

Controle de qualidade de produtos comerciais
à base de fungos para o manejo de
invertebrados (insetos, ácaros, nematoides)
em sistemas agropecuários



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

DOCUMENTOS 377

Controle de qualidade de produtos comerciais
à base de fungos para o manejo de
invertebrados (insetos, ácaros, nematoides)
em sistemas agropecuários

*Marcos Faria
Gabriel Moura Mascarin
Daniela Aguiar de Souza
Rogerio Biaggioni Lopes*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológica

Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte
Caixa Postal 02372
70770-917, Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
www.embrapa.br/fale-conosco/sac
www.embrapa.br

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Presidente
Wagner Alexandre Lucena

Secretária-Executiva
Daniela Aguiar de Souza

Membros
*Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes, Andrielle
Câmara Amaral Lopes, Bruno Machado Teles Walter;
Marcos Aparecido Gimenes; Solange Carvalho
Barrios Roveri José; Márcio Martinello Sanches;
Edson Junqueira Leite; Débora Pires Paula*

Supervisão editorial
Daniela Aguiar de Souza

Revisão de texto
Jakcelia Costa da Silva

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Cíntia Pereira da Silva

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Cíntia Pereira da Silva

Foto da capa
Marcos Faria

1ª edição
1ª edição (on-line) - 2022

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 Recursos Genéticos e Biotecnologia

Controle de qualidade de produtos comerciais à base de fungos para manejo de
invertebrados (insetos, ácaros, nematoides) em sistemas agropecuários. /
Marcos Faria, Gabriel Moura Mascarin, Daniela Aguiar de Souza, Rogério
Biaggione Lopes – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnolo-
gia, 2021.

48 p. - (Documentos/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 377).

ISSN: 0102 0110

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader (PDF)

Modo de Acesso: World Wide Web

1. Controle biológico. 2. Biofábrica. 3. Agricultura. I. Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia. II. Série.

631.46 – CDD 21

© Embrapa, 2022

Autores

Marcos Faria

Agrônomo, PhD em Patologia de Invertebrados, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF

Gabriel Moura Mascarin

Agrônomo, PhD em Patologia de Invertebrados, analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna - SP

Daniela Aguiar de Souza

Bióloga, PhD em Biologia Molecular, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF

Rogério Biaggioni Lopes

Agrônomo, PhD em Patologia de Invertebrados, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF

Apresentação

O controle biológico de pragas agropecuárias vem crescendo a passos largos, tanto no Brasil quanto em outros países. Num curto espaço de tempo, um número surpreendente de agricultores brasileiros passou a fazer uso de produtos biológicos e, em especial, daqueles à base de microrganismos. Para que o ritmo de crescimento continue acelerado, faz-se necessária a adoção pelas biofábricas de especificações cientificamente embasadas para os seus produtos, assim como de critérios rigorosos para o controle de qualidade.

Há pouco mais de 10 anos a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia iniciou estudos voltados a um melhor entendimento de processos fisiológicos ligados aos propágulos infectivos dos fungos patogênicos aos invertebrados (insetos, ácaros e nematoides). Os estudos demonstraram, por exemplo, que esporos vigorosos caracterizados por rápida velocidade de germinação são consideravelmente mais infectivos que os esporos com lenta germinação. Somado a tudo isso, foram realizadas pesquisas na Embrapa Meio Ambiente sobre fermentação líquida submersa, o que possibilitou o alcance de bioprocessos mais eficientes envolvendo propágulos como blastosporos, conídios submersos e microescleródios.

Este documento segue o mesmo princípio de uma relevante iniciativa denominada Projeto Qualibio, de 2008, que teve como propósito o desenvolvimento e padronização de metodologias para avaliação da qualidade dos produtos biológicos, com foco naqueles à base do fungo antagonista *Trichoderma* e bactérias do gênero *Bacillus*. Já naquela época se reconhecia a necessidade de protocolos harmonizados para que os fabricantes pudessem investir na melhoria de seus produtos biológicos, buscando alcançar padrões mínimos de qualidade e, ao mesmo tempo, que os órgãos oficiais pudessem contar com metodologias apropriadas para a inspeção e fiscalização.

A presente publicação preenche uma lacuna ao discutir em profundidade a harmonização de critérios técnicos para a averiguação da qualidade de produtos comerciais à base de fungos de invertebrados.

Maria Cleria Valadares Inglis

Chefe-Geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

1. Introdução	7
2. Mecanismo de ação dos fungos de invertebrados	8
3. Principais estratégias de controle biológico com fungos	9
4. Produção de fungos	11
5. Identificação taxonômica dos principais fungos de invertebrados	13
5.1 Fungos entomopatogênicos	13
5.1.1 Complexo <i>Beauveria bassiana</i>	13
5.1.2 Complexo <i>Metarhizium anisopliae</i>	14
5.1.3 <i>Cordyceps javanica</i>	14
5.1.4 <i>Simplicillium lanosoniveum</i>	16
5.1.5 Outros fungos entomopatogênicos	16
5.2 Fungos nematófagos	17
5.2.1 <i>Purpureocillium lilacinum</i>	17
5.2.2 <i>Pochonia chlamydosporia</i>	17
5.2.3 Outros fungos nematófagos	17
5.3 Identificação de isolados	18
6. Classificação das preparações e formulações empregadas para o controle de invertebrados	18
6.1 Micopesticidas não-formulados	19
6.1.1 Material técnico (TC)	19
6.1.2 Concentrado técnico (TK)	20
6.2 Principais formulações para micopesticidas empregados no controle de invertebrados	20
6.2.1 Pó molhável (WP)	20

6.2.2 Granular (GR)	20
6.2.3 Grânulos dispersíveis em água (WG)	20
6.2.4 Isca (RB)	21
6.2.5 Pó polvilhável (DP)	21
6.2.6 Dispersão oleosa (OD)	21
6.2.7 Suspensão concentrada (SC)	22
6.2.8 Suspensão concentrada miscível em óleo (suspensão miscível em óleo) (OF)	22
6.2.9 Suspensão para aplicação a ultrabaixo volume (SU)	22
7. Principais parâmetros utilizados no controle de qualidade de micopesticidas	22
7.1 Concentração de propágulos viáveis e concentração de conídios vigorosos	24
7.1.1 Concentração de unidades formadoras de colônias (UFC)	25
7.1.2 Estimativa direta da concentração de propágulos viáveis	27
7.1.3 Vigor conidial	30
7.2 Virulência	32
7.2.1 Bioensaios	33
7.2.2 Vigor conidial	33
7.3 Pureza	33
7.4 Vida de prateleira (prazo de validade)	36
7.5 Parâmetros físico-químicos relacionados aos micopesticidas	38
7.6 Casos especiais	38
7.6.1 Micopesticidas com agentes biológicos de diferentes classes	39
7.6.2 Micopesticidas com mais de um isolado do mesmo fungo	39
7.6.3 Micopesticidas à base de clamidósporos	39
7.6.4 Micopesticidas à base de microescleródios	40
7.7 Amostragem de micopesticidas comerciais	41
7.7.1 Amostragens realizadas pelas biofábricas	41
7.7.2 Amostragens realizadas por agentes públicos (fiscalização)	41
8. Ensaio para o controle de qualidade de micopesticidas destinados ao manejo de invertebrados-praga	42
8.1 Produtos para o controle biológico inundativo de invertebrados	42
8.2 Produtos para o controle biológico inoculativo de invertebrados	44
9. Considerações finais	44
10. Referências	45

1. Introdução

Entre os agentes de controle biológico de pragas, aqueles à base de microrganismos (fungos, vírus e bactérias) são coletivamente chamados biopesticidas. A maior parte dos biopesticidas atualmente registrados no Brasil tem os fungos como princípio ativo, incluindo aqueles destinados ao controle de invertebrados, especialmente os insetos, ácaros e nematoides fitoparasitos. A utilização desses micopesticidas no Brasil foi iniciada nas usinas de cana-de-açúcar da região Nordeste, ainda na década de 70, através da aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* visando ao controle biológico da cigarrinha-da-folha, *Mahanarva posticata*. Nos anos subsequentes, observou-se a expansão do uso desse fungo para o manejo de outras cigarrinhas da cana e de pastagens e, anos mais tarde, outras espécies de fungos passaram a fazer parte do repertório dos agricultores contra diferentes pragas e em diversas culturas.

Somente através de constantes melhorias na qualidade dos micopesticidas é que essa expansão terá continuidade. Não há mais espaço no mercado brasileiro para micopesticidas de baixa qualidade, que levam a resultados de campo inconsistentes e podem colocar em risco a saúde das pessoas. Boas especificações para os micopesticidas, paralelamente à adoção de parâmetros robustos de controle de qualidade, são o melhor caminho para produtos seguros e resultados consistentes no campo. O controle de qualidade de micopesticidas à base de células de fungos é consideravelmente mais complexo que o controle de qualidade de agrotóxicos de natureza química, cada qual usualmente composto por uma única molécula como princípio ativo. Sua adoção pelas biofábricas é condição prioritária para que as preparações (não formulados) e formulações comerciais atendam às especificações assumidas junto aos órgãos reguladores. Afora as questões relacionadas à criteriosa seleção de isolados, formulação e empacotamento para aumento da vida de prateleira, o controle de qualidade é etapa essencial para garantir que a concentração de propágulos funcionais esteja em consonância com critérios mínimos preestabelecidos; é também relevante que micopesticidas com elevada concentração de propágulos de alta qualidade não apresentem contaminantes acima de limites aceitáveis. Além da concentração de ingrediente ativo e pureza, outros parâmetros devem ser também considerados, como será discutido adiante. Atualmente, as diferentes biofábricas envolvidas na produção de micopesticidas têm adotado protocolos próprios para a aferição da qualidade e, em alguns casos, os critérios considerados não estão alinhados às recomendações científicas. Essa situação indesejável, de ausência de padronização entre os protocolos destinados à avaliação da qualidade de micopesticidas, provavelmente tem como uma das principais causas o reduzido número de pesquisas dedicadas ao assunto e à deficiente divulgação junto a biofábricas. Pouquíssimas publicações internacionais abordam de forma satisfatória e abrangente as questões relacionadas ao controle de qualidade. Mesmo as publicações ricas nesse tema, a exemplo das obras de Jenkins *et al.* (1998), Jenkins e Grzywacz (2000, 2003) e Ravensberg (2011), em alguns casos estão defasadas ou o teor não é completamente aplicável aos diferentes produtos comerciais disponíveis no Brasil. Dado o grande número de micopesticidas no mercado brasileiro, a padronização de parâmetros e protocolos para o controle de qualidade faz-se necessária atualmente. Infelizmente, ainda há muita desinformação em torno desse complexo assunto.

A presente publicação tem a intenção de abordar, de forma detalhada, os principais parâmetros a serem adotados visando ao controle de qualidade dos micopesticidas comerciais destinados ao manejo de insetos, ácaros e nematoides fitoparasitos em sistemas agropecuários. O documento apresenta critérios de avaliação e propõe a harmonização de ensaios para o controle de qualidade de inúmeras preparações e formulações comerciais disponíveis no Brasil. Apesar de possíveis falhas e limitações intrínsecas a toda publicação que propõe um novo olhar sobre um assunto com-

plexo, os autores esperam contribuir para o nivelamento de conceitos e padronização de protocolos e, dessa forma, possibilitar que os micopesticidas ao alcance dos produtores rurais sejam cada vez melhores. O que se busca, de fato, é contribuir para que os produtos comerciais entreguem aos produtores rurais o que é prometido nos rótulos/bulas.

Como último objetivo, espera-se que o presente documento possa resultar em sugestões e críticas construtivas por parte da comunidade científica e biofábricas, impulsionando assim o lançamento futuro de publicações atualizadas e cada vez mais informativas.

2. Mecanismo de ação dos fungos de invertebrados

Mais de 1.000 espécies de fungos filamentosos e não filamentosos (leveduras) interagem de maneiras diversas com os insetos e ácaros, incluindo simbiose, colonização externa e, o que mais interessa aos leitores dessa publicação, infecção dos hospedeiros. Esses fungos diferem consideravelmente de outros agentes de controle biológico de artrópodes quanto ao processo de infecção. Os vírus e bactérias entomopatogênicos agem pela via oral, por isso, devem ser ingeridos pelas pragas-alvo. Os fungos entomopatogênicos, por outro lado, agem por contato. A infecção e poste-

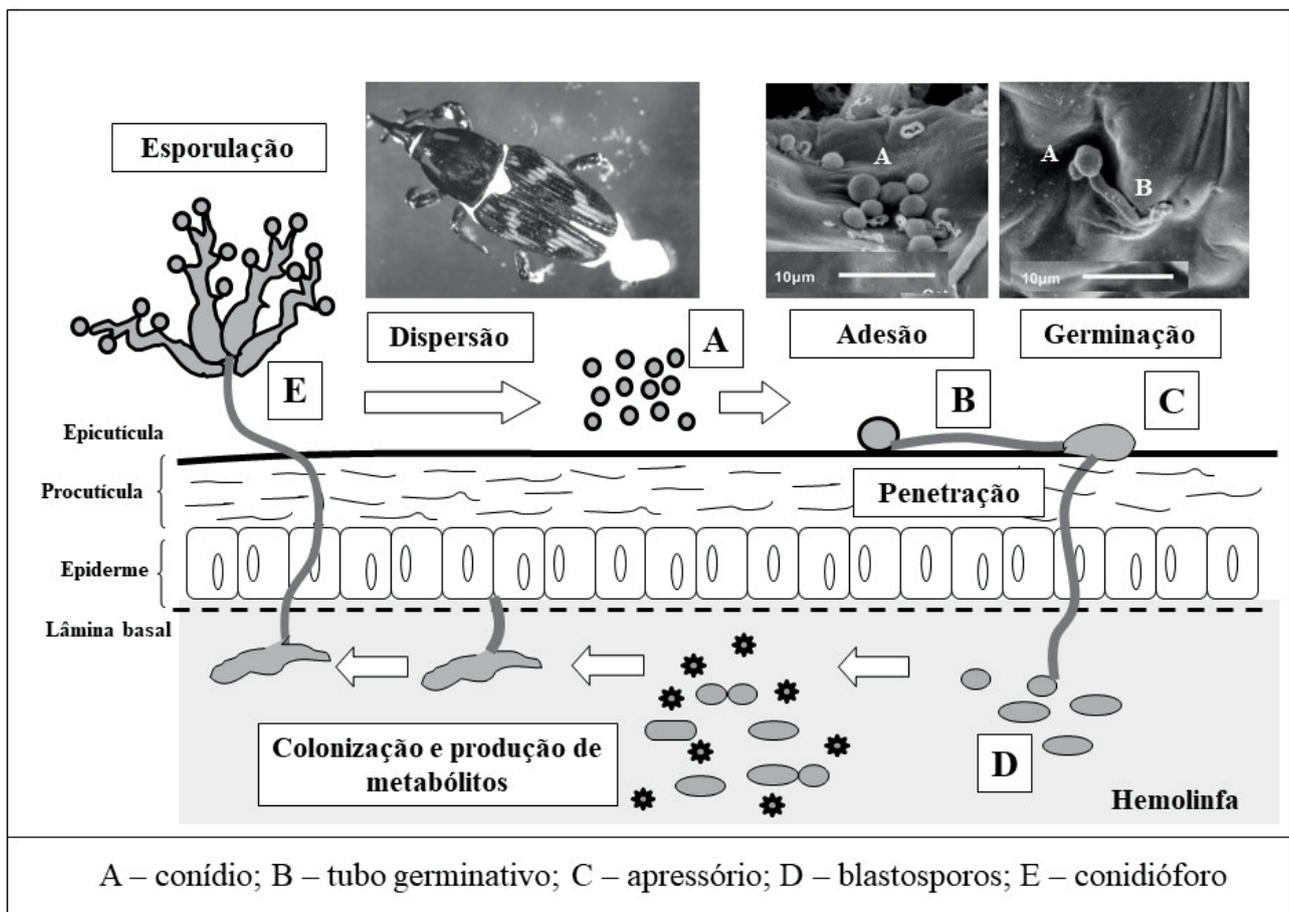


Figura 1. Ilustração do processo infeccioso de artrópode suscetível por um fungo entomopatogênico (ilustração adaptada de Mascarin e Jaronski, 2016). Etapas do processo patógeno-hospedeiro: A) dispersão dos conídios no ambiente; B) adesão e germinação (emissão de tubo germinativo e formação de apressório) do conídio na cutícula do inseto-alvo; C) penetração da hifa através do tegumento do inseto via atividade enzimática e mecânica; D) diferenciação da hifa de penetração em blastosporos ou corpos hifais (células leveduriformes) na hemolinfa e rápida multiplicação do fungo para disseminação pelos órgãos do inseto e absorção de nutrientes, acompanhado da síntese de metabólitos imunossupressores; E) extrusão do fungo e formação de conidióforos para produção de conídios aéreos como fonte de inóculo para reiniciar, no ambiente, o ciclo da doença em hospedeiros suscetíveis.

rior morte do organismo-alvo ocorrem quando uma quantidade mínima de células infectivas é depositada sobre a superfície corporal de um organismo suscetível. Uma vez sobre essa superfície, os propágulos germinam e atravessam a cutícula por meio de pressão mecânica e digestão da cutícula por enzimas hidrolíticas produzidas pelo fungo. Então, o fungo multiplica-se no interior do hospedeiro, libera toxinas e absorve os nutrientes, levando o hospedeiro à morte após alguns dias. Ao final do processo de infecção, o patógeno produz células infectivas sobre o cadáver, as quais poderão entrar em contato com novos hospedeiros e, caso as condições sejam favoráveis, dar início a um novo ciclo de infecção. A figura 1 resume e ilustra didaticamente o ciclo do fungo entomopatogênico em um inseto hospedeiro.

Os propágulos infectivos de fungos que parasitam os ovos de nematoides apresentam um processo de infecção similar ao dos fungos entomopatogênicos. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de que esses fungos saprófitas consigam sobreviver por longos períodos após incorporados ao solo, e que as hifas produzidas nesse habitat sejam, em muitos casos, os principais propágulos responsáveis pela infecção de nematoides suscetíveis. Na realidade, há uma acentuada carência de pesquisas que busquem elucidar vários aspectos ainda obscuros do processo de infecção por fungos nematófagos.

3. Principais estratégias de controle biológico com fungos

O conceito de praga adotado nessa publicação é o mesmo da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), ou seja, qualquer espécie, raça ou biótipo de planta, animal ou agente patogênico nocivo a plantas ou produtos vegetais. Com relação às estratégias de controle biológico (CB), o CB clássico e o CB conservativo não serão abordados aqui. As duas outras abordagens para o controle biológico de pragas com microrganismos envolvem a utilização de produtos, incluindo os micopesticidas. Eilenberg *et al.* (2001), em robusto artigo que trata da harmonização de terminologias adotadas na área de controle biológico, conceituaram o CB inoculativo como “a liberação intencional de um organismo vivo como agente de controle biológico com a expectativa que ele se multiplicará e controlará a praga por um período prolongado, porém, não permanentemente”. Como a quantidade de propágulos liberados costuma ser reduzido, o sucesso dessa estratégia depende da capacidade desses propágulos de se multiplicarem no ambiente. No caso de liberação de fungos visando ao controle biológico, o que se espera é a posterior formação de esporos infectivos, os quais poderão entrar em contato com os organismos-alvo e infectá-los. Por outro lado, o CB inundativo é quando “o controle biológico da praga pode ser atribuído exclusivamente ao organismo vivo liberado”. Nessa modalidade, os propágulos liberados, uma vez em contato com o organismo-alvo, impactam diretamente a população da praga. Na prática, as liberações inundativas envolvem grandes quantidades de propágulos infectivos, saturando o ambiente onde a praga-alvo vive, buscando-se assim uma rápida supressão de sua população, semelhantemente ao que se busca com o controle químico. Ao contrário da modalidade anterior, o sucesso dessa estratégia independe da capacidade de multiplicação do agente no local onde foi liberado.

Entretanto, em muitos casos requer mais de uma liberação, dependendo do alvo e das condições ambientais. A quase totalidade das aplicações de micopesticidas visando à regulação de populações de invertebrados enquadra-se nessa última modalidade. Em levantamento realizado por Faria e Wraight (2007), mais de 90% dos produtos globais destinados ao controle de insetos e ácaros foram desenvolvidos sob a ótica do CB inundativo. Ainda, a abordagem do CB inoculativo pode ser factível em determinadas situações, mais comumente por meio de preparações com baixa concentração de propágulos infectivos ou preparações compostas preponderantemente por estruturas

à base de hifas (micélio ou microescleródios) e clamidósporos. Embora haja relatos de sua adoção em alguns países, essa estratégia não foi devidamente avaliada no Brasil.

Informações gerais sobre as estratégias de CB inundativo e inoculativo com fungos de invertebrados são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Principais estratégias de controle biológico através de micopesticidas à base de fungos de invertebrados.

Controle Biológico	Propágulos	Doses mínimas de estruturas infectivas	O que se busca	Desafios (durante e após a aplicação)	Principais preparações ou formulações*
Inundativo de pragas associadas à parte aérea das plantas	Conídios aéreos, conídios submersos, e blastosporos	Elevadas ($\geq 10^{12}$ propágulos infectivos/ha)	Contato direto das estruturas infectivas com a praga-alvo; condições favoráveis para adesão das estruturas infectivas e penetração no alvo	Garantir o contato e adesão de grande quantidade de propágulos infectivos à praga-alvo; prolongar a sobrevivência dos propágulos no ambiente, principalmente, por meio da redução do impacto da radiação UV, tanto durante a aplicação quanto nas horas subsequentes	TC [esporos puros (conídios aéreos)], TK (grãos colonizados ou meios líquidos ricos em blastosporos e/ou conídios submersos), WP (pó molhável), WG (grânulos dispersíveis em água), OD (dispersão oleosa)
Inundativo de pragas associadas ao solo	Conídios aéreos	Elevadas ($\geq 10^{12}$ propágulos infectivos/ha)	Contato direto das estruturas infectivas com a praga-alvo; condições favoráveis para adesão das estruturas infectivas e penetração no alvo	Garantir o contato e adesão de grande quantidade de propágulos infectivos à praga-alvo; evitar efeitos deletérios da UV durante a aplicação e também nas horas subsequentes caso a praga se encontre na superfície do solo	TC, TK (grãos colonizados e, potencialmente, meios líquidos ricos em blastosporos e/ou conídios submersos), WP, WG, GR
Inoculativo de pragas associadas ao solo	Principalmente hifas (micélio, microescleródios) e clamidósporos	Baixas (sem ou com poucas estruturas infectivas)	Nos ambientes onde liberados, espera-se que haja a posterior formação de focos primários da doença e infecções subsequentes	Garantir que o fungo consiga estabelecer-se num ambiente repleto de outros microrganismos e, posteriormente, que gere quantidade suficiente de estruturas infectivas, as quais deverão entrar em contato direto com a praga-alvo	TC, TK (grãos colonizados e, potencialmente, meios líquidos com baixa concentração de propágulos infectivos)

* As definições e outras informações a respeito das diferentes preparações e formulações encontram-se no tópico 6.

