

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

# Bioinsumos na cultura da soja

*Maurício Conrado Meyer  
Adeney de Freitas Bueno  
Sérgio Miguel Mazaro  
Juliano Cesar da Silva*

Editores Técnicos

**Embrapa**  
Brasília, DF  
2022

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Soja**

Rodovia Carlos João Strass, acesso Orlando Amaral, Distrito de Warta  
Caixa Postal 231, CEP 86001-970, Londrina, PR  
Fone: (43) 3371 6000 Fax: (43) 3371 6100  
www.embrapa.br/  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

**Unidade responsável pelo conteúdo e edição**

Embrapa Soja

**Comitê Local de Publicações**

**Presidente:** *Alvadi Antonio Balbinot Junior*

**Secretária-Executiva:** *Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*

**Membros:** *Claudine Dinali Santos Seixas, Edson Hirose, Ivani de Oliveira Negrão Lopes, José de Barros França Neto, Liliane Márcia Mertz-Henning, Marco Antonio Nogueira, Mônica Juliani Zavaglia Pereira e Norman Neumaier*

**Supervisão editorial:** *Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol*

**Normalização bibliográfica:** *Valéria de Fátima Cardoso*

**Projeto gráfico e editoração eletrônica:** *Edil Gomes*

**Capa:** *Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol*

1ª edição: 2022

1ª impressão: PDF digitalizado

O conteúdo do livro, bem como a exatidão das citações e referências, são de inteira responsabilidade dos autores.

**Todos os direitos reservados.**

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

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Soja

---

Bioinsumos na cultura da soja / Maurício Conrado Meyer... [et al.] editores técnicos – Brasília,  
DF: Embrapa, 2022.  
550 p.

ISBN: ISBN: 978-65-87380-96-4

1. Soja. 2. Produção vegetal. 3. Insumo. 4. Fertilizante. I. Meyer, Maurício Conrado. II. Bueno, Adeny de Freitas. III. Mazaró, Sérgio Miguel. IV. Silva, Juliano Cesar da.

CDD: 633.34: 631.8 (21. ed.)

---

Valéria de Fátima Cardoso (CRB 9/1188)

©Embrapa, 2022

# Controle de qualidade de produtos microbiológicos

Natasha Sant'Anna Iwanicki

Italo Delalibera Júnior

Marcos Rodrigues de Faria

Rogério Biaggioni Lopes

Marcio Martinello Sanches

Marlinda Lobo de Souza

Claudine Dinali Santos Seixas

Daniel R. Sosa-Gómez

### Introdução

O controle de qualidade de bioinsumos à base de microrganismos é definido como um conjunto de procedimentos de ações preventivas e corretivas que visam garantir que o produto final seja seguro, viável e eficaz. Esses procedimentos são implementados em todas as fases do desenvolvimento do bioinsumo, iniciando pelas etapas de confirmação da identidade taxonômica, preservação adequada do microrganismo, produção *in vitro* ou *in vivo*, estabilização e armazenamento e terminando pelos testes para confirmação de sua eficácia.

Os bioinsumos à base de microrganismos aplicados na cultura da soja são compostos por fungos, bactérias ou vírus, usados no manejo de insetos-praga ou fitopatógenos. No caso de fungos à bactérias, podem ainda trazer benefícios para as plantas pelo estabelecimento de relações simbióticas. Já os produtos à base de vírus têm sido destinados exclusivamente ao controle de insetos.

Os fungos empregados nos bioinsumos podem ser classificados como: entomopatogênicos, a exemplo de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps (Isaria) javanica*, *Cordyceps (Isaria) fumosorosea*, *Cordyceps (Isaria) fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae*, utilizados no controle de insetos como mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*); micropatogênicos, como *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum*, aplicados para o controle de doenças fúngicas como a tombamento e morte em reboleira (*Rhizoctonia solani*) e o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), ou nematocidas como é o caso de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium (Paecilomyces) lilacinus* aplicados para o controle de nematoide de galhas (*Meloidogyne* spp.) e *Pratylenchus brachyurus* (Coutinho, 2018; Loureiro et al., 2020).

Bioinsumos constituídos por bactérias são usados por exemplo, na fixação de nitrogênio por *Bradyrhizobium japonicum*, controle de lagartas desfolhadoras por *Bacillus thuringiensis*, controle de nematoides por *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus firmus*, *Bacillus methylothrophicus* e controle de doenças como o mofo-branco por *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*. Alguns fungos e bactérias podem também atuar de forma indireta no controle de pragas e doenças pela ativação do sistema de defesa da planta. Além dessas funções, fungos e bactérias podem promover crescimento da parte aérea e radicular e podem disponibilizar nutrientes para as plantas, como a solubilização de fósforo e a fixação de nitrogênio.

Em contraste com a versatilidade de funções e o grande número de bioinsumos registrados a base de bactérias e fungos, os vírus representam o grupo de microrganismos de registros recentes disponíveis para manejo de insetos em lavouras. Esses microrganismos são altamente específicos comparativamente aos fungos e às bactérias e são empregados no controle de lagartas desfolhadoras, como é o caso de diversos representantes da família Baculoviridae, como *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HearNPV), *Chrysodeixis includens* nucleopolyhedrovirus (ChinNPV), *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) e *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) (Sosa-Gómez et al., 2020).

Um produto microbiano deve ser constituído por isolado previamente selecionado em laboratório e cuja eficácia tenha sido confirmada a campo, devendo ainda apresentar satisfatório rendimento industrial. Ainda, de acordo com a literatura (Jenkins et al., 1998; Jenkins; Grzywacz, 2000; Ravensberg, 2011; Faria et al., 2022a), os principais parâmetros a serem considerados no controle de qualidade de produtos comerciais à base de microrganismos são:

- identidade do microrganismo;
- concentração de unidades infectivas e/ou vigorosos por kg ou L da preparação ou formulação;
- virulência das unidades infectivas (quando o produto é registrado em conformidade com a estratégia inundativa de controle biológico)
- natureza e teor de contaminantes;
- vida de prateleira em temperatura representativa;
- características físico-químicas associadas ao produto.

Para cada parâmetro, há padrões e protocolos a serem seguidos para se obter produtos com boas especificações. A grande diversidade e as particularidades de cada microrganismo exigem processos de produção distintos, tornando o controle de qualidade de bioinsumos uma etapa complexa. No entanto, independente das peculiaridades, o controle de qualidade é indispensável em qualquer unidade de produção, indústria ou fazenda, pois visa garantir a reprodutibilidade do processo, a padronização do produto, a segurança ao ambiente e ao ser humano, a eliminação ou redução de contaminantes a níveis aceitáveis e a eficácia em campo. A comercialização de produtos de forma irregular, com baixa qualidade e fora de padrões pré-estabelecidos podem comprometer a confiabilidade no segmento de biocontrole.

Diretrizes que esclareçam os processos de controle de qualidade se fazem imperativas dentro do cenário atual de crescimento da adoção de bioinsumos na agricultura brasileira, das novas modalidades de produção de microrganismos e da exploração da biodiversidade. Neste capítulo abordaremos os principais processos envolvidos no controle de qualidade de bioinsumos, principalmente à base de microrganismos destinados ao controle de pragas tendo como modelo a aplicação na cultura da soja.

### Identificação taxonômica e preservação

A correta identificação de um microrganismo é o primeiro passo para o sucesso de um programa de controle de qualidade. Essa etapa está diretamente relacionada à eficácia do bioinsumo em campo e à segurança do processo de produção. É primordial que a indústria se preocupe em identificar corretamente os microrganismos prospectados, produzidos e comercializados. Essa atividade é usualmente realizada por taxonomistas ou pessoas experientes e treinadas e, se possível, validada por instituições ou laboratórios especializados.

Para a identificação são utilizadas ferramentas que dependem do grupo de microrganismo envolvido e frequentemente são utilizadas técnicas moleculares, testes bioquímicos, análises morfológicas das colônias e das estruturas celulares. No caso dos baculovírus a caracterização morfológica é feita por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Para a maioria dos microrganismos as técnicas moleculares são eficazes e mais discriminatórias, em muitos casos são as únicas capazes de distinguir espécies de um mesmo gênero. Isso é devido à grande semelhança morfológica e bioquímica entre algumas espécies. Portanto, essas técnicas geralmente são empregadas para um primeiro diagnóstico ou em conjunto com as técnicas moleculares.

O sequenciamento de regiões específicas do genoma é a principal ferramenta molecular utilizada na identificação de espécies de microrganismos. Para cada gênero existem genes ou regiões intergênicas informativas, denominados marcadores moleculares, que apresentam um nível de polimorfismo adequado para diferenciar as espécies. Existe uma tendência entre os estudiosos de que a análise conjunta de múltiplos genes informativos confere maior confiabilidade na identificação de uma determinada espécie. Na maioria das vezes, a utilização desses marcadores permite diferenciar com sucesso espécies de bactérias e fungos. Uma vez obtidas, as sequências dos marcadores moleculares são editadas em programas específicos com o auxílio do cromatograma, para correção de possíveis erros de sequenciamento, concatenadas e alinhadas com sequências homólogas das mesmas regiões do genoma, de outros(as) isolados/cepas, incluindo sequências de isolados/cepas de referência de espécies do gênero estudado. Posteriormente, uma análise filogenética é realizada para determinar os clados e a inferência da espécie do organismo de interesse.

A identificação molecular também tem sido empregada para caracterizar e possibilitar a distinção de isolados de uma mesma espécie. Para esse fim, marcadores moleculares do tipo microssatélites têm sido usados com sucesso no monitoramento de isolados fúngicos aplicados em campo, como por exemplo, no monitoramento de isolados comerciais de *Metarhizium anisopliae* e *M. robertsii* (Castro et al., 2018; Iwanicki et al., 2019) e de um isolado comercial de *Beauveria bassiana* (Reineke et al., 2014). Nos trabalhos citados, os autores distinguiram os isolados aplicados daqueles nativos. Os microssatélites podem ser empregados também para diferenciar isolados de uma mesma espécie de fungo produzidos em uma mesma biofábrica. Desta forma, é possível criar uma identidade única ou um “fingerprint” para cada isolado, o que pode ser muito útil na detecção de possíveis contaminações cruzadas e como diagnóstico para a empresa. Com a redução do custo de sequenciamento, em um futuro próximo a identificação molecular de isolados e espécies será amplamente difundida e se tornará uma atividade corriqueira incorporada nos protocolos de controle de qualidade dos laboratórios das biofábricas.

A identificação inequívoca dos vírus de insetos é realizada por sequenciamento do genoma. Entretanto, técnicas como a de Restriction Endonuclease Analysis (REN) podem ser utilizadas rotineiramente para verificar a identidade genética do isolado e para detectar a possível ocorrência de variantes durante o processo de produção. Existem protocolos já publicados para essas análises moleculares (O'Reilly et al. 1992; Moore, 2002; Costa et al., 2005; Sanches et al., 2019).

Uma vez obtido o microrganismo puro o passo posterior à sua identificação é sua preservação, para garantir culturas estoques para usos posteriores e para preservar a vitalidade e as características genéticas do mesmo. É sabido que repicagens consecutivas em meio de cultura de fungos e bactérias podem levar à degeneração genética pelo acúmulo de mutações e, conseqüentemente, perda de características originais das cepas e isolados como virulência e características úteis para a produção massal, entre outras. Da mesma forma, a geração de mutantes também pode ocorrer quando se replica, sucessivamente, baculovírus em cultura de células de inseto (Krell, 1996; Moscardi et al., 2011). Portanto, a preservação dos microrganismos obtidos do primeiro isolamento do ambiente, de preferência utilizando mais de um método (armazenamento em N<sub>2</sub> líquido, liofilização, ultrafreezer de -80 °C, entre outros), é primordial para garantir a reprodutibilidade dos processos de produção em grande escala e dos resultados de eficácia. No entanto, a escolha dos métodos de preservação mais adequados deve ser ponderada com base nas características de cada microrganismo e pelas vantagens e desvantagens de cada método.

