



ESTUDO EXPERIMENTAL DE ESTABILIDADE ACELERADA PARA BIODEFENSIVOS LÍQUIDOS E SEM FORMULAÇÃO À BASE DE *Bouvera bassiana*.

EXPERIMENTAL STUDY OF ACCELERATED STABILITY FOR LIQUID BIODEFENSIVES WITHOUT FORMULATION BASED ON *Bouvera bassiana*.

Hugo Raphael Mendes da Silva¹ i
Kerley Cristiane Victorino Romão² ii

Data de submissão: (07/12/2023) Data de aprovação: (29/04/2024)

RESUMO

A nova Portaria Conjunta do Ministério da Agricultura, IBAMA e ANVISA estabelece os procedimentos exclusivos para o registro de produtos microbiológicos para controle de pragas. Contudo, apesar de não fornecer dados ou protocolos de referência, exige-se que após o registro do produto, sejam realizadas análises a respeito da qualidade e estabilidade dos biodefensivos. Um protocolo preliminar foi desenvolvido com base em literaturas sobre estabilidade acelerada para cosméticos e produtos biológicos da indústria farmacêutica, usando amostras testes de um novo defensivo biológico e sem formulante, produzido em fermentação no estado líquido com o fungo *Bouvera bassiana* - IBC66 como princípio ativo. Os estudos prévios demonstraram que o tempo de prateleira do produto poderia ser de 28 dias em temperaturas entre 25 °C a 30 °C ou 48 dias caso o produto fosse armazenado sob refrigeração de até 5°C.

Palavras-chave: estabilidade acelerada; *Bouvera bassiana* - IBC66; bioinseticidas; assuntos regulatórios; fungos.

ABSTRACT

The new Joint Ordinance of the Ministry of Agriculture, IBAMA and ANVISA establishes the exclusive procedures for the registration of microbiological products for pest control. However, although it does not provide data or reference protocols, it is required that after the registration of the product, analyses regarding the quality and stability of the biopesticides are performed. A preliminary protocol was developed based on literature on accelerated stability for cosmetics and biological products of the pharmaceutical industry, using test samples of a new biological pesticide and without a formulant produced in liquid fermentation with the fungus *Bouvera bassiana* - IBC66 as active ingredient. Previous studies have shown that the shelf life of the product could be 28 days at temperatures between 25 °C and 30 °C or 48 days if the product was stored under refrigeration of up to 5 °C.

¹ Graduado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e aluno da Faculdade de Tecnologia SENAI Mario Amato E-mail: hrmdasilva@gmail.com

² Mestre em Ciências da Saúde e professora da Faculdade de Tecnologia SENAI Mario Amato. E-mail: kerley.romao@sp.senai.br



Keywords: accelerated stability; *Bouvera bassiana* - IBC66; bioinsecticides; regulatory affairs; fungi.

1 - INTRODUÇÃO

O controle de pragas, principalmente em plantações, não é uma prática exclusiva da sociedade moderna. Povos antigos como gregos, romanos e até mesmo orientais já buscavam metodologias para o controle de insetos-praga ao usar substâncias naturais como óleos essenciais, raízes de plantas, cinzas e até mesmo enxofre (Braibante; Zappe, 2012).

O primeiro pesticida sintético no mundo, com relatos comprovados, foi utilizado por fazendeiros dos estados de Illinois e Indiana, nos Estados Unidos, em 1867, ao observar que o produto químico "Paris Green," usado para tingir roupas, também conseguia matar algumas espécies de insetos (Holton, 1926).

Como uma tentativa desesperada de salvar suas lavouras da praga *Leptinotarsa decemlineata* (Jacques, 1998), comumente conhecido como escaravelho-da-batata, e sabendo de sua ação inseticida, o produto, Paris Green, foi utilizado em experimento ao combate desse tipo inseto (Holton, 1926). Devido aos resultados satisfatórios, o produto químico até então utilizado para tingir roupas, passou a ser preferência não somente no combate ao escaravelho-da-batata, como também passou a ser utilizado para outras espécies de insetos-praga das lavouras americanas e até mesmo no controle de nematoides (Holton, 1926).

Anos mais tarde, descobre-se que ação inseticida do produto para tingimento de roupas, Paris Green, provinha da alta composição de arsênio na sua formulação (Emsley, 2006), levando a comunidade científica ao questionamento do uso demasiado do produto na agricultura e sua absorção direta e indireta pela sociedade a longo prazo (Mackay et al, 1934; Walsh; Keeney, 1975). No entanto, somente no século XX que o desenvolvimento dos pesticidas sintéticos começou a acelerar, entre os anos de 1940 e 1950, tornando-se o DDT - dicloro difenil tricloroetano (OMS, 1982) - o pesticida mais popular e amplamente utilizado no mundo para combater insetos causadoras de doenças em plantas e outros insetos vetores de doenças em humanos (Beard, 2005; Kinkela, 2013)

Contudo, somente em 1960, com o desenvolvimento e expansão da indústria química, associada ao melhoramento genético de plantas, criação de técnicas de irrigação e métodos de monocultura em larga escala, que o uso de agrotóxicos (pesticidas, herbicidas, fungicidas etc.) sofreram uma explosão na agricultura mundial e popularmente ficou conhecida como a revolução verde, uma revolução vista como solução para o aumento da produtividade e oferta de alimentos no mundo (Albergoni; Pelaez, 2007; Kinkela, 2013).

Não obstante, por ser um país essencialmente vinculado a commodities, a agricultura no Brasil cresceu juntamente com o desenvolvimento desenfreado dos agrotóxicos durante a revolução verde, entre os anos de 1960 e 1970 (Octaviano, 2010), podendo, até mesmo, por assim dizer, que o país se tornou um grande viveiro experimental devido a introdução massiva desses tipos de defensivos agrícolas (Lignani; Brandão, 2022). O que leva o governo federal, em 1975, a iniciar a regulamentação do uso e registro dos pesticidas, criando a Lei dos Agrotóxicos (Sousa et al, 2022), sendo mais tarde atualizada com a lei nº 7.802/89 de 1989, que melhor regulamentava o uso desses produtos no país (Sousa et al, 2022).

Em 1994, a agricultura no mundo passa por mais uma transformação radical. Nos Estados Unidos é autorizada comercialização de sementes geneticamente modificadas com resistência a insetos e ao herbicida roundup (Pelaez; Schmidt, 2000).

Apesar das polêmicas a respeito das primeiras plantas geneticamente modificadas e por ser um “contraponto” aos agrotóxicos, não houve impedimentos para que o uso dos defensivos agrícolas continuasse em expansão, principalmente no Brasil. Somente em 2022, no país foram registrados mais de 600 novos tipos de agrotóxicos, um aumento de mais de 16% com relação a 2021 (Salati, 2023).

Em contrapartida, na virada do século, no ano 2000, com a solidificação da biotecnologia, das técnicas de bioprocessos, associadas às pesquisas sobre microrganismos causadores de doenças a outras espécies consideradas verdadeiras pragas invasoras das plantações, surge os defensivos biológicos ou popularmente conhecidos como biopesticidas (MAPA, 2022). Uma realidade recente que aos poucos começa a fincar raízes como novo método de controle de pragas alternativo ao uso dos agroquímicos.

Em 2006, no Brasil foi aprovada Instrução Normativa Conjunta nº 3, norma esta que é regulada pela Lei 7.802, de 1989 – Lei dos agrotóxicos e o Decreto 4.074, de 2002 (MAPA, 2006). Essa instrução normativa direciona sobre o registro, rotulagem, armazenamento e comercialização dos defensivos biológicos popularmente conhecidos como biopesticidas. Apesar da instrução de regulamentação, o registro dos biopesticidas no país leva em média 4 anos para ser aprovado, devido as exigências burocráticas de órgãos regulatórios como Anvisa – Agência Nacional de Saúde, MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária e IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, que exigem inúmeros teste, ensaios in vivo de eficácia e, por se tratar de um defensivo agrícola onde o ingrediente ativo é outro microrganismo, também deve-se acusar os impactos causados ao meio ambiente (Barros; Coffani, 2022).