Como regra geral, as publicações técnicas e científicas recomendam doses de, pelo menos, 1×10^{12} propágulos (conídios aéreos, conídios submersos e/ou blastosporos) por hectare quando se adota a estratégia de CB inundativo. Porém, doses mais elevadas resultam em maior deposição de propágulos sobre o alvo, aumentando as chances de infecção da praga-alvo. Em alguns casos, doses de 1×10^{13} ou mesmo 1×10^{14} propágulos por hectare podem ser requeridas para níveis de controle elevados. Portanto, um produto com 1×10^{12} propágulos por kg ou L (equivalente a 1×10^9 propágulos por g ou mL) será provavelmente menos eficaz que outro 10 ou 100 vezes mais concentrado, ambos aplicados na mesma dose como, por exemplo, 1 kg/ha. Ainda, para micopesticidas utilizados no CB inundativo e com concentrações muito baixas de ingrediente ativo por kg ou L, são

necessárias quantidades muito grandes de produto por hectare para que sejam efetivos, dificultando a logística de transporte e armazenamento e, em muitos casos, inviabilizando economicamente o seu uso em pulverizações.

Em anos recentes, preparações líquidas compostas por meio de cultura e estruturas fúngicas passaram a ser registradas no Brasil. As concentrações dessas preparações variam entre os diferentes fabricantes, sendo muito reduzidas em alguns casos, como 1×10^7 propágulos por L. Doses dessa magnitude são extremamente baixas para estratégias de CB inundativo, mesmo quando se recomendam cerca de 2-3 litros por hectare. São doses mais de trinta mil vezes inferiores à dose mínima tradicionalmente recomendada para uso a campo. Além disso, nem todos os propágulos dessas preparações são infectivos, mas são exclusivamente, ou quase que exclusivamente, fragmentos de hifas e, portanto, de reduzida valia para a estratégia de controle biológico inundativo. Produtos dessa natureza podem ser úteis para a estratégia de CB inoculativo, desde que demonstrado que os propágulos sobrevivem e se multiplicam nos ambientes onde liberados, levando à posterior formação de propágulos infectivos.

4. Produção de fungos

A produção de fungos chama-se por muitas vezes de fermentação, muito embora não seja um processo que busque a transformação de açúcar em álcool na ausência de oxigênio. Alguns especialistas preferem o termo multiplicação, mas o nosso entendimento é que esses termos podem ser usados de forma intercambiável. O processo de produção de propágulos nas biofábricas é etapa essencial para o sucesso de qualquer micopesticida. A produção consistente e uniforme de lotes com elevado rendimento e qualidade deve ser uma meta constante das biofábricas.

São diversas as estruturas produzidas por fungos de invertebrados quando cultivados em substratos sólidos ou líquidos, conforme ilustrado a seguir (figura 2).

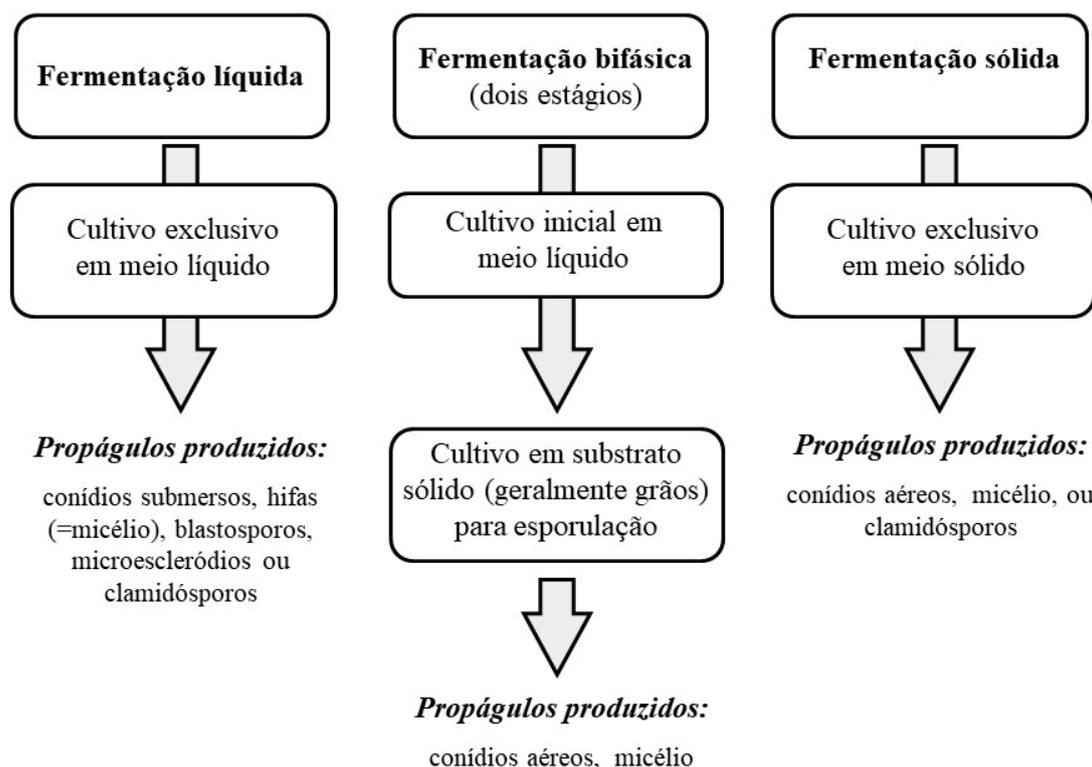


Figura 2. Tipos de fermentação com fungos de invertebrados.

A multiplicação de fungos com o emprego de substratos sólidos é uma prática antiga. Por exemplo, a produção massal de *M. anisopliae* em arroz cozido para o controle de cigarrinhas da cana-de-açúcar foi desenvolvido no Caribe no início do século passado. Por outro lado, a multiplicação de fungos patogênicos a insetos por fermentação líquida é bastante recente no Brasil. No exterior, é utilizada principalmente para a produção de blastosporos com vistas ao controle de pragas em casa de vegetação.

Os micopesticidas obtidos a partir de substratos sólidos têm como principal estrutura fúngica um tipo de esporo conhecido como conídio aéreo, embora algumas preparações ou produtos possam conter pequena participação de outras estruturas, principalmente hifas. Uma espécie de fungo utilizada no Brasil, *Pochonia chlamydosporia*, é conhecida pela significativa produção em substrato sólido de estrutura conhecida como clamidósporo. Por outro lado, as principais estruturas fúngicas produzidas em meios líquidos são as hifas e estruturas vegetativas unicelulares com parede celular relativamente delgada, como os blastosporos e os conídios submersos (figura 3). A proporção de cada categoria de propágulo é bastante influenciada pela composição do meio líquido e das condições de cultivo. Na prática, considerando-se que as aplicações de micopesticidas para o controle de invertebrados baseiam-se quase que exclusivamente na estratégia inundativa, o que se tem buscado na fermentação líquida são preparações com elevada proporção de blastosporos e baixa concentração de hifas. Os blastosporos e conídios submersos são células infectivas, mas a produção dos primeiros costuma ocorrer em maiores concentrações que a dos últimos. Por sua vez, a

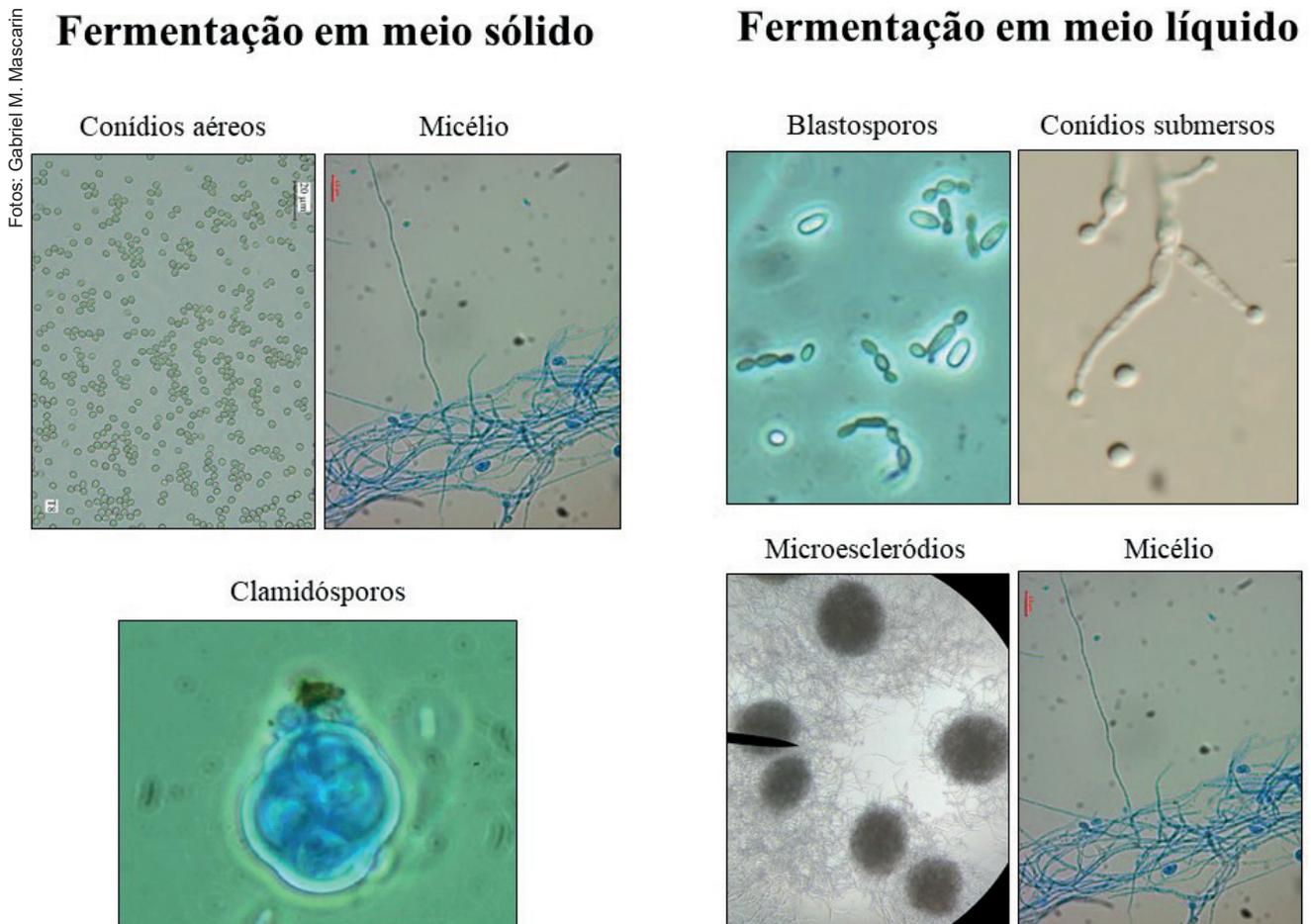


Figura 3. Propágulos produzidos por fungos de invertebrados em substratos sólidos ou líquidos.

hifa não é infectiva aos insetos e ácaros, embora possa infectar diretamente os nematoides e, sob condições favoráveis no solo, pode diferenciar-se em esporos infectivos.

Esse trabalho não tem a pretensão de abordar detalhadamente as diferentes metodologias de produção de conídios aéreos ou outros propágulos fúngicos utilizados como ingredientes ativos de micopesticidas, as quais já são de conhecimento das biofábricas brasileiras.

5. Identificação taxonômica dos principais fungos de invertebrados

A identificação do agente biológico que constitui um biopesticida é etapa crucial do controle de qualidade. Felizmente, não precisa ser realizada para todos os lotes produzidos, mas deve ser realizada de tempos em tempos para fins de confirmação da espécie. Uma verdadeira revolução ocorreu ao longo das últimas décadas no que concerne à identificação de espécies de fungos e outros microrganismos. Há muitos anos, a identificação era centrada apenas em caracteres morfológicos, incluindo parâmetros como forma, tamanho e disposição dos esporos e conidióforos, além de características macroscópicas e de crescimento da cultura. Na atualidade, a identificação morfológica continua relevante, permitindo, geralmente, se chegar ao gênero do fungo avaliado. Por outro lado, chegar à identificação de espécie com base em critérios puramente morfológicos só é possível em pouquíssimos casos.

A identificação de espécies vem sendo feita através de técnicas avançadas, como espectrometria de massa ou, mais comumente, o sequenciamento de determinadas regiões do genoma. Resumidamente, após a extração de DNA de um isolado fúngico, é feita a amplificação e o sequenciamento da região de interesse. As sequências obtidas são comparadas às sequências de referência mantidas em banco de dados. Múltiplas regiões podem ser necessárias para a correta identificação de uma espécie. Essa classificação vem sofrendo ajustes ao longo dos anos, já que a região do genoma utilizada para a identificação de uma determinada espécie pode ser alterada ou mais comumente, novas regiões são acrescentadas para a realização da chamada análise multigênica.

A seguir faremos breves comentários acerca da identificação taxonômica de alguns fungos utilizados para o controle biológico de invertebrados no Brasil.

5.1 Fungos entomopatogênicos

5.1.1 Complexo *Beauveria bassiana*

O fungo *Beauveria bassiana*, representante da família Cordycipitaceae, é um complexo de espécies, por isso, também conhecido como *B. bassiana* sensu lato (s.l.). De acordo com um levantamento realizado pela Embrapa, as espécies *B. bassiana* sensu stricto (s.s.), *B. amorpha*, *B. caledonica* e *B. pseudobassiana* já foram relatadas no Brasil. A identificação de isolados desse complexo vem sendo realizada através do sequenciamento de uma região do genoma conhecida como BLOC (*B locus intergenic region*). A representação de uma árvore filogenética elaborada com alguns representantes desse complexo encontra-se na figura 4.

Pode-se observar que dois isolados comerciais incluídos na análise (ESALQ PL63 e IBCB 66) foram identificados como *B. bassiana* s.s. Outro isolado disponível comercialmente (CG 716), não incluído na figura 4, foi também identificado pela Embrapa como *B. bassiana* s.s. através de outra metodologia, conhecida como espectrometria de massa.

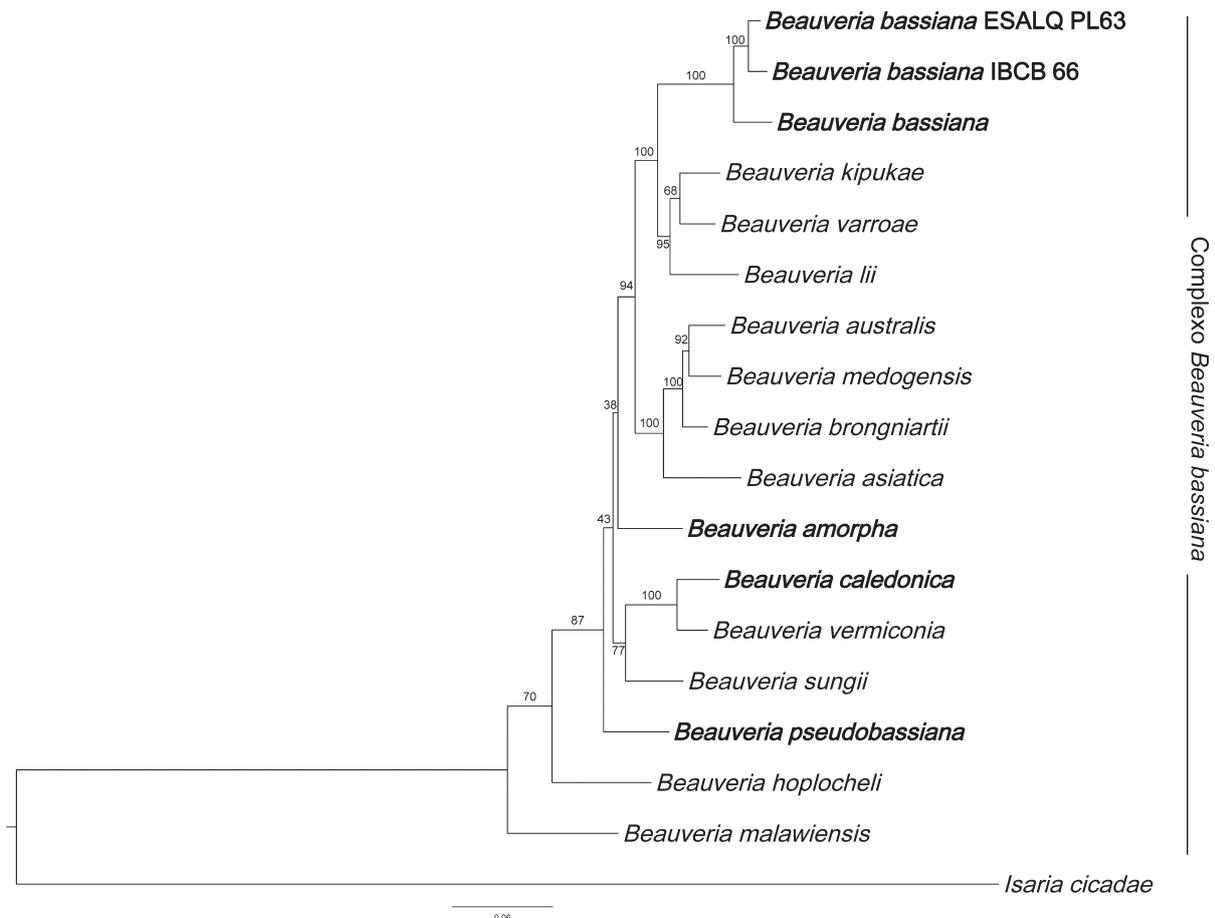


Figura 4. Árvore filogenética simplificada para o complexo *Beauveria bassiana*, elaborada a partir do sequenciamento da região genômica BLOC. Espécies em negrito possuem ocorrência já confirmada no Brasil.

5.1.2 Complexo *Metarhizium anisopliae*

O famoso fungo cosmopolita *Metarhizium anisopliae*, membro da família Clavicipitaceae é, também, um complexo de espécies, ao qual nos referimos como *M. anisopliae* s.l. Quase 20 espécies já foram reconhecidas neste complexo. A precisa identificação de representantes dessa espécie é normalmente conduzida através do sequenciamento de uma região do genoma conhecida como TEF (*translation elongation factor*). Na figura 5, tem-se a representação de uma árvore filogenética com algumas espécies do gênero *Metarhizium* que ocorrem no Brasil. Dentre as espécies listadas, duas pertencentes ao complexo *M. anisopliae* foram identificadas e descritas no Brasil como novas espécies: *M. alvesii* e *M. humberi*.

5.1.3 *Cordyceps javanica*

O fungo anteriormente conhecido como *Paecilomyces fumosoroseus* é ingrediente ativo de alguns produtos comerciais em todo o mundo. A classificação taxonômica desse gênero passou por inúmeras mudanças ao longo dos últimos anos. Inicialmente, a partir de estudos utilizando as regiões marcadoras ITS e/ou β -tubulina, as espécies patogênicas aos artrópodes foram agrupadas no gênero *Isaria*. Mais tarde, a partir de análise multigênica, a maior parte foi transferida para o gênero *Cordyceps*. Análise multigênica, realizada pela Embrapa, sugere que o isolado comercial ESALQ 1296, atribuído a *C. fumosorosea*, seja, de fato, *C. javanica*, conforme ilustrado na figura 6.

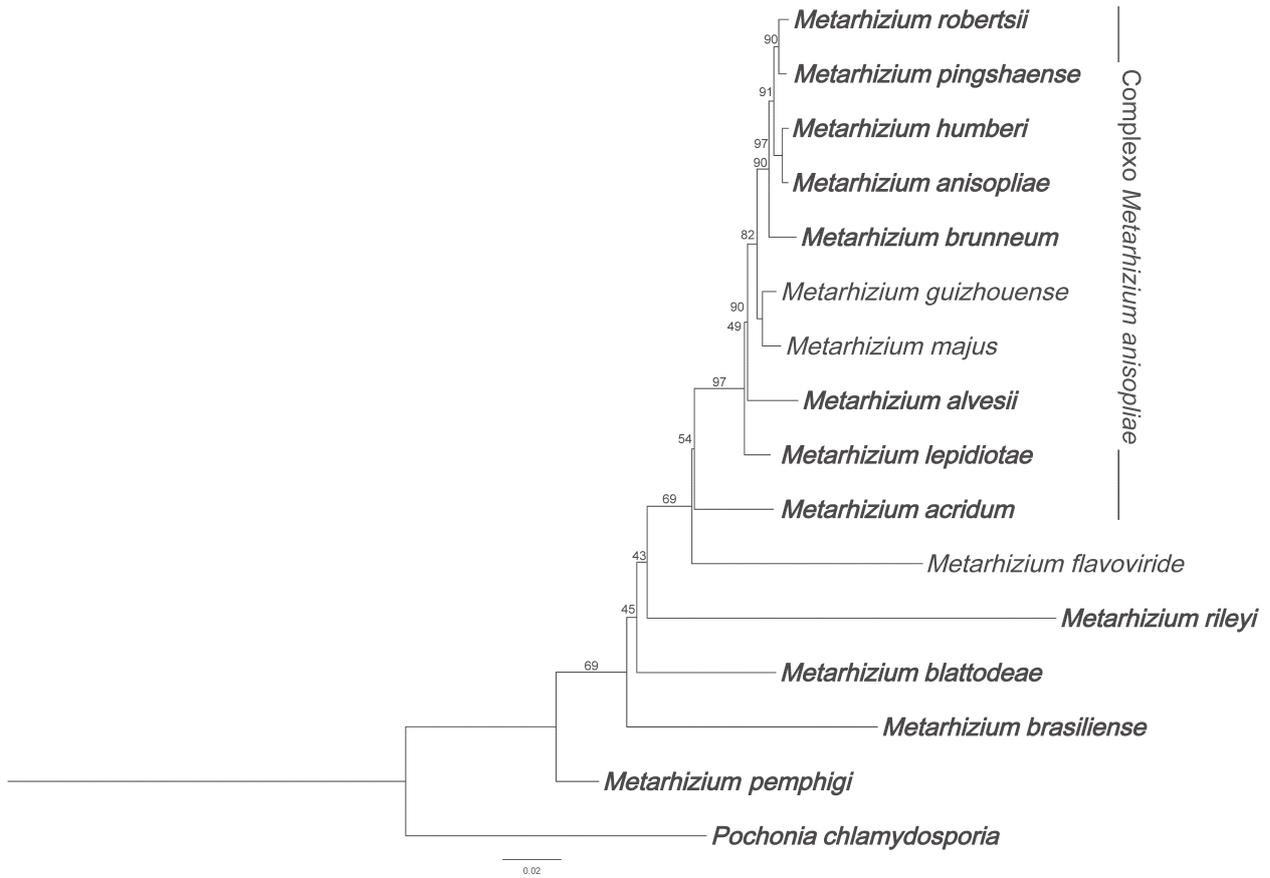


Figura 5. Árvore filogenética simplificada para o gênero *Metarhizium*, elaborada a partir do sequenciamento da região genômica TEF. Espécies em negrito possuem ocorrência já confirmada no Brasil.