## Identificação taxonômica

### Bactérias

A quase totalidade de bactérias utilizadas para promoção de crescimento em soja e registradas para controle de insetos-praga e doenças no Brasil pertence ao gênero *Bacillus*, versátil grupo de bactérias Gram-positivas. *Bacillus* são bactérias comumente encontradas no solo, com formato bastonete, resistentes a fatores adversos e, que em condições específicas, produzem endósporos e uma grande diversidade de antibióticos e metabólitos (Fisher; Garczynski, 2012; Tiwari et al., 2019). Dentre as espécies mais conhecidas e empregadas na agricultura brasileira estão *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefasciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus methylophilicus* e *Bacillus velezensis* (Mapa, 2022).

A primeira etapa para identificação de *Bacillus* é a obtenção de colônias puras de células. Essa etapa é fundamental para garantir a manipulação de uma única espécie uma vez que muitos *Bacillus* são morfológicamente semelhantes. Essas colônias podem ser obtidas, por exemplo, pelo método do plaqueamento em estrias de suspensões de bactérias diluídas em meio sólido como ágar nutriente, Luria Bertani ou ágar tripton de soja, seguido por incubação a 30 °C por 16-24 h. Uma vez obtida a colônia isolada pura, faz-se necessário o crescimento dessas bactérias em meio sólido ou líquido por 48 h a 30 °C e 250 rpm, para então realizar a avaliação das características morfológicas aparentes ao longo das fases de cultivo, testes bioquímicos e sequenciamento para confirmar a espécie.

Os métodos morfológicos consistem na visualização em microscópio com contraste de fase no aumento de 1000x com o auxílio de óleo de imersão, de características da cultura de *Bacillus* como a presença de cristais, tamanho de esporos, motilidade de células vegetativas, forma e posição do esporo (Fisher;

Garczynski, 2012; Monnerat et al., 2020). Muitas dessas características permitem um rápido diagnóstico preliminar. Por exemplo, a presença de cristais proteicos no meio de cultivo é uma característica da espécie *B. thuringiensis*, que pode ser facilmente detectada em microscópio com contraste de fase. Além desses aspectos, algumas espécies de *Bacillus* apresentam colônias com características específicas que auxiliam na identificação, como por exemplo, superfície lisa ou rugosa, bordas onduladas ou serrilhadas cores opacas ou brilhosas, entre outras. Mais detalhes sobre os métodos morfológicos para identificação de algumas espécies de *Bacillus* utilizados na agricultura podem ser encontrados em Fisher e Garczynski (2012) e Monnerat et al. (2020).

Métodos bioquímicos consistem em testes laboratoriais como coloração Gram, que distingue bactérias Gram-positivas, como *Bacillus*, de Gram-negativas; habilidade de fermentar manitol, uma vez que espécies do grupo *B. cereus lato sensu* (que inclui *B. thuringiensis* e *B. anthracis*) não são capazes de fermentar esse álcool, o que os difere de outros microrganismos esporulantes; atividade hemolítica; produção de lecitinase; sensibilidade à penicilina, entre outros, ou características de mobilidade que diferencia, por exemplo, *B. anthracis* e *B. mycooides* de *B. thuringiensis* (Jääskeläinen, 2008; Fisher; Garczynski, 2012).

Os métodos morfológicos e bioquímicos geralmente são empregados em uma primeira análise. No entanto, para uma correta identificação das espécies, é imprescindível que esses métodos sejam complementados com a identificação molecular, feita por meio da análise de sequências de regiões genômicas específicas. No caso de *Bacillus*, a identificação é realizada com a análise de sequências de múltiplos genes, a maioria de genes constitutivos que são necessários para a manutenção da função celular básica (housekeeping). Dentre eles, o mais conhecido é o RNA ribossômico 16S (16S rRNA). Para as espécies pertencentes ao grupo de *Bacillus cereus*, ou *B. cereus lato sensu*, que inclui *B. thuringiensis* e espécies que podem causar problemas à saúde humana, como *B. cereus stricto sensu*, patógeno oportunista que produz toxinas prejudiciais à saúde e *B. anthracis*, agente etiológico do carbúnculo hemático, tem-se recomendado sua diferenciação pelo sequenciamento do gene *23S rRNA*, *gyrB* (Bavykin et al., 2004) e genes dos plasmídeos *pXO1* e *pXO2* (Zasada, 2020).

No caso do grupo de *B. subtilis* que incluem espécies como *B. subtilis stricto sensu*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus velezensis*, além do gene *16S rRNA*, é recomendado o sequenciamento de genes como *girasse A (gyrA)*, *RNA polymerase subunidade B (rpoB)*, *5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide formyltransferase (purH)*, *DNA polymerase III (polC)* e *60 kDa heat-shock protein groEL (groEL)* (Rooney et al., 2009; Dunlap, 2019).

*Bradyrhizobium* pertence a um grupo diverso de bactérias diazotróficas, Gram-negativas, aeróbicas, com capacidade de estabelecer simbiose com plantas leguminosas amplamente utilizado em soja. A identificação específica dessas bactérias também é realizada por meio da análise multilocus sendo o gene 16S rRNA empregado para separação de gêneros. Alguns dos genes utilizados como marcadores filogenéticos na classificação de rizóbios são os da *ATP sintase subunidade beta (atpD)*, da *recombinase A (recA)*, da *glutamina sintetase tipo I (glnA)* e *tipo II (glnB)*, da *chaperona (dnaK)*, da *citrato sintase I (gltA)* e da *RNA polimerase subunidade beta (rpoB)* (Aserse et al., 2012; Azevedo et al., 2015; Ferraz Helene et al., 2020).

## Fungos

Os fungos são identificados, quanto ao gênero, por meio de análises morfológicas de colônias e estruturas celulares, e quanto à espécie, por meio do sequenciamento de um ou múltiplos genes. Diferentemente do que é feito para bactérias, testes bioquímicos não são empregados para diferenciar espécies de fungos, embora alguns possam ser bastante úteis para diferenciar características qualitativas e quantitativas de alguns isolados como maior ou menor habilidade de produzir fitohormônios e enzimas envolvidas no processo infectivo ou de colonização de plantas.

O primeiro passo para a correta identificação é a obtenção de colônias monospóricas do fungo de interesse, garantindo assim que a manipulação será feita de um único microrganismo. Colônias monospóricas podem ser obtidas, por exemplo, por plaqueamento de suspensões diluídas de conídios em meio de batata dextrose ágar, meios completos ou meios de cultura específicos (Goettel; Inglis, 1997). Após a incubação, sob microscópio óptico, conídios germinados são transferidos individualmente, para o centro de uma nova placa com meio de cultivo em câmaras de fluxo de ar estéril. Em seguida, o fungo é incubado até que cresça e esporule. Obtida uma colônia proveniente de um único conídio, pode-se prosseguir com a análise de estruturas morfológicas da colônia, preservação e identificação molecular por meio da extração, da purificação e da amplificação do DNA, bem como o sequenciamento de regiões do genoma.

Métodos morfológicos consistem em seguir chaves taxonômicas, que permitem a identificação do gênero de fungos. As chaves dicotômicas compreendem a análise de estruturas desses fungos como: presença ou não de septos nas células vegetativas, formato, tipo e dimensões de estruturas reprodutivas, número de septos em esporos coloração, entre outros. Embora essas chaves sejam bastante úteis para um diagnóstico inicial, somente o sequenciamento de regiões específicas do genoma são capazes de diferenciar a maioria das espécies. Na Tabela 1 apresentamos a relação das principais regiões genômicas utilizadas para identificação da espécie de alguns fungos utilizados na cultura da soja e os trabalhos de referência que podem ser consultados para obtenção dos protocolos de extração, amplificação e sequenciamento do DNA.

## Vírus

Os vírus empregados na cultura da soja são utilizados para controle de diversas espécies de lagartas. Esses vírus pertencem à família Baculoviridae, mais especificamente aos gêneros Alphabaculovirus e Betabaculovirus, nucleopoliedrovírus (NPVs) e granulovírus (GVs), respectivamente, cujo DNA é constituído por fitas duplas (Jehle et al., 2006; Grzywacz, 2017). Os baculovírus são nomeados de acordo com o hospedeiro do qual foram isolados. Por exemplo, o baculovírus isolado da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*, recebe o nome de *Anticarsia gemmatalis* múltiplo nucleopoliedrovírus (AgMNPV). Entretanto, a taxonomia e a nomenclatura dos vírus encontra-se em revisão com possíveis alterações em sua denominação atual (<https://talk.ictvonline.org/>).

Devido a sua especificidade, a correta identificação de seu hospedeiro pode ser um indício da identidade do vírus. Entretanto, sua patogenicidade deve ser confirmada pelos postulados de Koch e sua identidade definida ou confirmada por sequenciamento do seu genoma.

A identificação morfológica dos baculovírus é realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) que permite verificar se o vírus é do tipo “simples” ou “múltiplo”, isto é, se o número de

**Tabela 1.** Relação de genes empregados em análises filogenéticas dos principais gêneros de fungos que compõem bioinsumos para a cultura da soja.

Gênero	Genes empregados em análises filogenéticas	Referências
<i>Beauveria</i>	Região nuclear intergênica B (BLOC), DNA nuclear ribossomal (nrSSU) e (nrLSU), Fator de elongação (EF), $\beta$ -tubulina (Bt), subunidades da RNA polimerase II (RPB1) e II (RPB2), região ITS (Internal Transcribed Spacer)	Rehner et al. (2006); Rehner et al. (2011); Kepler et al. (2017); Bustamante et al. (2019); Khonsanit et al. (2020).
<i>Metarhizium</i>	Fator de elongação (EF-1-alpha), RNA polimerase I (RPB1) e II (RPB2), Beta-tubulina (Bt), região ITS (Internal Transcribed Spacer)	Bischoff et al. (2009); Rezende et al. (2015); Lopes et al. (2018); Luz et al. (2019); Botelho et al. (2019); Iwanicki et al. (2019); Glare et al. (2021); Fernández-Bravo et al. (2021);
<i>Trichoderma</i>	Fator de elongação (EF), RNA polimerase I (RPB1) e II (RPB2), alpha-actina (act), calmodulina (cal), região ITS (Internal Transcribed Spacer), Fator de elongação (EF)	Dou et al. (2020); López-Quintero et al. (2013); Chaverri et al. (2003); Meyer et al. (2019); Druzhinina e Kubicek (2005)
<i>Pochonia</i>	Beta-tubulina (Bt), ITS (Internal Transcribed Spacer), DNA nuclear ribossomal (nrSSU) e (nrLSU), RNA polimerase I (RPB1) e II (RPB2), Fator de elongação (EF-1-alpha)	Sung et al. (2007); Nonaka et al. (2013); Hirsch et al. (2000); Medina-Canales et al. (2014)
<i>Cordyceps (Isaria)</i>	Fator de elongação (EF), RNA polimerase I (RPB1) e II (RPB2) (TEF), Beta-tubulina (Bt), ITS (Internal Transcribed Spacer)	D'Alessandro et al. (2013); Kepler et al. (2017); Wu et al. (2021); Mongkolsamrit et al. (2018)
<i>Purpureocillium</i>	ITS (Internal Transcribed Spacer), Fator de elongação da tradução (EF), Beta-tubulina (Bt),	Luangsa-ard et al. (2011); Perdomo et al. (2013); Baron et al. (2020)

víriões presentes em cada envelope no corpo de oclusão (em forma de poliedro ou de grânulo) é único (unienvolopado) ou são vários (multienvolopado). O tamanho e o formato do corpo de oclusão também podem ser determinados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A presença de outros vírus (ex. cypovírus) pode ser visualizada por microscopia eletrônica.

Para fins de diferenciação de espécies e estudos filogenéticos, os baculovírus podem ser identificados pelo sequenciamento dos genes *late expression factor 8* (*lef-8*), *late expression factor 9* (*lef-9*) e *polyhedrin/granulin* (*polh/gran*) (Lange et al., 2004; Jehle et al., 2006). Esses genes fazem parte de um conjunto de 38 genes conservados (core genes) encontrados nos gêneros da família Baculoviridae (Miele et al., 2011; Garavaglia et al., 2012; Castro et al., 2020). No entanto, para o sequenciamento é necessária a purificação das partículas virais (Corpos de Oclusão/OBs ou Budded Virus/BVs), seguindo métodos descritos na literatura. Detalhes sobre métodos de extração e purificação de DNA de Baculovírus podem ser consultados em Eberle et al. (2012) e em O'Reilly et al. (1992).

