

Capítulo 12

Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas

Chapter 12

Development and scaling of biopesticides

Andrés Díaz García,¹ Martha Isabel Gómez Álvarez,¹
Erika Paola Grijalba Bernal,¹ Adriana Marcela Santos Díaz,¹
Fredy Mauricio Cruz Barrera,¹ Diana Marcela León Moreno,¹
Erika Andrea Alarcón Torres,¹ Alba Marina Cotes¹

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

Contenido

Introducción 632

Información previa para el desarrollo de bioplaguicidas 632

 Vigilancia tecnológica.....632

 Estudio de prefactibilidad 634

 Posible opción de negocio 634

Desarrollo del bioplaguicida 634

 Diseño de medios de cultivo 635

 Selección del tipo de fermentación 636

 Formulación 640

 Evaluación de la compatibilidad de bioplaguicidas con agroquímicos 645

 Control de calidad de bioplaguicidas 655

 Estabilidad de bioplaguicidas en condiciones de almacenamiento 657

 Estudios de eficacia 658

 Modelo de negocios 663

 Potencial de mercado 664

Escalamiento piloto de bioplaguicidas 665

 Optimización de medios de cultivo 665

 Escalamiento del proceso de producción masiva
 de los microorganismos biocontroladores 669

 Cambio de escala de operaciones unitarias “aguas abajo” 674

 Ajuste y cambio de escala de las formulaciones 677

 Costos de producción 677

 Estrategias de mercadeo 678

Registro y transferencia de la tecnología 679

 Registro 679

 Implementación del modelo de negocio 679

Conclusiones y perspectivas 680

Agradecimientos 681

Referencias 682

Resumen

Como se mostró en el capítulo anterior, el desarrollo tecnológico de un bioplaguicida inicia con la etapa de prueba, la cual enmarca una serie de actividades e iniciativas de carácter investigativo y experimental para generar una línea base apropiada para la aplicación de las etapas posteriores. En el presente capítulo se exponen con detalle las etapas de desarrollo, escalamiento piloto, registro y transferencia de la tecnología, que permitirán la implementación exitosa de un bioplaguicida. Inicialmente se debe acopiar, analizar y hacer una primera toma de decisiones sobre los candidatos o aislamientos más apropiados, a partir de la información generada por los estudios de vigilancia tecnológica y prefactibilidad (basados en una posible opción de negocio preliminar). En la etapa de desarrollo se selecciona el tipo de fermentación, se termina el diseño del medio de cultivo, se realizan las pruebas de compatibilidad con agroquímicos, se estandarizan los métodos de control de calidad, se determina la estabilidad en almacenamiento de los prototipos de formulación y su eficacia, y se define el modelo de negocios y el potencial de mercado. En la etapa de escalamiento piloto se optimiza el medio de cultivo, se realiza el escalamiento tanto de la producción masiva por fermentación como de la formulación, se calculan los costos de producción y se implementan estrategias de mercadeo. En la última etapa, se lleva a cabo el registro del producto, la transferencia de la tecnología y la implementación del modelo de negocios. La suma de todas estas actividades implica que el desarrollo tecnológico de un bioplaguicida se considere como una tecnología de mediano plazo (entre 4 y 5 años), que requiere de una inversión de alto costo. La aplicación de las etapas mencionadas requiere de una organización robusta y eficiente, a cargo de un personal multidisciplinario (idóneo para el uso efectivo de recursos logísticos y técnicos; para el manejo de información experimental, económica y legal; y para la gestión administrativa), capaz de abordar todos los retos asociados a la optimización, escalamiento y registro de bioplaguicidas en Colombia.

Palabras clave

Bioplaguicidas microbianos, escalamiento, fermentación, formulación, optimización, transferencia de tecnología

Abstract

As shown in the previous chapter, the technological development of a biopesticide begins with the proof of concept stage that involves a series of activities and initiatives of investigative and experimental nature to generate an appropriate baseline for the application of the further stages. In this chapter, the stages of development, pilot scaling, registration and transfer of the technology that allow the successful implementation of a biopesticide are discussed in detail. Initially it is necessary to collect, analyze and make a first decision about the most appropriate candidates or isolates based on the information generated by the studies of technological surveillance and prefeasibility, based on a possible initial business option. In the development stage, the type of fermentation is selected, the design of the culture medium is finished, the tests of compatibility with agrochemicals are carried out, the quality control methods are standardized, the storage stability of the formulation prototypes and their efficiency are determined and the business model and the market potential are defined. In the pilot scaling stage, the culture medium is optimized, mass production by fermentation and formulation are scale-up, production costs are calculated and marketing strategies are implemented. In the last stage the registration, transfer of technology and implementation of the business model are carried out. The sum of all these activities allows to visualize that the technological development of a biopesticide can be considered as a medium-term technology (between 4 and 5 years), which requires an investment of several million dollars. As will be evident throughout the text, the application of this stages requires of a robust and efficient organization by a suitable multidisciplinary staff for the effective use of logistical and technical resources, experimental, economical and legal information analysis, and administrative management to address all the challenges associated with the optimization, scaling and registration of biopesticides in Colombia.

Keywords

Fermentation, formulation, microbial biopesticides, optimization methods, scaling, technology transfer

Introducción

En líneas generales, el desarrollo de bioplaguicidas tiene una relación estrecha con el estudio y explotación de la biotecnología moderna, por lo tanto, para que las entidades relacionadas con tales iniciativas (industria, universidades y centros de investigación, entre otros) puedan generar innovación y desarrollo tecnológico requieren de un recurso humano altamente calificado de carácter multidisciplinario (Chaparro et al., 2013).

En este contexto, se puede entender el desarrollo tecnológico como la utilización de los conocimientos científicos existentes para la producción de nuevos materiales, dispositivos, productos, procedimientos, sistemas o servicios, así como para su mejora sustancial, lo cual incluye la realización de prototipos y de instalaciones piloto (Instituto Vasco de Estadística [Eustat], s. f.). Sin embargo, el desarrollo tecnológico de un bioplaguicida microbiano es una tarea compleja que involucra no solo etapas de carácter técnico científico, sino también etapas asociadas al análisis de viabilidad económica y de potencial del mercado, así como el cumplimiento de regulaciones y reglamentaciones

nacionales para bioproductos, (todas las cuales se deben tener en cuenta desde la concepción misma de la idea de investigación).