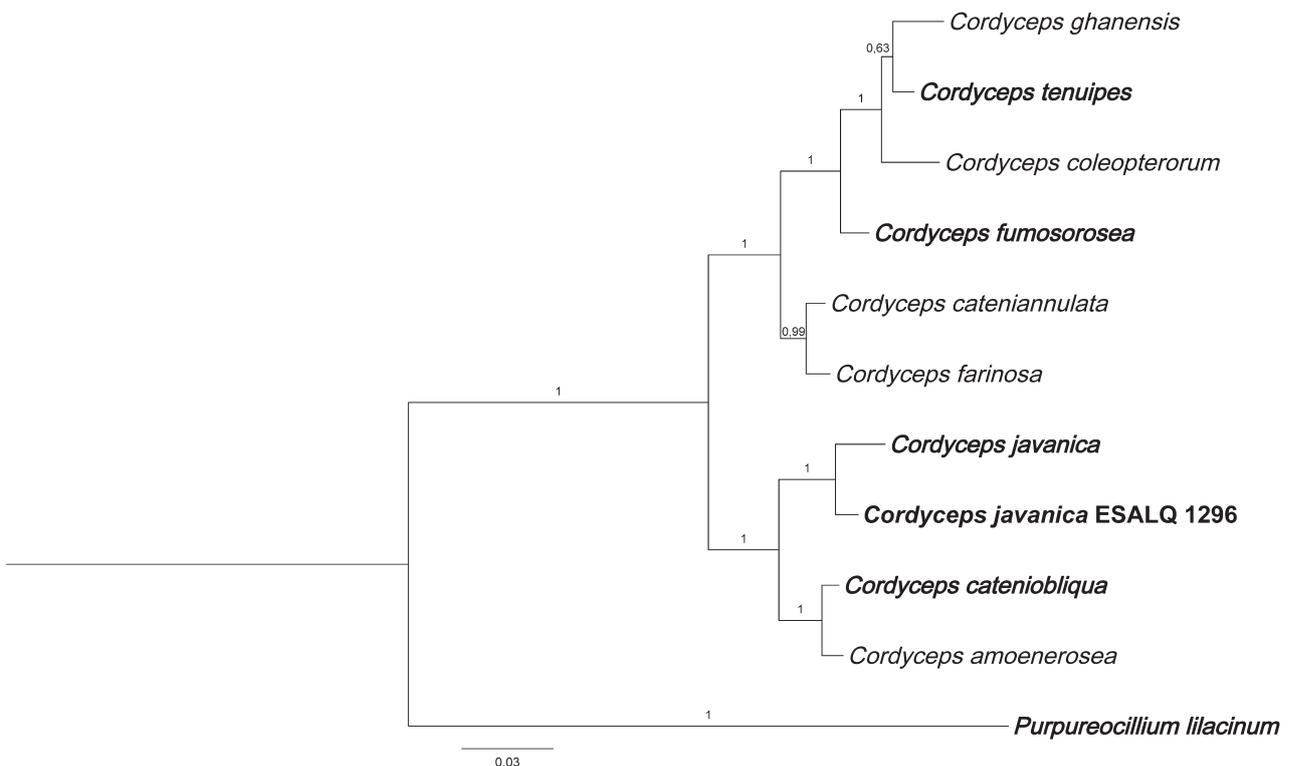


Figura 6. Árvore filogenética simplificada com isolados do gênero *Cordyceps*, elaborada a partir do sequenciamento das regiões genômicas ITS, LSU, TEF, RPB1 e RPB2. Espécies em negrito possuem ocorrência já confirmada no Brasil.

5.1.4 *Simplicillium lanosoniveum*

O fungo até recentemente conhecido como *Sporothrix insectorum* é um caso emblemático de quão relevante se tornou a taxonomia molecular. Esse fungo foi identificado morfológicamente na década de 80 e, desde essa época, é produzido exclusivamente no Brasil para o controle do percevejo-de-renda da seringueira, conhecido cientificamente como *Leptopharsa heveae*. Entretanto, análise multigênica realizada pela Embrapa confirmou a suspeita de que isolados pulverizados nos seringaais são, de fato, representantes da espécie *Simplicillium lanosoniveum* (figura 7).

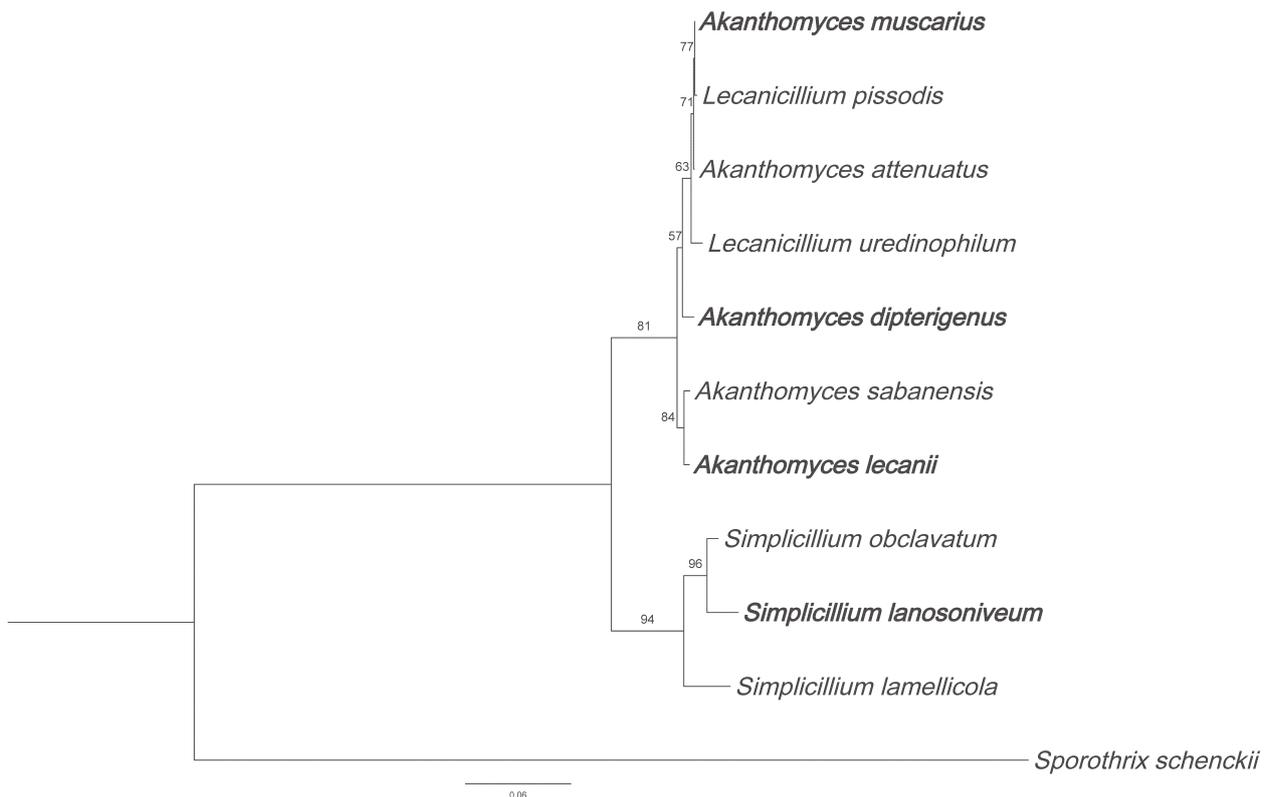


Figura 7. Árvore filogenética simplificada com isolados dos gêneros *Akanthomyces* e *Simplicillium*, elaborada a partir do sequenciamento das regiões genômicas ITS, LSU, SSU e TEF. Espécies em negrito possuem ocorrência já confirmada no Brasil.

5.1.5 Outros fungos entomopatogênicos

Um dos fungos mais conhecidos pelo agricultor e intimamente associado a lagartas de lepidópteros na família Noctuidae, mas ainda pouco explorado, é o *Metarhizium rileyi* (= *Nomuraea rileyi*). Em várias regiões do globo são comuns os relatos de surtos epizooticos sobre populações de lepidópteros causados por *M. rileyi*. Para essa espécie, de maneira geral, a identificação visual costuma ser bastante precisa pela análise combinada de suas características morfológicas e ecológicas. Trata-se de um patógeno específico de lepidópteros na fase larval, apresenta coloração verde-claro-azulada e conidióforos e conídios com formato característico. Em meio sólido, usualmente apresenta uma fase leveduriforme na fase inicial de crescimento. A confirmação específica pode ser feita pela análise da mesma região do genoma utilizada para identificação de espécies no complexo *M. anisopliae*.

Espécies do gênero *Akanthomyces*, anteriormente conhecido como *Lecanicillium*, são importantes agentes de controle de insetos. Embora pouco conhecidos no Brasil, pelo menos duas espécies já foram desenvolvidas em outros países para o manejo de insetos sugadores de plantas, principal-

mente pulgões e moscas-brancas: *Akanthomyces muscarius* (= *L. muscarium*) e *A. dipterigenus* (= *L. longisporum*). A confirmação específica pode ser feita pela análise das regiões do genoma ITS, LSU, SSU e TEF.

5.2 Fungos Nematófagos

5.2.1 *Purpureocillium lilacinum*

Fungos nematófagos são importantes agentes de controle natural de fitonematoides no solo. *Purpureocillium lilacinum*, antes conhecido como *Paecilomyces lilacinus*, é parasita de ovos de nematoides. Análises genômicas utilizando as regiões marcadoras ITS e TEF mostraram que *P. lilacinum* não tem nenhuma relação com a espécie termofílica e frequentemente patogênica a vertebrados, *Paecilomyces variotii*. Contudo, isolados de *P. lilacinum* utilizados no controle de nematoides são geneticamente próximos àqueles causadores de infecções em pessoas imunodeprimidas (Luangsa-ard *et al.* 2011), o que demanda atenção redobrada quanto à avaliação toxicológica dos isolados que venham a ser considerados como componentes de micopesticidas.

5.2.2 *Pochonia chlamydosporia*

Da mesma forma que *P. lilacinum*, o fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* age predominantemente parasitando os ovos de fitonematoides, embora alguns isolados possam induzir respostas de defesa às pragas em plantas via estabelecimento de relação mutualística com as raízes. Duas variedades principais são conhecidas (*catenulata* e *chlamydosporia*). Enquanto os conídios aéreos têm sido os principais propágulos empregados em produtos à base de *P. lilacinum*, os produtos à base de *P. chlamydosporia* são, geralmente, à base de clamidósporos, apesar de isolados dessa espécie também produzirem conídios de forma abundante. A análise multigênica das regiões SSU, LSU, TEF, RPB1, RPB2 é recomendada para identificação de espécies nesse gênero.

5.2.3 Outros fungos nematófagos

Inúmeros fungos causam danos às populações de fitonematoides. Por exemplo, embora não sejam utilizados comercialmente, fungos como *Arthrobotrys oligospora* são predadores, capazes de capturar e enforçar as presas que passam por anéis pegajosos formados nas hifas. Fungos do gênero *Trichoderma*, apesar de serem conhecidos principalmente como antagonistas de fungos fitopatogênicos, têm representantes reconhecidos pela ação sobre nematoides de plantas. Há evidências de que, além da ação direta (parasitismo), alguns isolados são capazes de desencadear outros mecanismos, como a indução de respostas de defesa pelas plantas (Poveda *et al.* 2000, Martínez-Medina *et al.* 2017). Estudo recente realizado no Brasil, utilizando as regiões marcadoras ITS, TEF, Cal, ACT e RPB2, sugere que os isolados de *Trichoderma* atualmente comercializados necessitam de revisão taxonômica (Inglis *et al.* 2020), o que também se faz necessário para outros fungos de invertebrados. Há ainda o fungo *Clonostachys rosea*, dentre outros.

Embora a presente publicação não tenha a pretensão de propor protocolos para o controle de qualidade de fungos utilizados como antagonistas, acreditamos que os produtos destinados exclusivamente ou majoritariamente ao controle de nematoides deveriam ser aqui abordados. Isso porque o controle desses vermes pela abordagem inundativa, como tem sido normalmente preconizada pelas biofábricas, fundamenta-se na ação direta do fungo (parasitismo, com intenso contato físico) que, então, depende de elevada quantidade e qualidade de propágulos para ocasionar os resultados esperados.

5.3 Identificação de isolados

Para cada espécie de fungo, há variantes genéticas chamadas de isolados. Muitas vezes utilizam-se também os termos linhagem, cepa, estirpe ou *strain*. A rigor, este último refere-se a um isolado que teve sua identidade confirmada através de um método reconhecidamente preciso. Embora nas publicações científicas essa diferenciação seja comum, nas publicações técnicas esses cinco termos podem ser utilizados de forma intercambiável.

Um micopesticida, quando utilizado pelo produtor rural, somente deverá funcionar adequadamente se for constituído por um isolado sabidamente virulento a determinada(s) praga(s). Além da virulência, o isolado deve possuir outros atributos desejáveis. Para cada espécie de fungo, os isolados são morfológicamente idênticos, não sendo possível a distinção a partir de atributos microscópicos. A diferenciação envolve técnicas de biologia molecular e são normalmente realizadas por empresas especializadas ou órgãos públicos, com equipes capacitadas nessa área. Até a presente data, não há metodologia consolidada para a diferenciação entre isolados da mesma espécie, nem mesmo quando são adotadas técnicas moleculares. Estudos nessa área do conhecimento são urgentes. O sequenciamento de genomas completos, cujo custo tem diminuído drasticamente em anos recentes, poderá ser uma alternativa para a identificação de isolados.

6. Classificação das preparações e formulações empregadas para o controle de invertebrados

No caso dos micopesticidas, formular é o mesmo que misturar os propágulos vivos com substância(s) denominada(s) formulante(s), com o intuito de tornar o produto efetivo para o propósito almejado. De acordo com Jones e Burges (1998), essa mistura teria um ou mais dos seguintes objetivos:

- a) estabilização do organismo durante as etapas de produção, distribuição e armazenamento;
- b) auxílio no manuseio e aplicação do produto, para garantir que este alcance o alvo de forma adequada;
- c) proteção do agente biológico contra fatores ambientais deletérios no local de aplicação, aumentando sua persistência;
- d) aumento na eficiência do organismo no local de aplicação através do aumento da atividade, multiplicação, contato e interação com a praga-alvo.

Bernhard e colegas (1998) classificaram os principais formulantes em veículos líquidos (óleos minerais e vegetais, querosene desodorizado etc.), veículos minerais (argilas, vermiculita, terra diatomácea etc.), dessecantes (sílica-gel não indicadora, sílica em pó etc.), umectantes (PEG, carboximetilcelulose, maltodextrina etc.), *binders* ou aglutinantes (amido, óleos vegetais etc.), espalhantes adesivos, surfactantes, espessantes e protetores solares. Muitos formulantes apresentam múltiplos usos, a exemplo da carboximetilcelulose, que pode aumentar a viscosidade da formulação para evitar o *caking* (sedimento compacto que não ressuspende mesmo após agitação da embalagem) ou ser usada como espalhante adesivo, no último caso com o propósito de melhorar a aderência do organismo a sementes ou folhagens. A goma arábica pode ser utilizada como espalhante adesivo, *binder* ou mesmo como estabilizador quando os propágulos são submetidos a métodos específicos de secagem. A glucose pode ser utilizada em iscas como fagoestimulante, *binder* ou mesmo como

estabilizador em outras formulações. No Brasil, a Instrução Normativa n.º 46, de outubro de 2011, relaciona algumas das substâncias citadas anteriormente (glucose, goma arábica, carboximetilcelulose, argilas como caulim, diversos óleos e gorduras, sorbitol, lecitina, sílicas) e muitas outras, como os grãos de cereais e terra diatomácea, como passíveis de utilização na confecção de preparações ou formulações fitossanitárias destinadas à agricultura orgânica.

Os micopesticidas comerciais podem ser disponibilizados na forma de produtos não formulados (= preparações), nos quais nenhuma substância é adicionada com o propósito de melhorar as propriedades do produto. Ou seja, o micopesticida a ser aplicado no campo é o resultado do processo de fermentação sólida ou líquida e, em muitos casos, é apenas diluído em água — com ou sem espalhante adesivo — por ocasião da aplicação nas lavouras. Por outro lado, muitos micopesticidas são formulados através de mistura dos propágulos vivos com um ou mais formulantes. Formulações de agrotóxicos de natureza química são bastante elaboradas, uma vez que o princípio ativo é constituído por uma ou poucas moléculas, muitas vezes compatíveis com uma gama de formulantes, sendo possível chegar a modos de ação nada convencionais, como ação translaminar ou através de gases tóxicos. Mais de 100 formulações distintas para os pesticidas químicos já haviam sido desenvolvidas há cerca de 20 anos (CropLife International 2002). Em contrapartida, os micopesticidas têm como ingrediente ativo um organismo vivo, normalmente uma complexa célula que age por contato, e cuja qualidade deve ser mantida a todo custo.

Para um mesmo tipo de formulação, fica claro que não se deve esperar que os micopesticidas tenham as características físicas definidas para os agrotóxicos químicos. Não se deve esperar que em uma suspensão com conídios, por exemplo, a sedimentação de parte dos propágulos seja incomum, muito embora a utilização de formulantes adequados possa ser necessária para evitar o *caking* acentuado. Uma classificação possível e bastante difundida foi proposta por Faria e Wraight (2007), elaborada a partir de definições utilizadas pela FAO e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para a classificação de biopesticidas à base de bactérias entomopatogênicas. Nessa classificação manteve-se o sistema de código de duas letras da CropLife International para pesticidas técnicos e formulados. É muito importante que essas definições sejam bem entendidas, pois os protocolos de avaliação de qualidade são bastante influenciados pela natureza da formulação.

6.1 Micopesticidas não formulados

Os micopesticidas não formulados, tratados neste documento como “preparações”, podem ser utilizados na elaboração de micopesticidas formulados ou, alternativamente, usados diretamente pelo usuário final. Em alguns países são registrados como “produtos artesanais”. Essas preparações podem ser de dois tipos.

6.1.1 Material técnico (TC)

Um ingrediente ativo isolado a partir de matérias-primas utilizadas para produzi-lo (FAO/WHO, 2002). Para a produção de fungos empregam-se substratos de cultura líquidos ou sólidos. O ingrediente ativo pode ser extraído do substrato sólido por peneiramento, por exemplo, enquanto a extração por filtração ou centrifugação pode ser adotada nos substratos líquidos. Geralmente os materiais técnicos são a base para os produtos formulados, embora em algumas circunstâncias eles também possam ser utilizados como preparações finais; havendo neste caso elevada concentração de propágulos do fungo no micopesticida. Conforme a definição da CropLife, materiais técnicos podem incluir “impurezas associadas e pequenas quantidades de aditivos necessários”, de tal forma que os produtos não devam possuir resíduos de impureza maior que 10% do seu peso (T. S.

Woods, coordenador do Specifications Expert Group, CropLife International, comunicação pessoal). Portanto, conídios ou outro tipo de propágulo isolado do substrato, com impurezas associadas, são incluídos nesta categoria.

6.1.2 Concentrado técnico (TK)

Material consistindo de ingrediente ativo junto a subprodutos oriundos do processo da produção e livre da adição de agentes modificantes. Essa definição ajusta-se a biopesticidas que incluem componentes do meio de cultura, como grãos de cereais colonizados ou meio de cultura líquido contendo estruturas fúngicas. Nesses casos, nenhum processo é utilizado para separar o ingrediente ativo do substrato no estágio final da produção do fungo; os substratos sólidos ou líquidos colonizados pelo fungo podem conter proporções variáveis de esporos e células vegetativas, dependendo de fatores como idade da cultura e lote.

Em alguns países europeus os concentrados técnicos são utilizados como produtos finais para uso a campo. Nos concentrados técnicos baseados em substratos sólidos os propágulos consistem em conídios e hifas, enquanto nas preparações produzidas em meio líquido, misturas de blastosporos, conídios submersos e/ou hifas podem estar presentes. No Brasil os produtos comerciais TK têm recebido outras denominações, desde grânulos (GR) para os produtos sólidos, até soluções concentradas (SC) ou concentrados solúveis (SL) para os produtos líquidos, as quais estão em completa desarmonia com a classificação adotada no presente documento. Tal fato não impede que inúmeras preparações TC e TK funcionem muito bem sob determinadas condições, o que justifica o grande número de produtos comercializados dessa forma desde a década de 70.

6.2 Principais formulações para micopesticidas empregados no controle de invertebrados

6.2.1 Pó molhável (WP)

Formulação em pó para aplicação após suspensão em água; pronto para uso, ou seja, dispensa aditivos no preparo e aplicação da calda. Assim, um material técnico hidrofóbico que não inclui aditivos que possibilitem sua mistura com água (tais como surfactantes ou argilas) não se enquadram nesta definição. Da mesma forma, mesmo um material técnico hidrofílico que não tenha sido misturado a um formulante com propósito definido, não deve ser enquadrado nesta definição.

6.2.2 Granular (GR)

Formulação sólida, sob a forma de grânulos, com partículas de tamanho definido e pronta para uso. Embora concentrados técnicos constituídos por substratos sólidos possam assemelhar-se e funcionar como formulações granulares, o termo grânulo geralmente refere-se a formulações mais elaboradas com partículas de tamanho uniforme e com o ingrediente ativo fortemente aderido ou incorporado ao grânulo. Grãos de cereais colonizados por fungos não estão incluídos nesta definição, mas deveriam ser classificados como TK, conforme já abordado.

6.2.3 Grânulos dispersíveis em água (WG)

Formulação consistida de grânulos a serem aplicados após sua desintegração e dispersão em água.