Uma vez obtidas as seqüências dos genes *lef-8*, *lef-9* e *polh*, as mesmas são comparadas com os vírus mais próximos e estabelecidas as distâncias, par a par. Quando realizados os alinhamentos concatenados e as distâncias genéticas são superiores a 0,05 se cumpre o critério para a separação entre espécies (Jehle et al., 2006).

### Preservação

Os métodos de preservação de microrganismos mais comumente empregados consistem em etapas de desidratação e redução de oxigênio do ambiente, seguido, para alguns grupos de microrganismos, por resfriamento ou congelamento visando reduzir o metabolismo dos organismos. Dentre os principais

métodos utilizados para preservação de fungos, bactérias e vírus a longo prazo destacam-se a liofilização, o ultracongelamento à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e a criopreservação em nitrogênio líquido à  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  e, a curto e médio prazos, destacam-se a secagem de material biológico retido em tiras de papel-filtro, refrigeração de culturas em geladeira, imersão em óleo mineral e adsorção em sílica gel.

Adicionalmente, é muito importante manter bases de dados dos acessos com o máximo de informações possíveis, tais como, identificação da espécie, coletor, local e data de coleta, data da preservação, quantidade de amostras preservadas, publicações associadas à sua caracterização, entre outros. Essas medidas são de extrema relevância para garantir o controle da preservação e planejar ações como ativação dos microrganismos a cada tempo específico entre outras práticas.

### Curto e médio prazos

A forma mais simples de preservar fungos, bactérias e vírus para uso corriqueiro é a manutenção em geladeira de colônias puras e tecidos do hospedeiro infectado pelo microrganismo, por exemplo, contendo partículas virais. Embora esse seja um método simples, a repicagem contínua para manutenção de colônias de fungos ou bactérias e vírus em laboratório deve ser realizada com cautela. Esse método pode levar à rápida degeneração genética dos microrganismos e consequente perda das características iniciais, além de proporcionar altas chances de contaminação do material armazenado.

Para bactérias esporulantes do gênero *Bacillus* uma forma bastante empregada e pouco onerosa para preservação, a curto e médio prazos, é o uso de tiras de papel-filtro estéreis, imersas por pelo menos 30 minutos em culturas com células vegetativas e/ou esporos, secas e armazenadas em tubos criogênicos em geladeira podendo conter ou não sílica gel (Monnerat et al., 2020). Alternativamente, após a completa esporulação em meio líquido, a cultura pode ser aquecida à  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12 minutos para remoção de fases vegetativas e submetidas por duas semanas a uma secagem à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  dentro de criotubos. Após esse processo os tubos podem ser mantidos em geladeira (Fisher e Garczynski (2012). Para fungos, um método semelhante e barato pode ser adotado para armazenamento em curto período. Fungos crescidos sobre papel filtro esterilizado sobre meio sólido de cultivo, podem ser armazenados em criotubos com sílica gel e mantidos em geladeira à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Outro método barato para preservar fungo é a imersão de colônias esporuladas em óleo mineral seguido do armazenamento em geladeira. Esse método permite preservar estruturas a médio prazo, a depender da espécie de fungo. O óleo evita a desidratação das células e evita trocas gasosas, resultando em baixo metabolismo do fungo.

### Longo prazo

A liofilização consiste na desidratação das células pelo processo de sublimação. Inicialmente o material é congelado e depois seco, na presença de vácuo, sendo a umidade removida pela evaporação do gelo, evitando assim a formação de cristais. Embora bastante eficaz em preservar microrganismos, principalmente fungos, por muitos anos em baixa temperatura, a liofilização é um método considerado caro, que exige um equipamento específico (liofilizador) e muitas vezes inviável para as biofábricas no Brasil.

No caso dos fungos empregados na soja e listados na Tabela 1, as estruturas que são comumente liofilizadas são conídios aéreos obtidos em meios de cultura (Humber, 1997). Um processo de custo reduzido e que proporciona bons resultados é o uso de suspensões de conídios em leite desnatado adsorvidos em sílica gel e mantidas a -20 °C. Esse processo realizado adequadamente tem permitido a preservação do fungo *M. rileyi* a longo prazo (>15 anos) (Sosa-Gómez, não publicado).

Já no caso de *Bacillus*, é recomendado o uso do processo de liofilização para preservação de seus esporos, obtidos em meio de cultura líquido (Fisher; Garczynski, 2012).

O método de ultracongelamento consiste no armazenamento de células bacterianas, esporos e hifas e partículas virais a -80 °C em suspensões crioprotetoras. Entre os agentes mais utilizados consta o glicerol, em concentrações de 10% no caso dos fungos, até 25% para bactérias (Fisher; Garczynski, 2012). A criopreservação em nitrogênio líquido é outra técnica empregada para preservar microrganismos, sendo a mais comum em grandes coleções públicas e privadas. Assim como a liofilização, o ultracongelamento e a criopreservação são métodos onerosos pois exige que o laboratório adquira um freezer -80 °C e estrutura para armazenar nitrogênio líquido, assim como sua reposição periódica.

Independente do microrganismo, é recomendável que antes do processo de congelamento, as células de fungos e bactérias sejam suspensas em agentes crioprotetores que preservem a estabilidade no armazenamento e facilitem a reidratação, como por exemplo, o dissacarídeo trealose, o soro bovino, o leite em pó desnatado, o glicerol, a sacarose, entre outros (Hubálek 2003; Wolkers; Walker, 2015; Fisher; Garczynski, 2012). Já os baculovírus podem ser preservados por longos períodos em temperaturas inferiores a -15 °C sem a adição de crioprotetores. Na coleção de vírus entomopatogênicos da Embrapa Soja encontram-se armazenadas suspensões de baculovírus desde o ano de 1980 (Sosa-Gómez, D.R. não pub.). Da mesma forma, amostras de baculovírus encontram-se preservadas, desde a década de 1980, na Coleção de Vírus de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) (Souza, M.L. não pub.). Dados sobre os vírus depositados nas coleções estão disponíveis no sistema de informação da Embrapa, baseado na Web, denominado AleloMicro.

### **Produção e armazenamento de bioinsumos**

A produção de microrganismos é um processo que envolve uma sequência de etapas interligadas e que devem ser monitoradas cautelosamente quanto à qualidade do material produzido e das condições de cultivo como temperatura, umidade, pH, consumo de oxigênio e presença de contaminantes. Por outro lado, cuidados durante o armazenamento de produtos à base de microrganismos são primordiais para garantir a manutenção da sua viabilidade até o momento da aplicação no campo. A seguir, abordaremos as principais etapas do processo de produção dos microrganismos e os parâmetros de monitoramento que afetam a qualidade do produto.

### **Etapas do processo de produção que afetam a qualidade do produto**

#### **Preparo do inóculo**

A primeira etapa do processo produtivo é a obtenção de um inóculo de qualidade, a partir de uma cultura preservada. Nessa etapa é importante se atentar para a presença de contaminantes durante o

cultivo do microrganismo desejado, a padronização das condições de cultivo e a idade das culturas a serem utilizadas nos lotes de produção. Esses procedimentos são imprescindíveis para reprodutibilidade dos resultados nas etapas seguintes.

A produção dos fungos que têm sido utilizados na cultura da soja inclui diversas espécies, englobando aqueles entomopatogênicos como *B. bassiana*, *C. javanica*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae s.l.* (incluindo *M. rileyi*), micopatogênicos como *Trichoderma* spp. e fungos nematófagos como *P. clamydosporia* e *P. lilacinium*. A produção desses fungos ocorre por um processo denominado fermentação em meio sólido ou em meio líquido, podendo ocorrer em pequena, média ou grande escala.

No caso desses fungos, a obtenção de inóculo começa com a transferência do material preservado para meio de cultura apropriado (Batata Dextrose Ágar, Sabouraud Dextrose Ágar com extrato de levedura ou Sabouraud Maltose Ágar com extrato de levedura). De forma geral, os fungos empregados na cultura da soja e listados na Tabela 1 crescem bem nos meios já mencionados, sendo a única exceção o fungo *M. rileyi*, que cresce e esporula adequadamente em meio SMAY. Uma vez feita a transferência do material preservado sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, as placas são incubadas por duas a três semanas a 26 °C e 12 h de fotofase. Durante esse processo é feito o acompanhamento do crescimento dos fungos em placas visando à detecção de contaminantes como fungos oportunistas, leveduras e bactérias, e a observação da setorização de colônias de fungos, o que pode indicar degeneração/instabilidade genética do material. Nesses casos, o material deve ser descartado e feita uma nova transferência do material preservado. Em última instância, a qualidade do material preservado deve ser revista.

Uma vez obtidas placas com conídios, isentas de contaminantes, os conídios aéreos são raspados e é feito o preparo de uma suspensão entre  $10^6$  e  $10^8$  conídios/mL. Essa suspensão será inoculada em matrizes de grãos de cereais ou em meio líquido nutritivo, a depender do processo de produção. Nessa etapa, o inóculo deve ser crescido em meio de cultivo e acompanhado para verificação de possíveis contaminações no processo de preparo.

Na fermentação sólida, grãos de cereais são comumente utilizados como substrato para o crescimento micelial e posterior esporulação dos fungos. No Brasil, o cereal mais utilizado é o arroz parboilizado, embora seja possível utilizar outros grãos mais duros como sorgo, milheto e trigo, em mistura com o arroz parboilizado, visando melhorar oxigenação das matrizes. Independente do grão selecionado, ele pode ser inicialmente embebido em água destilada para hidratação, distribuído em sacos de polipropileno termorresistentes ou em frascos e esterilizados sob pressão e vapor em autoclave à 120 °C por 20 minutos. Esse procedimento elimina fungos e bactérias que possam ocorrer superficialmente e internamente nos grãos. Em seguida, as sacolas ou frascos contendo o substrato são resfriados em temperatura ambiente e abertos e inoculados com uma suspensão de esporos sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. A mistura de substrato mais conídios é homogeneizada manualmente e os sacos/frascos são fechados, mas não vedados por completo, para permitir trocas gasosas. Em seguida, o material é incubado em câmara climatizada à 26 °C, 12h de fotofase por 8 a 15 dias a depender do fungo cultivado. Em uma biofábrica de médio a grande porte, os frascos contendo arroz inoculado com a suspensão de conídios, após a completa esporulação pelo fungo, servirão de inóculo para uma segunda etapa de produção, dessa vez em sacos visando escalonar o processo produtivo. Esse primeiro material é denominado de matriz. A

inoculação de uma grande quantidade de substrato pode ser feita a partir da transferência de uma parte do material esporulado para o substrato estéril ou pelo preparo de suspensões de conídios obtidos da lavagem com água esterilizada do arroz esporulado. É importante destacar que os protocolos descritos anteriormente apresentam inúmeras variações em função da disponibilidade de equipamentos e da infraestrutura local.

No caso da fermentação líquida de fungos, suspensões de conídios são inoculadas em meio líquido apropriado e crescidos por alguns dias, até a obtenção de uma biomassa a ser utilizada para inocular biorreatores herméticos de maior volume. As chances de contaminação durante a obtenção do inóculo na fermentação líquida são menores em relação a fermentação sólida. Esse fato se deve à menor manipulação do material e maiores assepsia e controle das condições de crescimento em frascos de cultivo e biorreatores em relação ao processo de fermentação sólida. Os cuidados no processo de obtenção de inóculo via fermentação líquida estão relacionados ao preparo das suspensões de conídios sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar vertical, correta esterilização dos frascos e do meio de cultivo e limpeza da sala ou ambiente onde ficam as incubadoras e os biorreatores.

A obtenção do inóculo de bactérias se inicia com o processo de ativação dos propágulos que se encontram preservados. Por exemplo, no caso de *Bacillus* preservados em tiras de papel, se faz necessário um cultivo prévio em frascos por 72 horas até a completa esporulação. Existem diversos meios de cultivo que permitem a esporulação, por exemplo, Luria Bertani suplementado com sais e meio Embrapa líquido (Monnerat et al., 2020). Uma vez obtidos os esporos, o cultivo é submetido a um choque térmico em banho-maria à 80 °C por 12 minutos e depois em banho de gelo por mais 5 minutos. Em seguida, o cultivo deverá ser analisado quanto à pureza e à concentração de esporos e posterior utilização para inocular frascos de maior volume e biorreatores. Os cuidados no processo de obtenção de inóculo de bactérias são os mesmos mencionados para a obtenção de inóculo de fungos pelo processo de fermentação líquida.