Otros aspectos importantes en el desarrollo de un bioplaguicida son los costos de implementación y ejecución, la complejidad relativa y la duración de cada etapa. Como se muestra en la figura 12.1, a medida que se avanza en el desarrollo tecnológico se van tamizando los posibles microorganismos o aislamientos candidatos, pero, a su vez, los costos, la complejidad y el tiempo requerido aumentan debido a las múltiples pruebas, bioensayos, análisis y estudios que deben surtirse para asegurar la eficiencia y reproducibilidad del bioproducto en condiciones controladas, semicontroladas y de campo. Una vez ejecutadas todas las etapas del desarrollo de un bioplaguicida (que pueden tomar entre cuatro y cinco años), se puede asegurar que el desarrollo tecnológico es eficiente, efectivo y estable, lo que permite proyectar la comercialización y distribución del bioplaguicida en el mercado emergente de los bioproductos a nivel mundial.

Información previa para el desarrollo de bioplaguicidas

Gran parte de la información que sustenta el desarrollo tecnológico de un nuevo bioplaguicida se logra mediante estudios de vigilancia tecnológica y análisis de prefactibilidad, que orientan a los desarrolladores sobre las posibles opciones de negocio. Con base en este conocimiento, se inicia el proceso de desarrollo del nuevo producto. En la figura 12.1 aparecen todas las etapas que conducen a la obtención de un nuevo bioplaguicida (las relativas al diseño conceptual y a la prueba de concepto fueron discutidas en el capítulo anterior).

Vigilancia tecnológica

Según la norma UNE 166000:2011, se entiende la vigilancia tecnológica como “Un proceso organizado,

selectivoysistemático,paracaptarinformacióndelexterior y de la propia organización sobre ciencia y tecnología, seleccionarla, analizarla, difundirla y comunicarla, para convertirla en conocimiento, con el fin de tomar decisiones con menor riesgo y poder anticiparse a los cambios” (Aldasoro Alustiza, Cantonnet Jordi, & Cilleruelo Carrasco, 2012). Existen diferentes tipos de vigilancia tecnológica a desarrollar, y esta dependerá de lo que se quiera obtener y de la fase en que se encuentre el desarrollo del bioproducto. Entre ellas se encuentran: 1) la vigilancia comercial (asociada a mercados, competidores, productos, precios, etc.), 2) la vigilancia científica y tecnológica (que permite identificar líderes, dinámicas, campos tecnológicos y patentes, entre otros), 3) la vigilancia normativa y regulatoria (que permite conocer leyes, normativas,

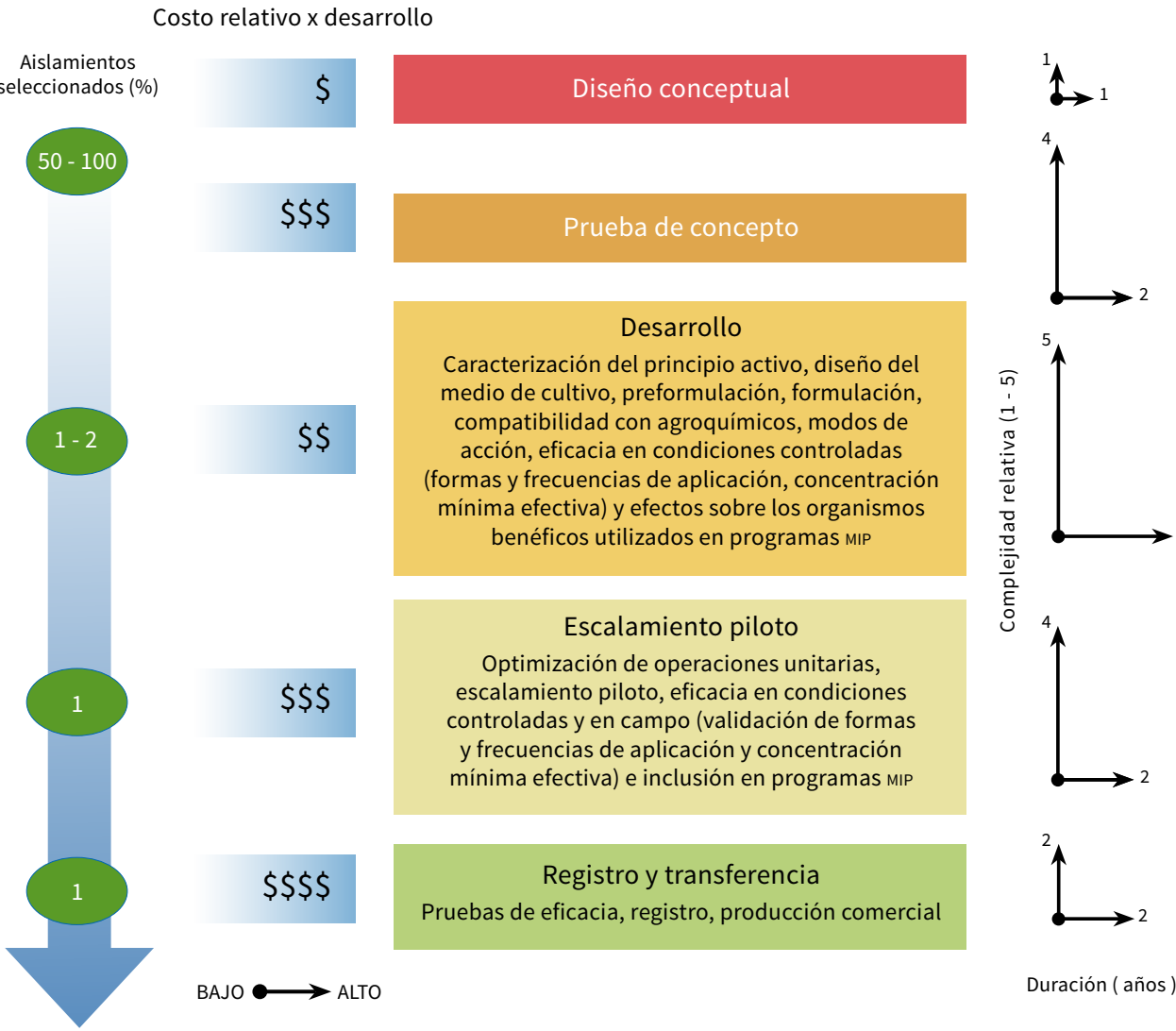


Figura 12.1. Etapas para el desarrollo de un bioplaguicida microbiano y duración típica de las etapas de acuerdo con la experiencia de AGROSAVIA en Colombia.