6.2.4 Isca (RB)

Formulação desenvolvida para atrair e ser consumida pela(s) praga(s)-alvo. Esta definição tem sido geralmente aplicável aos micoinseticidas; contudo, como muitos fungos entomopatogênicos infectam seus hospedeiros penetrando diretamente a cutícula, a ingestão pode ser desnecessária e iscas podem ser constituídas por componentes atrativos de diversas naturezas, incluindo feromônios ou cores atrativas.

6.2.5 Pó polvilhável (DP)

Pó (seco), devidamente formulado, para polvilhamento.

6.2.6 Dispersão oleosa (OD)

Suspensão estável constituída de ingrediente(s) ativo(s) em fluído originalmente não miscível em água e com emulsificante(s); para uso após diluição em água. A palavra “estável”, nesta e em formulações anteriormente mencionadas, indica que o produto pode apresentar sedimentação do ingrediente ativo durante o armazenamento, porém facilmente ressuspendida por agitação manual ou mecânica. Dispersões oleosas de fungos entomopatogênicos têm sido referidas mais comumente na literatura como suspensões emulsionáveis, suspoemulsões ou suspensões em óleo emulsionável e identificadas pela abreviação ES (Moore e Caudwell, 1997; Jones e Burges, 1998). Todavia, a abreviação ES pelo sistema de códigos da CropLife International refere-se a emulsões para tratamento de sementes. Nesta categoria também se enquadraria a formulação chamada concentrado emulsionável (EC). Conforme a definição da FAO/WHO (2002), o concentrado emulsionável deve ser uma formulação líquida concentrada e homogênea, para ser aplicada como emulsão após diluição em água. O termo “homogênea” aplica-se a soluções, portanto, o emprego da denominação EC para suspensões à base de microrganismos não é indicado.

Algumas formulações encontram-se representadas na figura 8.

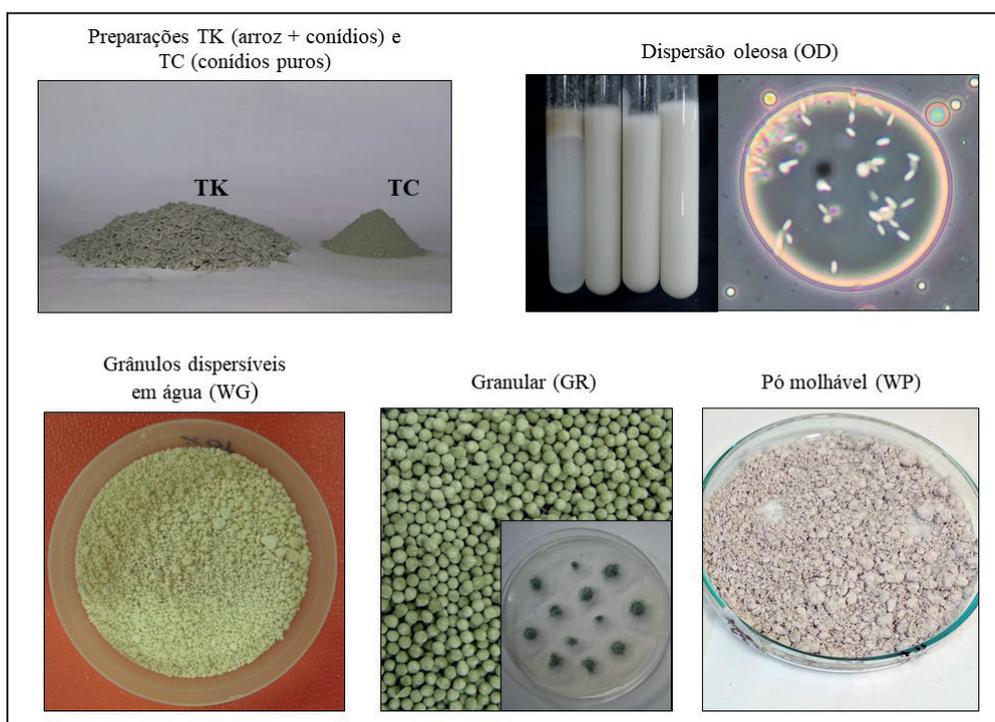


Figura 8. Tipos de formulações preparadas com fungos agentes de controle biológico de pragas.

6.2.7 Suspensão concentrada (SC)

Suspensão estável de ingrediente(s) ativo(s) em água para aplicação após diluição em água. Meios de cultura líquidos colonizados por estruturas fúngicas não são enquadrados nesta definição, mas deveriam ser classificados como TC, conforme já abordado.

6.2.8 Suspensão concentrada miscível em óleo (suspensão miscível em óleo) (OF)

Suspensão estável de ingrediente(s) ativo(s) em um fluido para aplicação após diluição em um líquido orgânico.

6.2.9 Suspensão para aplicação a ultrabaixo volume (SU)

Suspensão pronta para uso através de equipamento UBV, sem necessidade de diluição.

A classificação anteriormente discutida não abarca todas as formulações de micopesticidas possíveis e, de fato, antevemos o lançamento no mercado brasileiro de formulações que não foram aqui abordadas.

7. Principais parâmetros utilizados no controle de qualidade de micopesticidas

Controle de qualidade refere-se aos procedimentos conduzidos pelo fabricante com a finalidade de garantir que determinado produto esteja em consonância com critérios previamente estabelecidos, também chamados padrões. O controle de qualidade tem o propósito de assegurar que o usuário final adquira um produto comercial que está em conformidade às especificações informadas pelo fabricante aos órgãos reguladores. Se o fabricante registra um produto com bons padrões, a exemplo dos produtos abordados nas tabelas 2 e 3, provavelmente chegará a um produto que apresente controle satisfatório da(s) praga(s)-alvo. Por outro lado, o estabelecimento de padrões sem lastro científico resulta na fabricação de produtos ruins que, invariavelmente, levam a resultados insatisfatórios.

De acordo com Ravensberg (2011), o controle de qualidade dos biopesticidas tem como objetivo assegurar que:

- 1) as propriedades das matérias-primas utilizadas nas biofábricas estejam de acordo com as especificações dos fornecedores;
- 2) haja consistência entre diferentes lotes e preparações/produtos;
- 3) o produto final atenda aos critérios estabelecidos junto aos órgãos reguladores; e
- 4) o desempenho do produto atenda à expectativa do usuário final, levando-o a realizar novas aquisições do produto.

As tabelas a seguir descrevem as especificações de dois produtos comerciais disponibilizados em outros países.

Tabela 2. Especificações do micoinseticida Mycotal®, à base do fungo *Akanthomyces muscarius* (antes *Lecanicillium muscarium*), para o controle de moscas-brancas.

Número de propágulos	Germinação	Virulência	Pureza ^a	Parâmetros físico-químicos
<p>Padrão: $1,0 \times 10^{10}$ blastosporos por grama</p> <p>Tolerância: $\pm 15\%$</p> <p>Metodologia: duas amostras de 50 g são obtidas a partir de embalagem comercial. De cada amostra, são preparadas 4 subamostras. Após diluição, o número de propágulos é estimado em câmara de contagem com auxílio de microscópio. A média é, então, comparada com o padrão.</p>	<p>Padrão: $\geq 85\%$</p> <p>Metodologia: uma amostra de 50 g é obtida a partir de embalagem comercial. São preparadas 3 subamostras. Após diluição e plaqueamento em meio SDA, as placas são incubadas por 16 horas a 21 °C. Em seguida, faz-se a leitura em microscópio dos propágulos germinados e não germinados. A percentagem média deve ser igual ou superior ao padrão estabelecido.</p>	<p>Padrão: mortalidade de ninfas de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> nos bioensaios $\geq 70\%$</p> <p>Metodologia: uma amostra de 5 g é obtida a partir de embalagem comercial. São realizados bioensaios com ninfas de 2º e 3º instares da mosca-branca <i>T. vaporariorum</i>, mantidas em folhas fixadas em ágar-água. As ninfas são pulverizadas em torre de Potter com a dose comercial do produto, e mantidas a 21 °C e UR de 75%. Com o auxílio de lupa, avalia-se após oito dias a mortalidade em 5 discos foliares, contando-se cerca de 100 ninfas por disco.</p>	<p>Padrão: < 50.000 unidades formadoras de colônias (UFC) por g</p> <p>Metodologia: uma amostra de 50 g é obtida a partir de embalagem comercial. A partir de 4 subamostras são preparadas duas diluições, as quais são plaqueadas em dois meios específicos. Oito placas com o meio CLED para detecção de bactérias são incubadas a 30 °C e 37 °C por 2 dias. Oito placas com o meio MEA para detecção de fungos e leveduras são incubadas a 30 °C por 3 dias, quando o número de colônias é estimado.</p>	<p>Teor de água Padrão: entre 5% e 9%</p> <p>Metodologia: uma amostra de 1 g é desidratada a 100 °C em um analisador de umidade por infravermelho. Por diferença de peso (antes e após a secagem) chega-se ao teor de água do produto.</p> <p>Resíduo Padrão: $< 2\%$ resíduo em peneira de 75 μm</p> <p>Metodologia: uma amostra de 5 g é diluída em 5 L de água (dose comercial) e agitada por 30 min. A suspensão é vertida numa peneira de 75 μm, e o material retido é desidratado e pesado. O percentual do material retido é calculado e comparado ao padrão.</p>

Fonte: informações extraídas de Ravensberg (2011).

^aA avaliação de microrganismos perigosos à saúde humana é feita a partir de amostra de 250 g obtida de embalagem comercial, a qual é enviada para laboratório acreditado. Os limites aceitáveis são os seguintes: total de organismos aeróbicos a 37 °C (< 50.000 UFC/g), fungos e leveduras a 37 °C (< 10 /g), coliformes (< 50 /g), *Staphylococcus aureus* (< 50 /g), estreptococos fecais (< 50 /g), *Salmonella* (ausente em 25 g).

Na forma de pó molhável, as células do produto Mycotal® obtidas por fermentação líquida, são formuladas e destinadas ao controle de moscas-brancas em casas de vegetação. Todo lote é avaliado após a produção, assim como aos 3 e 6 meses (final da vida de prateleira a 5-10 °C). Pureza, teor de água e determinação do resíduo são avaliados apenas antes das vendas. O produto deve atender integralmente a todas as especificações para só então estar apto para comercialização.

Tabela 3. Especificações do micoinseticida Green Muscle®, à base do fungo *Metarhizium acridum*, para o controle de gafanhotos.

Número de propágulos	Germinação	Virulência	Pureza	Parâmetros físico-químicos
<p>Padrão: 4 a $5,0 \times 10^{10}$ esporos por grama</p> <p>Metodologia: cerca de 0,1 g de massa conidial é pesada e adicionada a 100 mL de Shellsol T ou Tween 80 a 0,05%. O número de propágulos é estimado em câmara de contagem com auxílio de microscópio.</p>	<p>Padrão: $\geq 85\%$</p> <p>Metodologia: suspensão conidial é adicionada a placas com meio SDA. Após incubação a 25 °C por 24 horas, um total de 300 conídios é microscopicamente examinado para a presença (ou ausência) de tubo germinativo com comprimento igual ou superior à largura de um conídio.</p>	<p>Padrão: tempo médio de sobrevivência de <i>Schistocerca gregaria</i> não deve ser $> 0,5$ dia em relação ao valor de referência.</p> <p>Metodologia: a virulência é quantificada através de bioensaios, conforme metodologia descrita em Prior <i>et al.</i> (1995).</p> <p>Essa avaliação não é feita para todos os lotes, mas apenas para o primeiro lote de massa conidial obtido a partir de uma nova placa com meio DAS.</p>	<p>Padrão: $< 0,002\%$ (equivalente a $1,0 \times 10^6$ UFC/g)</p> <p>Metodologia: são preparadas suspensões decimais seriadas entre aprox. 50 e 5×10^7 conídios/mL. Para cada diluição, 0,2 mL é distribuído em cada placa ($n = 2$) com meio. Após incubação a 25 °C por 4-6 dias, estima-se o número de colônias de <i>Metarhizium</i> e de contaminantes. A proporção de contaminantes deve ser inferior a 0,002% que, neste caso, equivale a $1,0 \times 10^6$ UFC/g.</p>	<p>Teor de água Padrão: $\leq 5\%$</p> <p>Metodologia: secagem com ar seco, o qual passa por camada de sílica-gel mantida em recipiente de madeira, onde encontra-se a massa conidial. O processo de secagem leva de 3 a 5 dias. A temperatura do ar não deve exceder a 40 °C. Tamanho de partículas Padrão: $> 99\%$ das partículas (em número) deve ter diâmetro $< 6 \mu\text{m}$</p> <p>Metodologia: para os lotes selecionados, é usado um analisador de tamanho de partículas.</p>

Fonte: Informações extraídas de Jenkins *et al.* (1998) e Jenkins e Grzywacz (2000).

No caso do produto Green Muscle®, o rendimento médio obtido em arroz cozido é da ordem de $1,5 \times 10^9$ conídios aéreos por grama, embora haja grande variação em função do baixo grau de controle sobre os parâmetros de produção, podendo chegar a $2,4 \times 10^9$ conídios aéreos por g em alguns lotes. Os conídios aéreos são extraídos do substrato, e o produto final é um pó constituído exclusivamente por conídios (TC), com concentração variando de 4 a 5×10^{10} por g, sendo a dose recomendada para o controle de gafanhotos de 5×10^{12} conídios por hectare, ou seja, cerca de 100 a 125 g de conídios puros por hectare.

Em muitos países, sobretudo nos menos desenvolvidos, o registro de produtos biológicos ainda não é uma exigência, e muitos fabricantes nem mesmo avaliam de forma satisfatória a qualidade dos bioinseticidas produzidos. Como consequência, a regra geral é a baixa qualidade dos produtos disponibilizados aos usuários finais. Nos países onde o registro de produtos biológicos é uma exigência, há uma tendência de micopesticidas com qualidade superior, desde que sejam adotadas especificações adequadas e metodologias robustas e realistas para monitorá-las. Está claro que a avaliação dos parâmetros relacionados à qualidade dos micopesticidas através de protocolos inadequados é perda de tempo, sendo o usuário final o principal prejudicado. No Brasil, o grau de adoção do controle de qualidade por biofábricas vem crescendo ao longo dos anos, mas ainda há muito que ser feito. Há uma carência de diretrizes padronizadas e confiáveis que reflitam de forma fidedigna a qualidade dos micopesticidas. As biofábricas têm considerado diferentes parâmetros para a realização do controle de qualidade e, igualmente preocupantes, protocolos distintos são empregados para a avaliação de um mesmo parâmetro, alguns deles sem suficiente embasamento científico. Os parâmetros e as metodologias para avaliá-los deveriam ser harmonizados, o que, adicionalmente, permitiria a comparação de resultados de uma mesma amostra quando analisada em diferentes laboratórios.

Além da identificação taxonômica, já abordada no tópico 5, outros parâmetros são também considerados para o controle de qualidade de preparações e formulações comerciais à base de fungos de invertebrados. São eles: concentração de propágulos viáveis (e sua variante, sendo esta a concentração de conídios vigorosos), pureza, virulência, vida de prateleira e parâmetros físico-químicos relacionados a preparação ou formulação. Não se tem, nessa publicação, a pretensão de esmiuçar o passo a passo de cada etapa, muitas das quais já rotineiramente adotadas nas biofábricas. Portanto, informações que abrangem a preparação de meios de cultura, técnicas de plaqueamento de suspensões fúngicas em meios de cultura, realização de diluições seriadas, uso da câmara de contagem (câmara de Neubauer e outras), dentre outros, não serão aqui abordadas. Há diversas publicações, inclusive disponíveis na internet, que explicam de maneira detalhada a aplicação dessas técnicas. Além disso, espera-se que toda biofábrica tenha pessoal minimamente capacitado para a condução dos protocolos propostos. Os protocolos, descritos a seguir, são rotineiramente empregados ou já foram testados no Laboratório de Micologia de Invertebrados (LMI) e Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA), ambos da Embrapa, para avaliação de micopesticidas à base de conídios aéreos, blastosporos, clamidósporos, micélio e microescleródios de fungos de invertebrados.

7.1 Concentração de propágulos viáveis e concentração de conídios vigorosos

O que é?

A concentração de propágulos viáveis refere-se ao número de propágulos vivos por kg ou L de um micopesticida. Tem sido o parâmetro mais utilizado pelas biofábricas brasileiras para avaliar a qualidade dos produtos comerciais. Entretanto, nem sempre a concentração de propágulos viáveis está

diretamente relacionada à virulência ao invertebrado-alvo. No caso de micopesticidas à base de conídios aéreos, um parâmetro mais relacionado à virulência é a concentração de conídios vigorosos, conceito relativamente recente e que será abordado mais adiante.

Como estimar?

O número de propágulos viáveis pode ser estimado de várias formas, uma delas envolve a estimativa indireta através de contagem das unidades formadoras de colônias ou UFC (tópico 7.1.1). Outra forma é a estimativa direta dos propágulos viáveis (tópico 7.1.2).

7.1.1 Concentração de unidades formadoras de colônias (UFC)

O que é?

Trata-se de uma maneira indireta de se chegar à concentração de propágulos viáveis nos micopesticidas.

Limites de tolerância: a variação no número de UFC por kg ou L de micopesticida comercial deve ser menor que 20% do valor informado no rótulo. Por exemplo, um produto comercial cujo rótulo informa a concentração de $1,0 \times 10^{12}$ UFC/kg, deverá conter entre $0,8 \times 10^{12}$ UFC/kg e $1,2 \times 10^{12}$ UFC/kg ao longo do seu prazo de validade.

Como estimar?

Resumidamente, amostras do micopesticida com peso ou volume conhecidos são sucessivamente diluídas em água pura ou, no caso de propágulos hidrofóbicos, água com espalhante adesivo (Tween 80 ou similar). Alíquotas de volumes conhecidos são posteriormente espalhadas em placas de Petri com meio de cultura sólido, geralmente com antibióticos para evitar a proliferação de bactérias contaminantes. As placas são então incubadas em temperatura conhecida por certo número de dias e, posteriormente, conta-se o número de colônias do fungo de interesse em cada placa. As colônias são reconhecidas por critérios morfológicos típicos da espécie de interesse, como cor e formato da colônia, assim como sua velocidade de crescimento. Quando necessário, observações microscópicas das estruturas vegetativa e reprodutiva do patógeno podem auxiliar no reconhecimento e diferenciação de eventuais fungos contaminantes. Após os devidos cálculos, chega-se, então, ao número de UFC por cada kg ou L do produto analisado. O esquema ilustrado na figura 9 pode ser empregado para se chegar à concentração de UFC.

A figura 10 ilustra a formação de colônias (UFC) do fungo entomopatogênico *Cordyceps javanica*.

Comentários adicionais.

- Trata-se de uma metodologia bastante difundida, mas, que de maneira geral, é menos precisa que as contagens diretas, havendo elevada variação entre as amostras de um mesmo lote do produto (elevado desvio padrão). Unidades formadoras de colônias podem originar-se de propágulos não infectivos, o que é comum em algumas preparações obtidas a partir da fermentação líquida e com baixa produção de propágulos infectivos (conídios submersos e blastosporos) e elevada concentração de fragmentos de hifas. Em síntese, a contagem de UFC pode não representar a quantidade de ingrediente ativo nos micopesticidas destinados ao controle de invertebrados.
- A metodologia UFC deve ser usada nos casos em que o emprego de outras metodologias não é indicado. Para os micopesticidas com partículas de grãos ou formulantes que dificultam a

visualização direta do ingrediente ativo (propágulos infectivos), a utilização da UFC é justificável. Caem nesta categoria muitos micopesticidas com cereais moídos em sua composição, situação em que há partículas com tamanho e formato semelhantes aos esporos, ou nas quais os farelos ou formulantes servem de escudo físico, impossibilitando uma precisa visualização e contagem dos propágulos fúngicos em microscópio óptico.

- Dispersões oleosas, uma vez diluídas em água, produzem micelas de óleo com agregados de conídios aéreos que interferem significativamente no número de UFC formados sobre o meio de cultura, reduzindo a precisão da contagem.

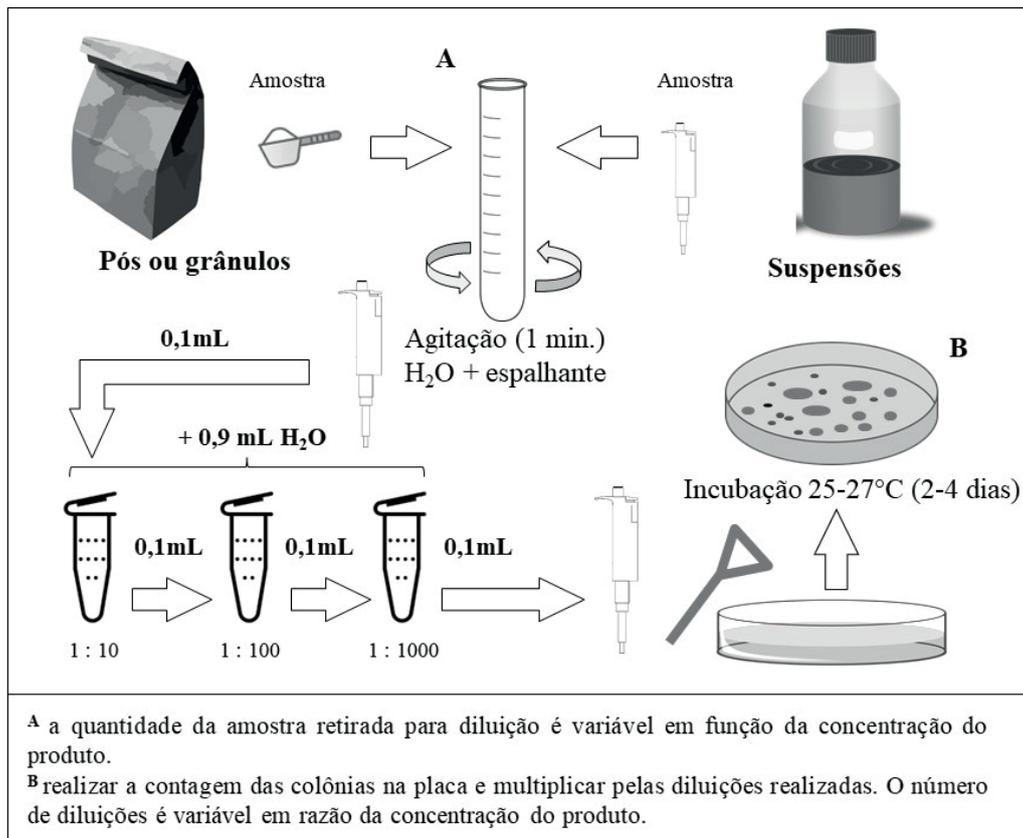


Figura 9. Ilustração do procedimento para estimativa da concentração de UFC por unidade de peso ou volume.