Visando tornar menos burocrático e eficaz o pleito pelo registro de defensivos agrícolas de origem microbiológica, em maio de 2023, a Instrução Normativa Conjunta nº 3 foi revogada e atualizada, uma vez que os órgãos regulamentadores como Anvisa, Mapa e Ibama entraram em consenso sobre a importância da separação definitiva entre os agrotóxicos de origem químico e os defensivos de origem microbiológica. Logo, a partir de 1 de julho de 2023, entrará em vigor e em substituição a Instrução Normativa Conjunta nº 3 a Portaria Conjunta SDA/Mapa - Ibama - Anvisa nº 1/2023, que será utilizada no registro de novos produtos biológicos.

Apesar da nova instrução esclarecer e separar os inseticidas agrícolas de origem microbiológica para uma nova classe de defensivos, os bioinseticidas, ainda não é exigido estudos prévios de estabilidade acelerada para o pleito do registro perante os órgãos fiscalizadores. A nova instrução não esclarece ou compartilha protocolos de como esses estudos de estabilidade acelerada devem ser realizados para com os produtos, uma vez que o princípio ativo é de origem microbiológica e o estudo de estabilidade acelerada para definir o tempo de prateleira do defensivo biológico difere dos estudos já estabelecidos para os agroquímicos. Além disso, a mesma instrução solicita que esses estudos devem ser realizados e mantidos pelo período de 5 anos para futuras revisões desses órgãos.

Portanto, o presente artigo tem como objetivo determinar a capacidade do produto, cujo princípio ativo é o microrganismo *Bouvera bassiana* - IBC66, em manter sua qualidade, eficiência e segurança durante o seu tempo de prateleira pré-estabelecido.



2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Surgimento dos Bioinseticidas

Os primeiros registros científicos sobre microrganismos causadores de doenças em insetos, conhecidos como entomopatogênicos, datam de 1902 no Japão. Nestes primeiros registros, cientistas acreditavam que uma bactéria era responsável pela mortalidade da lagarta *Bombyx mori*, popularmente conhecido como bicho-da-seda. A morte precoce e sempre no estágio larval do inseto, causado por essa bactéria, vinha devastando a economia do país, que tinha a produção de seda um de seus carros-chefes de exportação (Praça et al, 2007). Anos mais tarde, em 1911, pesquisadores alemães também acreditavam que algum tipo de bactéria era responsável pela mortalidade do inseto *Anagasta kuhniella*, o qual era conhecida como traça-da-farinha (Praça et al, 2007). Entretanto, apesar dos primeiros relatos sobre bactérias entomopatogênicas ocorrerem em 1911, somente em 1977 que o uso potencial de microrganismos, principalmente bactérias, para o controle de pragas foi considerado uma alternativa viável, após a comunidade científica comprovar que a mortalidade de certos tipos de lagartas estava associada ao já conhecido *Bacillus thuringiensis* (Bravo et al, 2011). Acreditava-se que após a ingestão de folhas de plantas contaminadas com o *Bacillus thuringiensis*, o inseto perdia o apetite, o que causava o abandono do alimento e consequentemente a morte do hospedeiro (Praça et al, 2007; Bravo et al, 2011).

Ao estudar o ciclo de vida do *Bacillus thuringiensis*, conhecido também como BT, descobriram que uma proteína (proteína Cry) produzida pelo *Bacillus* era responsável pela inanição e consequentemente morte desses insetos. Com a descoberta da potencialidade dessa proteína, iniciou-se o uso massivo desse microrganismo na agricultura, principalmente nos Estados Unidos. Somente em 1998, os EUA possuíam mais de 200 tipos de biopesticidas registrados e com o microrganismo, *Bacillus thuringiensis*, sendo um dos seus princípios ativos (Bravo et al, 2011). Além disso, o desenvolvimento da biotecnologia possibilitou a criação das primeiras culturas transgênicas, ou seja, plantas contendo pedaços de genes codificadores da proteína Cry do *Bacillus thuringiensis* (Praça et al, 2007), o qual conferia à planta modificada uma auto resistência ao ataque de certos tipos de insetos. Um dos exemplos mais bem sucedidos da biotecnologia foi a inserção de plantas transgênicas na agricultura como o milho BT (MAPA, 2022).

No Brasil, os primeiros estudos sobre o uso de organismos vivos para controle de pragas se desenvolveram concomitantemente com o crescimento dos agrotóxicos nos anos de 1950 e 1960, porém de maneira menos expressiva. Um dos casos mais emblemáticos no qual se foi utilizado outros organismos vivos para o controle de pragas foi a importação de um inimigo natural da praga *Diatraea saccharalis*, conhecida como broca da cana-de-açúcar, a *Cotesia flavipes*, uma vespa originária de Trinidad e Tobago que foi introduzida nos canaviais do país como uma forma de conter a infestação do inseto (Diniz; Rodrigues; Rossi, 2008).

A partir dos anos 1990, no Brasil começam os primeiros estudos sobre a viabilidade de utilização de microrganismos como fungos e bactérias no controle de pragas na agricultura. Logo, surgiram os primeiros registros de inseticidas à base de microrganismos, sendo 7 produtos registrados na época e tendo como principal ingrediente ativo o *Bacillus thuringiensis* (BT) (Moraes; Berti Filho, 2005). Devido a crescente utilização do BT como



bioinseticida e sendo um dos primeiros biodefensivos registrados no país, em 1995 começa a primeira tentativa de regulamentação específica para registros desse tipo de defensivo, dando ainda mais potência para a criação da primeira empresa público - privada produtora de defensivos biológicos do país, a Itaforte, em 1996 (Lopes, 2012). A empresa tornou-se especialista no controle e manejo de insetos-praga que afetavam culturas agrícolas como cana, grãos, frutas, flores e hortaliças, além de pastagens através do uso de utilização de fungos e bactérias (Lopes, 2012).

Em 1998, tem-se início os primeiros registros de defensivos biológicos no país, elevando para 18 produtos à base de microrganismos. Destes registros, 14 biodefensivos eram à base de *Bacillus Thuringiensis* e 4 à base de baculovírus (Bettiol e Medeiros, 2023). Atualmente, no mercado brasileiro existe uma gama enorme de defensivos biológicos registrados com os mais diversos tipos de microrganismos como princípio ativo do produto (Bettiol e Medeiros, 2023);

- **Biofungicida:** São mais de 142 tipos de produtos registrado e que possuem como ingrediente principal; *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. subtilis* e *B. velezensis*), *Clonostachys rosea*, *Trichoderma afroharzianum*, *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. reesei*, *T. stromaticum* e *T. viride*)
- **Biobactericidas:** Foram registrados 17 produtos à base de *Bacillus subtilis* sp.
- **Bionematicidas:** Atualmente estão registrados 96 tipos de produtos à base de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. methylotrophicus*, *B. paralicheniformis*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *Paecilomyces lilacinus*, *Pasteuria nishizawae*, *Purpureocillium lilacinus*, *Trichoderma endophyticum* e *T. harzianum*.
- **Bioinseticidas:** Estão registrados 95 produtos à base de *Beauveria bassiana*, 91 produtos à base de *Metarhizium anisopliae*, 44 produtos à base *Bacillus thuringiensis*, 14 produtos à base de *Baculovirus anticarsia*, 8 produtos com *Isaria fumosorosea* como princípio ativo, entre outros.
- **Biocaricidas:** 76 produtos à base de *Beauveria bassiana*.

É inegável o aumento expressivo dos biopesticidas no Brasil, principalmente quando comparado com os primeiros registros em 1995. Contudo, ainda há muitos desafios a serem enfrentados, principalmente com relação a regulamentação e leis que amparem de forma menos burocrática os registros desse tipo de produto.