Fuente: Elaboración propia

tratados y acuerdos), 4) la vigilancia competitiva (asociada específicamente a identificar actores de la cadena de valor, como competidores, fabricantes, comercializadores, proveedores, etc.) (Aguilera, 2014) y 5) la vigilancia estratégica (que permite la generación y el tratamiento de ideas aplicables al desarrollo o mejora de productos y servicios, así como vigilar el entorno y explotar esta información para la toma de decisiones) (Coca, García, Santos, & Fernández, 2010).

No existe una sola metodología para las etapas de un proceso de vigilancia tecnológica, sin embargo, en general se manejan las siguientes: diagnóstico (en la cual se identifica y precisa el tema a vigilar), búsqueda y captura de la información (se diseña e implementa

la estrategia de recopilación de información), análisis de la información (se filtra la información relevante), difusión y comunicación a los interesados y, finalmente, orientación en la toma de decisiones a partir de los resultados obtenidos (Observatorio Virtual de Transferencia Tecnológica [OVRT], s. f.).

Uno de los propósitos principales de la vigilancia tecnológica en el contexto del desarrollo de bioplaguicidas es anticiparse a los posibles cambios en el desarrollo tecnológico. Gracias a esto, es posible identificar sectores emergentes o nichos potenciales, reducir riesgos respecto a aquellos sectores (cultivos, tipo de bioplaguicida, etc.) que están entrando a la etapa de madurez o declive (y evitar, así, el gasto de recursos), identificar aliados y expertos para

desarrollar el bioproducto, y definir enfoques y prioridades dentro de la investigación (Cruz, 2013).

Estudio de prefactibilidad

El estudio de prefactibilidad de los bioplaguicidas contempla un estudio de mercado, un estudio técnico, un estudio financiero y un estudio organizacional y legal. En Corpoica se realiza el análisis de factibilidad del mercado utilizando la metodología *quick look*, desarrollada por la Universidad de Texas, que sirve para priorizar y definir en términos comerciales y de mercado los proyectos de desarrollo de bioinsumos (Harbert, 2012). La guía para la pertinencia del mercado de Corpoica define diferentes pasos que permiten identificar el tipo de tecnología y los beneficios que esta le puede entregar al usuario final; los mercados potenciales, el interés y las proyecciones del mercado; la selección de posibles segmentos objetivo o de interés; las tecnologías competentes y los competidores; el estado y desarrollo de la tecnología; el estado de la propiedad intelectual; las barreras de mercado, y las posibles recomendaciones (Corpoica, 2015).

El estudio técnico parte del estado actual del desarrollo del bioplaguicida, y permite un acercamiento preliminar a su definición, así como a los procesos, procedimientos y capacidades requeridas (mano de obra, equipos, maquinaria e instalaciones, entre otras). Además, permite una posible definición de las actividades que se desarrollarán y su planeación en el tiempo para determinar el momento de entrada de la tecnología en el mercado (López, González, Osobampo, Cano, & Gálvez, 2013; Miranda, 2005). El estudio financiero, por su parte, contempla el presupuesto preliminar y la cronología de las inversiones. Este estudio toma

información del estudio de mercado (proyecciones generales de ventas) y del estudio técnico (costos e inversiones). De acuerdo con el nivel de información que se tenga, se puede construir un flujo de caja del proyecto con evaluación financiera (Miranda, 2005) o se plantea una hipótesis del modelo financiero que permita identificar factores claves a tener en cuenta en el desarrollo del proyecto.

Posible opción de negocio

Como parte del proceso inicial del desarrollo del bioplaguicida, se pueden evaluar las posibles opciones de negocio que van a definir la introducción de la tecnología en el mercado una vez culminado su perfeccionamiento. Esta aproximación se puede hacer teniendo en cuenta que en la industria del biocontrol se tienen diferentes opciones de negocio. La primera opción es la de la propiedad del capital, dado que el desarrollador invierte a un nivel limitado y el progreso es gradual (empresas pequeñas). La segunda es la inversión social, en la cual se realizan grandes aportes económicos antes de que se produzcan las ventas, lo que promueve un desarrollo más rápido (centros de investigación con apoyo gubernamental, por ejemplo). La tercera es la inversión de capital de riesgo, con cantidades de capital importantes que superan en gran medida las ventas, de modo que los desarrollos sean grandes y rápidos (alianzas entre centros de investigación o empresas pequeñas con inversionistas). La cuarta opción es aquella en la cual las multinacionales encuentran atractivo el tema de los bioplaguicidas y establecen una unidad de negocio para desarrollar este potencial, compran empresas que ya tienen desarrollos, hacen alianzas o generan nuevas líneas de producción (Glare & Moran-Diez, 2016; Ravensberg, 2011).

de bioensayos para la evaluación de la eficacia en condiciones controladas, la compatibilidad del bioplaguicida con agroquímicos y su efecto sobre los organismos benéficos implicados rutinariamente en el manejo integrado del cultivo (parasitoides, depredadores y polinizadores).

Desarrollo del bioplaguicida

En esta fase intermedia se realiza el diseño del medio de cultivo y el desarrollo o definición del sistema fermentación, se abordan estudios de preformulación, formulación, vida útil y control de calidad del nuevo producto (microbiológico, fisicoquímico, biológico). Otros aspectos importantes son la estandarización

Diseño de medios de cultivo

El diseño de un medio de cultivo para la obtención del principio activo de un bioplaguicida es una tarea compleja, ya que está en función directa con el tipo de propágulo a producir (bacilo, espora, conidio, etc.) y requiere del mayor conocimiento posible acerca del metabolismo y la fisiología del microorganismo. Esto incluye información experimental, como los perfiles de asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno, los rangos de crecimiento en función del pH, la temperatura, la actividad de agua, la intensidad lumínica y los requerimientos de oxígeno y agitación, entre otros. Debido a las múltiples interacciones entre el medio de cultivo y el microorganismo (bacteria, hongo, levadura o virus), es usual que el medio diseñado sea específico para el microorganismo estudiado y no se puedan garantizar resultados similares incluso con otras cepas de la misma especie. Adicionalmente, el medio de cultivo diseñado debe garantizar la estabilidad de la actividad biológica, insecticida o antagónica, aun cuando se lleve a cabo la integración de estrategias de mejoramiento del ingrediente activo (por ejemplo, potenciación de su actividad enzimática, antagonista o biocontroladora) (Singh, Yadav, Chaudhary, Rana, & Sharma, 2016).