Em contraste com os fungos e bactérias, atualmente todo o processo produtivo de vírus ocorre *in vivo*. Nesse sistema é necessário estabelecer uma criação de insetos, no caso lagartas hospedeiras do vírus a ser produzido. A criação massal de insetos é uma atividade que por si só exige um sistema de monitoramento da qualidade próprio e rigoroso para obtenção de lagartas sadias. A qualidade da colônia de insetos pode ser monitorada por meio do registro das determinações da fecundidade, fertilidade, peso de pupas, porcentagens de insetos deformados e índice de mortalidade. Esse processo pode ser encontrado em detalhes na literatura (Bell et al., 1981; Singh; Moore, 1985; Hunter-Fujita et al., 1998). Nas etapas iniciais e durante o processo de produção faz-se necessário garantir a assepsia da criação de insetos, assim como da alta qualidade e pureza das partículas virais. O inóculo contendo partículas virais deve ser purificado por meio de processos repetidos de centrifugação diferencial ou gradientes de sacarose e filtração visando a remoção de eventuais contaminantes como bactérias, protozoários (Sudhakar et al., 1997) e outros vírus que possam se replicar no corpo do inseto e reduzir a produtividade e a qualidade do vírus de interesse.

As partículas virais purificadas são misturadas à dieta e fornecidas para alimentação de lagartas sadias. Após a ingestão da dieta contaminada, as lagartas são mantidas até a completa propagação do

vírus no corpo, seguido do congelamento dos insetos para posterior processamento para obtenção das partículas virais.

### **Escalonamento da produção**

Uma vez obtido um inóculo de boa qualidade, com ausência de contaminantes, o próximo passo é escalar a produção com cultivos sucessivos em biorreatores, no caso de processos via fermentação líquida de fungos e bactérias, do cultivo em maior número de sacos com arroz, no caso da fermentação sólida de fungos ou do aumento no número de insetos infectados, no caso dos vírus. Independente do microrganismo, durante o processo de escalonamento é primordial o cuidado com contaminações e as condições de cultivo. O escalonamento da produção deve ser feito de forma cautelosa seguindo protocolos de produção, que incluem controle de parâmetros como temperatura, fotoperíodo, pH, oxigenação, rotação, umidade e tempo de cultivo bem estabelecidos, garantindo assim a segurança e a reprodutibilidade do processo.

A produção de fungos via fermentação sólida faz uso de sacos de arroz inoculados com suspensões de conídios mantidos em salas climatizadas por cerca de 8 a 12 dias até a completa esporulação a depender do fungo cultivado, ou de 3 a 5 dias no caso de a fase de esporulação ser conduzida em bandejas. A cada lote de produção, as salas climatizadas onde serão crescidos os fungos precisam ser previamente desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio e, se possível, com luz ultravioleta germicida (UVC) por períodos prolongados devido a sua baixa penetrabilidade. Esse procedimento garante um ambiente asséptico para receber os sacos inoculados com arroz. Durante o período de incubação é importante monitorar o crescimento uniforme do fungo no arroz, principalmente nos primeiros dias em que fungos e bactérias oportunistas e de rápido crescimento podem se multiplicar e colonizar o substrato antes mesmo do fungo de interesse. Sacos contaminados devem ser retirados da sala de crescimento para evitar que sirvam como fonte de contaminações futuras. Recomenda-se também manter os sacos e frascos na horizontal para garantir maior oxigenação entre os grãos, evitando ainda o acúmulo de água, o que pode levar à proliferação de bactérias indesejadas e prejudicar o processo de esporulação. Após a completa colonização dos grãos de arroz pelo fungo, os sacos de arroz podem ser despejados em bandejas para estimular o processo de esporulação em condições de maior oxigenação e alta umidade. No entanto, o momento de abertura dos sacos deve ser avaliado em função do crescimento homogêneo do isolado nos grãos de arroz. A colonização incompleta dos grãos pode dar a oportunidade para microrganismos oportunistas crescerem no substrato.

No processo de escalonamento da produção de propágulos fúngicos e bactérias em meio líquido, o monitoramento do cultivo em biorreatores deve visar garantir os parâmetros ótimos de cultivo dos microrganismos, como por exemplo, aeração, rotação e pH. Geralmente esses parâmetros já são conhecidos e o monitoramento é feito visando à sua manutenção e a observação de eventuais respostas inesperadas, como, por exemplo, grande quantidade de espuma, o que pode indicar contaminação ou problemas na bomba que injeta antiespumante.

A transferência de um caldo fermentado de uma dorna de menor volume para uma de maior volume, contendo meio de cultura, deve ser feita com cautela. Nesse processo, amostragens devem ser feitas para confirmar a pureza do caldo fermentado e a concentração das células produzidas. Por meio desse

procedimento evita-se que possíveis culturas contaminadas sejam utilizadas como inóculo para cultivos em volumes maiores, o que por sua vez, levaria ao desperdício de insumos, energia, tempo e descarte do material final produzido. As amostragens devem visar também a comprovação de que o microrganismo presente no caldo fermentado final corresponda àquele de interesse. Nesse caso, o crescimento em meio de cultivo em placas e a observação de estruturas das células produzidas devem ser usadas para confirmação.

No caso dos vírus o processo de escalonamento da produção passa necessariamente pelo aumento da criação massal de lagartas sadias. Durante esse processo faz-se necessário garantir que as lagartas estejam no instar desejado para que sejam infectadas continuamente por partículas virais inoculadas na dieta. No início e durante o processo de aumento dos níveis de escalonamento os lotes devem ser rotineiramente verificados quanto à presença de contaminantes como cypovirus, iflavírus e microsporídios.

Uma vez transcorrido o período de incubação, as lagartas recentemente mortas ou muito próximas da morte, são coletadas e maceradas para liberação das partículas virais e o caldo resultante é filtrado para remoção do tegumento da lagarta. Em alguns casos o filtrado ainda é concentrado e tratado para remoção de substâncias como lipídeos e microrganismos provenientes do trato digestivo das lagartas. No entanto, para evitar a proliferação de bactérias indesejadas, formulações de baculovírus podem incluir bacteriostáticos que impedem a multiplicação de bactérias existentes. A criação massal de lagartas para fins de produção de vírus é uma tarefa que demanda mão de obra e despesas de manutenção. Portanto, as biofábricas de vírus tradicionais apresentam limitação no escalonamento de suas produções, embora existam empresas com processos automatizados com uso de robôs e menor uso de mão de obra.

### Secagem, formulação e armazenamento

Após a etapa de produção de microrganismos em larga escala, faz-se necessário o processamento desse material para torná-lo disponível para comercialização ou para armazenamento visando seu uso futuro. De forma geral, esse processamento pode ser feito pela formulação direta do caldo fermentado ou de partículas virais, como ocorre com a grande maioria das produções com *B. subtilis* e baculovírus formulados como suspensão concentrada; da secagem, separação do substrato e formulação, no caso de fungos produzidos via fermentação sólida, e da formulação e secagem no caso de fungos obtidos via fermentação em meio líquido, de alguns *Bacillus* formulados como pó molhável ou grânulos dispersíveis em água. Independente do processamento, as etapas geralmente envolvem processos de remoção do meio de cultivo, redução do teor de água a níveis preferencialmente inferiores a 5% ou atividade de água inferior a 0,1 aw ou estabilização do caldo fermentado e de suspensões com partículas virais com o uso de estabilizantes. Nessas etapas, especial atenção deve ser dada para a qualidade dos co-formulantes utilizados nas formulações e ao processo de secagem sob condições definidas para cada microrganismo.

A secagem de grãos de arroz com conídios é uma etapa importante para facilitar a extração e garantir a posterior redução do teor de água inferior a 0,1 aw para evitar a proliferação de contaminantes e aumentar a vida útil do produto. Alguns fungos podem apresentar maior ou menor aderência no arroz e, portanto, deve-se estabelecer um protocolo de secagem específico para cada isolado, visando maximizar o processo de extração sem prejudicar a viabilidade dos conídios. A secagem pode ser feita espalhando o arroz esporulado em bandejas em condições de baixa umidade e, posteriormente, quando

o material estiver com baixa umidade, é feita a separação dos conídios do substrato em equipamentos de extração como leito fluidizado, sistema de peneiras, tambores rotativos ou outros equipamentos desenvolvidos especificamente para essa finalidade. Independente do processo, é importante o uso dos equipamentos de proteção individual (EPI) visando proteger principalmente as vias nasais e os olhos do contato com conídios que eventualmente estarão em suspensão no ar. Embora não patogênicos às pessoas imunocompetentes, os conídios aéreos podem causar alergias e irritação nas mucosas nasais e nos olhos.

No caso de baculovírus, o processo de secagem deve ser realizado de forma rápida para evitar a inativação do vírus e prevenir a proliferação de contaminantes. As formulações básicas mais utilizadas são os pós molháveis e as suspensões concentradas (Moscardi, 1999; Sosa-Gómez, 2017). O pH do produto final tem particular relevância, uma vez que os corpos de oclusão são desestabilizados em ambientes alcalinos e pode ocasionar a perda da atividade do produto. Por exemplo, Quiroga-Cubides et al. (2021) estabeleceram para uma formulação sólida pó-molhável à base de baculovírus (GV) limites de pH do produto entre 7 e 7,5 e teores de umidade abaixo de 10%. No caso das formulações em pó a atividade de água menor de 0,4 aw prolonga o tempo de prateleira do produto, devido à menor multiplicação dos contaminantes. A manutenção desses níveis de atividade de água com o tempo, depende da hermeticidade e da permeabilidade seletiva do material utilizado nas embalagens. Além disso, a seleção criteriosa dos inertes e o tamanho de partículas inferior a 20 µm previne a formação de aglomerados e facilita a dispersão do biopesticida na aplicação em campo (Jenkins; Grzywacz, 2000; Quiroga-Cubides et al., 2021).

Uma vez embalado e lacrado, o produto deve ser armazenado em ambientes limpos, secos, podendo ser refrigerados ou não, a depender do microrganismo. No caso de produtos à base de fungos, geralmente recomenda-se o armazenamento em geladeira (4 °C), sendo comum períodos de prateleira de alguns meses, e no caso do armazenamento dos conídios puros e secos, pode-se manter em freezer a -20 °C por períodos mais longos. Em temperatura ambiente (25 °C), os fungos geralmente perdem a viabilidade mais rápido. No caso de *Bacillus*, esses toleram o armazenamento em temperatura ambiente por mais tempo do que os fungos. No entanto, devido à grande diversidade de espécies de *Bacillus* e tipos de formulações que existem no mercado, deve-se sempre consultar a bula do produto para obter informações de armazenamento específicas para a espécie de interesse. De maneira geral, vírus formulados em suspensões líquidas podem ser armazenados pelo mínimo 12 meses em temperaturas de -15 a -20 °C, em salas climatizadas (<25 °C) por seis meses e à temperatura ambiente pode ser mantido por até 2 meses. A atividade pode ser rapidamente reduzida com temperaturas acima de 32 °C.

No Brasil o bioproduto pode percorrer um longo percurso até chegar ao produtor. Nesse cenário, as condições de armazenamento mencionadas anteriormente estendem-se para os meios de transportes. A adoção de caminhões e containers refrigerados e transporte de freezers até as fazendas é uma realidade para muitas biofábricas no Brasil, o que garante as vendas, viabiliza a logística e assegura a manutenção da viabilidade do microrganismo até o momento de aplicação em campo. No caso das produções *on farm*, não há necessidade de armazenamento por longos períodos uma vez que o produto produzido já é logo aplicado em campo. No entanto, dependendo do microrganismo, o produtor deve se atentar com as condições de armazenamento até o momento da aplicação em campo, preferindo manter o material produzido em ambiente refrigerado, seco e não exposto ao sol.