2.2 Regulamentação dos defensivos biológicos no Brasil.

Apesar da a lei nº 7.802/89 ter se tornado um marco na regulamentação dos agrotóxicos no país, ela também se tornou o “calcanhar de Aquiles” para a regulação dos defensivos agrícolas à base de microrganismos. Uma vez que esta lei se torna abrangente para além de defensivos à base de produtos químicos (MAPA, 2022). Conforme artigo 2º, parágrafo 1º da lei nº 7.802/89:



“Art. 2º Para os efeitos desta Lei, consideram-se:

I - Agrotóxicos e afins:

- a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos...” (Brasil, 1989).

Conforme entendimento do artigo citado acima, os defensivos agrícolas à base de microrganismos também se enquadravam aos agrotóxicos químicos. Portanto, devido esta consideração, o registro dos bio defensivos tornava-se extenso e oneroso burocraticamente até sua disponibilização para o agricultor (Diniz; Rodrigues; Rossi, 2008).

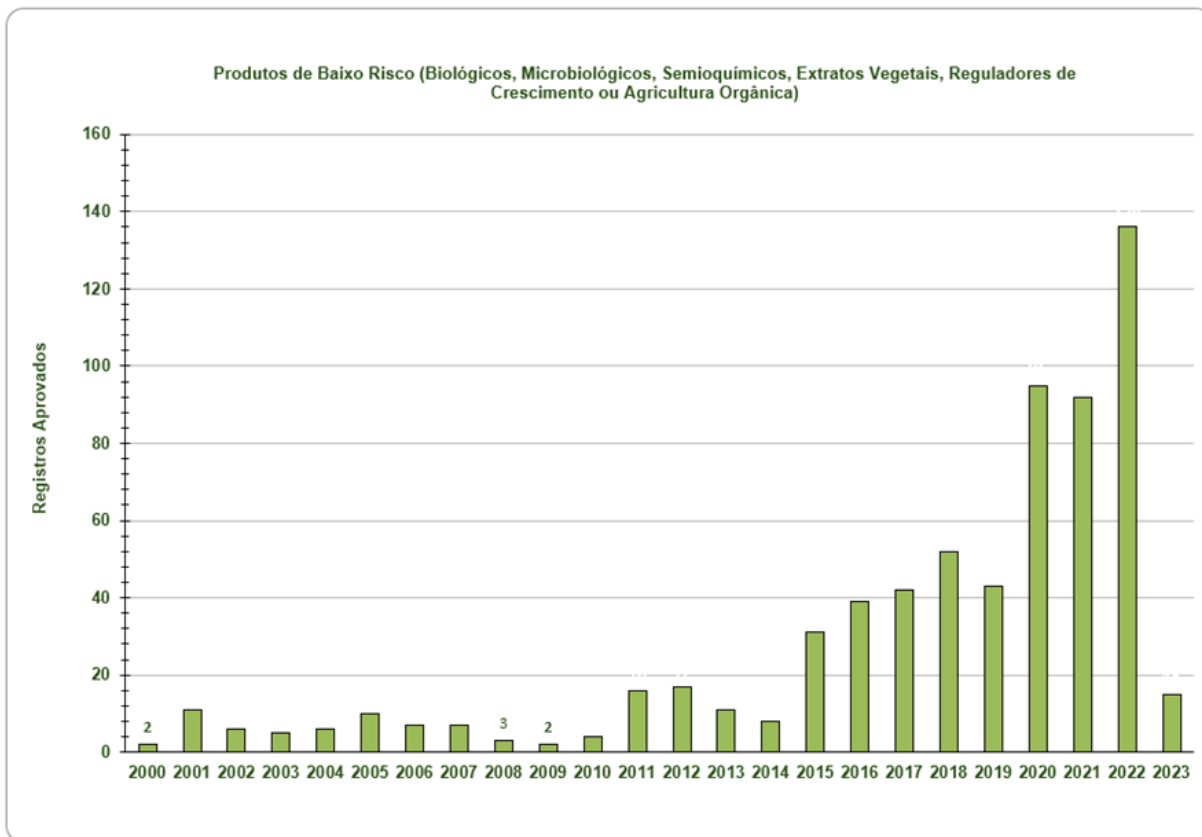
No entanto, com a expansão dos defensivos biológicos no país e o entendimento sobre o baixo impacto ambiental e social causado quando comparado aos agrotóxicos, leva o governo federal a “afrouxar” o registro desses produtos com o decreto nº 4.074/2002, o qual explicita que produtos de baixa toxicidade e periculosidade devem ter a avaliação dos seus pleitos de registro priorizada (Brasil, 2002). Ou seja, os órgãos responsáveis pela liberação do registro de defensivos agrícolas no país devem priorizar e agilizar o registro de defensivos à base de microrganismos, uma vez que os danos causados tanto a natureza, quanto a sociedade são infimamente menores quando comparados aos agrotóxicos de origem química.

Em 2006, visando facilitar ainda mais os registros dos bio defensivos no país, foi criado a instrução normativa conjunta nº 3. Está instrução com base sustentada na lei nº 7.802/89 e decreto nº 4.074/2002, juntamente com auxílio dos órgãos regulamentadores; Anvisa – Agência Nacional de Saúde, MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária e IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, estabelece regras para o registro desse tipo de produto, que antes utilizava-se os mesmos protocolos de registro dos defensivos sintéticos/químicos devido a lei nº 7.802/89, regulamentando e facilitando, assim, o registro desses defensivos (Brasil, 2006).

A Instrução Normativa Conjunta Nº 3, de 10 de março de 2006, possui protocolos bem definidos e estabelece os órgãos responsáveis pela fiscalização e registro dos bio defensivos. Contudo, ainda havia muito o que se discutir sobre a regulamentação desses produtos, uma vez que apesar de buscar facilitar seu registro, a instrução ainda os coloca na mesma posição de agrotóxicos, levando ao pleiteador do registro a adequação de suas embalagens, formulações, estudos de estabilidade, toxicidade etc. como se fossem registrar um agrotóxico.

Apesar de todos os percalços como burocracia, custos relacionados a testes de viabilidade para pleito (Mondin, 2022) e tabus a respeito dos defensivos de origem microbiológica, o mercado de biopesticidas está mais aquecido. O que demonstra isso é o panorama emitido pelo ministério da agricultura, somente no primeiro trimestre de 2023 foram registrados 15 produtos de baixa toxicidade conforme figura 01.

Figura 01.: Evolução do registro de produtos de baixo risco (microbiológicos, semi-químicos, extratos vegetais etc.) no Brasil nos últimos 23 anos.



Fonte: MAPA, 2023

Visando o crescimento exponencial desse mercado, a instrução normativa nº 3 foi revogada em maio de 2023 e um novo decreto estabelecido passou a vigorar a partir de 1º de julho de 2023, a portaria conjunta SDA/Mapa - Ibama - Anvisa nº 1/2023. Essa nova portaria finalmente visa desburocratizar os registros de defensivos biológicos e cria regras próprias de avaliação, uma vez que a portaria conjunta nº 3 considerava o biodefensivos na mesma classe dos agrotóxicos. Além disso, ela dá prioridade na fila de registro.