En términos generales, el diseño de un medio de cultivo involucra la evaluación de un número significativo de factores, que incluyen la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, los macroelementos y los microelementos, así como aminoácidos y vitaminas (todos ellos como causantes del crecimiento en niveles que aumenten la productividad del proceso y reduzcan los costos de producción). Además, se deben evaluar las variables fisicoquímicas del proceso fermentativo, como la temperatura, el pH, la velocidad de agitación y la demanda de oxígeno, las cuales deben ser estudiadas y fijadas en valores adecuados.

Ya que el medio de cultivo debe garantizar la reproducibilidad del proceso, se debe considerar, especialmente en pequeña escala, el uso de medios de cultivo definidos y homogéneos (Kennedy & Krouse, 1999; Singh, Yadav et al., 2016), pues sustratos complejos, a causa de su heterogeneidad, pueden afectar la fiabilidad del agente de control producido. Sin embargo, es necesario llevar a cabo un análisis

de factibilidad cuando se requiera llevar la producción a una escala superior, para asegurar la viabilidad económica del medio de cultivo. También se deben tener en cuenta otros criterios de los componentes del medio tales como la solubilidad y sedimentación en grandes tanques, el manejo, el transporte y las adecuaciones previas para asegurar la implementación de la producción industrial de los bioplaguicidas. En este punto, la selección apropiada del tipo de fermentación puede reducir considerablemente el costo total de los procesos de fermentación y purificación.

Numerosos estudios se han centrado en el diseño de medios de cultivo asociados a los ingredientes activos que constituyen los bioplaguicidas, ya sean bacterias —como *Bacillus thuringiensis* (Ennouri, Ben Hassen, & Zouari, 2013) y *Bacillus subtilis* (Chen et al., 2010)—, levaduras —como *Rhodosporidium paludigenum* (Wang, Liu, Wang, Ruan, & Zheng, 2011)—, hongos biocontroladores —como *Trichoderma* sp. (Li, Song, Li, & Chen, 2016; Zhang & Yang, 2015)— u hongos entomopatógenos —como *Verticillium* sp. (Shi, Xu, & Zhu, 2009), *Metarhizium* sp. (Bhanu Prakash, Padmaja, & Siva Kira, 2008) o *Beauveria* sp. (Petlamul & Prasertsan, 2014)—. En la mayoría de estos estudios, se distingue como factor común el uso sistemático de herramientas estadísticas con el fin de obtener altos rendimientos y productividades del ingrediente activo.

Estrategias para el diseño de medios de cultivo

Durante el diseño inicial de medios de cultivo, se pueden utilizar varias estrategias, como la evaluación de un factor a la vez o la manipulación de varios de ellos simultáneamente. Estas estrategias han sido utilizadas independientemente de la técnica de fermentación, ya sea fermentación sumergida (SmF, por su sigla en inglés) o sólida (SSF, por su sigla en inglés).

Un factor a la vez

En esta técnica, conocida como la alternativa clásica de tanteo de factores, solo uno de ellos es manipulado, mientras que los demás se mantienen constantes. Esta estrategia ha sido la más utilizada históricamente por

los investigadores en las etapas iniciales del diseño (Singh, Haque et al., 2016; González, Islas, Obregón, Escalante, & Sánchez, 1995). No obstante, la mayor limitante que se encuentra al utilizar esta estrategia radica en la dificultad de estimar las interacciones de los factores (Gupte & Kulkarni, 2003; Kennedy & Krouse, 1999; Singh, Yadav et al., 2016). Además, resulta en ocasiones tedioso, cuando existen varios factores de interés para ser evaluados.

Dentro de la estrategia de un factor a la vez se enmarcan otras variantes, tales como la *técnica de retiro*, que consiste en ir retirando un componente del medio de cultivo a la vez, para revisar el efecto que esto tiene sobre la producción de la biomasa o del metabolito de interés; la *técnica de suplementación*, que se utiliza principalmente cuando se desea conocer el efecto de varios suplementos de carbono o nitrógeno, principalmente, para evaluar su incidencia en la producción de metabolitos con actividad antifúngica (Singh, Rai, & Tripathi, 2012; Tripathi, Praveen, Singh, & Bihari, 2004); y la *técnica de reemplazo*, que básicamente utiliza la fuente de carbono o nitrógeno que muestre efectos positivos en experimentos de suplementación como única fuente de estos.

Más de un factor a la vez:
diseño de experimentos

El uso de métodos estadísticos basados en el diseño de experimentos (*design of experiments* [DOE, por su sigla en inglés]) para la estandarización de medios de cultivo puede superar los cuellos de botella encontrados en la estrategia de un factor a la vez. Fisher (1992) propuso una teoría básica del diseño de experimentos que demostró que cambiar más de un factor o variable en el medio es más eficiente que cambiar cada uno de ellos de forma independiente. La mayoría de los DOE permiten la identificación y selección preliminar de 2 a 10 componentes del medio de cultivo con un limitado número de experimentos. En comparación con la estrategia de un factor a la vez, la aplicación del DOE conlleva menos tiempo, menos experimentos y menos materiales para obtener la misma cantidad de información del medio de cultivo; adicionalmente, se pueden determinar las interacciones entre los

componentes del medio de cultivo (Adinarayana & Ellaiah, 2002; Keskin Gündoğdu, Deniz, Çalışkan, Şahin, & Azbar, 2016). Entre los diseños de cribado, se destacan los factoriales fraccionados (resoluciones III, IV y V), los factoriales irregulares, los factoriales irregulares mixtos, los de tipo Plackett Burman (resoluciones III, IV y V) y los diseños de Taguchi.

El diseño Plackett Burman (PBD, por su sigla en inglés) fue introducido por Plackett y Burman (1946) como solución para determinar los efectos principales en cualquier proceso. Este diseño es un modelo de dos niveles en el cual se asume que las interacciones de los factores no son significativas. Con este modelo se pueden evaluar *n* variables en *n*+1 experimentos, lo que lo hace muy económico en el número de tratamientos a evaluar. El PBD debe ser usado solo cuando los factores del medio de cultivo no tengan interacciones o efectos aditivos en la respuesta, de otra forma los resultados podrían ser potenciados o enmascarados por otras variables, lo que genera una interpretación errónea.