## Parâmetros de monitoramento da qualidade

### Meio de cultivo e substrato

O meio de cultivo, seja ele artificial ou natural (no caso os insetos usados para propagação de vírus ou grãos de arroz para cultivo de fungos), deve fornecer os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo de interesse. De forma geral, os meios de cultivo são compostos por fonte(s) de carbono, nitrogênio, sais e podem ser suplementados com vitaminas e micronutrientes. Nas biofábricas é comum a utilização de resíduos industriais ricos em nutrientes para compor os meios de cultivo, como, por exemplo, o extrato de levedura, subprodutos provenientes da indústria de processamento do milho e da produção de etanol, respectivamente, utilizados como fonte de proteína e carbono para produção de biomassa. Nesses casos, é recomendável conhecer a procedência e a qualidade desses subprodutos. Devido à variação nos teores de carboidratos e proteínas em função do processo industrial, faz-se necessário, na medida do possível, análises químicas de cada lote adquirido pela biofábrica. Dessa maneira, é possível ajustar as concentrações dos ingredientes de tal forma a padronizar a composição do meio e garantir rendimentos semelhantes entre bateladas. A variação na composição nutricional dos grãos, utilizados como substrato, entre as safras é menor. No entanto, recomenda-se padronizar os fornecedores desses grãos, visando, assim, minimizar possíveis diferenças nutricionais decorrentes de processamentos e regiões produtoras distintos. No caso de cultivo de vírus, especial cuidado deve ser tomado na escolha dos ingredientes que irão compor a dieta das lagartas, atentando-se para a padronização e a escolha de ingredientes isentos de resíduos de inseticidas encontrados, por exemplo, em algumas farinhas.

Deve-se atentar também para correto armazenamento dos ingredientes utilizados nos meios de cultivo. Os armazéns devem ser ambientes limpos, refrigerados (se houver necessidade) e secos. Alguns ingredientes como glucose e maltodextrina podem facilmente empedrar em contato com umidade e outros podem se deteriorar em ambientes com alta temperatura.

### Concentração e Pureza

A disponibilização no mercado de produtos com baixa concentração de ingredientes ativos, sobretudo quando apresentam baixa qualidade, é uma das causas dos resultados inconsistentes ainda reportados por usuários. A determinação da concentração e da pureza de uma cultura de células ou de produtos à base de propágulos de fungos, esporos de bactérias e partículas virais devem ser verificadas durante as etapas do processo de produção e no produto final. A concentração traz a informação de quantas células ou partículas infectivas do microrganismo de interesse estão presentes por mililitros em uma suspensão ou por grama de produto ou substrato sólido. Por outro lado, a pureza refere-se à porcentagem de microrganismos contaminantes, como bactérias e fungos oportunistas, na cultura de células ou no produto final. O conhecimento da concentração e da pureza são determinantes para o preparo do inóculo e a continuação ou descarte da produção. Conhecendo a concentração é possível fazer ajustes na quantidade de microrganismos que irão compor o produto final a fim de compensar, por exemplo, a redução da viabilidade dos microrganismos ao longo do tempo de armazenamento.

A avaliação da concentração de propágulos fúngicos, corpos de oclusão de baculovírus e de células vegetativas e esporos de bactérias, pode ser feita por microscopia com o auxílio de câmara de Neubauer.

Durante o preparo do inóculo, do processo produtivo em biorreatores e do produto final, amostras geralmente de 1 mL, 1 g ou 0,1 g são assepticamente retiradas do meio de cultivo ou do produto final e diluídas de 10x a 10.000x em água com algum adjuvante (no caso de propágulos hidrofóbicos como os esporos). A partir de uma diluição seriada é feito a contagem das células, corpos de oclusão e propágulos fúngicos em microscópio óptico sob aumento de 400x ou 1000x. No caso específico de produtos de base oleosa, deve-se retirar o óleo do produto com centrifugações e suspensão em água com espalhante adesivo, antes de proceder com a diluição seriada em água. Mais detalhes desse método podem ser encontrados em Oliveira et al. (2015).

A quantificação dos corpos de oclusão de baculovírus foi considerada um ponto de análise crítico tanto para a etapa de obtenção do ingrediente ativo, quanto para avaliação do produto formulado no estudo de Quiroga-Cubides et al. (2021). A quantificação dos corpos de oclusão (poliedros) de baculovírus do gênero Alphabaculovirus (NPVs), é simples de ser efetuada uma vez obtido o ingrediente ativo. Os poliedros são visíveis ao microscópio óptico como corpos brilhantes refringentes com tamanho de cerca de 1 µm a 15 µm (Grzywacz; Moore, 2017) e podem ser contados por meio de câmara de Neubauer com microscópio óptico convencional ou preferencialmente de contraste de fase. Já no caso de baculovírus do gênero Betabaculovirus (GVs) a observação ao microscópio óptico e quantificação dos corpos de oclusão, conhecidos como grânulos, é mais desafiadora devido ao seu tamanho ainda menor (0,2 µm x 0,5 µm), de forma que sua quantificação requer experiência e a utilização de microscópio de campo escuro (Grzywacz; Moore, 2017). Alternativamente pode ser utilizada a espectrofotometria para a quantificação dos grânulos (Quiroga-Cubides et al., 2021). A análise dos produtos formulados, a quantificação por microscopia ou espectrofotometria é difícil devido aos inertes e adjuvantes adicionados na formulação. Dessa forma, têm sido desenvolvidos protocolos baseados na técnica de PCR em tempo real para a quantificação em produtos à base de Betabaculovirus (Barrera et al., 2016) e Alphabaculovirus (Sanches et al., 2019). Entretanto, técnicas de bioensaios envolvem menor custo e proporcionam informações sobre a atividade inseticida da formulação.

A determinação da concentração de células bacterianas, sejam elas vegetativas ou esporos, pode também ser feita de forma indireta pela leitura da absorbância de uma suspensão em espectrofotômetro. Nesse caso uma curva padrão deve ser estabelecida para que seja possível correlacionar o valor da absorbância com a quantidade de bactérias, determinada por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) ou contagem em câmara de Neubauer. Embora menos preciso do que a contagem direta em câmara, esse método permite uma rápida análise e é adotado em análises corriqueiras.

Outro método bastante empregado, para determinar a concentração de fungos e bactérias em caldos fermentados ou em produtos, é a contagem de UFC. Diferente do método de contagem direta em câmara de Neubauer e da determinação por espectrofotômetro, o método de contagem de UFC permite avaliar a concentração e a viabilidade, concomitantemente, além de detectar presença de contaminantes que crescem no meio de cultivo. A estimativa da concentração de propágulos viáveis tem sido o parâmetro mais adotado no Brasil para avaliação da qualidade dos produtos biológicos à base de fungos. O número de propágulos viáveis tem sido estimado indiretamente (contagem das UFC) ou diretamente (concentração de propágulos viáveis). UFC podem originar-se de propágulos não infectivos e, como tal, não deveriam

ser utilizadas para expressar a concentração nos rótulos de produtos destinados à estratégia inundativa de controle biológico. Por outro lado, o método de contagem de UFC é útil para produtos onde a contagem direta não seja tecnicamente possível, como em preparações ou formulações onde os ingredientes inertes interferem significativamente na visualização dos propágulos infectivos.

A concentração desejável de células num dado produto depende, dentre outros fatores, da estratégia a ser adotada, se controle biológico (CB) inoculativo ou inundativo (Tabela 2). De acordo com Eilenberg et al. (2011), o primeiro pode ser entendido como aquele em que o organismo tem que se multiplicar no ambiente após a aplicação para levar ao controle da praga-alvo. Ou seja, admite-se que produtos biológicos destinados ao controle biológico inoculativo sejam constituídos por propágulos não-infectivos, desde que possam gerar posteriormente estruturas infectivas e promover a redução populacional da praga-alvo. Um exemplo é a incorporação ao solo de grãos colonizados por conídios e hifas do fungo *Beauveria brongniartii* visando ao controle do besouro *Melolontha* spp. em alguns países europeus (Eilenberg et al., 2011; Mayerhofer et al., 2015). Nesse caso, algum tempo após a incorporação ocorre a produção adicional de conídios aéreos a partir de hifas, os quais são necessários para infectar parte considerável da população da praga-alvo.

Por outro lado, na estratégia inundativa a redução populacional observada deve-se exclusivamente, ou majoritariamente, ao organismo liberado. Consequentemente, o produto deve conter elevada concentração de propágulos infectivos, pois não se espera que haja, necessariamente, uma reciclagem no ambiente que resulte na geração de progênie infectiva. Essa modalidade de controle biológico busca uma rápida supressão da praga, sendo a mais usual com fungos entomopatogênicos, tanto no Brasil quanto em outros países (Faria; Wraight, 2007). A natureza e a concentração de propágulos em cada produto depende, portanto, da estratégia de controle a ser adotada, conforme detalhado na Tabela 2.

Para a maioria dos fungos utilizados no controle de artrópodes, de maneira geral busca-se, na estratégia inundativa, liberar um mínimo de  $1,0 \times 10^{12}$  propágulos infectivos por hectare, em cada aplicação. Um produto hipotético cuja recomendação seja de 500 g por hectare deveria apresentar, portanto, uma concentração mínima de  $2,0 \times 10^{12}$  propágulos infectivos por quilograma. Importante frisar que os propágulos mortos ou moribundos não são infectivos e, dessa forma, todo fabricante deveria fazer os ajustes necessários para garantir a concentração mínima de princípio ativo. O entendimento do que seja “propágulo infectivo” não deve ser reduzido àquele que está viável, mas sim àquele que está vigoroso (= viável e com germinação rápida). A correlação entre a concentração de conídios vigorosos e virulência já foi comprovada, por exemplo, para o fungo *B. bassiana* (Faria et al., 2015) e, muito provavelmente, é verdadeira para a grande maioria das espécies de fungos entomopatogênicos. Idealmente, a concentração nos produtos à base de fungos de artrópodes-praga deveria ser expressa, sempre que possível, na forma de propágulos vigorosos ao invés de viáveis. Até a presente data, a determinação do vigor só foi metodologicamente estabelecida para produtos à base de conídios aéreos, que são os mais comuns nos mercados brasileiro e mundial. Ao contrário de método de contagem de UFC, a estimativa direta permite a visualização do(s) tipo(s) de propágulo(s) que compõe(m) um determinado micopesticida, tornando a estimativa mais precisa, além de possibilitar a determinação do vigor.

**Tabela 2.** Principais estratégias de controle biológico com emprego de produtos à base de fungos que infectam artrópodes-praga.

	Controle biológico inundativo		Controle biológico inoculativo
Pragas	Associadas à parte aérea das plantas	Associadas ao solo	Associadas ao solo
Propágulos	Esporos aéreos e submersos	Esporos aéreos	Principalmente hifas (micélio, microescleródios) e clamidospores
Doses mínimas de estruturas infectivas	Elevadas ( $\geq 10^{12}$ propágulos infectivos ha <sup>-1</sup> ); não expressar concentração em UFC	Elevadas ( $\geq 10^{12}$ propágulos infectivos ha <sup>-1</sup> ) não expressar concentração em UFC	Baixas (preparações ou formulações sem ou com poucas estruturas infectivas)
O que se busca	Contato direto das estruturas infectivas com a praga-alvo; condições favoráveis para adesão das estruturas infectivas e penetração no alvo	Idem ao anterior	No ambiente onde liberados, espera-se que haja a posterior formação de focos primários da doença e infecções subsequentes
Desafios (durante e após a aplicação)	Garantir o contato e a adesão de grande quantidade de esporos à praga-alvo; prolongar a sobrevivência dos propágulos no ambiente, principalmente, reduzindo o impacto da radiação UV tanto durante a aplicação quanto nas horas subsequentes	Garantir o contato e a adesão de grande quantidade de propágulos à praga-alvo; evitar efeitos deletérios da radiação UV durante a aplicação e/ou quando se visa atingir a praga que se encontra na superfície do solo	Garantir que o fungo aplicado consiga estabelecer-se num ambiente repleto de outros microrganismos e, posteriormente, que gere quantidade suficiente de estruturas infectivas, e que essas venham a ter contato direto com a praga-alvo

Modificado de Faria et al. (2022a).

Embora no Brasil já tenhamos o registro de produtos com concentrações bastante elevadas, inclusive  $1,0 \times 10^{13}$  propágulos viáveis por quilograma ou litro, infelizmente a legislação brasileira não estabelece um padrão mínimo para esse parâmetro. Produtos com concentrações de  $1,0 \times 10^7$  propágulos por litro (ou seja, um milhão de vezes menos concentrados que os anteriormente mencionados), têm sido registrados para o controle de pragas aéreas. Igualmente preocupante é o registro de produtos constituídos exclusivamente ou quase que exclusivamente por propágulos não-infectivos e que visam ao controle de pragas aéreas pela estratégia inundativa, ou mesmo de pragas de solo de difícil alcance, porém sem um robusto lastro científico.