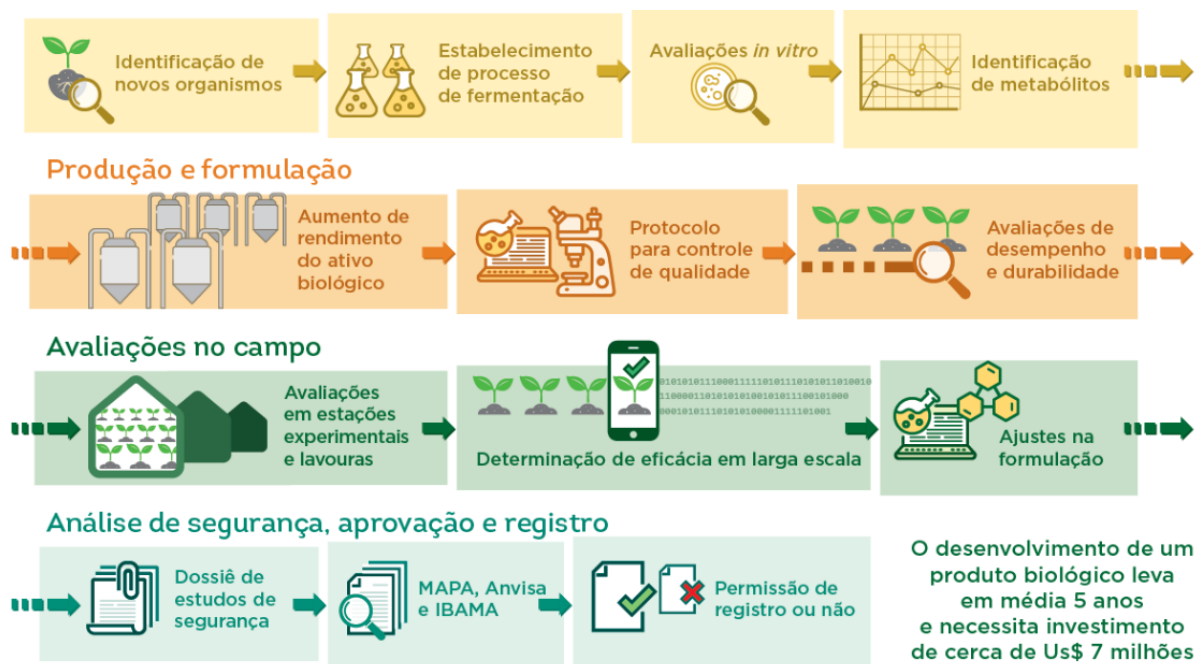
2.3 - Passos iniciais para registro dos Biopesticidas no país.

Para que o produto de interesse seja liberado para comercialização, o biopesticida deve ser avaliado e aprovado nos critérios estabelecidos pelos órgãos regulamentadores como ANVISA, MAPA e IBAMA, que realizam suas análises de forma independente. Logo, a nova a portaria conjunta SDA/Mapa - Ibama - Anvisa nº 1/2023, auxilia as empresas que resolvem se desbravar no mercado de produtos biológicos com instruções e protocolos a serem seguidos antes de pleitear o registro do defensivo. Portanto, a instrução normativa sugere que seja registrado dados significativos quanto (Brasil, 2023):

1. Identidade e pureza do ativo biológico; espera-se que o microrganismo/cepa utilizado(a) seja de linhagem pura, com dados sobre sua aquisição, linhagem genética etc.

- Os métodos analíticos usados para identificar o (s) ativo (s);** Quais métodos e protocolos são utilizados pelas empresas na identificação do microrganismo e comprovam que o produto final condiz com o que foi inoculado.
- Dados de eficácia;** sejam disponibilizados estudos clínicos, in-vivo, ex -vivo ou mesmo no próprio local (lavoura) que comprove a eficácia da ação do produto no microrganismo que foi proposto para combate.
- As propriedades físicas, químicas e biológicas;** por se tratar de um defensivo agrícola, é de suma importância possuir dados sobre sua composição, além das características físico-químicas que o produto utilizado apresentará ao consumidor final.
- Informações sobre o uso, processos de produção e atividade em campo;** Dados sobre estudo da ação do produto em plantas, lavouras experimentais etc., além da determinação da eficácia em larga escala e dados sobre sua formulação.
- Possíveis efeitos na saúde humana e não-alvos;** Apesar de ser um produto de origem biológica, é imprescindível estudo clínicos de toxicidade em humanos e algumas espécies de seres vivos como minhocas, abelhas, peixes etc. Além de estudos de controle de contaminantes e toxinas conforme anexo III da portaria. Conforme figura 02 abaixo, encontra-se descritos os passos a serem realizados antes de pleitear registro do produto biológico no ministério da agricultura.

Figura 02.: Esquemática das etapas envolvidas no registro de novos biopesticidas.



Fonte: CropLifeBrasil, 2020

Além disso, o parágrafo 6º da nova portaria conjunta SDA/Mapa - Ibama - Anvisa nº 1/2023 estabelece que:

Art. 6º Os documentos referentes ao processo de produção e ao respectivo controle de qualidade dos produtos microbiológicos devem ser devidamente arquivados e permanecerem à disposição dos órgãos competentes pelo período de 5 (cinco) anos.
I - Dentre as informações documentadas, deve haver dados sobre a origem da matéria-prima, os estudos de estabilidade e o controle de contaminantes indicados para o produto;
II - Quando o produto for composto por microrganismos vivos, a unidade biológica utilizada na declaração de composição qualitativa e quantitativa apresentada no requerimento de registro deve ser a mesma em todos os estudos e testes que compuserem o processo produtivo[...]

Ou seja, para os defensivos agrícolas de origem microbiológica, ainda que não tenha modelo de protocolos anexados na nova portaria, exige-se que testes de estabilidade acelerada e de longa duração deve ser realizados e apresentados quando solicitados, mesmo após aprovação do registro.

2.4 Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade tem como objetivo determinar a capacidade do produto em manter sua qualidade, eficiência e segurança durante o seu tempo de prateleira, ou seja, durante o prazo de validade determinado em seu rótulo (ANVISA, 2004). Portanto, os estudos de estabilidade têm por finalidade fornecer informações valiosas sobre a formulação do produto, a extensão da perda da qualidade da formulação devido ao tipo de embalagem utilizada e avaliar como o armazenamento pode prejudicar sua eficácia (Mirco; Rocha, 2015).

Existem duas abordagens principais utilizadas para o estudo de estabilidade: acelerada e de longa duração. No estudo acelerado, o produto de interesse é estressado sob condições ambientais variadas para entender qual é a influência dessas variações atípicas na sua qualidade. Geralmente, os testes duram de 3 a 6 meses, e os dados coletados durante o estudo são usados para desenvolver uma curva de degradação, que é usada para prever a estabilidade do produto em condições normais de armazenamento (ANVISA, 2004). Logo, com base nesses dados, os fabricantes podem estabelecer uma data de validade para o produto. Além disso, essa metodologia é muito utilizada para avaliar as condições de armazenamento, principalmente durante o transporte (Mirco; Rocha, 2015).

No estudo de estabilidade de longa duração, o tempo médio de avaliação é entre 12 e 18 meses ou mesmo durante o tempo de prateleira estimado no estudo de estabilidade acelerada. Neste caso, avalia-se a degradação do produto em condições normais de armazenamento. É importante ressaltar que o estudo de estabilidade de longa duração é um requisito regulatório obrigatório para garantir a segurança e a eficácia do produto durante sua vida útil (ANVISA 2004).

Atualmente, não existem protocolos de estudos específicos voltados a estabilidade dos defensivos agrícolas cujo princípio ativo é de origem microbiológica. Entretanto, conforme

quadro 1, anexo III da então revogada Instrução Normativa Conjunta Nº 3, de 10 de março de 2006, por classificar os biodefensivos como agrotóxicos, exigia-se que durante estudos para pedido de registro fosse realizado ao mínimo a estabilidade acelerada do produto puro e pós formulado considerando-se a luz solar, pH, umidade, temperatura, metais e seus íons, além de estudos de condições de armazenamento conforme quadro 01. Portanto, utilizou-se a portaria revogada para desenvolver uma metodologia de estudo de estabilidade acelerada para os biodefensivos.

Quadro 01.: Resumo dos testes a serem realizados para a submissão de registro de biodefensivos à base de microrganismos.

Testes a serem realizados	Produto a ser testado	Observações
Pureza da cultura estoque	Produto técnico	Identificação e quantificação
Miscibilidade	Produto técnico e formulado	Não se aplica
pH	Produto técnico e formulado	Não se aplica
Densidade	Produto técnico e formulado	Não se aplica
Estabilidade	Produto técnico e formulado	A luz solar, pH (5 - 7,9), ar, temperatura, metais e seus íons.
Estabilidade durante armazenagem.	Produto técnico e formulado	Condições para manutenção do produto
Viscosidade	Produto técnico e formulado	Apenas para líquidos a temperatura ambiente.

Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de MAPA, (2006) Anexo III da Instrução Normativa Conjunta Nº 3, de 10 de Março de 2006.

Vale ressaltar que a nova portaria conjunta SDA/Mapa - Ibama - Anvisa nº 1/2023 não solicita o estudo prévio de estabilidade durante o pedido de registro do produto. Contudo, conforme artigo 6º da mesma portaria, os órgãos fiscalizadores solicitam que esses estudos sejam feitos e mantidos por no mínimo 5 anos após a liberação do produto, uma vez que podem requerê-los para possível reanálise.

3 METODOLOGIA

3.1 Desenvolvimento de estudo estabilidade acelerada

O fungo *Bouvera bassiana* - IBC66 foi inoculado em caldo previamente preparado no biorreator de 250L do tipo STR (figura 3a), sendo microrganismos crescidos via fermentação em estado líquido, com controle rigoroso de temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,00$), aeração (oxigenação constante) e pH ($7,00 \pm 1,00$) até atingir uma concentração celular acima de 1×10^8 UFC/ml (5 dias). Após obtenção da concentração celular desejada, o caldo contendo o fungo foi transferido para bags estéreis de 1L (figura 3b), sendo 5 bags separadas para o estudo. O produto será lançado sem formulante para garantir uma melhor eficácia e pelo fato de o microrganismo ser sensível aos componentes da formulação. Logo, com a estabilidade acelerada, pretende-se entender qual o prazo máximo de prateleira para este produto.

Figura 3a.: Biorreator de 250L do tipo STR utilizado para a produção do bioinseticida através da fermentação em estado líquido.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023)

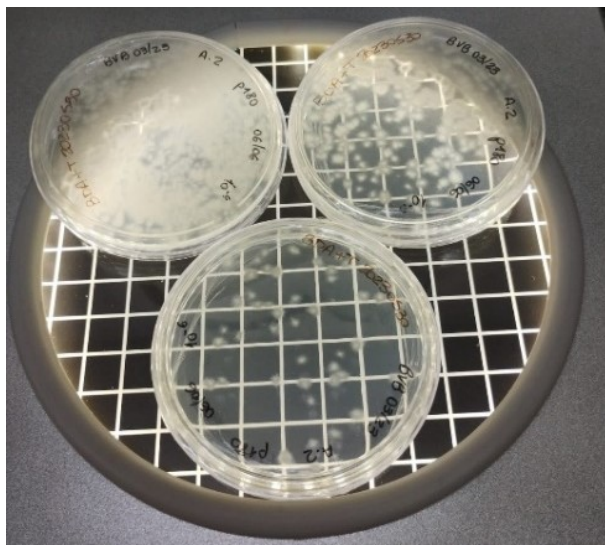
Além disso, o estudo foi realizado utilizando um protocolo adaptado do guia de estudo de estabilidade acelerada para cosméticos (ANVISA, 2004). Logo, cada bag de 1L foi colocada em estufas e/ou freezers com temperaturas controladas de $50^{\circ}\text{C} \pm 2$; $30^{\circ}\text{C} \pm 2$; $25^{\circ}\text{C} \pm 2$; $5^{\circ}\text{C} \pm 2$ e $-5^{\circ}\text{C} \pm 2$, sendo as mostras também privadas de luz para simular as condições de armazenamento.

Figura 03.: Bag de 1L do bioinseticida produzido em fermentação em estado líquido e envasado de forma estéril e sem formulação.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

A quantificação total da concentração de células vivas do microrganismo nas amostras, viabilidade do produto, foram analisadas semanalmente utilizando os mesmos protocolos realizados pelo fornecedor das bags. Portanto, retirou-se 1 ml da amostra e em seguida diluiu-se a alíquota nas concentrações 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} . Em seguida, 100 μml de cada diluição foi semeada, em triplicatas, em placas de Petri contendo meio Sabouraud Dextrose Agar - SAB, um meio seletivo para crescimento de fungos (figura 4), e incubadas por 72hs.

10⁻⁷**Figura 04.:** Placa de Petri semeada com amostras do produto em meio SAB nas diluições 10⁻⁵, 10⁻⁶ e

Fonte: Semeadura das amostras realizada pelo autor (2023).

A contagem total de células viáveis, viabilidade celular, para cada diluição semeada nas placas de Petri foram feitas seguindo a seguinte formula:

$$UFC = \frac{NC \times DS \times 10}{FD}$$

UFC= Unidade Formadora de colônia

ND= Número médio de colônias contadas manualmente

FD= Fator de diluição da amostra

DS= Diluição exponencial selecionada

Os dados obtidos conforme tabela 01, viabilidade semanal das amostras, foram plotados no software estatístico minitab para predizer o tempo máximo de prateleira do microrganismo envasado sem formulação para cada temperatura escolhida.

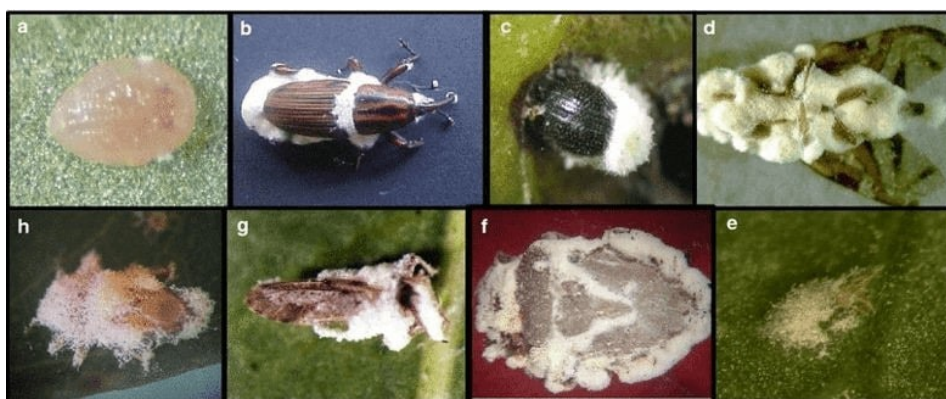
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido aos inúmeros dados de eficácias e estudos, os fungos se tornaram a espécie preferida na produção de bioinseticidas, principalmente o fungo *Bouvera bassiana*. Somente em 2021 foram registrados 32 novos bioinseticidas cujo “princípio ativo” exclusivo é o

microrganismo (MAPA, 2021). Logo, a *Bouvera* tornou-se o principal microrganismo das empresas voltadas ao controle microbiológico devido ao seu amplo espectro de ação em insetos-praga e sua facilidade de cultivo (figura 06).

Figura 05.: Ação praguicida do fungo *Bouvera bassiana* em diversos tipos de insetos.

a) Ninfa da mosca branca praga do tabaco; **b)** *Metamasius hemipterus* conhecida como Broca da cana-de-açúcar e banana; **c)** Broca do café, o inseto *Hyphotenemus hampei*; **d)** Mosca das frutas, *Anastrepha fraterculus*; **e)** Ácaro rajado, *Tetranychus urticae*; **f)** Percevejo verde da soja, *Nezara viridula*; **g)** *Diaphorina citri*; **h)** Praga do eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus*.



Fonte: Mascarin; Jaronski, 2016

Além disso, a produção desses fungos em escala industrial é realizada via fermentação no estado sólido, devido à alta fonte de nutrientes fornecida para o microrganismo ser proveniente de resíduos como palha de arroz, restos de madeiras etc., favorecendo um ótimo crescimento desse fungo, com facilidade na colheita e principalmente do controle de parâmetros como pH e temperatura (Frassatto et al, 2020). Contudo, as desvantagens nesse método de produção estão ligadas ao fato de os resíduos sólidos precisarem de um pré-tratamento, da esterilização e dos resíduos sólidos gerados no fim da fermentação não possuírem destinação ecológica, além de requerer grandes demandas de espaço para os biorreatores. Entretanto, o maior percalço está no tempo médio do início da produção até o envase do produto propriamente dito, podendo durar em média de 15 a 20 dias até a obtenção do produto propriamente dito (Ferreira et al, 2019).