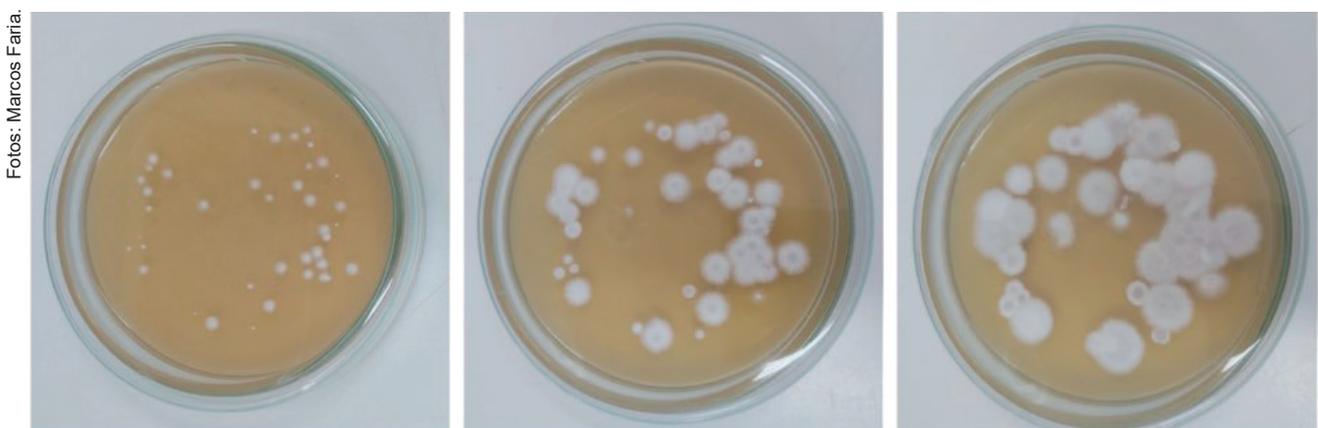


Figura 10. Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Cordyceps javanica* em placa de Petri com meio BDA mais antibiótico, após incubação a 25 °C por 4, 5 e 6 dias, respectivamente. No 4º dia é possível realizar a precisa contagem do número de colônias. Nos dias seguintes tem-se a coalescência de colônias, sendo que a partir do 6º dia a individualização delas é imprecisa.

7.1.2 Estimativa direta da concentração de propágulos viáveis

O que é?

Refere-se ao número de propágulos vivos por kg ou L de um micopesticida, calculado diretamente (sem o emprego da metodologia UFC). Ao contrário da metodologia UFC, a estimativa direta permite a visualização do(s) tipo(s) de propágulo(s) que compõem um determinado micopesticida, tornando a estimativa mais precisa.

Limites de tolerância: a variação na concentração de propágulos viáveis por kg ou L de micopesticida comercial deve ser menor que 20% do valor informado no rótulo. Por exemplo, um produto comercial cujo rótulo informa a concentração de $1,0 \times 10^{12}$ conídios viáveis por kg, deverá conter entre $0,8 \times 10^{12}$ e $1,2 \times 10^{12}$ conídios viáveis por kg durante seu prazo de validade.

Como estimar?

O primeiro passo consiste em estimar o número total de propágulos (viáveis + mortos) por unidade de peso ou volume do micopesticida, conforme detalhado na figura 11.

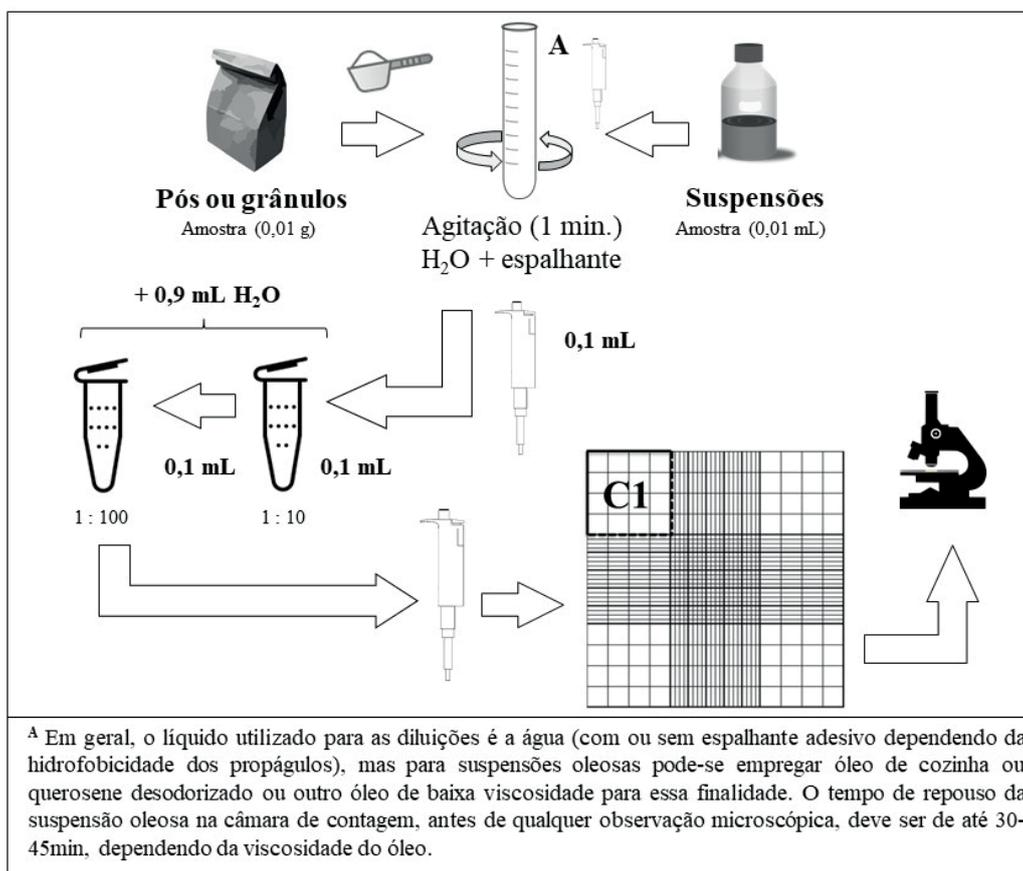


Figura 11. Ilustração do procedimento para contagem do número total de propágulos de fungos por unidade de peso ou volume.

Concentração total de propágulos: amostras de peso ou volume conhecido de um determinado micopesticida são criteriosamente diluídas em água pura, ou no caso de propágulos hidrofóbicos, como os conídios aéreos de algumas espécies de fungos, em água com espalhante adesivo compatível. A contagem do número de propágulos é feita em microscópio óptico com auxílio de uma câmara de contagem. O esquema a seguir ilustra o procedimento rotineiramente adotado por nossa equipe.

Porcentagem de germinação (viabilidade): a segunda etapa para a determinação da concentração de propágulos viáveis consiste na estimativa da porcentagem de germinação, que nada mais é que a proporção de propágulos capazes de germinar em meio de cultura após incubação por determinado período e temperatura. Embora na literatura científica o termo viabilidade possa ter um significado diferente de porcentagem de germinação, nesta publicação eles são utilizados de forma intercambiável. Procedimento rotineiramente adotado em diversos laboratórios é ilustrado na figura 12.

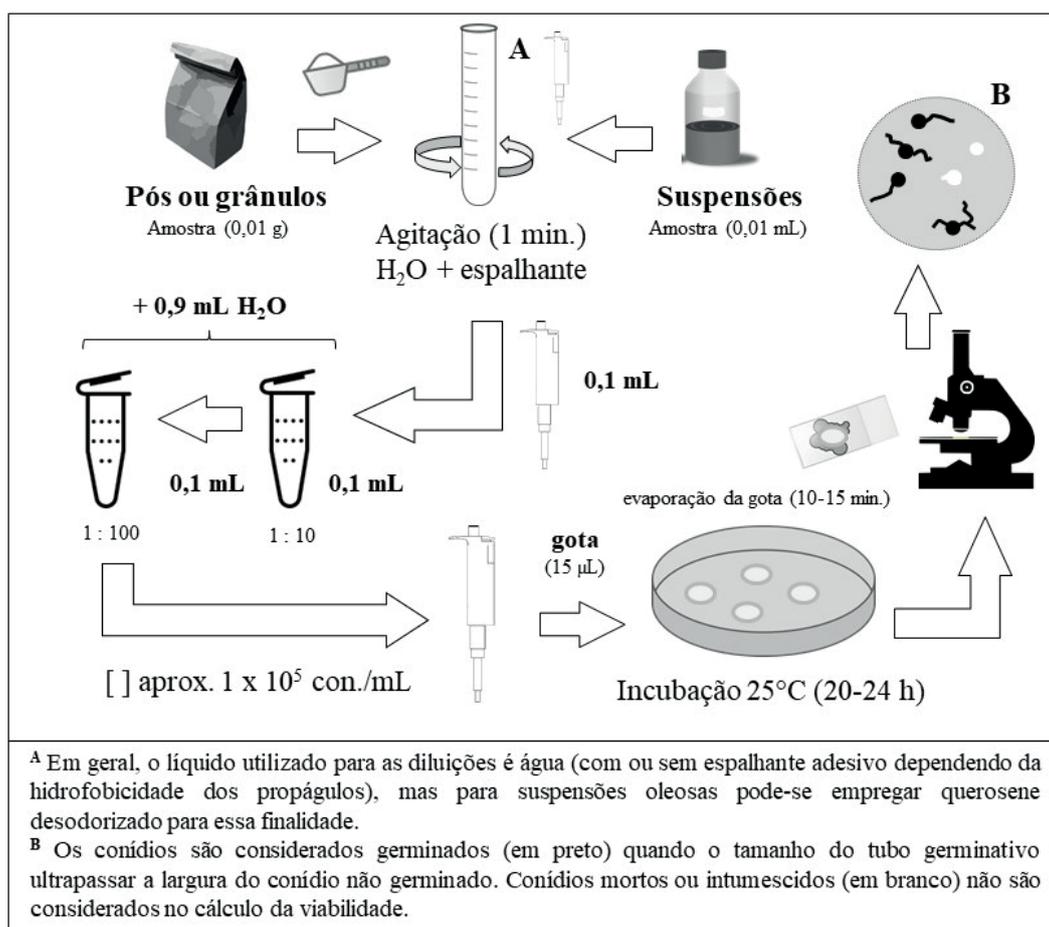


Figura 12. Ilustração do procedimento para estimativa da viabilidade de propágulos de fungos por unidade de peso ou volume.

Portanto, a estimativa da concentração de propágulos viáveis nada mais é que o produto da concentração total de propágulos pela porcentagem de germinação. Por exemplo, um produto com 1×10^{13} conídios aéreos por kg e porcentagem de germinação média de 80%, a concentração de propágulos viáveis será de 8×10^{12} ou $0,8 \times 10^{13}$ ($= 1 \times 10^{13} \times 0,80$) conídios aéreos por kg de produto.

Comentários adicionais.

- Apesar de ser o parâmetro mais utilizado no Brasil para avaliar a qualidade de micopesticidas, a concentração de propágulos viáveis é um parâmetro pouco informativo caso os propágulos tenham baixa qualidade. De fato, é sabido que a viabilidade não é um bom preditor da virulência ou mortalidade. Ensaio com o fungo *A. muscarius* e ninfas de mosca-branca, por exemplo, demonstraram haver uma fraca correlação entre viabilidade e mortalidade (Ravensberg 2011). Em outras palavras, mesmo os lotes com elevada viabilidade podem ser pouco virulentos à praga-alvo.

- Processos pós-produção podem afetar a concentração de propágulos viáveis. Por exemplo, processos abrasivos de extração dos conídios aéreos dos grãos de cereais, extração dos conídios aéreos com o emprego de água, secagem em salas com temperaturas elevadas ou com grandes variações térmicas, formulação com adjuvantes tóxicos, empacotamento de propágulos com elevado teor d'água, dentre outros fatores, afetam negativamente o potencial germinativo.
- As maiores concentrações de propágulos por unidade de peso são obtidas em preparações do tipo TC (conídios puros), sobretudo quando possuem baixa concentração de restos de substrato. Além do mais, o número de conídios por g de massa conidial varia de uma espécie de fungo para outra, e varia em função do teor de água da amostra, conforme ilustrado na figura 13. Preparações TC dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* com baixos teores de água podem conter quase $1,2 \times 10^{11}$ e $0,7 \times 10^{11}$ conídios por g, ou seja, próximo de $1,2 \times 10^{14}$ e 7×10^{13} conídios por kg, respectivamente.

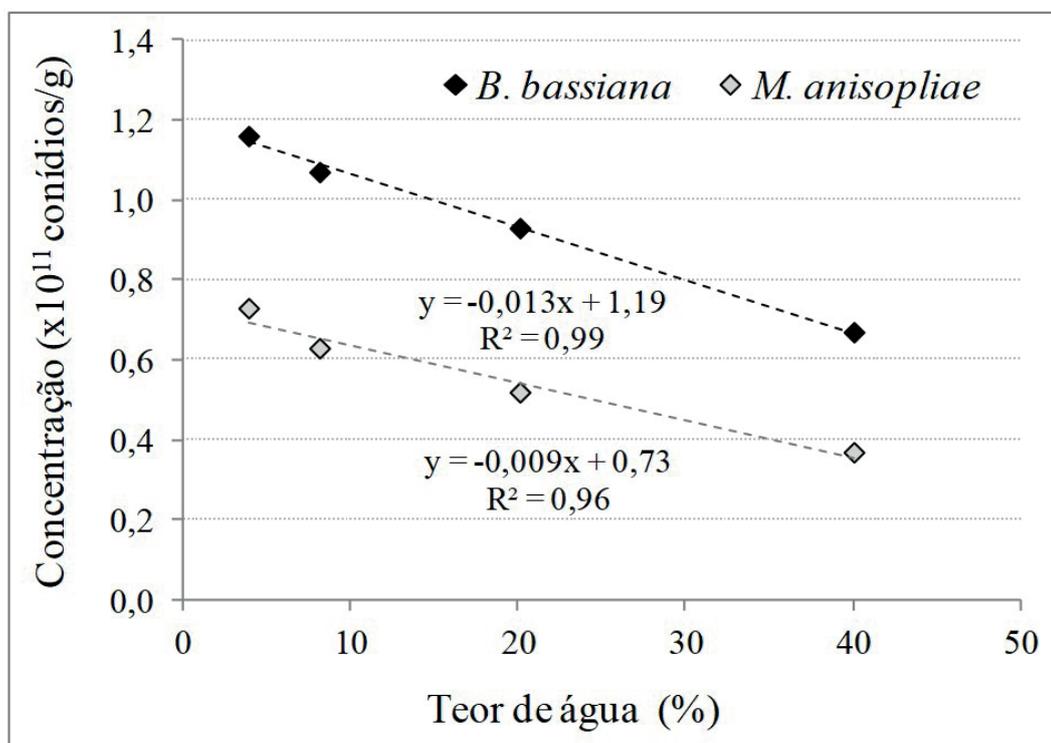


Figura 13. Efeito do teor de água da massa conidial sobre o número de conídios por g de preparações TC (conídios puros) para dois isolados de fungos entomopatogênicos (*Beauveria bassiana* GHA e *Metarhizium anisopliae* CG1125).

- Cuidado especial deve ser dado à etapa de amostragem de preparações TK sólidas, pois erros grosseiros ocorrem no momento de retirada da amostra a ser avaliada. A coleta de amostra(s) no fundo da embalagem (sacolas etc.), onde há grande quantidade de conídios aéreos soltos, usualmente resulta em superestimativa da concentração de propágulos na preparação. Da mesma forma, a coleta de amostra(s) na parte superior da embalagem poderia levar a uma subestimativa. Uma forma de contornar essa situação é o processamento de todo o conteúdo da embalagem, ou adoção de volume representativo se proveniente de embalagens ou recipientes muito grandes.
- A fermentação líquida resulta em “caldos fermentados” contendo propágulos fúngicos, os quais podem durar algumas horas sem refrigeração ou até alguns dias sob refrigeração adequada

(4-6 °C). O congelamento do caldo fermentado em *freezer* e sem adição de criopreservantes pode causar danos irreversíveis às células, resultando em rápida perda de viabilidade do material biológico. Como controle interno, recomenda-se que as biofábricas estimem a concentração de propágulos viáveis imediatamente após a produção e, dessa forma, possam ter uma boa indicação do rendimento industrial. Os produtos devem ser avaliados imediatamente antes da comercialização, com teste de germinação de blastosporos em BD ou BDA com intervalo de incubação de 7-8 h e 11-13 h, respectivamente, devendo a incubação ser realizada em local regulado para 25-28 °C e na ausência de luz. Dessa forma, o produto da multiplicação da concentração total pela percentagem de germinação resultará na concentração de propágulos viáveis por mL ou L de meio de cultura. Em preparações com elevada proporção de conídios submersos, o tempo de incubação varia em função da espécie de fungo, havendo a necessidade de estudos adicionais para recomendações mais precisas.

7.1.3 Vigor conidial

O que é?

Esporos vigorosos são aqueles que germinam rapidamente e, por consequência, apresentam maior potencial infectivo. O vigor é um parâmetro relacionado à virulência, conforme demonstrado por Faria *et al.* (2015). Os esporos vigorosos são os principais ingredientes ativos dos micopesticidas utilizados na estratégia de CB inundativo, embora possam sê-lo também em preparações ou produtos destinados ao CB inoculativo. Em resumo, o vigor pode ser entendido como a percentagem de propágulos infectivos com rápida germinação e, conseqüentemente, com maior potencial de controle. Atualmente, a estimativa da concentração de propágulos vigorosos só é possível para produtos sólidos e à base de conídios aéreos.

Limites de tolerância: a variação no número de conídios aéreos vigorosos por kg de um micopesticida comercial deverá ser menor que 20% do valor informado no rótulo. Entretanto, até a presente data, infelizmente não há no mercado brasileiro nenhum produto cuja concentração de propágulos seja expressa na forma de número de conídios vigorosos.

Como estimar?

Para a estimativa da concentração de esporos vigorosos, são necessários dois passos. Primeiro estima-se a concentração total de esporos (ver tópico 7.1.1); em seguida, a proporção de conídios vigorosos. A desidratação de cada amostra para teores de água $\leq 8\%$ é fundamental para a estimativa do vigor conidial, já que os conídios vigorosos são tolerantes ao dano de embebição (morte causada pela imersão de esporos secos em água fria). Uma maneira de desidratar a amostra é mantê-la em dessecador ou recipiente menor com sílica-gel ou sulfato de cálcio (Drierite®) durante, pelo menos, 6 horas (figura 14). No LMI, a secagem é feita com amostra de aproximadamente 15 mg do micopesticida em recipiente de vidro de 175 mL, preenchido até a metade com *pellets* de Drierite® (figura 15).

No esquema anterior, conídios vigorosos são aqueles com tubo germinativo longo, portanto, os conídios mortos, os intumescidos sem tubo germinativo e os conídios germinados, porém com tubo germinativo muito pequeno (menor que o diâmetro de um conídio não germinado), não são considerados na determinação do vigor (%). A estimativa da concentração de ingrediente consiste na multiplicação da concentração de propágulos pelo vigor (%). Por exemplo, num lote com média de 1×10^{13} conídios por kg do micopesticida e vigor conidial de 80%, a concentração de ingrediente ativo é de 8×10^{12} ($= 1 \times 10^{13} \times 0,80$) conídios vigorosos por kg.

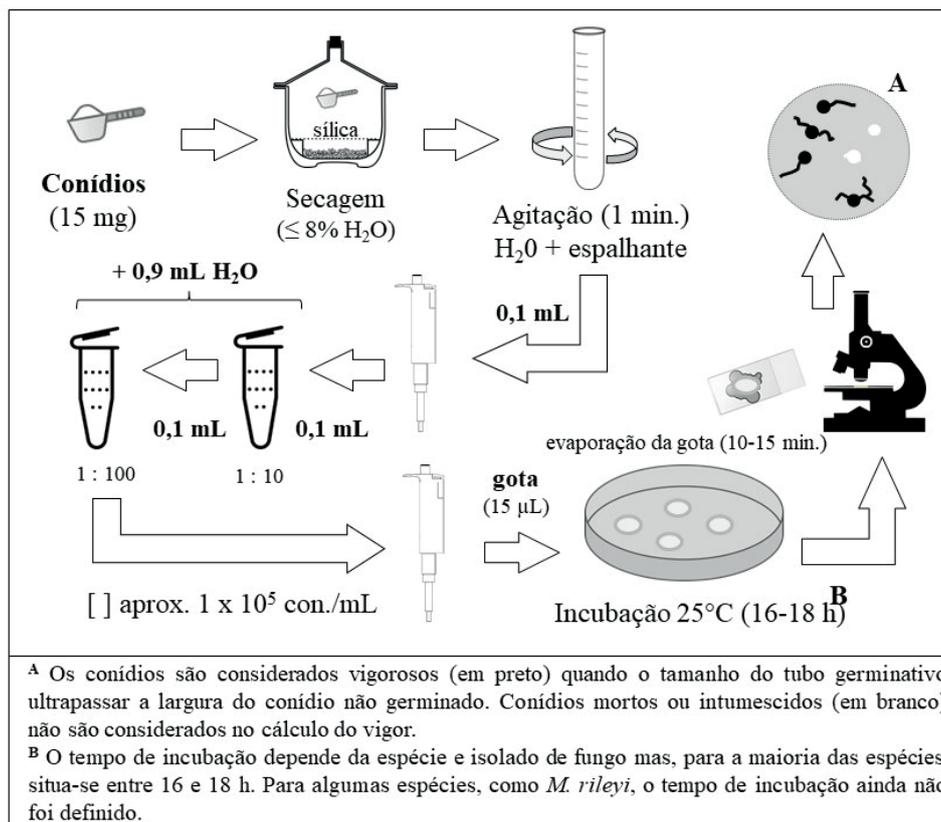


Figura 14. Ilustração do procedimento para determinação do vigor de uma preparação ou formulação sólida.