As contaminações são causadas quase que exclusivamente por bactérias, fungos e leveduras oportunistas. A concentração dos mesmos nos produtos pode ser expressa em porcentagem ou número total por unidade de peso ou volume. A legislação brasileira ainda não estabeleceu a concentração máxima de contaminantes nos biopesticidas comerciais. Por meio de diluições e plaqueamento em meios específicos, a adoção do método de contagem de UFC permite estimar a concentração de cada organismo contaminante. Para cada lote, o número de placas de Petri com meios específicos deve ser grande o suficiente para garantir a obtenção de resultados confiáveis. Acreditamos que o número total de organismos aeróbicos indesejáveis não deva ser, num primeiro momento, superior a  $5 \times 10^6$  UFC por grama ou mililitro. Gradativamente, valores inferiores poderão ser estabelecidos, até que se chegue a limites próximos de adotados em outros países, normalmente  $1,0 \times 10^6$  UFC de contaminantes aeróbicos por grama (Jenkins et al., 1998; OECD 2011). Análises referentes à presença e aos teores de microrganismos perigosos à saúde humana são feitas por algumas biofábricas estrangeiras.

Os principais contaminantes que aparecem em cultivo sob fermentação sólida de fungos são os fungos oportunistas: *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp. e *Trichoderma* spp. e bactérias de diversos gêneros. Por outro lado, no processo de cultivo de bactérias e fungos sob fermentação líquida os principais contaminantes são bactérias oportunistas e leveduras. No Brasil, ainda estão sendo estabelecidos os limites máximos aceitáveis de contaminantes em produtos biológicos, especialmente para alguns microrganismos como *Salmonella* sp., coliformes termotolerantes e *Bacillus cereus*, esse último principalmente em amostras de produtos à base de baculovírus devido à presença natural dessas bactérias no trato digestivo de lagartas.

Bactérias do gênero *Enterococcus* também são encontradas em larvas mortas por baculovírus. A contaminação por microrganismos pode ser reduzida quando as larvas são coletadas antes da morte, enquanto que a contaminação por bactérias *Bacillus* saprófitas pode aumentar quando as larvas são coletadas 24 horas após a morte. A concentração aceitável de contaminantes totais sugerida para formulações sólidas é inferior a  $5 \times 10^8$  UFC.g<sup>-1</sup>, enquanto que para formulações líquidas o limite estabelecido como seguro foi inferior a  $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> (Jenkins; Grzywacz, 2000). A presença de patógenos humanos na produção de baculovírus não tem sido observada, porém na maior parte dos processos para registro de biopesticidas em outros países tem sido requerido testes para ausência de patógenos específicos como *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. e *Escherichia coli* (Grzywacz; Moore, 2017). Discrepâncias quanto à qualidade e quantidade da presença de contaminantes nos produtos comerciais deverão ser definitivamente e estabelecidas.

### Viabilidade e Vigor

A viabilidade de células bacterianas e propágulos fúngicos determina a quantidade de células que estão metabolicamente ativas, ou seja, que são capazes de germinar e formar uma colônia, em meio de cultivo. Por outro lado, o vigor é um termo utilizado para informar a velocidade com que conídios de fungos germinam em meio de cultivo (Faria et al., 2015). A rápida germinação é um fator bastante desejável uma vez que, em condições de campo, conídios que germinarem mais rápido ficam menos tempo expostos a fatores ambientais deletérios como a radiação ultravioleta e a baixa umidade relativa, ou podem ser mais virulentos, uma vez que infectam mais rápido seus hospedeiros. O vigor é uma característica intrínseca da genética do isolado, mas que pode variar em função da manipulação do meio de cultivo, da metodologia de processamento ou do tempo de armazenamento do produto. Para determinação da porcentagem de conídios vigorosos em um produto, é feito um ensaio de viabilidade e a contagem da germinação dos conídios é determinada após um período de incubação mais curto do que o usual, por exemplo, 16 horas para *B. bassiana* (Faria et al., 2015), quando o convencional seria uma incubação por 20-24 horas. Conídios vigorosos são considerados aqueles que germinarem dentro das 16 horas de incubação.

No caso dos fungos, a viabilidade pode ser determinada de forma direta, pela contagem de conídios germinados em meio de cultura ou indireta, pela contagem de UFC, como descrito no tópico 2. No primeiro caso, pode-se preparar uma suspensão de conídios na concentração de  $10^6$  células mL<sup>-1</sup> que é plaqueada em meio de cultivo BDA em placas de Petri e incubada por 16 a 20 horas a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, é feita a contagem daqueles conídios que germinaram e não germinaram,

contando pelo menos 200 conídios por placa. O resultado da viabilidade é dado em porcentagem de conídios germinados em relação ao total de conídios contados. No caso do método da contagem de UFC, também adotada para produtos à base de células bacterianas, a viabilidade é dada em função da contagem de colônias formadas em placa de cultivo.

### Atividade biológica

A eficácia é tida como o parâmetro mais relacionado à performance em campo (Jenkins; Grzywacz, 2003). Quando o produto é registrado para uso em conformidade com a estratégia inundativa de controle biológico, é relevante que todos os lotes produzidos sejam avaliados. Uma das razões é que os propágulos infectivos dos fungos podem ter sua virulência atenuada após inúmeras passagens por meios de cultura. O problema é que a eficácia é medida a campo, o que inviabiliza sua adoção pelos fabricantes de biopesticidas. A alternativa tem sido a avaliação da virulência (grau de patogenicidade) em laboratório, que pode ser estimada, por exemplo, por meio de bioensaios padronizados com a praga-alvo. Os níveis de mortalidade mínimos devem ser definidos caso a caso. Na Europa, por exemplo, existem empresas que conduzem bioensaios com todos os lotes produzidos sobre o hospedeiro alvo em condições controladas. Entretanto, em muitos casos, a realização de bioensaios rotineiros com produtos à base de fungos pode ser técnica ou logisticamente inviável. Uma alternativa aplicável para os produtos constituídos exclusivamente ou majoritariamente por conídios aéreos seria a estimativa do vigor. Nesses produtos, é desejável que o número de conídios aéreos vigorosos não seja inferior a 80% do total de propágulos viáveis ou UFC declarados nos rótulos (Faria et al., 2022a). Conforme frisado anteriormente, medidas como “conídios viáveis” ou “UFC” em produtos destinados à estratégia inundativa de controle biológico são pouco informativas.

A atividade biológica pode ser determinada por bioensaios, realizados em laboratório ou em casa de vegetação, com os produtos formulados. Geralmente os bioensaios são feitos com cada lote de produção e os resultados obtidos são comparados com resultados padrões com efeitos já conhecidos em função da concentração do produto aplicado. Esse processo objetiva garantir a eficácia dos diferentes lotes de produtos que serão comercializados ou aplicados diretamente no campo.

Para determinação da ação inseticida ou nematicida de microrganismos são feitos ensaios de dose-resposta, visando determinar a concentração letal média ( $CL_{50}$ ) e o tempo letal médio ( $TL_{50}$ ) das pragas alvo. A concentração ou dose letal média é a concentração ( $CL_{50}$ ) ou número de partículas infectivas ( $DL_{50}$ ) requerida para matar 50% da população de insetos testada. Da mesma forma, o tempo letal médio ( $TL_{50}$ ) é o período necessário para causar a mortalidade de 50% dos indivíduos em estudo.

O potencial letal dos baculovírus é avaliado por bioensaios, com insetos alvos, cuja mortalidade é um indicador da eficácia do produto (Grzywacz; Moore, 2017; Quiroga-Cubides et al., 2021). Os principais métodos de bioensaio para verificar a atividade dos baculovírus consistem na deposição de corpos de oclusão na superfície do alimento (Moore, 2002), incorporação em dietas artificiais (Morales; Moscardi, 1993) e ingestão de microgotas (Hughes et al., 1986; Hunter-Fujita et al., 1998).

No caso de fungos micopatogênicos e bactérias com ação antagonista a fitopatógenos, são feitos ensaios com plantas inoculadas com os fitopatógenos e com os agentes de controle. Quando o produto

é destinado à aplicação foliar, são feitos ensaios de pulverização e as avaliações realizadas em tempos definidos visando determinar a eficácia de controle das doenças pelos agentes de biocontrole.

### **Vida de prateleira em temperatura representativa**

A vida de prateleira é o intervalo de tempo durante o qual o produto retém as suas especificações, desde que armazenado na embalagem original e de acordo com as condições estabelecidas pelo fabricante. Essas condições referem-se especialmente à temperatura de armazenamento, embora no caso de embalagens não herméticas a umidade relativa tem um significativo efeito sobre a vida útil do produto. No caso dos produtos à base de fungos, a vida de prateleira pode ser entendida como o tempo para que a concentração inicial de ingrediente ativo seja reduzida em 20% quando armazenado num dado regime de temperatura e umidade relativa (Faria et al., 2022b). Quedas superiores a 20% poderiam colocar em risco a eficácia do produto quando utilizado pelo usuário final.

Estudo realizado pela Embrapa demonstrou que temperaturas representativas nos depósitos de agrotóxicos do Brasil variam de 21,7 °C a 28,0 °C, dependendo da região geográfica (Faria et al., 2022b). Conseqüentemente, é recomendável que 30 °C seja a temperatura utilizada nos ensaios para determinação da vida de prateleira dos biopesticidas a serem comercializados nacionalmente e sem a indicação de armazenamento com refrigeração no rótulo. No caso de embalagens não herméticas, os referidos ensaios deverão ser conduzidos com 75% de UR. Sob essas condições, os ensaios para determinação da vida de prateleira são de curta duração, não havendo a necessidade de adoção de testes acelerados (*Accelerated Shelf-Life Testing* - ASLT), que são amplamente utilizados pelas indústrias farmacêutica e alimentícia para produtos com vida de prateleira superiores a 12 meses.

### **Características físico-químicas associadas ao produto**

Algumas exigências quanto às características de bioprodutos são definidas por meio de especificações de referência. Embora tenham surgido para atendimento de demanda relacionada à agricultura orgânica, uma vez que um bioproduto esteja registrado, pode ser utilizado por qualquer agricultor, independentemente do tipo de sistema de produção que adota. Especificação de referência são especificações e garantias mínimas que os produtos fitossanitários com uso aprovado para agricultura orgânica deverão seguir para obtenção de registro. Nas especificações de referência constam informações que vão nortear o controle de qualidade desses produtos, como a concentração do microrganismo, outros ingredientes que podem compor o produto e a sua função, o tipo de formulação e a indicação de uso. A partir da publicação da especificação de referência de determinado organismo, todas as empresas que tiverem interesse em registrar produto à base do mesmo organismo pode/ deve seguir o disposto na referida especificação. Mas, para a submissão de registro com base nessa especificação de referência devem ser apresentados ainda: a caracterização físico-química do produto formulado, constando pH, solubilidade, miscibilidade e densidade; o certificado de análise com quantificação do agente microbiológico de controle em UFC; a certificado de classificação taxonômica obtida junto à instituição de ensino ou pesquisa, comprovando a identidade do agente microbiológico de controle e informando o método utilizado; a identificação da coleção de depósito do agente microbiológico de controle e o teste de estabilidade de prateleira,

que comprove a validade do produto formulado. Portanto, o estabelecimento de uma especificação de referência precede o pleito de registro de um produto fitossanitário com uso aprovado para a agricultura orgânica junto ao Mapa (Ministério, 2021).

A avaliação de parâmetros físico-químicas em preparações ou formulações líquidas é menos comum, mas poderiam ser mencionados parâmetros como a estabilidade das suspensões e o pH. A avaliação do teor de água nas formulações sólidas é bastante utilizada, uma vez que, em excesso, pode levar à proliferação de contaminantes e reduzir drasticamente a vida de prateleira. Muitas biofábricas estrangeiras adotam padrões rigorosos, como teor de água  $\leq 5\%$  (Jenkins et al., 1998). A avaliação do tamanho de partículas para formulações sólidas tem sido também adotada (Jenkins et al., 1998).