Otra alternativa son los diseños de Taguchi, basados en arreglos ortogonales que solucionan la limitante de los modelos PBD. Los arreglos ortogonales estiman los efectos de los factores en la media y la variación de la respuesta. Un arreglo ortogonal significa que el diseño es balanceado, así que los niveles de los factores se ponderan equitativamente. Por esta razón, cada factor puede evaluarse de forma independiente respecto de todos los demás, de modo que el efecto de un factor no afecta la estimación de otro. Con la aplicación de este diseño y un número relativamente pequeño de experimentos, se pueden cuantificar efectos principales e interacciones de los factores en estudio y se reconoce que no todos los factores que causan variabilidad pueden ser controlados (Aggarwal & Singh, 2005).

Selección del
tipo de fermentación

El control biológico y el desarrollo de bioplaguicidas demandan una gran cantidad de principio activo (propágulos). La fermentación en estado sólido (SSF) y la fermentación sumergida (SmF) son las más usadas para la producción de estos agentes.

La principal diferencia entre las fermentaciones líquidas y las sólidas es la capacidad de mezcla. La fermentación líquida es un sistema de reacción altamente homogéneo que, en general, está perfectamente mezclado, de modo que, en cada parte del reactor y en un tiempo dado, está la misma cantidad del microorganismo, nutrientes y metabolitos (Gervais & Molin, 2003). De otra parte, la fermentación sólida es un sistema altamente heterogéneo en el que es muy difícil monitorear, controlar y homogeneizar variables de proceso tales como la temperatura, la aireación, la humedad y la concentración de nutrientes (Doelle, Mitchell, & Rolz, 1992; Pandey, 2003). Por tanto, el tipo de fermentación a usar para la obtención de un bioplaguicida depende directamente del género y especie del microorganismo, del medio de cultivo seleccionado, del tipo de propágulo a producir y del volumen de producción, entre otros factores.

Aplicaciones de la fermentación sólida

Los hongos filamentosos son los candidatos ideales para la aplicación de la fermentación sólida para la obtención de ingredientes activos de control biológico. En este sentido, los géneros *Trichoderma*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Beauveria*, *Coniothyrium* y *Clonostachys* han sido los más usados para la producción de biomasa fúngica a escala de laboratorio e industrial. Por ejemplo, Li, Song, Li y Chen (2016), quienes optimizaron un medio de cultivo sólido y el nivel de pH para *Trichoderma harzianum* SH2303, aplicaron una estrategia secuencial con un diseño Plackett-Burman seguido de un diseño Box-Behnken, con lo que obtuvieron una concentración máxima de clamidosporas de $4,5 \times 10^8$ esporas/ml (un aumento de ocho veces con respecto al medio sin optimizar).

Para la producción de esporas del hongo entomopatógeno *Coniothyrium minitans*, Chen, Li, Du y Chen (2005) aplicaron un diseño de experimentos Plackett Burman seguido de un diseño factorial completo para generar un modelo de segundo orden (superficie de respuesta). Este último estuvo basado en tres componentes críticos del medio de cultivo, para optimizar así el rendimiento del ingrediente activo. Al finalizar, los valores óptimos fueron de 36,43 g/l de almidón soluble, 3,91 g/l de urea y 1,02 g/l de

KH_2PO_4 con un valor máximo predicho por el modelo de $9,94 \times 10^9$ esporas/g que se corroboró en la práctica ($1,04 \times 10^{10}$ esporas/g).

Para el caso del control biológico del moho gris en fresa, causado por el patógeno *Botrytis cinerea* en poscosecha, Viccini, Mannich, Capalbo, Valdebenito y Mitchell (2007) evaluaron factores fisicoquímicos (como la humedad, la concentración del inóculo y la agitación) en un medio de cultivo basado en granos de arroz a escala de laboratorio en un fermentador artesanal convencional (bolsas plásticas). La mayor producción de esporas ($3,4 \times 10^9$ esporas/g) se obtuvo con una humedad inicial del 46 %, una concentración de inóculo de 1×10^6 esporas/g y agitación manual cada 15 días. Estos resultados sugieren que la producción a gran escala puede ser factible, dado que se requeriría un espacio de 24 m² de incubación para producir suficientes esporas para el tratamiento continuado de 1 ha de plantas de fresa.

Los sistemas SSF pueden utilizar subproductos agrícolas relativamente baratos, tales como salvado de trigo, salvado de arroz y otros residuos de cereales o leguminosas (Feng, Liu, & Tzeng, 2000; Zhu, Knol, Smits, & Bol, 1996). No obstante, los sustratos para la fermentación sólida tienen algunas desventajas como las siguientes: espesor de la capa de sustrato, baja porosidad, limitada capacidad de transferencia de calor y estructuras internas que perturban la aireación y la absorción eficiente de nutrientes (Hölker & Lenz, 2005; Marín-Cervantes et al., 2008). Además, en la mayoría de los casos es imposible separar la biomasa del sustrato sólido residual, de modo que la estimación directa del crecimiento no es fiable. Una alternativa viable es el uso de soportes inertes, tales como resinas de intercambio iónico y espumas de poliuretano. Los soportes inertes presentan una alta porosidad, baja densidad, absorción de agua relativamente alta y un ambiente satisfactorio para el crecimiento de hongos, donde los nutrientes de un medio líquido son absorbidos (Auria, Ortiz, Villegas, & Revah, 1995; Shi et al., 2009). El uso de soportes inertes permite la determinación directa de biomasa directa, la reutilización, extracciones más limpias, buena aireación y remoción de calor (Marín-Cervantes et al., 2008; Zhu, Smits, Knol, & Bol, 1994). Por ejemplo, con el hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii*, Xu, Yu y Shi (2011) evaluaron

dos soportes inertes y tres orgánicos para la obtención de esporas, gracias a lo cual seleccionaron la espuma de poliuretano y el bagazo de caña como los más promisorios, por favorecer el crecimiento del hongo ($1,0 \times 10^{10}$ esporas/g soporte) y mantener una alta actividad quitinasa de los conidios (entre 2,7 y 3,3 U/mg) para su aplicación como agente biocontrolador.

Particularmente en los hongos filamentosos, la adición de compuestos inductores, la manipulación de las concentraciones de carbono y las relaciones C/N pueden alterar las características morfológicas y fisiológicas de las esporas, lo que conduce a una mayor actividad en hongos entomopatógenos (Hallsworth & Magan, 1994b; Ibrahim, Butt, & Jenkinson, 2002; Lane, Trinci, & Gillespie, 1991) y fitopatógenos (Jackson, 1997; Jackson & Schisler, 1992; Schisler, Jackson, & Bothast, 1991; Yu, Hallett, Sheppard, & Watson, 1998). Por ejemplo, para *Metarhizium anisopliae*, Ibrahim et al. (2002) demostraron que el medio de cultivo y la adición de inductores de virulencia (por ejemplo, KCl) tienen una influencia crítica no solo sobre el crecimiento de las estructuras de resistencia, sino sobre algunos eventos asociados al biocontrol, tales como la germinación de los conidios, el desarrollo de los apresorios y el crecimiento micelial; aun cuando sugieren que la virulencia depende en mayor medida de la velocidad de infección.