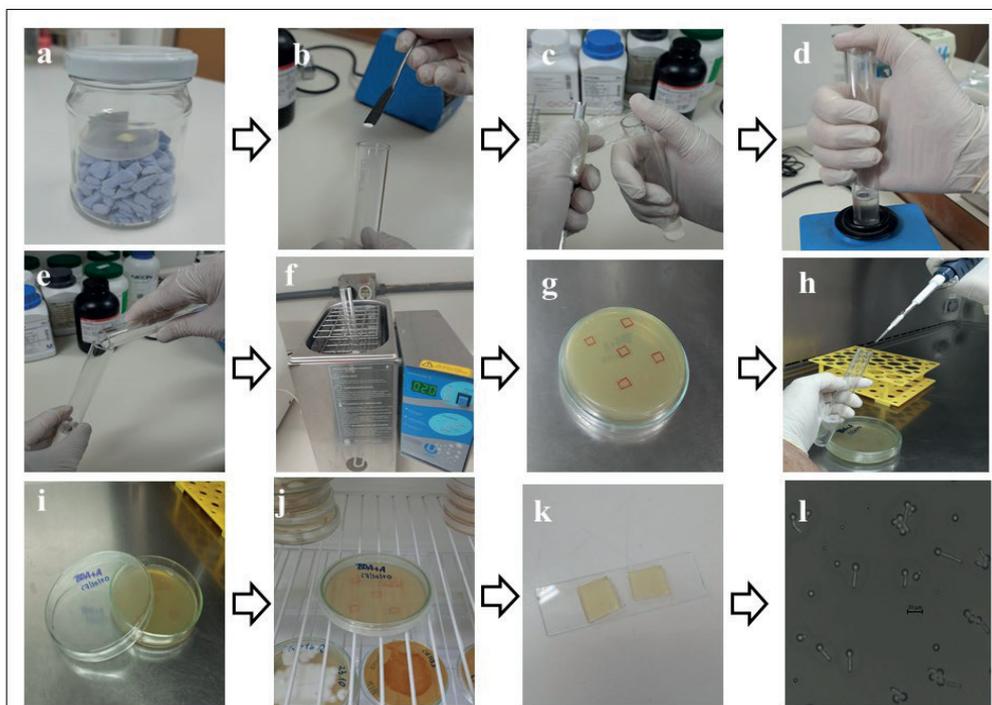


Figura 15. Ilustração do procedimento para determinação do vigor de uma preparação ou formulação sólida. Esquema para determinação do vigor de conídios aéreos. Passos: (a) secagem dos esporos; (b) preparação de suspensão conidial aquosa; (c) vedação do tubo de ensaio com filme plástico; (d) homogeneização da suspensão de conídios em vórtex; (e) diluição rápida; (f) banho de ultrassom por 2 min após diluição; (g) marcação no fundo de placa de Petri com meio BDA; (h) inoculação de 10-15 μl em área demarcada da placa de Petri; (i) secagem em fluxo laminar por aprox. 10-15 min; (j) incubação da placa vedada com parafilme em incubadora regulada para $25^\circ C$; (k) após 16 horas, transferência do segmento de meio de cultura inoculado com suspensão para lâmina microscópica; (l) observação microscópica para estimativa do percentual de esporos vigorosos.

Comentários adicionais.

- O vigor conidial agrega informação a respeito da quantidade e qualidade dos propágulos presentes em determinado micopesticida, sendo possível a diferenciação entre esporos vigorosos e esporos de baixo vigor. A concentração de conídios viáveis (percentagem de conídios com capacidade germinativa) tem sido rotineiramente utilizada como indicador da concentração de ingrediente ativo em micopesticidas. Entretanto, estudos realizados ao longo dos últimos anos revelam que conídios aéreos de baixo vigor apresentam três características marcantes quando comparados a conídios vigorosos: 1) germinam lentamente e, logo, são menos infectivos; 2) são mais sensíveis ao dano de embebição; 3) são menos longevos durante o armazenamento. Esse fenômeno é análogo ao de sementes que, mesmo vivas e com capacidade de germinação, nem sempre vingam ou não produzem plantas robustas caso não possuam elevado vigor fisiológico. O entendimento de que o ingrediente ativo é composto majoritariamente pelos esporos sabidamente mais infectivos é a melhor forma de incrementar substancialmente a qualidade de micopesticidas.
- Sob condições laboratoriais, onde os fungos são cultivados em meios de cultura vertidos em placas de Petri, mantidas em incubadoras sob condições estáveis e muito satisfatórias (temperaturas na faixa de 25-28 °C), e com posterior remoção dos conídios do meio de cultura através de procedimentos pouco agressivos, o vigor conidial pode ser superior a 95%. Nas biofábricas, que trabalham com grandes volumes de substrato, onde as condições de cultivo e beneficiamento dos esporos nem sempre são tão satisfatórias, o vigor conidial dos lotes deve ser, preferencialmente, $\geq 85\%$.
- Até a presente data, a estimativa do vigor conidial é aplicável para micopesticidas à base de conídios aéreos e sem óleo na composição, o que incluiria preparações (TC e TK) e algumas formulações como, por exemplo, WP e WG. Formulações WP e preparações TK à base de conídios aéreos são as mais comuns no mercado brasileiro. Outra limitação para o emprego do vigor conidial é no caso de preparações obtidas por fermentação líquida. Embora tecnicamente plausível, protocolos para avaliação do vigor de blastosporos e conídios submersos obtidos em meios líquidos ainda não foram desenvolvidos.
- Para os micopesticidas compostos por conídios aéreos formulados em óleo emulsionável (OD), ou outros formulantes de natureza oleosa, a estimativa do vigor conidial poderá ser realizada com os conídios puros imediatamente antes da mistura destes ao líquido, desde que a mistura seja elaborada por ocasião da comercialização (no máximo, até poucos dias antes das vendas).

7.2 Virulência

O que é?

Patogenicidade refere-se à capacidade de um patógeno desencadear doença, enquanto a virulência refere-se ao grau de patogenicidade. Um patógeno pode ser avirulento (quando não causa doença), ou ter virulência variando de baixa a elevada, geralmente expressa pela percentagem de mortalidade dos organismos tratados. Outro parâmetro, denominado eficácia, refere-se ao desempenho do biopesticida após sua aplicação pelo usuário final, sendo considerado, por alguns especialistas, como o parâmetro mais importante ligado ao controle de qualidade de micopesticidas. Embora não possa ser diretamente mensurada pelas biofábricas, a eficácia pode ser indiretamente estimada, em laboratório, por meio da virulência dos propágulos fúngicos que compõem um micopesticida. Até o momento, a avaliação da virulência não tem sido levada em consideração pela maioria das biofábricas brasileiras, mas é bastante desejável que essa prática seja inserida nos programas de controle de qualidade dos micopesticidas.

Como estimar?

Há duas formas distintas de se estimar a virulência dos propágulos fúngicos à praga-alvo. A primeira forma — e a mais mencionada na literatura — refere-se aos bioensaios padronizados; a segunda, à estimativa do vigor conidial (ver tópico 7.1.3), já que existe uma forte correlação entre a concentração de conídios vigorosos e a virulência medida em bioensaios.

Limites de tolerância: os níveis de controle esperados nos bioensaios padronizados precisam ser definidos caso a caso, pois variam em função do alvo, fungo, tipo de formulação, dose, forma de aplicação, condições de incubação, dentre outros fatores. Há exemplos, em outros países, de biofábricas que realizam bioensaios com todos os lotes produzidos, sendo a comercialização do biopesticida vetada quando a mortalidade é inferior aos padrões preestabelecidos (tabelas 2 e 3).

7.2.1 Bioensaios

Bioensaios padronizados com a praga-alvo são bastante informativos e, na prática, é o parâmetro avaliado em laboratório que está mais correlacionado com o sucesso do micopesticida quando empregado pelo usuário final. Os bioensaios, quando tecnicamente possíveis e práticos, deverão ser realizados com lotes padronizados do invertebrado-alvo, sob condições controladas e observando as boas práticas relacionadas ao assunto, como inclusão de controles, número significativo de insetos por repetição/tratamento, análise estatística adequada, dentre outros detalhes. Para serem obtidos dados confiáveis, várias doses poderão ser avaliadas. Alternativamente, pode-se utilizar apenas a dose recomendada pela biofábrica para o usuário final, estando o lote apto para comercialização se o nível de mortalidade obtido estiver acima do limite previamente estabelecido. Caso contrário, o lote deverá ser descartado.

Comentários adicionais.

- É usual que bioensaios com fungos sejam técnica e/ou logisticamente complexos, além de demorados — usualmente, na faixa de 7-14 dias. Adicionalmente, nem toda biofábrica possui uma plataforma para a criação de indivíduos padronizados da praga-alvo e, em alguns casos, não há nem mesmo metodologias disponíveis para a criação da praga em laboratório ou para a realização de bioensaios tecnicamente aceitáveis.
- Em alguns casos, a realização de bioensaios não precisará ser realizada para todos os lotes produzidos (veja exemplo na tabela 3). No caso de micopesticidas registrados para o controle de mais de uma praga-alvo, os bioensaios não necessitarão ser realizados com todas elas, já que a virulência poderá ser estimada com ajuda de ensaios com um único alvo.

7.2.2 Vigor conidial

A importância do vigor e a metodologia para sua estimativa estão detalhados no tópico 7.1.3.

7.3 Pureza

O que é?

Embora, a rigor, os termos pureza e percentagem de contaminação soem como antônimos, na prática, são tratados de forma indistinta. Referem-se à quantidade e natureza dos microrganismos contaminantes presentes num dado micopesticida, podendo ser expresso em percentagem

de contaminantes em relação ao total de propágulos do fungo de interesse ou, ainda, no total de contaminantes por g ou mL. Os microrganismos contaminantes podem ocasionar prejuízos vultosos ao sistema produtivo e à qualidade final do produto, além de riscos ao ambiente e à saúde humana. As contaminações são causadas quase que exclusivamente por bactérias, fungos e leveduras oportunistas. Após muitos anos de fermentações sólida, líquida e bifásica nos laboratórios LMI e LMA da Embrapa, nunca foi observado o crescimento de patógenos de humanos nos substratos e meios utilizados.

Limites de tolerância: a contaminação total por organismos aeróbicos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras oportunistas) não deve ser superior a 5×10^6 UFC por g ou mL do produto comercial. Para patógenos de humanos, níveis aceitáveis ainda precisam ser definidos para os biopesticidas destinados à agropecuária.

Como estimar?

A constatação de microrganismos contaminantes ao longo do processo de produção de micopesticidas em substratos sólidos é bastante simples. Felizmente, olhos bem treinados captam facilmente as mudanças em progresso. As contaminações bacterianas podem ser reconhecidas pela aparência distinta e odor desagradável. Na fermentação sólida, os fungos contaminantes são reconhecidos pelo crescimento acelerado e aspectos morfológicos distintos. Na fermentação líquida, a constatação da contaminação por fungos não é tão simples, e a mera observação visual raramente é suficiente, embora em alguns casos mudanças de coloração da cultura possam indicar a presença de contaminantes. A determinação da pureza é baseada na estimativa de UFC dos organismos contaminantes (figura 16). Esse é um processo relativamente demorado em função do período de incubação das placas em temperatura conhecida (usualmente, 2-4 dias). O número e tamanho de amostras devem ser representativos do lote analisado, para que os resultados obtidos sejam precisos e informativos.

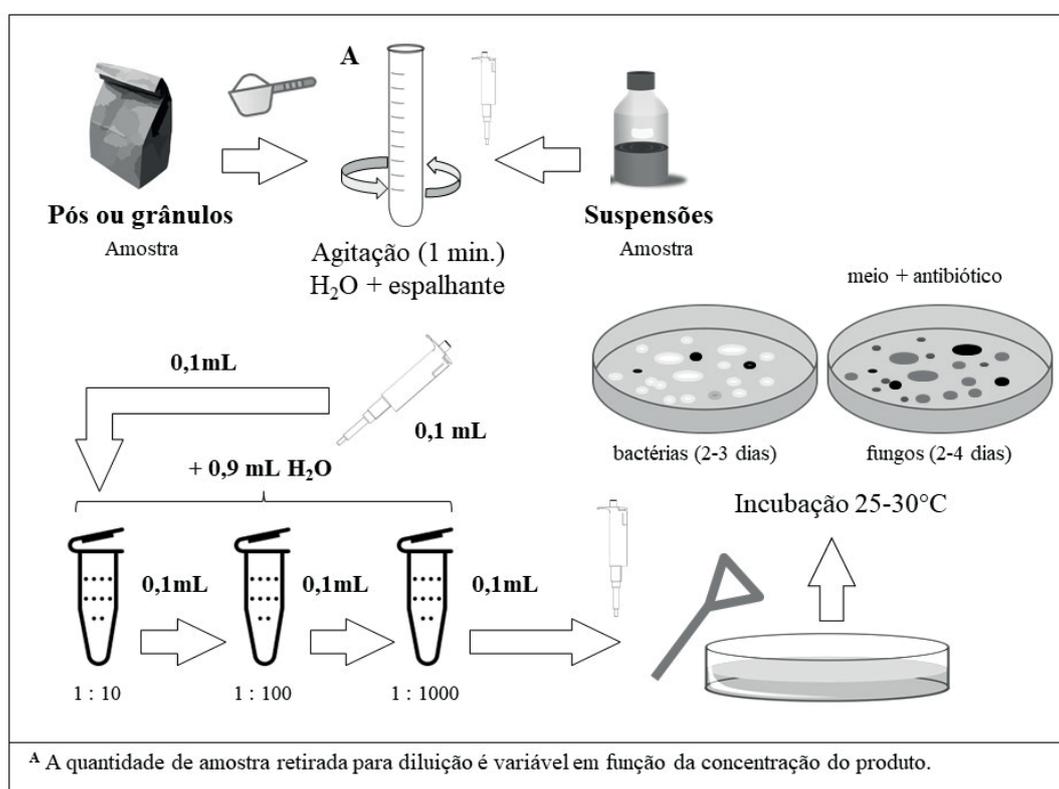
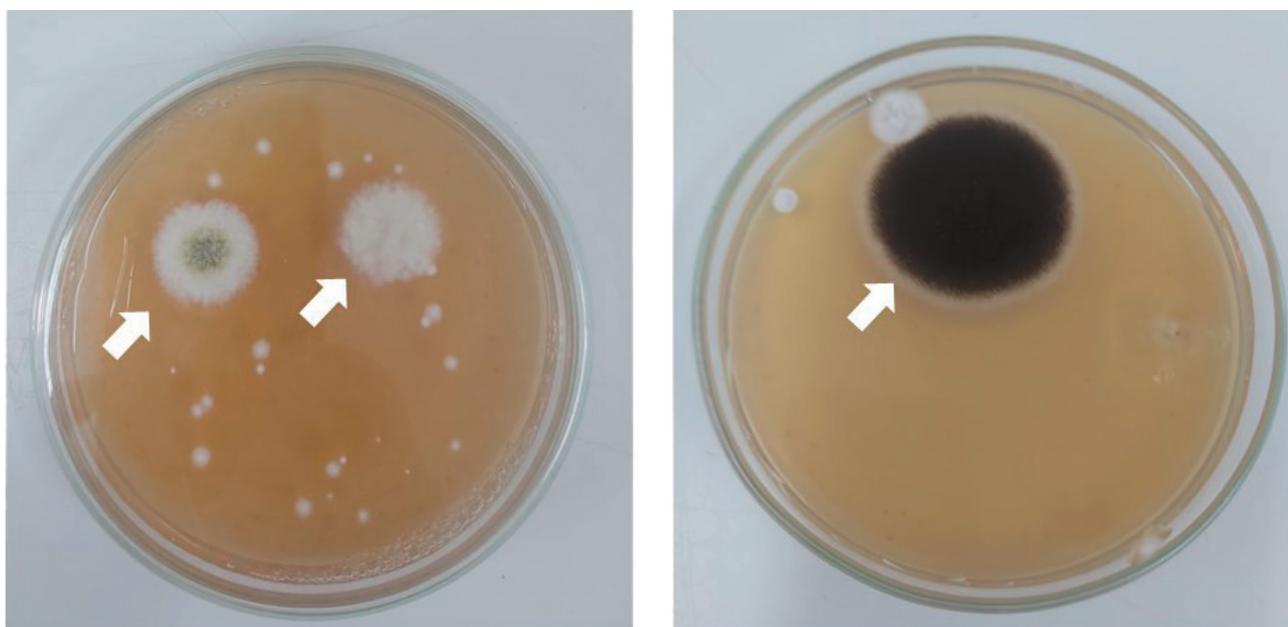


Figura 16. Ilustração do procedimento para estimativa do nível de contaminação por unidade de peso ou volume.

Um meio de cultura que pode ser utilizado para a detecção de fungos contaminantes é o BDA, facilmente encontrado no mercado, e enriquecido com antibióticos, conforme ilustrado na figura 17.



Fotos: Marcos Faria.

Figura 17. Placas de Petri com pequenas colônias do fungo entomopatogênico *Cordyceps javanica* em meio BDA, e colônias grandes de duas espécies de fungos contaminantes do gênero *Aspergillus*, indicadas pelas setas brancas.

Comentários adicionais.

- A concentração de organismos contaminantes no micopesticida deve ficar abaixo de valores predefinidos. Limites máximos rigorosos, de até 1×10^5 UFC para bactérias aeróbicas e até 1×10^3 UFC para fungos filamentosos e leveduras por g ou mL, foram sugeridos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2011). Um pouco menos rigoroso é o índice máximo de contaminação de 0,002% estabelecido para o produto Green Muscle®, que corresponderia a um propágulo contaminante (bactéria, fungo filamentoso ou levedura) para cada grupo de 50.000 conídios aéreos de *M. acridum*. Em outras palavras, no referido produto é tolerada a presença de até 1×10^6 UFC de contaminantes por g. Acreditamos que 5×10^6 UFC de propágulos contaminantes por g ou mL seria um limite satisfatório no atual momento. Em levantamento realizado no ano de 2010 com 11 produtos comercializados no Brasil, a concentração de contaminantes ficou dentro dessa faixa para 73% deles (D.G.P Oliveira, UTFPR, informação pessoal). O referido limite deve ser gradativamente reduzido, ao longo dos anos, para valores mais próximos daqueles sugeridos pela OCDE.
- Os contaminantes atingem níveis muito elevados quando os processos produtivos são precariamente conduzidos. Contaminações, normalmente em menor escala, podem estar associadas ao ambiente, como máquinas ou mãos sujas, salas sem a devida assepsia, utilização de inertes (formulantes) e embalagens não estéreis.
- No LMI, observamos elevada concentração de bactérias em um micopesticida comercial cuja extração dos esporos dos grãos colonizados foi realizada na biofábrica através de lavagem com água. Outro ponto que merece atenção é que alguns fabricantes, que trabalham com mais de uma espécie de fungo, têm que tomar cuidados adicionais para manterem-se dentro do patamar de contaminação $\leq 5 \times 10^6$ UFC/g, sobretudo em função do maior risco de contaminação

cruzada. Contaminações cruzadas são indesejáveis, e ainda mais graves nos casos em que envolvem fungo antagonista, o qual pode interferir na eficiência de controle proporcionado pela outra espécie. Não por acaso, a produção de fungos antagonistas do gênero *Trichoderma* é normalmente conduzida em ambientes físicos isolados daqueles empregados na produção e processamento de fungos entomopatogênicos ou nematófagos. Além do isolamento espacial, deve-se evitar o compartilhamento de equipamentos e, sempre que possível, até mesmo o compartilhamento de funcionários.

- Existem inúmeros meios de cultura que podem ser empregados para a detecção de bactérias, fungos e leveduras contaminantes. Para bactérias, por exemplo, pode ser recomendado um meio desenvolvido pela Embrapa (Monnerat *et al.* 2020).
- Muitos fungos produzem metabólitos secundários, os quais pertencem a diferentes classes químicas. O risco de produção de micotoxinas por alguns isolados específicos, mesmo durante a fermentação líquida conduzida de forma tecnicamente correta, é algo que, apesar de pouco provável, demandará discussões futuras.

7.4 Vida de prateleira (prazo de validade)

O que é?

A vida de prateleira pode ser entendida como o intervalo de tempo durante o qual o micopesticida retém as suas especificações, desde que armazenado na embalagem original e conforme condições estabelecidas pelo fabricante. Durante o prazo de validade espera-se que os inúmeros parâmetros do produto relacionados à qualidade sejam mantidos em consonância com os limites de tolerância. O prazo de validade é bastante influenciado pelas condições de armazenamento, principalmente a temperatura e, no caso de embalagens não herméticas, também pela umidade relativa. Em outras palavras, o produto deverá ser igualmente virulento, apresentar o mesmo nível de contaminação e manter as características físico-químicas tanto no início quanto ao final de sua vida de prateleira. Estudo realizado pelo LMI da Embrapa sugere que, no Brasil, 30 °C é a temperatura mais representativa dos depósitos de agrotóxicos. Tal valor está alinhado com as condições sugeridas para estudos visando à determinação de prazos de validade de medicamentos e alimentos no Brasil, de 30 ± 2 °C e 75 ± 5% UR (Anvisa 2018). Portanto, sugerimos que para os micopesticidas que são comercializados em todo o território nacional, e para os quais não há indicação no rótulo de armazenamento sob condições refrigeradas, os ensaios de vida de prateleira sejam realizados a 30 °C — e, caso a embalagem seja permeável, 75 ± 5% UR.

Limite de tolerância: no caso dos micopesticidas, a vida de prateleira pode ser entendida como o tempo para que a concentração inicial de ingrediente ativo (propágulos viáveis ou, preferencialmente, vigorosos) seja reduzida em 20% quando armazenado num dado regime de temperatura e umidade relativa. Por exemplo, se a concentração inicial de um produto em embalagem não hermética é de 1×10^{13} conídios vigorosos por kg, e após três meses de armazenamento a 30 °C e 75% de UR a concentração cai para $0,8 \times 10^{13}$ conídios vigorosos por kg, infere-se que a vida de prateleira desse produto nas condições de T e UR empregadas é de três meses. Reduções superiores a 20% na concentração de ingrediente ativo poderiam colocar em risco a eficácia do produto.

Como estimar?

A vida de prateleira sob condições não refrigeradas pode ser estimada após armazenamento de várias embalagens do micopesticida a 30 °C e 75% UR, com remoção de algumas delas de tempos

em tempos para avaliação de parâmetros relevantes. A virulência dos propágulos infectivos dessas amostras pode ser avaliada através de bioensaios, mas como discutido anteriormente, nem sempre isso é tecnicamente factível. Alternativamente, pode-se monitorar o vigor dos propágulos ou mesmo a viabilidade (quando o cálculo do vigor não é tecnicamente possível). Paralelamente, a contagem de contaminantes e as características físico-químicas da preparação ou formulação devem ser monitoradas.