O produto que foi doado e utilizado no estudo de estabilidade acelerada possuía como princípio ativo cepa do microrganismo *Bouvera bassiana* – IBC 66. Além disso, o produto foi produzido por fermentação em estado líquido. Esse tipo de processo, fermentação em estado líquido, é pouco usual para produção de fungos em escala industrial. Sendo uma das grandes desvantagens o fato de requerer controles mais robustos dos parâmetros físico-químicos de fermentação e a facilidade com que o produto pode sofrer contaminação durante a “fermentação” (Medeiros, 2020). Entretanto, o tempo de fermentação é reduzido drasticamente (entre 3 e 5 dias) até o seu envase, o que favorece muito sua produção em larga escala, além de requerer pouco espaço para produção (Medeiros, 2020). Bags contendo o microrganismo *Bouvera bassiana* e que foram doadas para o estudo de estabilidade

acelerada (Figura 3b) possuíam viabilidade inicial, ou seja, concentração de células vivas do microrganismo na ordem de $5,56 \times 10^8$ UFC/ml no momento do envase, conforme laudo fornecido pela empresa. No entanto, após uma semana de envasado, o produto apresentou uma queda significativa da concentração de células (Tabela 01) para todas as temperaturas avaliadas no estudo. Uma das hipóteses levantada foi a nova condição que o microrganismo foi colocado. Pois, durante o período de produção por fermentação líquida, o fungo era crescido em biorreatores (fermentadores) em constante agitação, aeração e pH controlado, os quais favoreciam um crescimento ótimo do microrganismo em pouco espaço de tempo. Nas semanas seguintes foi visualizado a adaptação do fungo ao novo “ambiente”, o que é percebido pela diminuição da taxa de decaimento das células viáveis ao longo das semanas. Entretanto, estudos precisam ser realizados com outros lotes do produto para que a tese da perda celular seja refutada, uma vez que não foi encontrada em literaturas, que envolviam a produção de fungos em fermentação em estado líquido, informações sobre a morte celular desse tipo de microrganismo causados pela mudança das condições do meio de crescimento.

Tabela 1.: Viabilidade da amostra em diferentes temperaturas com avaliações realizadas semanalmente.

Temperatura (°C)	Semana de avaliação	Viabilidade (UFC/ml)	Taxa de decaimento Por semana
	0	5,56E+08	-
50	1	0,0E+00	-
30	1	4,33E+06	99,22 %
30	2	2,29E+06	47,18 %
30	3	9,44E+05	58,74 %
30	4	6,56E+05	30,59 %
25	1	1,34E+07	97,60 %
25	2	1,17E+07	12,56 %
25	3	1,05E+07	10,47 %
25	4	3,41E+06	67,38 %
5	1	7,10E+07	87,00 %
5	2	5,62E+07	21,00 %
5	3	5,22E+07	7,00 %
5	4	4,48E+07	14,00 %
-5	1	3,23E+07	94,18 %
-5	2	1,01E+07	68,80 %
-5	3	2,53E+06	54,07 %
-5	4	4,63E+06	45,32 %

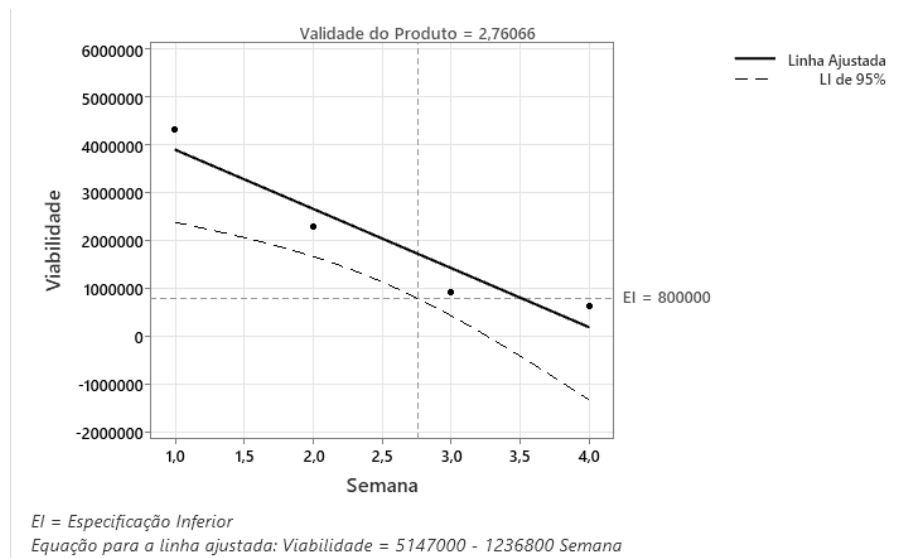
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023)

A especificação da concentração celular na ficha técnica do produto é de $1,00 \times 10^6$ ($\pm 2,00$) UFC/ml. Para manter essa especificação disponibilizado pela ficha técnica, o produto é fornecido em altas concentrações devido a queda inicial de viabilidade apresentada após uma semana de envase. Logo, com base nas informações cedidas pela ficha técnica e concentração inicial do lote fornecido, estipulou-se que a estabilidade acelerada do produto deveria ser

calculada até o produto atingir concentração de $8,00 \times 10^5$ UFC/ml, que é a concentração mínima esperada para o produto.

Durante a realização do estudo, não houve crescimento do fungo a $50\text{ }^\circ\text{C}$ (tabela 01). Conforme literaturas, a temperatura ótima de crescimento e ação do fungo *Bouvera bassiana* é de $25\text{ }^\circ\text{C}$ a $37\text{ }^\circ\text{C}$ (Pereira; Martins, 2016). Portanto, o calor excessivo inviabilizou o crescimento e análise nesta temperatura. Na temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$, o estudo de estabilidade acelerada indicou um tempo de prateleira de 2,7 semanas conforme figura 06 ou aproximadamente 21 dias levando em consideração o limite mínimo da especificação de $8,00 \times 10^5$ UFC/ml.

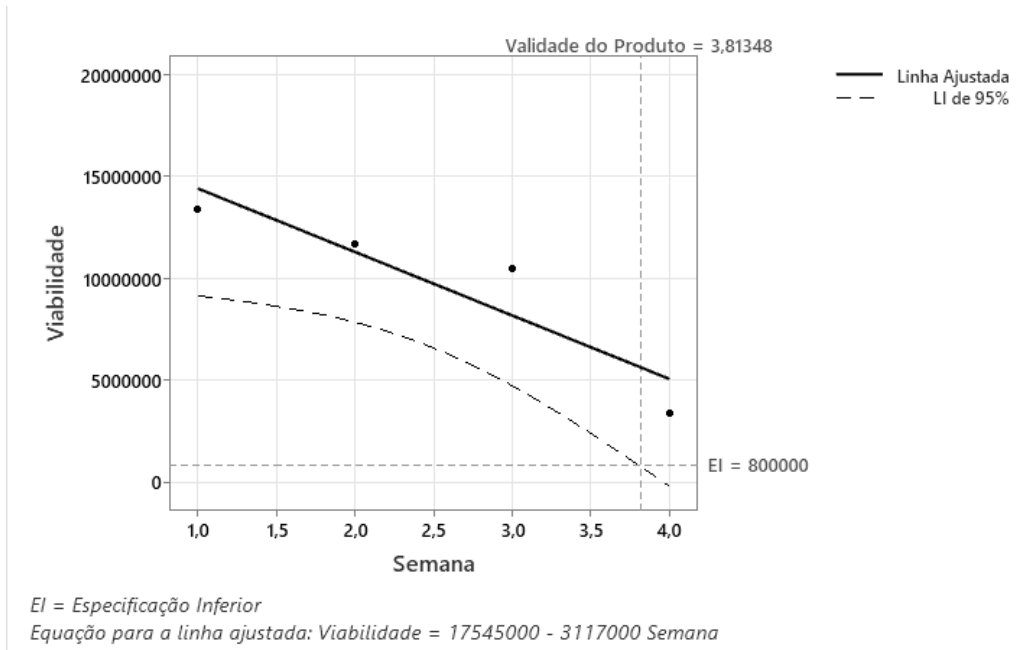
Figura 06.: Decaimento da concentração de células do microrganismo a $30\text{ }^\circ\text{C}$ com previsão de tempo máximo de prateleira.



Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o programa estatístico Minitab (2023).

Para a temperatura de $25\text{ }^\circ\text{C}$, considerada ambiente, o tempo de prateleira esperado foi de 3,81 semana ou aproximadamente 27 dias conforme figura 07.

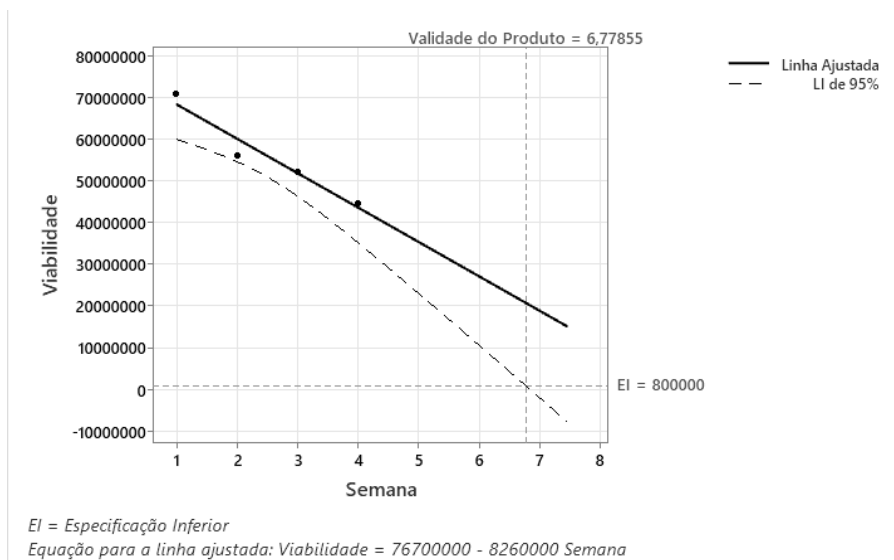
Figura 07.: Decaimento da concentração de células do microrganismo a 25°C com previsão de tempo máximo de prateleira.



Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o programa estatístico Minitab (2023).

Para a temperatura de 5°C, o tempo de prateleira indicado foi de 6,77 semanas ou aproximadamente 48 dias (figura 08).

Figura 08.: Decaimento da concentração de células do microrganismo a 5°C com previsão de tempo máximo de prateleira.



Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o programa estatístico Minitab (2023).



5 CONCLUSÕES

Conforme literaturas, bioinseticidas líquidos cujo princípio ativo são fungos, são formuladas em meio contendo tween 80 ou óleo emulsionável (Alves et al, 2021), sendo o tempo de prateleira para esses produtos variado de 45 dias para temperaturas de armazenamento entre 24°C a 28°C ou 365 dias para temperaturas entre -5°C a -12° (Silva, 2021). No estudo de estabilidade realizado, por se tratar de um produto sem qualquer tipo de formulação, ou seja, apenas o microrganismo no próprio meio utilizado para crescimento (caldo), o tempo de prateleira avaliado para o produto armazenado em temperaturas entre 25°C a 30 °C foi de 28 dias e de 48 dias para o produto armazenado sob refrigeração a 5°C.

Vale ressaltar que esse tempo de prateleira está levando em consideração o tempo máximo que o produto toma para atingir a concentração de $8,00 \times 10^5$ UFC/ml, que é o limite mínimo de concentração celular do produto considerado pela empresa produtora seguro para utilização. Portanto, necessita-se mais estudos sobre a concentração mínima segura esperada para agir de forma eficiente no controle de pragas a que está sendo proposta. Podendo, assim, aumentar o tempo de prateleira do produto conforme as novas especificações a serem analisadas.

Além disso, após revisar literaturas existentes e adaptar protocolos com base nos estudos de estabilidade acelerada para cosméticos, conseguiu-se estabelecer um guia preliminar para realização de testes de estabilidade acelerada para defensivos cujo princípio ativo são outros microrganismos. Contudo, novos estudos, com novos lotes e outros tipos de microrganismos, devem ser usados futuramente para refinar ainda mais o protocolo desenvolvido, criando, assim, um guia inicial para realização de estudos de estabilidade acelerada para bio defensivos.

REFÊRENCIAS

ALBERGONI, Leide; PELAEZ, Victor. Da Revolução Verde à agrobiotecnologia: ruptura ou continuidade de paradigmas? **Revista de Economia**, UFPR, v. 33, n. 31, p. 31-53, ago./2007.

ALVES, R. T; SPECHT, A; MALAQUIAS, J. V. **Eficiência de formulações de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill sobre a formiga-cortadeira Atta laevigata (Smith) em laboratório.** Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.2021. 18 p. Disponível em <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/232120/1/Bolpd-389.pdf> . Acesso em:26 jun. 2023



AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Série Qualidade em Cosméticos, Brasília: ANVISA, v. 1, n. 1, p. 1-49, mai. 2004. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cosmeticos.pdf> . Acesso em: 26 jun. 2023.

BEARD, John. DDT and human health. **Science of The Total Environment**, Lismore NSW, Austrália, v. 355, n. 1-3, p. 78-89, mai. /2005.

BETTIOL, Wagner e MEDEIROS, Flavio H. V. Como o Brasil se tornou o maior produtor e consumidor de produtos de biocontrole. **Embrapa Meio Ambiente**. Jaguariúna, 17 mar. 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/79156418/artigo-como-o-brasil-se-tornou-o-maior-produtor-e-consumidor-de-produtos-de-biocontrole> . Acesso em: 23 mar. 2023.

BRAIBANTE, Mara Elisa Fortes; ZAPPE, Janessa Aline. A química dos agrotóxicos. **Química nova na escola**, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012. Disponível em: http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc34_1/03-QS-02-11.pdf. Acesso em: 24 mar. 2023.

BRASIL. Presidência da República. **Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2022. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm . Acesso em: 24 mar. 2023.

BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 1989. Disponível em: <https://legis.senado.leg.br/sdleg-getter/documento?dm=3856063&disposition=inline> . Acesso em: 24 mar. 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária/Secretaria de Defesa Agropecuária. **Portaria Conjunta SDA/MAPA - IBAMA - ANVISA Nº 1, de 10 de abril de 2023**. Estabelece procedimentos a serem adotados para o registro de produtos microbiológicos empregados no controle de pragas ou como desfolhantes, dessecantes, estimuladores, inibidores de crescimento, além de revogar os atos normativos vigentes, pertinentes à esta matéria: Instrução Normativa Conjunta Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento/Anvisa/Ibama nº 03 de 10 de março de 2006 e o Ato CGAA/DSV/SDA nº 06, de 23 de janeiro de 2014. DF: Diário Oficial da União, 2023. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-conjunta-sda/mapa-ibama-anvisa-n-1-de-10-de-abril-de-2023-480871674>. Acesso em: 24 mar. 2024.



BRAVO et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0965174811000543?via%3Dihub> .

Acesso em: 24 mar. 2023.

CROPLIFEBRASIL **Regulamentação de produtos biológicos**. 2020. Disponível em:

<https://croplifebrasil.org/produtos-biologicos/regulamentacao-de-produtos-biologicos/> .

Acesso em: 23 jun. 2023.