Por otro lado, la alteración de la actividad del agua en los medios (Aw) también puede influir favorablemente en las características morfológicas y fisiológicas (Hallsworth & Magan, 1994a; Ibrahim et al., 2002). Sin embargo, el grado de patogenicidad o virulencia de los hongos entomopatógenos (*in vivo*) en función de las condiciones de crecimiento —ya sea por fermentación sólida o líquida— no presenta consenso, por tanto, la mayoría de los casos se limita a la dependencia exclusiva del aislamiento y de su condición genotípica (Ibrahim et al., 2002). El comportamiento de las esporas está ligado a los cambios fisiológicos relacionados con la concentración de carbohidratos intracelulares, por ejemplo, los polioles se correlacionaron con la germinación (Al-Hamdani & Cooke, 1987; Hallsworth & Magan, 1994a) y los disacáridos no reductores, con la tolerancia a la desecación (Crowe, Crowe, & Chapman, 1984; Hallsworth & Magan, 1994a; Harman et al., 1991; Jin, Harman, & Taylor, 1991).

Frente a las técnicas de fermentación sumergida, la fermentación en estado sólido presenta las ventajas que se enuncian a continuación (Feng, Liu, & Tzeng, 2002; Hölker & Lenz, 2005; Larroche, Theodore, & Gros, 1992; Pandey, Fernandes, & Larroche, 2008; Thomas, Larroche, & Pandey, 2013):

- Rendimientos volumétricos y productividades más altas.
- Costos más bajos por no demandar un consumo energético asociado a la agitación mecánica.
- Obtención de estructuras de resistencia (conidios o esporas) con mayor tolerancia al secado y otros fenómenos de estrés.
- Mayor economía del proceso al hacer uso de subproductos o residuos agrícolas e industriales como medio de cultivo.

Son numerosos los ejemplos de la aplicación práctica de la fermentación sólida para la obtención de biomasa de microorganismos biocontroladores como *Beauveria bassiana* (Chen et al., 2011; Desgranges, Vergoignan, Léréec, Riba, & Durand, 1993), *Trichoderma harzianum* (Chen et al. 2011) y *Bacillus thuringiensis* (Zhang et al. 2015), mediante el uso de sustratos agroindustriales. En Latinoamérica, la empresa brasilera Farroupilha Lallemand es un ejemplo exitoso a nivel industrial, ya que cuenta con la planta de producción más grande de *T. koningiopsis* para el control de *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*, y produce bioinsecticidas con base en *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Leymone, 2016).

Aplicaciones de la fermentación líquida

La fermentación sumergida ha sido utilizada en las últimas décadas como método de producción de bacterias y levaduras, principalmente, debido a su elevada homogeneidad dentro del medio de cultivo y a la facilidad para el control de parámetros de operación tales como temperatura, pH, humedad y oxígeno disuelto (Zhuang, Zhou, Wang, Liu, & Xu, 2011).

En general, para el caso de los hongos filamentosos, la esporulación durante la fermentación líquida suele ser más rápida y más fácil de controlar, pero la

productividad volumétrica de esporas es relativamente baja en comparación con la *ssf* (Tunga et al., 1998). Sin embargo, existen numerosos estudios que demuestran la aplicabilidad de la fermentación sumergida para la producción de otro tipo de estructuras de resistencia como blastosporas de diversos hongos entomopatógenos, con ventajas comparativas como una mejor tolerancia a procesos de secado y a la radiación ultravioleta. Por ejemplo, para *Isaria fumosorosea* se han obtenido altas concentraciones de blastosporas ($> 1 \times 10^9$ blastosporas/ml) en medios relativamente económicos y con tiempos cortos de fermentación (48 horas), que al ser sometidas a procesos de secado mantuvieron su viabilidad por encima del 86 % y presentaron una vida útil mayor a 14 meses, sin pérdida significativa de virulencia hacia la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Mascarin, Jackson, Kobori, Behle, & Delalibera Júnior, 2015; Jackson Cliquet, & Iten, 2010). En otro trabajo, Chong-Rodríguez, Maldonado-Blanco, Hernández-Escareño, Galán-Wong y Sandoval-Coronado (2011) evaluaron varios medios de cultivo y seleccionaron como fuente de carbono una mezcla de sacarosa con licor de maíz, con la que obtuvieron una concentración de $6,38 \times 10^9$ blastosporas/ml del hongo *Beauveria bassiana*. La velocidad de germinación de estas blastosporas no se vio afectada por el proceso de secado por aire forzado; se mantuvieron viables por seis meses, a una temperatura de almacenamiento de 4 °C, además, conservaron su virulencia contra larvas de tercer instar de *Plutella xylostella*, con mortalidades acumuladas del 90 % después de ocho días.

Sin lugar a dudas, el bioplaguicida más exitoso está basado en la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), que representa aproximadamente un 2 % del mercado total de insecticidas y cerca del 90 % de las ventas de todos los bioplaguicidas a nivel mundial. Su éxito comercial se debe a la habilidad de esta bacteria para producir, mediante procesos de fermentación líquida, grandes cantidades de inclusiones cristalinas que contienen proteínas conocidas como δ -endotoxinas o proteínas Cry. Tales proteínas tienen propiedades insecticidas que son altamente específicas para un amplio rango de insectos plaga (dípteros, lepidópteros y coleópteros) y son inocuas para plantas, animales y la mayoría de insectos no-blanco como abejas, mariquitas y parasitoides (Marvier, McCreedy, Regetz, & Kareiva, 2007).

Actualmente existen diferentes productos a base de Bt que han sido desarrollados para el control de insectos en agricultura y también contra especies de mosquitos de interés en sanidad pública. La mayoría de estos productos están basados en mezclas de esporas y cristales derivadas de cepas nativas como las siguientes: *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* (Btk) HD1 (que expresa proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2Aa) o HD73 (que produce Cry1Ac); *B. thuringiensis* var. *Aizawai* HD137 (que produce toxinas Cry ligeramente diferentes, tales como Cry1Aa, Cry1Ba, Cry1Ca y Cry1Da); *B. thuringiensis* var. *San Diego* y *B. thuringiensis* var. *Tenebrionis* (que producen la toxina Cry3Aa); y Bti (que contiene las toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt1Aa).