Comentários adicionais.

- Os ensaios de vida de prateleira devem ser realizados, obrigatoriamente, com o micopesticida tal qual será comercializado, ou seja, com a mesma concentração de propágulos viáveis, tipo de formulação, teor de água, tipo e volume de embalagem, e assim por diante. Normalmente, os ensaios são realizados durante a fase de desenvolvimento do produto e, posteriormente, sempre que houver alguma alteração na linha de produção que possa ter algum impacto na qualidade dos propágulos, ou mudanças relacionadas à formulação (composição e/ou qualquer parâmetro físico-químico, mesmo que aparentemente irrelevantes, a exemplo do teor de água) ou tipo de embalagem. Sempre que necessário, e com a anuência dos órgãos reguladores, os rótulos devem ser atualizados a fim de refletir o correto prazo de validade sob condições muito bem especificadas.
- Atualmente, ainda há no mercado brasileiro micopesticidas com baixíssima concentração de propágulos e, igualmente preocupante, baixa viabilidade dos propágulos por ocasião da comercialização. É importante que as biofábricas produzam propágulos com elevado vigor e, dessa forma, possam melhorar atributos relevantes, a exemplo da vida de prateleira.
- Devido às desarmonias no tocante a conceitos e protocolos, não raramente os ensaios de vida de prateleira têm sido conduzidos em temperaturas pouco informativas, com adoção de protocolos questionáveis, além de conceitos inadequados para vida de prateleira. Para produtos em que há a expressa recomendação de refrigeração na propriedade rural, temperaturas mais baixas devem ser adotadas nos ensaios de vida de prateleira. O importante é que o rótulo e a bula de cada produto contenham informações corretas e claras acerca do prazo de validade em função das condições de armazenamento. Inclusive, sempre que houver a necessidade de condições especiais de armazenamento, como refrigeração, recomenda-se que tal informação seja exibida de maneira destacada nos rótulos das embalagens.
- Além da temperatura, a vida de prateleira é influenciada por outros parâmetros, como a espécie de fungo. *Metarhizium acridum*, por exemplo, é conhecido por ser relativamente mais termotolerante que as demais espécies empregadas em programas de controle biológico de invertebrados. Outros parâmetros importantes são o isolado, o tipo de propágulo e sua qualidade inicial que é bastante influenciada pelas etapas de produção e a extração dos propágulos, além dos ingredientes e processos empregados na etapa de formulação. O teor de água do produto e a presença de oxigênio no interior da embalagem são igualmente relevantes e, sempre que possível, devem ser evitados.
- Além dos ensaios convencionais para definição da vida de prateleira com o emprego da temperatura real de armazenamento, outra forma é o Teste Acelerado de Vida de Prateleira (*Accelerated Shelf-Life Testing* – ASLT, em inglês). O ASLT é muito empregado nas indústrias farmacêutica e alimentícia. Em função de erros grosseiros que ocorrem quando não é conduzida a contento, o ASLT só deve ser utilizado para estimar a vida de prateleira de micopesticidas longevos (≥ 12 meses) na(s) temperatura(s) a ser(em) avaliada(s). A atual realidade dos micopesticidas

disponibilizados no Brasil, com a maioria ainda sendo comercializada com elevados teores de água ($\geq 8-10\%$) e em embalagens permeáveis, e que após a comercialização são submetidos a elevadas temperaturas durante o armazenamento nas propriedades rurais, dificilmente resultaria em vida de prateleira superior a poucas semanas ou meses. Consequentemente, a adoção da metodologia ASLT não tem sido indicada para os micopesticidas.

7.5 Parâmetros físico-químicos relacionados aos micopesticidas

É bastante desejável que algumas propriedades físico-químicas das preparações ou formulações à base de fungos sejam monitoradas pelas biofábricas. Alguns desses parâmetros foram mencionados nas tabelas 2 e 3. Para as formulações sólidas, talvez a medida mais simples e relevante seja a determinação do teor de água, parâmetro bastante relacionado à ocorrência de contaminantes e à vida de prateleira. Quanto menor o teor de água de uma preparação sólida ou oleosa, maior a vida de prateleira e menor a probabilidade de contaminações, razão pela qual, muitas biofábricas buscam formas para garantir que o produto final tenha teores de água $\leq 5-6\%$. A determinação desse parâmetro pode ser feita por métodos gravimétricos (diferença de peso antes e após a secagem). Uma forma mais rápida e precisa é através da utilização de um medidor de atividade de água, equipamento relativamente caro, porém bastante prático. Uma vez construída uma isoterma de sorção (curva que correlaciona valores de atividade de água \times teores de água), em poucos minutos estima-se de maneira não destrutiva o teor de água de micopesticidas sólidos.

A avaliação do tamanho de partículas em algumas preparações e formulações, como TC, WP, WG e OD, é bastante indicada. A tabela 3 menciona a metodologia empregada em uma preparação à base de conídios puros do fungo *M. acridum*. Nas dispersões oleosas é também recomendado que sejam usados conídios lipofílicos desidratados, pois caso contrário poderia haver a formação de sedimentações irreversíveis no fundo das embalagens.

Para determinadas formulações líquidas é possível avaliar ainda a estabilidade das suspensões microbianas. Na metodologia empregada pela Agrosavia (Corporación colombiana de investigación agropecuaria), a estabilidade é estimada através de medições da absorvância em diferentes tempos. No Brasil, o procedimento para determinação da estabilidade de emulsões é diferente e está descrito em norma específica (ABNT NBR 13452). O pH poderá ser também monitorado em alguns produtos líquidos, com valores ligeiramente ácidos resultando em menores níveis de contaminação.

Além das características físico-químicas que podem ser utilizadas corriqueiramente nas biofábricas, há outras que podem ser exigidas pelos órgãos reguladores. Entretanto, por serem os produtos biológicos compostos por células complexas e não por moléculas simples, é necessário ter em mente que nem sempre é possível que valores obtidos para os parâmetros físico-químicos dos biopesticidas estejam integralmente em consonância com especificações originalmente estabelecidas para formulações de agroquímicos.

7.6 Casos especiais

Os protocolos anteriores são dinâmicos, podendo, oportunamente, sofrerem alterações que os aperfeiçoem frente às novas espécies de fungos e formulações que poderão ser empregados em programas de controle biológico de invertebrados. Da mesma forma, os protocolos listados precisariam de adaptações para que possam ser utilizados sob determinadas circunstâncias, algumas das quais abordadas a seguir.

7.6.1 Micopesticidas com agentes biológicos de diferentes classes

Já fazem parte do rol de produtos registrados no MAPA aqueles biopesticidas com mais de um agente biológico, pertencentes a diferentes classes. Como proceder nestes casos? A resposta depender de qual formulação e, sobretudo, dos organismos que estão sendo combinados. No caso de produtos com o uso combinado de fungo e bactéria, por exemplo, as estimativas deverão ser executadas em meios de cultura seletivos. Aquelas com o fungo, em meio de cultura com antibiótico eficaz; ao passo que as avaliações relativas à bactéria podem ser conduzidas em meios de cultura com fungicida específico. No caso de misturas de fungo com baculovírus, as avaliações referentes ao fungo não seriam prejudicadas pela presença do vírus. Da mesma forma, a maioria das avaliações relativas ao vírus poderiam ser conduzidas de forma independente, muito embora haveria a necessidade de realização de bioensaios com o inseto-alvo para uma robusta análise da qualidade da mistura. O que sabemos com certeza é que não há espaço para generalizações, devendo cada caso ser analisado individualmente para se chegar aos protocolos mais indicados.

7.6.2 Micopesticidas com mais de um isolado do mesmo fungo

Produtos com mais de um isolado de uma mesma espécie de fungo já estão disponíveis no mercado brasileiro. As avaliações quanto à efetiva participação de cada isolado na mistura envolvem técnicas complexas, demoradas e caras. Em breve, o emprego de testes moleculares ou de outra natureza para estimativa da participação de cada isolado em misturas será algo plausível, mas, por enquanto, as avaliações referentes à qualidade deverão ser conduzidas com o *pool* de isolados, cabendo à biofábrica garantir que a proporção indicada na bula seja respeitada no produto comercial.

7.6.3 Micopesticidas à base de clamidósporos

No caso de produtos à base de clamidósporos, a concentração total deve ser estimada através da contagem direta dessas estruturas em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio. Em seguida, a viabilidade direta poderá ser estimada em meio de cultura seletivo, ou em ágar-água, por um determinado período de incubação para detectar a germinação dos clamidósporos. No caso de *P. chlamydosporia*, a germinação de clamidósporos pode ser realizada via plaqueamento de uma suspensão diluída em meio de sorbose-ágar com antibiótico. O meio consiste em 12 g de ágar, 2 g de sorbose (açúcar produzido a partir da fermentação do sorbitol) e o restante completado com água destilada para 1 L, com adição de 50 mg de cada antibiótico (sulfato de estreptomicina, clortetraciclina e cloranfenicol) após autoclavagem e resfriamento do meio. De acordo com Kerry e Bourne (2002), clamidósporos viáveis e não viáveis devem ser contados com auxílio de microscópio, após incubação a 25-26 °C por 2-3 dias. Esse longo período de incubação é necessário por tratar-se de uma estrutura de resistência e dormente. Todavia, este período de incubação pode variar com a espécie do fungo e até mesmo do isolado, necessitando de ajustes do protocolo de controle de qualidade de modo a alcançar resultados consistentes e informativos.

À semelhança do teste de viabilidade de grânulos contendo microescleródios, a viabilidade das formulações em grânulos contendo clamidósporos é determinada colocando-se 100 grânulos em meio ágar-água (2% p/v), incubando essas culturas a 25 °C por 4 dias, e depois contando-se o número de grânulos que apresentam micélio (germinação miceliogênica). O diâmetro das colônias crescidas a partir dos grânulos de uma amostra aleatória de 15 grânulos poderá ser utilizado como indicador do vigor, após dispersão de 1 g de grânulos em água destilada estéril e diluído sucessivamente, e plaqueamento de 0,1 mL de diferentes diluições em BDA com Triton X-100. Colônias do fungo serão contadas após incubação por 2-4 dias a 25 °C e expressas em UFC. No caso de grânulos que não

dissolvem em água, como alguns passíveis de aplicação no solo, o diâmetro poderia ser avaliado a partir do posicionamento dos grânulos sobre o meio de cultura.

7.6.4 Micopesticidas à base de microescleródios

Micopesticidas com propágulos à base de microescleródios ainda estão indisponíveis no mercado, apesar do interesse de algumas empresas na comercialização de grânulos de microescleródios de *Metarhizium* spp. visando ao controle de pragas de solo, e de *Trichoderma* spp. para o controle de doenças de plantas. Geralmente, grânulos secos contendo microescleródios são embalados a vácuo em pacotes de polietileno e armazenados a 4 °C, embora outras embalagens herméticas sejam também adequadas, desde que a umidade final seja mantida em cerca de 4% ou menos. A avaliação da qualidade é baseada em duas etapas: plaqueamento de 25-30 mg dos grânulos secos em meio ágar-água (2% p/v) em placa de Petri e incubação por 24 h a 28 °C para determinação da porcentagem de grânulos com presença de micélio (germinação miceliogênica ou hifal), a partir da análise de 100 grânulos aleatórios.

Após 7 dias adicionais de incubação, avalia-se a produção de conídios por g de grânulos (esporogênese), mediante lavagem da superfície do meio contendo todos os grânulos para posterior diluição seriada e contagem em câmara de Neubauer. O mais adequado é que esses grânulos sejam padronizados quanto ao tamanho, por exemplo, de 0,5 a 1,0 mm, utilizando peneiras seletivas. Dessa forma, é possível adicionar ao meio ágar-água uma quantidade conhecida de grânulos ($n = 100$, se forem grânulos uniformes) ou 25 mg e realizar a determinação da viabilidade pela germinação e esporogênese (Figura 18). Portanto, para micopesticidas contendo microescleródios na forma de grânulos, um dos critérios para avaliação da qualidade poderia ser a viabilidade, expressa em porcentagem de germinação dos grânulos, e a produção de conídios por g ou mg de grânulos.

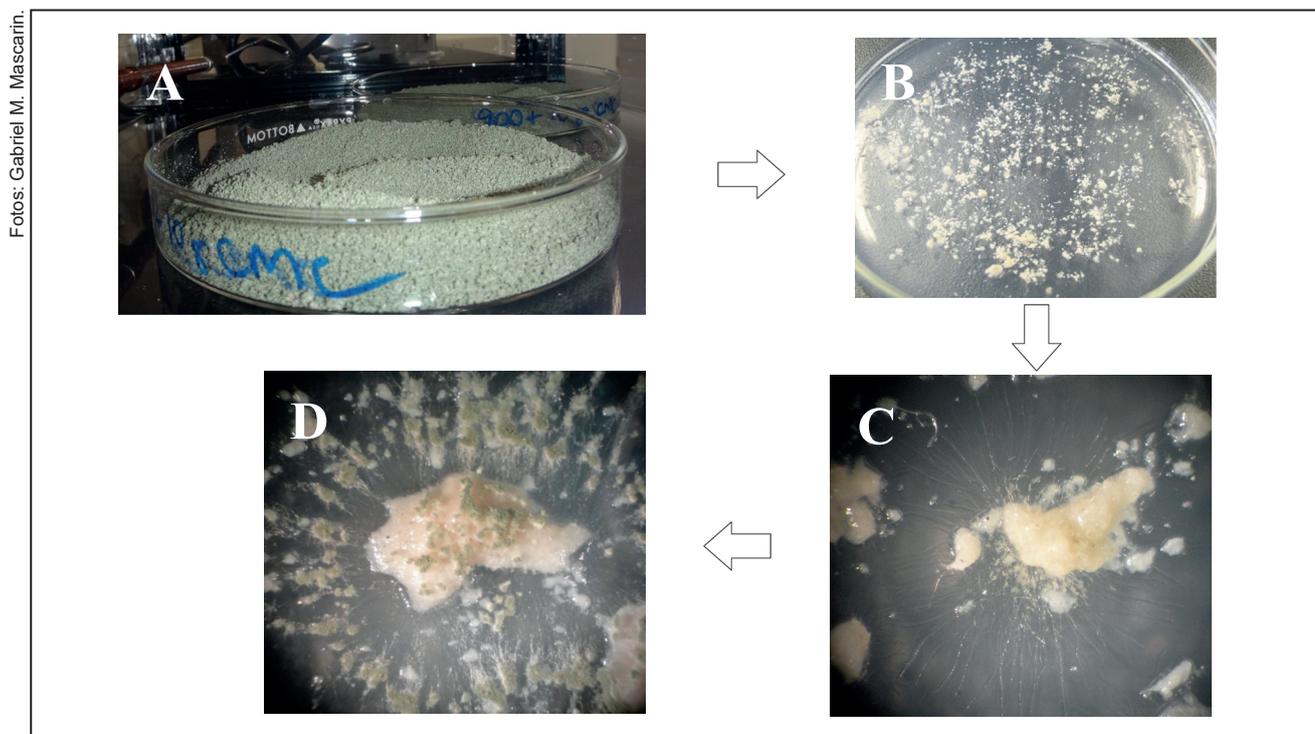


Figura 18. Esquema ilustrativo de plaqueamento de grânulos (25 mg) contendo microescleródios de *Metarhizium anisopliae* em meio simples de ágar-água (2% p/v) para avaliação da germinação miceliogênica e esporogênese. A) grânulos após secagem em recipiente de vidro; B) plaqueamento dos grânulos em meio ágar-água e incubação a 28 °C; C) grânulos de microescleródios reidratados em meio ágar-água por 24 h a 28 °C apresentando germinação micelial (miceliogênese); D) após mais 7 dias de incubação, formação de conídios aéreos (esporogênese) no grânulo.

7.7 Amostragem de micopesticidas comerciais

Crucial em todo programa de controle de qualidade é a etapa de amostragem. Elas podem ser feitas tanto com o material não formulado (preparações) quanto com as formulações. Se amostras pouco representativas do micopesticida forem selecionadas, os resultados das análises de nada valem. Se feita com amostras representativas, é possível avaliar de forma confiável se o produto atende às especificações preestabelecidas.

7.7.1 Amostragens realizadas pelas biofábricas

As amostragens de micopesticidas realizadas nas biofábricas, antes da comercialização, são muito importantes. Esses protocolos internos não são padronizados, cabendo a cada biofábrica definir a melhor forma de realizá-los, incluindo frequência, número e tamanho de amostras, assim como os métodos estatísticos para avaliação dos resultados. Tudo deve ser conduzido por pessoas treinadas. Nas tabelas 2 e 3, por exemplo, foram citados alguns procedimentos de amostragem adotados por duas biofábricas estrangeiras. Os procedimentos discutidos no tópico 7.7.2 também poderão ser adotados. Uma vez concluída a amostragem, é importante destacar que a realização de alguns dos ensaios, por laboratórios independentes, é uma estratégia que pode ser adotada pelas biofábricas.

7.7.2 Amostragens realizadas por agentes públicos (fiscalização)

A principal finalidade das amostragens discutidas neste item é checar, por agentes públicos, se o que está sendo comercializado está em consonância com as especificações do produto. Constitui-se, portanto, numa camada adicional de proteção ao usuário final. Infelizmente ainda há uma grande lacuna na literatura acerca do assunto. O documento que aborda com detalhes os procedimentos de amostragem de produtos fitossanitários é uma publicação internacional preparada pela FAO e pela OMS, chamada **Manual on Development and Use of FAO and WHO Specifications for Pesticides** – First edition (2002). Embora as orientações sejam direcionadas para produtos químicos, muitos princípios e procedimentos apresentados são igualmente válidos para os biopesticidas. Alteramos poucos procedimentos visando torná-los mais práticos para a realidade brasileira, incluindo parâmetros como o tamanho de embalagens e amostras. Em primeiro lugar, é importante destacar que as amostragens de produtos comerciais podem ser realizadas em qualquer ponto na cadeia de distribuição, como na própria fábrica, durante o transporte ou nos pontos de venda. Em nosso entendimento, amostragens de produtos não devem ser conduzidas nas propriedades rurais, já que não há garantias de que, após aquisição pelo produtor rural, o micopesticida tenha sido transportado e armazenado durante todo o período pós-compra conforme recomendações do fabricante. O fiscal deve ter conhecimento sobre procedimentos de amostragem, possibilitando assim que amostras representativas sejam analisadas *in loco* e/ou submetidas para análise em laboratório especializado.

Lotes de produto que não estejam claramente identificados por um código poderão ser amostrados como se fossem mais de um lote. Lotes muito grandes (> 5 t.), já empacotados ou a granel, também poderão, a critério do fiscal, ser amostrados como se fossem mais de um lote. Cada lote deverá ser amostrado separadamente, devendo-se obter uma amostra composta, formada a partir de amostras primárias, cada uma delas obtida aleatoriamente num ponto distinto do lote. A amostra composta deverá ser muito bem homogeneizada, devendo conter, no mínimo, 300 g ou mL para produtos não formulados (preparações) ou formulações. O número de amostras primárias para se chegar à amostra composta varia em função do tamanho do lote: até 5 embalagens, coletar uma amostra primária de cada uma delas; entre 6 e 100 embalagens, coletar uma amostra primária para cada

cinco unidades; acima de 100 embalagens, coletar uma amostra primária para cada 10 unidades. No caso de produtos armazenadas ou transportados a granel, 15 amostras primárias deverão ser aleatoriamente coletadas.

Posteriormente, para cada amostra composta devidamente uniformizada, deverão ser obtidas três amostras laboratoriais iguais, sendo que cada uma não poderá conter menos de 100 g ou 100 mL. Em função da natureza dos micopesticidas, muitos dos quais constituídos por propágulos pouco longevos, é imperativo que os produtos sejam analisados *in loco* e/ou rapidamente submetidos para laboratório especializado. No caso de produtos empacotados a vácuo ou com empacotamento ativo (uso de sachês absorvedores de oxigênio e/ou vapor d'água no interior da embalagem), a mera remoção do produto do interior da embalagem já altera algumas propriedades físico-químicas e reduz sua vida de prateleira, razão pela qual este tipo de produto deverá ser analisado rapidamente. Uma vez em laboratório especializado, os produtos cuja qualidade independe da embalagem deverão ser armazenados conforme as recomendações contidas nos rótulos até a realização das análises pertinentes, as quais deverão, obrigatoriamente, ser feitas dentro do prazo de validade do produto. No documento da FAO/OMS, o qual foca em agrotóxicos químicos, recomenda-se que uma das amostras seja enviada para laboratório especializado, que outra seja retida por uma entidade custodiadora escolhida de comum acordo entre as partes, e que a terceira amostra seja retida pelo responsável técnico do produto sob análise. Cada amostra é acompanhada por um Relatório de Amostragem, o qual conterá o nome da biofábrica, nome do produto comercial, data de fabricação do lote, código e volume do lote. Para as amostras a serem enviadas para análise laboratorial informa-se se o número de embalagens amostradas, o número de amostras primárias para confecção da amostra composta, data e assinaturas do fiscal e do proprietário/representante da biofábrica, dentre outros dados.

Com relação à análise da qualidade das embalagens, o número a ser amostrado para análise externa dependerá do tamanho do lote. Lote constituído por até 5 unidades (embalagens ou *containers*), todas as unidades devem ser analisadas. Entre 6 e 100 unidades, cinco devem ser aleatoriamente selecionadas. Para lotes com mais de 100 unidades, uma em cada 50 deve ser examinada. Essas análises devem verificar se as embalagens estão de acordo com a especificação do produto (tamanho e tipo de material, peso final, se o rótulo está devidamente afixado e se a informação está clara e em conformidade com o registro), se há a presença de furos, sinal de vazamento pela tampa ou deformação da embalagem.

8. Ensaio para o controle de qualidade de micopesticidas destinados ao manejo de invertebrados-praga

Até a presente data não há uma proposta harmonizada que aborde os ensaios a serem considerados para o controle de qualidade de micopesticidas comerciais destinados ao manejo de invertebrados. A seguir apresentaremos uma proposta que nos soa satisfatória, focada nos parâmetros de qualidade amplamente discutidos no tópico 7. Também, no tópico anterior, foram discutidos alguns protocolos detalhados relacionados a cada um desses parâmetros, razão pela qual sua leitura é fortemente recomendada antes que o leitor avance sobre os itens a seguir.