A concentração de propágulos do fungo ou células bacterianas, bem como dos corpos de oclusão de baculovírus, consta na bula dos produtos formulados registrados. As unidades de medida utilizadas para indicar a concentração destes ingredientes ativos não são padronizadas. Há produtos registrados considerando a concentração de esporos e/ou esporos viáveis, no caso de fungos e unidades formadoras de colônia tanto para fungos quanto para bactérias. Além disso, os métodos de análise de conformidade e controle de qualidade de produtos biológicos não são padronizados para todos os antagonistas, o que dificulta a análise adequada da qualidade dos produtos, a comparação de resultados, a realização de testes e a emissão de laudos no processo de registro (Teixeira et al., 2010).

### Considerações finais

O controle de qualidade de bioinsumos à base de microrganismos destinados ao controle de pragas da soja, detalhado acima, é um conjunto de procedimentos de ações preventivas e corretivas implementados em todas as fases do desenvolvimento do bioinsumo. Os procedimentos implementados durante o processo de produção são fundamentais para monitoramento da qualidade de cada etapa. Além da identidade do microrganismo, os parâmetros de qualidade mais importantes do produto comercial já acabado são a concentração, a pureza, a viabilidade e/ou vigor e a atividade (eficiência) biológica. O monitoramento desses parâmetros nos lotes de produção e acompanhamento durante o armazenamento são fundamentais para assegurar a qualidade do produto. O controle de qualidade é indispensável em qualquer unidade de produção para garantir a reprodutibilidade do processo, a padronização do produto. Não menos importante é a redução de contaminantes a níveis aceitáveis para maior segurança ao ambiente e ao ser humano. A principal finalidade do controle de qualidade é garantir a eficácia em campo e a satisfação do consumidor.

A implantação de um criterioso programa de controle de qualidade para produtos à base de microrganismos aplicados ao controle de pragas agropecuárias é uma camada de proteção adicional, tanto para os fabricantes quanto para os agricultores e pecuaristas brasileiros. Os parâmetros de controle de qualidade anteriormente mencionados contribuem para o alcance desse objetivo, desde que as especificações do produto sejam satisfatórias. O controle de qualidade de um produto registrado com baixa concentração de propágulos, por exemplo, não tem o poder mágico de transformá-lo num produto melhor quando aplicado em lavouras.

Todos os lotes comerciais deverão ser analisados quanto à concentração de ingrediente ativo e pureza. As avaliações relacionadas à agressividade ou virulência dos propágulos (via bioensaios ou determinação da concentração de propágulos vigorosos), assim como a avaliação de características físico-químicas, embora não sejam obrigatórias, são recomendáveis. Os demais parâmetros, vida de prateleira e identidade do entomopatógeno, são determinados antes mesmo do processo de registro, mas deverão ser reavaliados sempre que necessário. O primeiro deverá ser repetido sempre que houver alguma alteração no produto (mudança na embalagem ou no teor de água, por exemplo), enquanto o segundo deverá ser realizado periodicamente, visando confirmar que não houve nenhuma troca acidental do princípio ativo na biofábrica. Por outro lado, os parâmetros para o controle de qualidade das preparações obtidas on-farm não foram ainda estabelecidos, mas certamente, a identidade do agente microbiano e a pureza são pontos relevantes e imprescindíveis.

## Referências

- ASERSE, A. A.; RÄSÄNEN, L. A.; ASEFFA, F.; HAILEMARIAM, A.; LINDSTRÖM, K. Phylogenetically diverse groups of *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Crotalaria* spp., *Indigofera* spp., *Erythrina brucei* and *Glycine max* growing in Ethiopia. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 65, n. 2, p. 595-609, 2012.
- AZEVEDO, H.; LOPES, F. M.; SILLA, P. R.; HUNGRIA, M. A database for the taxonomic and phylogenetic identification of the genus *Bradyrhizobium* using multilocus sequence analysis. **BMC Genomics**, v. 16, Suppl 5, p. S10, 2015.
- BARON, N. C.; POLLO A. D.; RIGOBELLO, E. C. *Purpureocillium lilacinum* and *Metarhizium marquandii* as plant growth-promoting fungi. **PeerJ**, v. 5, p. 1-25, 2020.
- BARRERA, G.; MURCIA, J.; CERÓN, J.; CUARTAS, P.; GUZMÁN, C.; VILLAMIZAR, L. PCR en tiempo real: una metodología útil para la detección y cuantificación de granulovirus. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 18, n. 2, p. 24-31, 2016.
- BAVYKIN, S. G.; LYSOV, Y. P.; ZAKHARIEV, V. KELLY, J. J.; JACKMAN, J.; STAHL, D. A.; CHERNI, A. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3711-3730, 2004.
- BELL R. A.; OWENS C. D.; SHAPIRO M.; TARDIF, J. R. Mass rearing and virus production: development of mass rearing technology. In: DOANE, C. C.; MCMANUS, M. L. (Eds.). **The gypsy moth: research toward integrated pest management**. USDA Forest Service Technical Bulletin, 1584, 1981. p. 599-633.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512-530, 2009.
- BOTELHO, A. B. R. Z.; ALVES-PEREIRA, A.; COLONHEZ R. P.; ZUCCHI, M. I.; DELALIBERA I. *Metarhizium* species in soil from Brazilian biomes: a study of diversity, distribution, and association with natural and agricultural environments. **Fungal Ecology**, v. 41, p. 289-300, 2019.
- BUSTAMANTE, D. E.; OLIVA, M.; LEIVA, S.; MENDOZA, J. E.; BOBADILLA, L.; ANGULO, G.; CALDERÓN, M. S. Phylogeny and species delimitations in the entomopathogenic genus *Beauveria* (Hypocreales, Ascomycota), including the description of *B. peruviansis* sp. nov. **MycologyKeys**, v. 58, p. 47-68, 2019.
- CASTRO, M. E. B.; MORAIS RIBEIRO, B.; CRAVEIRO, S. R.; INGLIS, P. W.; VALICENTE, F. H. Controle de artrópodes-praga com vírus entomopatogênicos. In: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds.). **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília: Embrapa, 2020, p. 237-273.
- CASTRO, T.; EILENBERG, J.; DELALIBERA, I. Exploring virulence of new and less studied species of *Metarhizium* spp. from Brazil for two-spotted spider mite control. **Experimental and Applied Acarology**, v. 74, p. 139-146, 2018.
- CHAVERRI, P.; CASTLEBURY, L. A.; SAMUELS, G. J.; GEISER, D. M. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 302-13, 2002.
- COSTA, N. R.; CASTRO, M. E. B. de; SIHLER, W.; PEGORARO, R. A.; SOUZA, M. L. de. **Análise da estabilidade genética do *Erinnyis ello granulovirus* aplicado em Santa Catarina como bioinseticida no período de 1986 a 2000**. Brasília: Embrapa, 2005. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 110).

- COUTINHO, R. R. *Pochonia chlamydsporia*: controle de *Meloidogyne javanica* em soja, associação com culturas de cobertura e interação com bactérias fixadoras de nitrogênio e com o pH do solo. 2018. 91 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- D'ALESSANDRO, C. P.; JONES, L. R.; HUMBER, R. A.; LASTRA, C. C. L.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Characterization and phylogeny of *Isaria* spp. strains (Ascomycota: Hypocreales) using ITS1-5.8S-ITS2 and elongation factor 1-alpha sequences. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p. S21-S31, 2013.
- DOU, K.; LU, Z.; WU, Q.; NI, M.; YU, C.; WANG, M.; LI, Y.; WANG, X.; XIE, H.; CHEN, J.; ZHANG C. MIST: A multilocus identification system for *Trichoderma*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 18, e01532-20, 2020.
- DRUZHININA, I.; KUBICEK, C. P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and Hypocrea: from aggregate species to species clusters. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 6, n.2, p. 100-112, 2005.
- DUNLAP, C. A. Taxonomy of registered *Bacillus* spp. strains used as plant pathogen antagonists. **Biological Control**, v. 134, p. 82-86, 2019.
- EBERLE, K. E.; WENNMANN, J. T.; KLEESPIES, R. G.; JEHL, J. A. Basic techniques in insect virology. 2<sup>nd</sup> ed. In: LACEY A. L. (Ed.). **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**. Oxford: Elsevier, 2012. p. 15-74.
- EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **Biocontrol**, v. 46, p. 387-400, 2001.
- FARIA, M.; LOPES, R. B.; SOUZA, D. A.; WRAIGHT, S. P. Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 125, p. 68-72. 2015.
- FARIA, M.; MASCARIN, G. M.; SOUZA, D. A.; LOPES, R. B. **Controle de qualidade de produtos comerciais à base de fungos para o manejo de invertebrados** (insetos, ácaros, nematoides). Brasília: Embrapa, 2022a. 48 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 377).
- FARIA, M.; PALHARES, L. A. M.; SOUZA, D. A.; LOPES, R. B. What would be representative temperatures for shelf-life studies with biopesticides in tropical countries? Estimates through long-term storage of biocontrol fungi and calculation of mean kinetic temperatures. **BioControl**, 2022b. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10526-021-10126-2>
- FARIA, M. R.; WRAIGHT S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, p. 237-256, 2007.
- FERNÁNDEZ-BRAVO, M.; GSCHWEND, F.; MAYERHOFER, J.; HUG, A.; WIDMER, F.; ENKERLI, J. Land-use type drives soil population structures of the entomopathogenic fungal genus *Metarhizium*. **Microorganisms**, v. 9, p. 1380, 2021.
- FERRAZ HELENE, L. C.; O'HARA, G.; HUNGRIA, M. Characterization of *Bradyrhizobium* strains indigenous to Western Australia and South Africa indicates remarkable genetic diversity and reveals putative new species. **Systematic Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, 126053, 2020.
- FISHER, T. W.; GARCZYNSKI, S. F. Isolation, culture, preservation, and identification of entomopathogenic bacteria of the Bacilli. In: LACEY, L. A. (Ed.). **Manual of techniques in invertebrate pathology**. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego, CA: Academic Press, 2012. p. 75-99.
- GARAVAGLIA, M. J.; MIELE, S. A. B.; ISERTE, J. A.; BELAICH, M. N.; GHIRINGHELLI, P. D. The ac53, ac78, ac101, and ac103 genes are newly discovered core genes in the family Baculoviridae. **Journal of Virology**, v. 86, p. 12069-12079, 2012.
- GLARE, T. R.; SCHOLTE OP REIMER, Y.; CUMMINGS N.; RIVAS-FRANCO, F.; NELSON, T. L.; ZIMMERMANN, G. Diversity of the insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* in New Zealand. **New Zealand Journal of Botany**, v. 59, n. 4, p. 440-456, 2021.
- GOETTEL M. S.; INGLIS, G. D. Fungi: hyphomycetes. In: LACEY, L. A. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. New York: Academic Press, 1997. p. 213-249.
- GRZYWACZ, D. Basic and applied research: Baculovirus. In: LACEY, L. A. (Ed.). **Microbial control of insect and mite pests**. From theory to practice. Academic Press, London, 2017, p. 27-36.
- GRZYWACZ, D.; MOORE, S. Production, formulation, and bioassay of baculoviruses for pest control. In: LACEY, L. A. (Ed.). **Microbial control of insect and mite pests**: From theory to practice. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 109-124.
- HIRSCH, P.R.; MAUCLINE, T. H.; MENDUM T. A.; KERRY B. R. Detection of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydsporium* in nematode-infested plant roots using PCR. **Mycological Research**, v. 104, p. 435-439, 2000.
- HUBÁLEK Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, p. 205-229, 2003.
- HUMBER, R. A. Fungi: Preservation of cultures. In: Lacey L. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. New York: Academic Press 1997, p. 269-279.
- HUGHES, P. R.; VAN BEEK, N. A. M.; WOOD H. A. Modified droplet feeding method for rapid assay of *Bacillus thuringiensis* and Baculoviruses in noctuid larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 48, p. 187-192, 1986.
- HUNTER-FUJITA, F. R.; ENTWISTLE, P. F.; EVANS H. F.; CROOK, N. E. **Insect viruses and pest management**. Chichester, UK: Wiley, 1998. p. 632.