Los productos basados en Btk son efectivos para controlar muchos lepidópteros fitófagos, que son plagas de cultivos importantes o defoliadores en cultivos forestales. Los productos basados en Bt Aizawai son especialmente activos contra larvas de lepidópteros que se alimentan de granos en almacenamiento. Los productos basados en Bt San Diego y Bt Tenebrionis son recomendados para control de escarabajos plaga en agricultura. Finalmente, los productos basados en Bti son usados para el control de mosquitos que son vectores de enfermedades en humanos como el dengue y la malaria (Soberón, Gill, & Bravo, 2009).

La obtención de las mezclas de esporas y cristales en cualquiera de las variedades de *B. thuringiensis* mencionadas arriba requiere del diseño de un medio de cultivo específico para obtener las concentraciones adecuadas para los procesos de separación, formulación y almacenamiento. En los procesos de producción convencionales, los productos de Bt se desarrollan comercialmente en medios de cultivo sintéticos que contienen harina de soya o de pescado, glucosa, extracto de levadura, peptona, elementos traza y, algunas veces, otros ingredientes para incrementar la esporulación. El costo de producción de Bt depende de muchos factores, sin embargo, el costo de las materias primas es uno de los factores más importantes, que puede comprender entre el 30 % y el 40 % del costo total de producción (Ejiofor, 1991). Por tanto, recientemente se ha puesto mayor atención en el diseño de medios de cultivo más eficientes, con ingredientes de bajo costo (leche de soya, melazas, suero, residuos de plumas de pollo y cascarilla de arroz,

entre otros) y mediante la aplicación de herramientas estadísticas de optimización (Alves, Alves, Pereira, & Capalbo, 1997; Poopathi, Kumar, Kabilan, & Sekar, 2002; Paul, Paul, & Khan, 2011). Un buen ejemplo de esto es el trabajo de Hasanain (2017), quien evaluó siete ingredientes locales, todos con características de subproductos de diferentes procesos y, mediante un diseño factorial de 35 tratamientos, seleccionó cactus y agua de mar como los componentes principales de un medio de cultivo complejo, en el que se determinó como variable fisicoquímica clave el control del pH en un valor óptimo de 7,2 para favorecer la producción del complejo espora-cristal de *B. thuringiensis*. Este se usó en África para el control del mosquito *Anopheles*, vector de la malaria.

Otro modelo muy estudiado y exitoso de aplicación de la fermentación sumergida es el de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*, rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR, por su sigla en inglés) que presenta características interesantes para el desarrollo de biofertilizantes, bioplaguicidas y otros bioproductos. Esto, debido a que tiene una alta capacidad de colonización rizosférica, forma esporas que le confieren resistencia al secado y facilitan su formulación, produce enzimas industriales —como la α -amilasa y la subtilisina (una proteasa usada en detergentes y limpiadores de lentes de contacto)— y péptidos antibióticos, antibacteriales y antifúngicos (Yu et al., 2002).

En ese sentido, Díaz, García y Zapata-Narváez (2015) estandarizaron en Corpoica las condiciones de fermentación líquida de *B. amyloliquefaciens* Bs006 y optimizaron las concentraciones de microelementos en el medio para inducir altas concentraciones de esporas ($\sim 1 \times 10^{10}$ esporas/ml), con tiempos de fermentación de 60 horas. Estas esporas constituyen el ingrediente activo de un bioplaguicida para el control de *F. oxysporum* en el cultivo de uchuva.

En otros estudios también se ha demostrado la producción mediante la aplicación de procesos de fermentación líquida y de lipopéptidos antifúngicos del tipo iturina, surfactina y fengicina, que tienen el potencial de control de patógenos tales como *Sclerotinia sclerotiorum* (Álvarez et al., 2012), *Ralstonia solanacearum* (Singh, Yadav et al., 2016) y *Phytophthora blight* (Chung & Kim, 2005) en diferentes cultivos de interés comercial.

Formulación

El éxito en campo y la viabilidad económica de los productos para el control biológico depende de varios factores: el efecto sobre la plaga objetivo (fitopatógeno o insecto), el tamaño del mercado, el espectro de plagas afectadas por el agente de biocontrol, la consistencia en el efecto biocontrolador bajo condiciones de campo y los costos de producción. También influyen aspectos tecnológicos como la fermentación, la formulación y el sistema de entrega para que el producto sea fácil de aplicar y que (idealmente) no requiera cadena de frío para su transporte y almacenamiento. Se busca, entonces, que las formulaciones mejoren la estabilidad del producto en el almacenamiento para que este tenga una vida útil superior a un año y para que su eficacia sea consistente en campo cuando el producto se aplique en varios cultivos, contra diversas plagas y en distintas condiciones climáticas.

La formulación de microorganismos biocontroladores es considerada una etapa crucial para garantizar tanto la actividad del agente de biocontrol en condiciones de aplicación comercial como su estabilidad en condiciones de almacenamiento. El lento progreso de la investigación en la formulación de los bioplaguicidas se ha considerado como un obstáculo para el posicionamiento de estos productos. Sin embargo, antes de iniciar el proceso de formulación de un microorganismo, se deben definir varios aspectos tecnológicos que son requisito para este tipo de productos, como el tipo de propágulo que va a constituirse en principio activo del producto. El proceso previo de fermentación en fase sólida, líquida o bifásica debe garantizar que se produzca una alta cantidad de los propágulos (principio activo del futuro bioplaguicida), con óptima actividad biocontroladora y a bajo costo.

Es importante, también, caracterizar tanto el sitio en donde se llevará a cabo la aplicación del bioplaguicida (para determinar las condiciones que lo podrían afectar) como las plantas hospederas en el que este producto se aplicará (cultivo), particularmente, en lo relativo a su arquitectura y fenología. Además, es necesario conocer la biología del patógeno o del insecto plaga por controlar, ya que, de acuerdo con esta información, se debe desarrollar una formulación

que permita llegar a los sitios requeridos para prevenir los daños causados por estos agentes o para interrumpir su ciclo, lo cual facilita la aplicación.

