ensayos de laboratorio y cámara climática:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Comparación de la eficacia del producto técnico y de la formulación preliminar</li> <li>- Mortalidad producida por diferentes concertaciones (Dosis Letal Media, Concentración Letal, Tiempo Letal)</li> </ul>	<p>FuturEco NOFLY™ resultó eficaz para el control de 4 especies de moscas blancas (<i>Bemisia tabaci</i>, <i>Trialeurodes vaporariorum</i>, <i>Aleroidicus dispersus</i> y <i>Lecanoideus flccissimus</i>). Los efectos patogénicos se verificaron sobre todas las etapas del ciclo de vida.</p>
	<p><b>Ensayos de campo:</b></p> <p>Se evaluó el producto formulado en invernaderos experimentales en Tenerife y Barcelona para el control de mosca blanca en cultivo de tomate.</p>	<p>El producto resultó eficaz en los distintos ensayos para el control de los diferentes estadios de <i>Bemisia tabaci</i> y/o <i>Trialeurodes vaporariorum</i>. El control fue similar al conseguido con un pesticida sintético.</p> <p>En condiciones de campo, no se observaron efectos negativos sobre organismos beneficiosos (<i>Encarsia</i>, <i>Orius</i>, <i>Eretmocerus</i>, <i>Iphiseius</i>, <i>Phytoseiulus</i>)</p>
IV - Evaluación sobre la salud humana e impacto sobre el medio ambiente	<p><b>Toxicología:</b> Toxicidad oral aguda, toxicidad dérmica aguda, toxicidad aguda por inhalación, irritación dérmica, irritación ocular, sensibilización dérmica, potencial genotóxico (Ames test)</p>	<p>Todos los estudios demostraron la ausencia de toxicidad para humanos o animales. La toxicidad aguda por vía oral e intravenosa se realizó en ratas y la pulmonar en hurones. Los efectos de la formulación (irritación cutánea, ocular, sensibilización de la piel) se estudiaron en conejos. En todos los casos, los resultados revelaron que el producto es incapaz de producir efectos adversos relacionados con un carácter tóxico. <i>P. fumosoroseus</i> cepa FE9901 es incapaz de crecer a temperaturas superiores a 35 °C.</p>
	<p><b>Metabolitos y Toxinas:</b> determinación de la ausencia de metabolitos y toxinas por HPLC.</p>	<p>El análisis del extracto crudo de la fermentación realizada a partir de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> cepa FE9901 demostró que esta cepa no produce ningún metabolito o toxina remarcable.</p>
	<p><b>Depredadores y parasitoides:</b> evaluación del efecto del producto</p>	<p>El producto resultó inocuo para adultos de <i>Encarsia formosa</i> y <i>Eretmocerus mundus</i> así como ninfas de <i>Orius</i></p>

	formulado sobre artrópodos no diana (organismos benéficos) en condiciones de laboratorio o semi-campo.	laevigatus
V - Registro	Elaboración de un Dossier para el Registro en la UE según la Directiva 2001/36/EC. Selección de un país como RMS y presentación del Dossier	Elaboración y presentación del Dossier para el registro de la materia activa <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> FE9901 y del producto formulado FuturEco NOFLY™ en Bélgica (RMS) en febrero del 2005.

---

Copyright © 2002 AgroInformacion.com All Rights Reserved