- IWANICKI, N. S. A.; PEREIRA, A. A.; BOTELHO, A. B. R. Z.; REZENDE, J. M.; MORAL, R. A.; ZUCCHI, M. I.; DELALIBERA I. Monitoring of the field application of *Metarhizium anisopliae* in Brazil revealed high molecular diversity of *Metarhizium* spp. in insects, soil and sugarcane roots. **Scientific Report**, v. 9, p. 4443, 2019.
- JÄÄSKELÄINEN, E. **Assessment and control of *Bacillus cereus* emetic toxin in food**. 2008. 78 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade de Helsinki, Helsinki.
- JEHLE, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; CORY, J. S.; HERNIOU, E. A.; ROHRMANN, G. F.; THEILMANN, D. A.; THIEM, S. M.; VLAK, J. M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. **Archives of Virology**, v. 151, p. 1257-1266, 2006.
- JENKINS, N. E.; GRZYWACZ, D. Quality control of fungal and viral biocontrol agents: assurance of product performance. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 753-777, 2000.
- JENKINS, N. E.; GRZYWACZ, D. Towards the standardisation of quality control of fungal and viral biocontrol agents. In: VAN LENTEREN, J. C. (Ed.). **Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures**. Wallingford: CAB International, 2003. p. 247-263.
- JENKINS, N. E.; HEVIEFO, G.; LANGEWALD, J.; CHERRY, A. J.; LOMER, C. J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News and Information**, v. 19, p. 21N-31N, 1998.
- KEPLER, R. M.; LUANGSA-ARD, J. J.; HYWEL-JONES, N. L.; QUANDT, C. A.; SUNG, G.-H.; REHNER, S. A.; AIME, M. C.; HENKEL, T. W.; SANJUAN, T.; ZARE, R.; CHEN, M.; LI, Z.; ROSSMAN, A. Y.; SPATAFORA, J. W.; SHRESTHA, B. A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). **IMA Fungus**, v. 8, p. 335-353, 2017.
- KHONSANIT A.; LUANGSA-ARD, J. J.; THANAKITPIPATTANA, D.; NOISRIPOOM, W.; CHAITIKA, T.; KOBMOO, N. Cryptic diversity of the genus *Beauveria* with a new species from Thailand. **Mycological Progress**, v. 19, p. 291-315, 2020.
- KRELL, P.J. Passage effect of virus infection in insect cells. **Cytotechnology**, v. 20, p. 125-137, 1996.
- LANGE, M.; WANG, H.; ZHIHONG, H.; JEHL, J. A. Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran-specific baculoviruses. **Virology**, v. 325, n. 1, p. 36-47, 2004.
- LOPES, R. B.; SOUZA, D. A.; ROCHA, L. F. N.; MONTALVA, C.; LUZ C.; HUMBER, R. A.; FARIA, M. *Metarhizium alvesii* sp. nov.: A new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 151, p. 165-168, 2017.
- LÓPEZ-QUINTERO, C. A.; ATANASOVA, L.; FRANCO-MOLANO, A. E.; GAMS, W.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; THEELEN, B.; MÜLLER, W. H.; BOEKHOUT, T.; DRUZHININA, I. DNA barcoding survey of *Trichoderma* diversity in soil and litter of the Colombian lowland Amazonian rainforest reveals *Trichoderma strigosellum* sp. nov. and other species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, p. 657-674, 2013.
- LOUREIRO, E. de S.; DIAS NETO, J. A.; PESSOA, L. G. A.; ADÃO, D. V.; DIAS, P. M.; PEREIRA FILHO, A. A.; MATEUS, J. A. de F. Management of *Pratylenchus brachyurus* with *Trichoderma harzianum* and *Purpureocillium lilacinum* in soybean. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e124973828, 2020.
- LUANGSA-ARD, J.; HOUBRAKEN, J.; VAN DOORN, T.; HONG, S.-B.; BORMAN, A. M.; HYWEL-JONES, N. L.; SAMSON, R. A. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. **FEMS Microbiol Letters**, v. 321, p. 141-149, 2011.
- LUZ, C.; ROCHA, L. F. N.; MONTALVA, C.; SOUZA, D. A.; BOTELHO A. B. R. Z.; LOPES, R. B.; FARIA, M.; DELALIBERA JR, I. *Metarhizium humberti* sp. nov. (Hypocreales: Clavicipitaceae), a new member of the PARB clade in the *Metarhizium anisopliae* complex from Latin America. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 166, p. 107216, 2019.
- MAPA. **Agrofit: consulta aberta**. 2022. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agro\\_fit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agro_fit_cons)>. Acesso em: 08 mar. 2022.
- MAYERHOFER, J.; ENKERLI, J.; ZELGER, R.; STRASSER, H. Biological control of the European cockchafer: persistence of *Beauveria brongniartii* after long-term applications in the Euroregion Tyrol. **BioControl**, v. 60, p. 617-629, 2015.
- MEDINA-CANALES, M. G.; RODRIGUEZ -TOVAR, A. V. MANZANILLA-LOPEZ, R. H.; ZUÑIGA, G. Identification and molecular characterization of new Mexican isolates of *Pochonia chlamydosporia* for the management of *Meloidogyne* spp. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 1, p. 1-21, 2014.
- MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (Eds.). **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília: Embrapa, 2019. 538 p.
- MIELE, S. A. B.; GARAVAGLIA, M. J.; BELAICH, M. N.; GHIRINGHELLI, P. D. Baculovirus: molecular insights on their diversity and conservation. **International Journal of Evolutionary Biology**, 2011, p. 1-15, 2011.
- MINISTÉRIO da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). **Especificações de Referência**. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/produtos-fitosanitarios/especificacao-de-referencia>>. Acesso em: 18 out. 2021.
- MONNERAT, R. G.; MONTALVÃO, S. C. L.; MARTINS, E. S.; QUEIROZ, P. R.; SILVA, E. Y. Y. da; GARCIA, A. R. M.; CASTRO, M. T. de; ROCHA, G. T.; FERREIRA, A. D. C. de L.; GOMES, A. C. M. M. **Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura**. Brasília: Embrapa, 2020. 46 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 369)

- MONGKOLSAMRIT, S.; NOISRIPOOM, W.; THANAKITPIPATANA, D.; WUTIKHUN, T.; SPATAFORA, J. W.; LUNGSA-ARD, J. Disentangling cryptic species with *Isaria*-like morphs in Cordycipitaceae. *Mycologia*, v. 110, p. 230-257, 2018.
- MOORE, S.D. **The development and evaluation of *Cryptophlebia leucotreta granulovirus* (CrLeGV) as a biological control agent for the management of the false codling moth, *Cryptophlebia leucotreta*, on citrus.** 2002. 308 f. PhD Thesis - Rhodes University, Grahamstown, South Africa.
- MORALES, L.; MOSCARDI, F. Comparação entre duas metodologias de bioensaios para vírus entomopatogênicos. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 22, p. 535-540, 1993.
- MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera **Annual Review of Entomology**, v.44, p. 257-89, 1999.
- MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; MOSCARDI, M.; SZEWCZYK, B. Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHEL, P. (Eds.). **Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications**, New York: Springer, 2011. p. 415-445.
- NONAKA, K.; OMURA, S.; MASUMA, R.; KAIFUCHI, S. Three new *Pochonia* taxa (Clavicipitaceae) from soils in Japan. *Mycologia*, v. 105, p. 1202-1218, 2013.
- OECD. **OECD issue paper on microbial contaminant limits for microbial pest control products.** OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Pesticides, No. 65. 2011.
- OLIVEIRA, D. G. P.; PAULI, G.; MASCARIN, G. M.; DELALIBERA, I. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. *Journal of Microbiological Methods*, v. 119, p. 44-52, 2015.
- O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual.** Salt Lake City, UT: W.H. Freeman, 1992. 347 p.
- PERDOMO, H.; CANO, J.; GARCÍA, D.; GENÉ, J.; HERNÁNDEZ M.; GUARRO, J. Polyphasic analysis of *Purpureocillium lilacinum* isolates from different origins and proposal of the new species *Purpureocillium lavendulum*. *Mycologia*, v. 105, n. 1, p. 151-161, 2013.
- QUIROGA-CUBIDES, G. M.; TOLOZA-MORENO, D.; BARRERA, G.; GÓMEZ, J.; RUIZ, J.; GÓMEZ, M. I.; CORTÉS-ROJAS, D. F. Formulation process of a biopesticide based on the *Erinyis ello* betabaculovirus (ErelGV): unit operations analysis. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 20, n. 2, p. 989-1004, 2021.
- RAVENSBERG, W. J. **A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of Arthropods.** Dordrecht: Springer, 2011. 386 p.
- REHNER, S. A.; MINNIS, A. M.; SUNG, G.-H.; LUANGSA-ARD, J. J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R. A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, v. 103, p. 1055-1073, 2011.
- REHNER, S. A.; POSADA, F.; BUCKLEY, E. P.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; VEGA, F. E. PHYLOGENETIC origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 93, p. 11-21, 2006.
- REINEKE, A.; BISCHOFF-SCHAEFER, M.; RONDOT, Y.; GALIDEVARA, S.; HIRSCH, J.; UMA DEVI, K. Microsatellite markers to monitor a commercialized isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in different environments: technical validation and first applications. *Biological Control*, v. 70, p. 1-8, 2014.
- REZENDE, J. M.; ZANARDO, A. B. R.; LOPES, M. DA SILVA; DELALIBERA, I.; REHNER, S. A. Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarhizium* associated with sugarcane agriculture. *BioControl*, v. 60, p. 495-505, 2015.
- ROONEY, A. P.; PRICE, N. P. J.; EHRHARDT, C.; SEWZEY, J. L.; BANNAN, J. D. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International Journal of Systematic Evolution and Microbiology*, v. 59, p. 2429-2436, 2009.
- SANCHES, M. M.; SIHLER, W.; SILVA, C. E. P.; GUIMARÃES, G. C.; BENITO, N. P.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; SOUZA, M. L. Characterization of a *Chrysoideixis includens* nucleopolyhedrovirus isolate from Brazilian Cerrado and assessment of its co-infection with *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 62, e19180688, 2019. DOI: 10.1590/1678-4324-2019180688
- SINGH, P.; MOORE R. R. **Handbook of insect rearing.** v. 1. Amsterdam: Elsevier, 1985. 496 p.
- SOSA-GÓMEZ, D.R. Microbial Control of Soybean Pest Insects and Mites. In: LACEY, L. (Ed.). **Microbial Control of Insect and Mite Pests. From Theory to Practice.** Academic Press Elsevier. 2017. p. 199-208.
- SOSA-GÓMEZ, D.R.; MORGADO, F.S.; CORRÊA, R.F.T.; SILVA, L. A.; ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P.; RODRIGUES, B.M. P.; OLIVEIRA, E.E.; AGUIAR, R. W.S. RIBEIRO, B. M. Entomopathogenic viruses in the Neotropics: Current Status and Recently Discovered Species. *Neotropical Entomology*, 49, 315-331, 2020.

- SUDHAKAR, S.; VARATHARAJAN, R.; MATHAVAN, S. Simple method to purify polyhedral inclusion bodies from *Nosema* (Microspora: Nosematida) contamination. **Entomon**, v. 22, n. 2, p. 89-93, 1997.
- SUNG, G.-H.; SUNG, J.-M.; HYWEL-JONES, N. L.; SPATAFORA, J. W. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 44, n. 3, p. 1204-23, 2007.
- TEIXEIRA, H.; BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PINTO, Z. V.; LEHNER, M. S.; FREITAS, M. M. Q.; REZENDE, L.C. Conformidade e qualidade de produtos biológicos para o controle de doenças de plantas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. (Eds.). **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa: Epamig, 2010. p. 101-112.
- TIWARI, S.; PRASAD, V.; LATA, C. *Bacillus*: plant growth promoting bacteria for sustainable agriculture and environment. In: SHANKAR, S. J.; SINGH, D. P. (Eds.). **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. Lucknow: Elsevier, 2019. p 43-55.
- WOLKERS, W. F.; WALKER, J. M. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. New York, NY, USA: Springer, 2021. 742 p.
- WU, S.; TOEWS, M. D.; CASTRILLO, L. A.; BARMAN, A. K.; COTTRELL, T. E.; SHAPIRO-ILAN, D. I. Identification and virulence of *Cordyceps javanica* strain wf GA17 isolated from a natural fungal population in sweetpotato whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae). **Environmental Entomology**, v. 50, n. 5, 1127-1136, 2021.
- ZASADA, A. A. Detection and Identification of *Bacillus anthracis*: from conventional to molecular microbiology methods. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 125. 2020.