DINIZ, Fabiana Ruscitti; RODRIGUES, Karoline Fernandes; ROSSI, Marta Maria. Produção do parasitóide *cotesia flavipes* (hymenoptera: braconidae) para controle biológico da broca da cana-de-açúcar (*diatraea saccharalis*) (lepidoptera: crambidae). **Nucleus**, v. 1, n. 1, p. 1, jun. 2008. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4037489> . Acesso em: 23 mar. 2023.

EMSLEY, John. **The elements of murder**: a history of poison - Hardcover. 1. ed. New York, New York, USA: Oxford University Press, 2006. p. 1-418.

FERREIRA, et al. **Técnicas para produção artesanal e utilização do fungo**

entomopatogênicos *Beauveria bassiana* no campo. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2019. 13 p. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/210128/1/COT-225-2019-Joana-v2.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2023.

FRASSATTO et al. Celulases fúngicas: produção por cultivo sólido em biorreator de leite empacotado usando resíduos sólidos agroindustriais como substratos e aplicação na hidrólise de bagaço de cana. **Semina: Ciências Agrárias**, UNESP, São José do Rio Preto - SP, v. 41, n. 5, p. 2097-2116, jul./2020. Disponível em:

<https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/38502/27785>. Acesso em: 26 jun. 2023.

HOLTON, C. E. **Insecticides and fungicides**: Industrial and Engeneering Chemistry. Five years of Research in Industry, New York - NY, v. 18, n. 1, p. 931-933, set. /1926.

JACQUES, R. L. **The Potato Beetles: The Genus *Leptinotarsa* in North America (Coleoptera: Chrysomelidae)**. 1. ed. Abingdon - England: Routledge, 1998. p. 1-144.

KINKELA, David. **DDT and the American Century: Global Health, Environmental Politics, and the Pesticide That Changed the World**. 1. ed. Chapel Hill, Carolina do Norte, EUA:

University of North Carolina Press, 2013. p. 1-272.

LIGNANI, Leonardo de Bem; BRANDÃO, Júlia Lima Gorges. A ditadura dos agrotóxicos: o Programa Nacional de Defensivos Agrícolas e as mudanças na produção e no consumo de pesticidas no Brasil, 1975-1985. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 29, p. 337-359, 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hcsm/a/5H6kY84N7SqzwwrLps45gPw/> .

Acesso em: 26 jun. 2023.



LOPES, Fernando. **Holandesa Koppert compra empresa paulista de defensivos biológicos.** 2012. Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/noticia/2012/06/holandesa-koppert-compra-empresa-paulista-de-defensivos-biologicos.html>. Acesso em: 24/03/2023

MACKAY, R. *et al.* Arsenical poisoning associated with larvicidal treatment of water with Paris green. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxônia, Reino Unido, v. 27, n. 5, p. 517-523, mar. /1934.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World J Microbiol Biotechnol**, EMBRAPA, Goiás - GO, v. 32, n. 177, p. 1-26, ago. /2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-016-2131-3> . Acesso em: 26 jun. 2023.

MEDEIROS, Marcos. Invento pode estimular expansão da indústria de defensivos biológicos no Brasil. **Embrapa Meio Ambiente**. Jaguariúna, 27 out. 2020. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/56774840/invento-pode-estimular-expansao-da-industria-de-defensivos-biologicos-no-brasil?p_auth=idS6BZyr . Acesso em: 10 ago. 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano.** 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>. Acesso em: 24 mar. 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Controle Biológico: Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano.** Março de 2019, atualizado em dezembro de 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil> . Acesso em 1. fev. 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Título da redação:** produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica registrados. 24 jan 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/produtos-fitossanitarios/arquivos-registro/ProdutosFitossanitrioscomusoAprovadoparaaAgriculturaOrgnicaRegistradosatualiza-doem240121.pdf/view> . Acesso em: 26 jun. 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Instrução Normativa Conjunta nº 3, de 10 de março de 2006.** Estabelece procedimentos a serem adotados para efeito de registro de agentes microbiológicos, empregados no controle de uma população ou de atividades biológicas de um outro organismo vivo considerado nocivo. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/inc-03-2006-biologicos> . Acesso em: 24 mar. 2023.



MIRCO, Jessica; ROCHA, M. S. D. Estudo de estabilidade de medicamentos. **Revista acadêmica Oswaldo Cruz**, Faculdades Oswaldo Cruz (FOC), São Paulo - SP, v. 2, n. 07, p. 1-7, set./2015. Disponível em: http://revista.oswaldocruz.br/Edicao_07/Artigos. Acesso em: 28 abr. 2023.

MORAES, G. J. D.; BERTI FILHO, E. Controle biológico de pragas no Brasil. **Revista USP**, [S. l.], n. 64, p. 144-155, 2005. DOI: 10.11606/issn.2316-9036.v0i64p144-155. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revusp/article/view/13397> . Acesso em: 30 set. 2023.

OCTAVIANO, Carolina. Muito além da tecnologia: os impactos da Revolução Verde. **ComCiência**, Campinas, n. 120, 2010. Disponível em http://comciencia.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-76542010000600006&lng=pt&nrm=iso . Acessos em 25 mar. 2023.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ – OMS. **Critères d' Hygiene de l'Environment: DDT et ses Derivés Grande Bretagne**, 1982, vol. 9.

PELÁEZ, Victor; SCHMIDT, Wilson. A difusão dos OGM no Brasil: imposição e resistências. **Estudos Sociedade e Agricultura**, 2000.

PRAÇA, L. B. et al. *Bacillus Thuringiensis* Berliner (eubacteriales: bacillaceae): Aspectos gerais, modo de ação e utilização. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, v. 1, n. 1, p. 1-40, dez. 2007.

SALATI, Paula. Aprovação de agrotóxicos no Brasil bate recorde anual desde 2016. **G1 Globo**, 2023. Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2023/02/06/aprovacao-de-agrotoxicos-no-brasil-bate-recorde-anual-desde-2016.ghtml> . Acesso em: 1 fev. 2023.

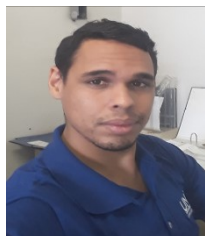
SILVA, Mariana Rosa da. **Como utilizar Beauveria bassiana para um controle eficiente de insetos na lavoura**. 2021. Disponível em: <https://maissoja.com.br/como-utilizar-beauveria-bassiana-para-um-controle-eficiente-de-insetos-na-lavoura/> . Acesso em: 26 jun. 2023.

SOUSA, D. S. D. *et al.* O uso de agrotóxicos no Brasil a partir de uma visão histórica acerca das bases legislativas: uma revisão de literatura. **Conexão Ciência**, Centro Universitário de Formiga – MG, v. 17, n. 1, p. 109-130, abr. 2022.

WALSH, L. M.; KEENEY, D. R. Behavior and phototoxicity of inorganic arsenicals in soils. **Arsenical Pesticides**, Washington, DC, v. 7, n. 1, p. 35-52, jun./1975.

Sobre os Autores

ⁱ Hugo Raphael Mendes da Silva



Possui Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela Universidade Federal do Tocantins – UFT (2017). Pós-graduação em Análise Instrumental Avançada pela Faculdade de Tecnologia SENAI Mário Amato (2023). Experiência em cultivo de células (animal, fungos e bactérias) em biorreatores e purificação de anticorpos monoclonais "biossimilares" na área de Downstream. Atualmente (2023), está se especializando em produção de defensivo biológico em biorreatores de escala industrial e estudos de regulamentação destes.

ⁱⁱ Kerley Cristiane Victorino Romão



Possui graduação em Química pelo Centro Universitário Fundação Santo André. Pós-Graduação em Gestão de Controles Ambientais pelo Senai. Mestrado pela Faculdade Medicina do ABC com ênfase em Fármacos. Ministra aulas Graduação e Pós-Graduação da Faculdade Tecnologia Senai, nos cursos de Tecnologia em Polímeros e Engenharia de Automação e Controle. Tem experiência na área de Química analítica, com ênfase em Análise Instrumental. Trabalhou com elastômeros durante 10 anos <https://orcid.org/0009-0003-2808-7339>