8.1 Produtos para o controle biológico inundativo de invertebrados

Conforme abordado no tópico 3, produtos à base de propágulos infectivos são normalmente destinados ao controle biológico inundativo. Atualmente, quase 90% dos micopesticidas registrados no Brasil para o controle de invertebrados têm os conídios aéreos como ingredientes ativos, sendo os

principais propágulos infectivos produzidos em grãos cozidos e em outros substratos sólidos. Num futuro próximo, acreditamos que micopesticidas constituídos, majoritariamente, por propágulos infectivos produzidos via fermentação líquida, principalmente blastosporos e conídios submersos, estarão também disponíveis no mercado brasileiro. Independentemente da natureza da fermentação praticada pela biofábrica e do produto obtido, há inúmeros parâmetros que podem e devem ser avaliados visando ao adequado controle de qualidade. A figura 19 traz uma relação desses parâmetros, indicando aqueles obrigatórios e os recomendáveis.

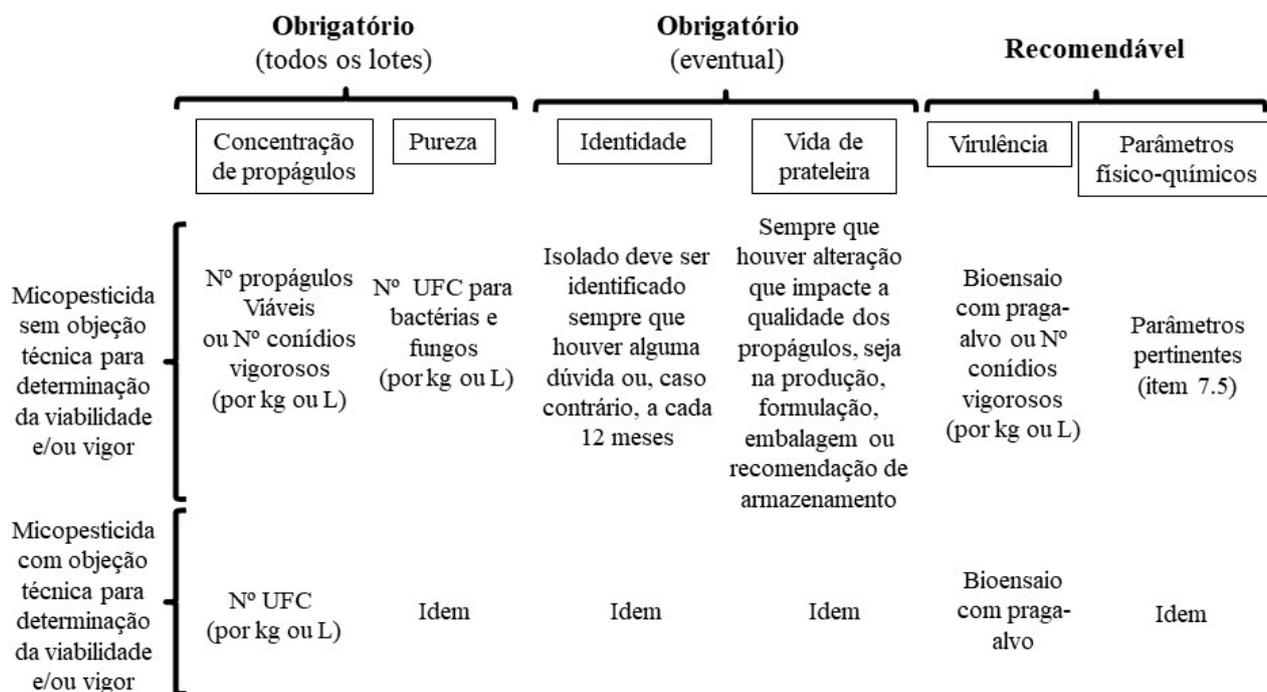


Figura 19. Representação esquemática dos parâmetros obrigatórios e recomendáveis visando ao controle de qualidade de micopesticidas (preparações e formulações) comerciais constituídos por propágulos infectivos, empregados na estratégia inundativa de controle biológico.

A seguir, focaremos nossa discussão na obrigatoriedade ou não das avaliações sugeridas. Para os micopesticidas para os quais é tecnicamente possível a determinação da viabilidade e vigor (mesmo que, atualmente, os rótulos dos produtos expressem a concentração na forma de UFC), as biofábricas deveriam avaliar a concentração desses parâmetros (preferencialmente, do vigor em produtos constituídos por conídios aéreos) em todos os lotes produzidos. Recomenda-se que, sempre que possível, as biofábricas optem pelo desenvolvimento de produtos sem adoção da metodologia UFC para determinação da concentração de ingrediente ativo, já que ela não possibilita a aferição do vigor dos esporos produzidos. Sugere-se a continuidade na adoção da metodologia UFC apenas para os produtos para os quais ainda não há metodologias disponíveis para determinação direta da viabilidade ou vigor. A pureza é outro parâmetro muito relevante para o controle de qualidade. Seria inadmissível a comercialização de um lote de micopesticida com níveis de contaminação acima de limites máximos preestabelecidos, o que explica a necessidade de sua realização em todos os lotes fabricados.

A identidade do agente biológico deverá ser estabelecida durante o desenvolvimento do micopesticida (antes do registro) e, posteriormente, sempre que necessário, conforme informado na figura 19. Independentemente do micopesticida, a identidade do isolado deverá ser confirmada ao menos uma vez a cada 12 meses. A exigência quanto à identificação do fungo poderá ser des-

necessária caso o fabricante adquira ou tenha contrato com empresa idônea para o fornecimento anual de placas com culturas puras, identificadas por meio de marcadores moleculares cientificamente validados, à exceção das espécies cuja identificação exclusivamente morfológica ainda seja possível, a exemplo de *M. rileyi*. Ensaios para a identificação de isolados deverão ser adotados tão logo estejam disponíveis. Da mesma forma, ensaios de vida de prateleira deverão ser conduzidos durante o desenvolvimento do micopesticida e, posteriormente, somente se houver mudanças que possam afetar parâmetros relevantes, a exemplo da concentração de propágulos viáveis ou vigorosos no produto comercial, ao longo de sua vida útil.

Embora neste momento de transição sugere-se que a avaliação da virulência e dos aspectos físico-químicos relacionados à preparação/formulação não sejam obrigatórios, recomenda-se que sejam considerados sempre que possível. Dependendo do tipo do produto e praga-alvo, a virulência poderá ser estimada por bioensaios com pragas-alvo ou através da determinação da concentração de conídios vigorosos. Uma situação indesejável seria aquela de produtos destinados ao controle de pragas de complexa ou mesmo impossível realização de bioensaios, e para os quais a estimativa da concentração de conídios vigorosos não seja possível, o que inviabilizaria as tentativas de avaliação da virulência. Para estes casos, uma alternativa seria a realização de bioensaios com espécies taxonomicamente próximas ao alvo ou, preferivelmente, o desenvolvimento de novo micopesticida com concentração conhecida de propágulos vigorosos. A vantagem da última opção recai também sobre o fato de que, ao avaliar a concentração de propágulos vigorosos para todos os lotes produzidos, a virulência estaria sendo automaticamente estimada para todos os lotes fabricados. Por último, a necessidade de medição dos parâmetros físico-químicos varia conforme a preparação ou formulação. A estimativa do teor de água, por exemplo, é bastante indicada para produtos sólidos. Esse parâmetro está associado ao nível de contaminação e à vida de prateleira, devendo, portanto, ser mantido dentro de limites bem definidos. Para formulações líquidas, caberia a cada biofábrica definir os parâmetros físico-químicos mais relevantes para a garantia da qualidade dos seus produtos.

8.2 Produtos para o controle biológico inoculativo de invertebrados

Ainda que menos comum, os micopesticidas comerciais podem ser comercializados para o controle de pragas através da estratégia inoculativa, desde que demonstrado inequivocamente que o princípio ativo consiga sobreviver no ambiente onde liberado e, posteriormente, que produza estruturas infectivas em quantidade suficiente para levar à redução populacional da praga-alvo (ver tópico 3). Para tais produtos, embora possa haver a presença de propágulos infectivos, o princípio ativo poderá ser constituído majoritariamente por outros propágulos, como aglomerados de hifas (micélio, microescleródios) e clamidósporos. À exceção da Virulência, os parâmetros que devem ser considerados no controle de qualidade desses produtos são os mesmos discutidos no tópico 8.1.

9. Considerações finais

Conforme buscamos deixar claro ao longo dessa publicação, nenhum micopesticida entregará os resultados prometidos caso não atinja padrões mínimos de qualidade que tenham sido muito bem estabelecidos. Especificações ruins geram produtos ruins e, por esse motivo, buscamos apresentar padrões mínimos de qualidade para os principais parâmetros relacionados ao controle de qualidade de produtos destinados ao manejo de invertebrados. Esperamos que os parâmetros, padrões e metodologias aqui discutidos possam ser amplamente adotados, possibilitando uma harmonização de conceitos e protocolos hoje inexistentes.

O processo de desenvolvimento de micopesticidas deve ser iniciado com a seleção de isolado taxonomicamente conhecido e virulento e, após várias etapas, ser finalizado com uma preparação ou formulação contendo satisfatória concentração de princípio ativo e baixo grau de contaminação ao longo de sua vida de prateleira. O que mais reforçamos neste documento é a importância da qualidade do propágulo fúngico, pois na principal modalidade de controle microbiano adotada no Brasil (CB inundativo), o propágulo só pode ser considerado como “princípio ativo” quando possuir elevada qualidade, o que permitirá que seja, de fato, infectivo ao alvo. Além de subsidiar as biofábricas de todos os portes, esperamos que as informações, aqui apresentadas, possam colaborar com pesquisadores de órgãos públicos e empresas privadas que estudam ou trabalham no desenvolvimento de micopesticidas.

A natureza ousada da presente publicação certamente suscitará inúmeras discussões técnicas, o que será bastante salutar para o constante aperfeiçoamento das informações e protocolos abordados. Certamente que atualizações serão necessárias, mesmo porque deveremos observar no mercado brasileiro o registro de novas espécies e isolados de fungos de invertebrados, alguns dos quais com peculiaridades ou formulações que não foram aqui tratadas e, que, portanto, poderão demandar protocolos específicos.

Por fim, gostaríamos de deixar claro que essa publicação não visa endossar a utilização de qualquer espécie de fungo, isolado, preparação, formulação ou marca comercial de reagentes que, porventura, tenham sido mencionados. O intuito principal da nossa equipe sempre será disponibilizar informações imparciais e confiáveis para que, de forma contínua e sustentável, micopesticidas cada vez melhores possam estar à disposição de nossos agricultores e pecuaristas.

10. Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. (Brasil). **Guia para determinação de prazos de validade de alimentos**. Guia nº 16/2018, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2018.

ALVES, L. F. A.; NEVES, P. M. J. O.; FARIA, M. R. de. **Recomendações para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas**. Piracicaba: CP 2: Rede Entomofungo, 2010. 52 p.

ALVES, R. T.; FARIA, M. R. de. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. 50 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 286).

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Agrotóxico e afins: determinação da estabilidade da emulsão**. NBR 13452, Terceira Edição. 2016.

BERNHARD, K.; HOLLOWAY, P. J.; BURGESS, H. D. A catalogue of formulation additives: function, nomenclature, properties and suppliers, In: BURGESS H. D. (Ed.) **Formulation of Microbial Biopesticides**. Dordrecht, Kluwer. 1998. p. 333-365.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011. Estabelece o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal**. Diário Oficial [da] União: Brasília, DF, seção 1,07 out. 2002.

BUTT, T. M.; WANG, C.; SHAH, F.A.; HALL, R. Degeneration of entomogenous fungi. In: EILENBERG, J.; HOKKANEN, H. M. T. (Eds) **An ecological and societal approach to biological control**. Dordrecht, Springer. 2006. p. 213-226.

COUCH, T. L.; IGNOFFO, C. M. **Formulation of insect pathogens**. In: BURGESS, H. D. (Ed.) **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. New York: Academic Press. 1981. p. 621-633.

CROPLIFE INTERNATIONAL. **Catalogue of pesticide formulation types and international coding system**. Technical Monograph, 5. ed., n 2. 2002.

de la TORRE, M.; CÁRDENAS-COTA, H. M. Production of *Paecilomyces fumosoroseus* conidia in submerged culture. **Entomophaga**, v.41, p. 443-453, 1996.

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **Biocontrol**, v.46, p.387-400, 2001.

- FAO/WHO. **Manual on development of FAO and WHO specifications for pesticides**. 1 ed. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2002. 173 p. (FAO Plant Production and Protection Papers)
- FARIA, M.; 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.
- FARIA, M.; HAJEK, A. E.; WRAIGHT, S. P. Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*, and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v.51, n.3, p.346-354, 2009.
- FARIA, M.; HOTCHKISS, J.H.; WRAIGHT, S.P. Application of modified atmosphere packaging (gas flushing and active packaging) for extending the shelf life of *Beauveria bassiana* conidia at high temperatures. **Biological Control**, v.61, p.78-88, 2012.
- FARIA, M.; SOUZA, D.A.; LOPES, R.B. Microbial control of *Leptopharsa heveae* Drake & Poor (Hemiptera: Tingidae) in Brazilian rubber tree plantations: a brief historical account and identification of entomopathogenic fungi by means of multigene phylogeny. **Neotropical Entomology**. 2020. Published online. (DOI 10.1007/s13744-020-00808-4)
- FARIA, M.; HOTCHKISS, J.H.; HAJEK, A.E.; WRAIGHT, S.P. Debilitation in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and implication with respect to viability determinations and mycopesticide quality assessments. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.105, p.74-83, 2010
- 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.; MARTINS, I.; SOUZA, D.A.; MASCARIN, G.M.; LOPES, R.B. Susceptibility of the biocontrol fungi *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma asperellum* (Ascomycota: Hypocreales) to imbibitional damage is driven by conidial vigor. **Biological Control**, v.107, p.87-94, 2017.
- 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**, no prelo.
- FERREIRA, J. M. S.; SANTOS, F. J. dos; PIMENTA, L. R.; SANTANA, A. V.; TALAMINI, V. **Técnicas para produção artesanal e utilização do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no campo**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2019. 13 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico, 225).
- FRANCO, C. M. A. **Liquid media for chlamydospore production of the fungus *Pochonia chlamydosporia***. Depositante: Carlos Manuel Antunes Franco. WO2007031949A22006. Depósito: 13 set. 2005. Concessão: 13 set. 2006.
- GHAHREMANI, Z.; ESCUDERO, N.; SAUS, E.; GABALDON, T.; SORRIBAS, F. J. *Pochonia chlamydosporia* induces plant-dependent systemic resistance to *Meloidogyne incognita*. **Frontiers in Plant Science**, v.10, p.945, 2019. (DOI 10.3389/fpls.2019.00945).
- HARMAN, G.E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v.96, p.190-194, 2006.
- HEDGECOCK, S.; MOORE, D.; HIGGINS, P.M.; PRIOR, C. Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in an oil formulation. **Biocontrol Science and Technology**, v.5, p.371-377, 1995.
- HEGEDUS, D. D.; BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.641-647, 1990.
- INGLIS, P. W.; MELLO, S. C. M.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; MACÊDO, K.; SIFUENTES, D. N.; VALADARES-INGLIS, M. C. *Trichoderma* from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: *Trichoderma azevedoi* and *Trichoderma peberdyi*. **PLOS ONE**, v.15, n.3, e0228485, 2020. (DOI 10.1371/journal.pone.0228485).
- IWANICKI, N.S.; MASCARIN, G.M.; MORENO, S.G.; EILENBERG, J.; DELALIBERA JR., I. Growth kinetic and nitrogen source optimization for liquid culture fermentation of *Metarhizium robertsii* blastospores and bioefficacy against the corn leafhopper *Dalbulus maidis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.1-13, 2020. (DOI 10.1007/s11274-020-02844-z).
- JACKSON, M.A.; JARONSKI, S.T. **Composition of entomopathogenic fungus and method of production and application for insect control**. Depositante: Mark A. Jackson; Stefan T. Jaronski. WO2009035925A2. Depósito: 13 set. 2007. Concessão: 09 maio 2008.
- JACKSON, M. A.; KOBORI, N. N.; BEHLE, R. W.; DELALIBERA JR, I. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.127, p.11-20, 2015. (DOI 10.1016/j.jip.2014.12.001).
- JARONSKI, S. T.; MASCARIN, G. M. Mass production of fungal entomopathogens. In: LACEY, L. A. (Ed.). **Microbial Agents for Control of Insect Pests: from theory to practice**. [S.l.]: Elsevier, Academic Press, 2016.

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.

JONES, K. A.; BURGESS, H. D. Technology of formulation and application. In: BURGESS, H. D. (Ed.) **Formulation of Microbial Biopesticides**. Dordrecht, Kluwer, 1998. p. 7-30.

KERRY, B. R.; BOURNE, J. M. (ed.). **A manual for research on *Verticillium chlamydosporium*, a potential biological control agent for root-knot nematodes**. Gent: International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants, West Palearctic Regional Section (IOBC/WPRS), 2002. 84p.

LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M. de; ALVES, S. B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A.S. Pinto, 2003. 92 p.

LEWIS, J. A.; PAPAIVIZAS, G. C. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media. **Soil Biology and Biochemistry**, v.15, n.3, p.351-357, 1983.

LOPES, R. B.; MARTINS, I.; SOUZA, D. A.; FARIA, M. Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.112, p.236-242, 2013.

LOPES, R. B.; FARIA, M.; SOUZA, D. A.; BLOCH JR, C.; SILVA, L. P.; HUMBER, R. A. MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect-pathogenic fungi from the *Metarhizium anisopliae* complex. **Mycologia**, v.106, n.4, p.865-878, 2014.

LOPES, R. B.; PAULI, G.; MASCARIN, G. M.; FARIA, M. Protection of entomopathogenic conidia against chemical fungicides afforded by an oil-based formulation. **Biocontrol Science and Technology**, v.21, n.2, p.125-137, 2011.

LOPES, R. B.; FARIA, M. Influence of two formulation types and moisture levels on the storage stability and insecticidal activity of *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, v.29, n.5, p.437-450, 2019.

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 Microbiology Letter**, v.321, p.141-149, 2011.

LUZ, C.; ROCHA, L. F. N.; CRISTIAN, M.; SOUZA, D. A.; BOTELHO, A. B. R. Z.; LOPES, R. B.; FARIA, M.; DELALIBERA JR, I. *Metarhizium humberi* 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, 107216, 2019.

MARTÍNEZ-MEDINA, A.; FERNANDEZ, I.; LOK, G. B.; POZO, M. J.; PIETERSE, C. M.; VAN WEES, S. C. Shifting from priming of salicylic acid- to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **New Phytologist**, v.313, p.1363-1377, 2017.

MAGALHÃES, B.; FARIA, M.; FRAZÃO, H. A technique to estimate the conidial viability of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes) formulated in vegetable oil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, n.3, p.569-572, 1997.

MASCARIN, G. M.; JACKSON, M. A. **Stable fungal blastospores and methods for their production, stabilization and use**. Patent Application, USDA Docket No. 22.14. PCT number: US2015049673. 2016.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.32, n.11, p177, 2016. (DOI 10.1007/s11274-016-2131-3)

MASCARIN, G. M.; JACKSON, M. A.; BEHLE, R. W.; KOBORI, M. M.; DELALIBERA JR, I. Improved shelf life of dried *Beauveria bassiana* blastospores using convective drying and active packaging processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, p.8359-8370, 2016.

MASCARIN, G. M.; JACKSON, M. A.; KOBORI, N. N.; BEHLE, R. W.; DELALIBERA JR, I. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.127, p.11-20, 2015.

MENT, D.; GINDIN, G.; GLAZER, I.; PERL, S.; DANI, E.; SAMISH, M. *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. **IOBC/WPRS Bulletin**, v.45, p.303-306, 2009.

MENT, D.; GINDIN, G.; GLAZER, I.; PERL, S.; ELAD, D.; SAMISH, M. The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. **Fungal Biology**, v.114, n.1, p.49-56, 2010.

- MONGKOLSAMRIT, S.; KHONSANIT, A.; THANAKITPIPATTANA, D.; TASANATHAI, K.; NOISRIPOOM, W.; LAMLERTTHON, S.; HIMAMAN, W.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A.; LUANGSA-ARD, J. Revisiting *Metarhizium* and the description of new species from Thailand. **Studies in Mycology**, v.95, p.171-251, 2020.
- MONNERAT, R.; 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, DF: 2020. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / Documentos, 369).
- NAHAR, P. B.; KULKARNI, S. A.; KULYE, M. S.; CHAVAN, S. B.; KULKARNI, G.; RAJENDRAN, A.; YADAV, P. D.; SHOUCHE, Y.; DESHPANDE, M. V. Effect of repeated in vitro sub-culturing on the virulence of *Metarhizium anisopliae* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biocontrol Science and Technology**, v.18, n.4, p.337–355, 2008.
- OECD. **OECD issue paper on microbial contaminant limits for microbial pest control products**. OECD Environment, Health and Safety Publications. 2014. (Series on Pesticides and Biocides, 65). Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264221642-en>.
- 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.
- PINTO, Z. V.; LUCON, C. M. M.; BETTIOL, W. Controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Trichoderma*, In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da (Ed.). **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p.275-295.
- POVEDA, J.; ABRIL-URIAS, P.; ESCOBAR, C. Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: *Trichoderma*, mycorrhizal and endophytic fungi. **Frontiers in Microbiology**, v.11, p.992, 2020. (DOI 10.3389/fmicb.2020.00992)
- PRIOR, C.; CAREY, M.; ABRAHAM, Y.J.; MOORE, D.; BATEMAN, R.P. Development of a bioassay method for the selection of entomopathogenic fungi virulent to the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). **Journal of Applied Entomology**, v.119, p.567-573, 1995.
- RAVENSBERG, W. J. **A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods**. Dordrecht ; London : Springer, c2011. xxv, 383 p. ill. ; 25 cm. (Progress in biological control, 10)
- ROBERTS, D. W. World picture of biological control of insects by fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.89-100, 1989.
- SOUZA, D. A.; LOPES, R. B.; HUMBER, R. A.; FARIA, M. Assessment of the diversity of Brazilian entomopathogenic fungi in the genus *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.171, p.107339, 2020.
- VALADARES-INGLIS, M. C. C.; LOPES, R. B.; FARIA, M. Controle de artrópodes-praga com fungos entomopatogênicos, In: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. cap. 7, p. 201-236.
- VEGA, F. E.; JACKSON, M. A.; MCGUIRE, M. R. Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Mycopathologia**, v.147, p.33-35, 1999.
- XAVIER-SANTOS, S.; LOPES, R. B.; FARIA, M. Emulsifiable oils protect *Metarhizium robertsii* and *Metarhizium pingshaense* conidia from imbibitional damage. **Biological Control**, v.59, p.261-267, 2011.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