Así mismo, antes de empezar el proceso de formulación, es necesario conocer las características ecofisiológicas del microorganismo biocontrolador, para definir cómo la temperatura, la humedad, el pH, la radiación ultravioleta, la actividad de agua (Aw) y otros factores presentes en las zonas en que se aplicará influyen en la viabilidad y la actividad del agente de control biológico. De esta forma, la formulación estará dirigida a conferirle tolerancia al microorganismo frente a las condiciones adversas, estabilidad en el almacenamiento, facilidad en la aplicación y alta efectividad, todo esto dentro de los parámetros de costo-efectividad. El diseño de una formulación implica dos etapas básicas: preformulación y formulación.

Preformulación

La etapa de preformulación tiene como objetivo recopilar información fisicoquímica relacionada con el ingrediente activo y con los auxiliares de formulación por emplear (Villarreal, 2013; Wells, 2004), ya sea a partir de la bibliografía existente o de pruebas experimentales. En el caso de los bioplaguicidas cuyo ingrediente activo es un microorganismo que debe permanecer vivo y activo biológicamente, la información también debe establecerse con pruebas microbiológicas y biológicas (bioensayos). Esta información permite conocer la morfología y ecofisiología del microorganismo para tener una mayor comprensión de cómo interactuará en el medio de cultivo o en la formulación a desarrollar y qué excipientes o procesos pueden afectarle. La etapa de preformulación incluye las siguientes actividades.

Caracterización del ingrediente activo y de los excipientes

En el caso de que el ingrediente activo sea un microorganismo, se establecen las características del tipo de propágulo que se obtiene a partir del proceso de producción masiva. Los propágulos pueden ser células vegetativas o esporas (en el caso de bacterias), conidios,

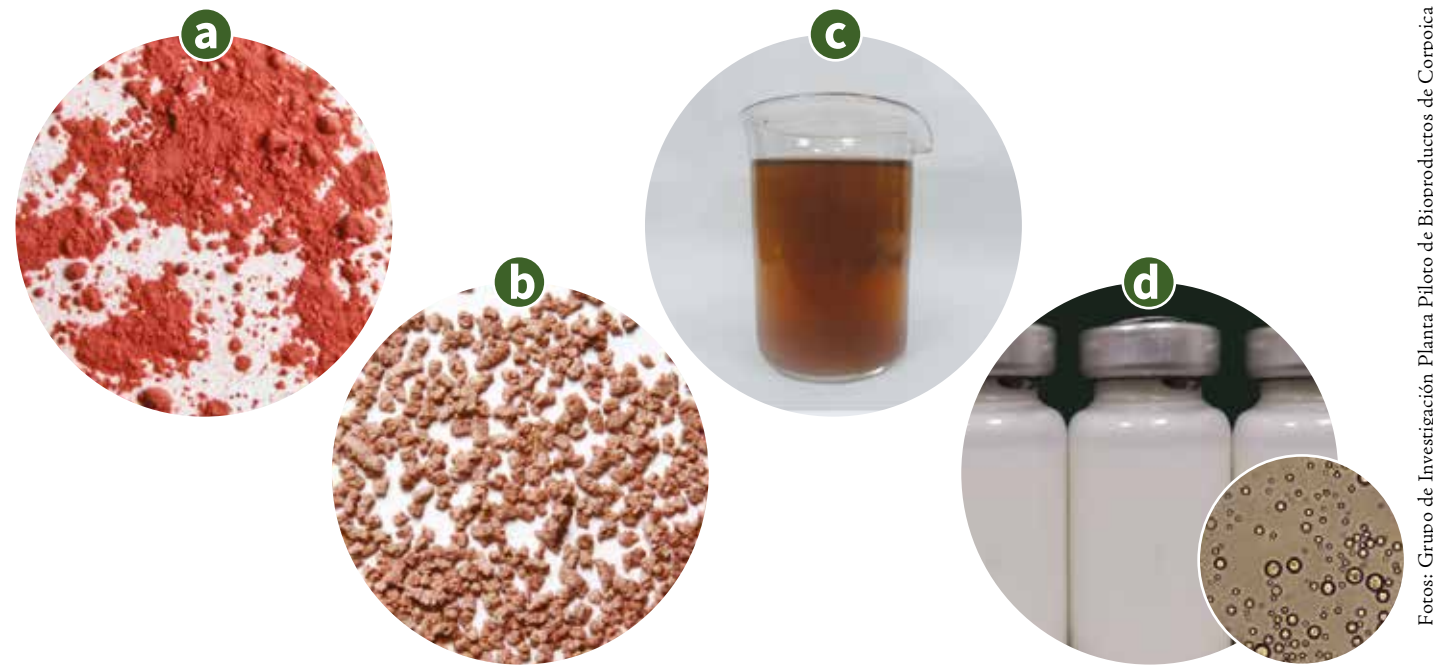
clamidosporas o micelios (en el caso de mohos), células vegetativas (en el caso de levaduras) o suspensión de células o de virus (en el caso de baculovirus). La caracterización del principio activo comprende la forma, el tamaño y la evaluación de variables como la concentración, el tamaño de partícula y la viabilidad (expresada como porcentaje de germinación, para el caso de los hongos, o como unidades formadoras de colonia, para el caso de las bacterias y las levaduras; mientras que, en el caso de los virus, la viabilidad se expresa casi siempre como eficacia).

En la caracterización del ingrediente activo también se busca establecer su comportamiento frente a los factores que puedan afectar su estabilidad en almacenamiento y en campo, como la temperatura, el pH y la radiación solar. Esto permite, además, tomar decisiones respecto al tipo de auxiliares de formulación que deben utilizarse y las operaciones unitarias que podrían involucrarse en el proceso de manufactura. Por ejemplo, Villamizar et al. (2006) caracterizaron los conidios de *Beauveria bassiana* (Bv056) y de *Paecilomyces fumosoroseus* (Pc013), aislamientos seleccionados para el control de *Bemisia tabaci*, con miras al desarrollo de prototipos de formulación. Para esto, a los conidios obtenidos a partir del sustrato de producción se les determinó su concentración, germinación, humedad y tamaño de partícula.

Por otra parte, para la caracterización de los auxiliares de formulación, se busca conocer sus propiedades físicas y químicas, y se establece también su sensibilidad frente a factores ambientales o posibles interacciones entre los auxiliares mismos o con el principio activo, ya que estas últimas pueden llegar a generar productos de degradación que, con el tiempo, afectarían la estabilidad del producto.

Diseño de los prototipos de formulación

En la primera etapa de preformulación, se define el sistema de entrega del microorganismo, que puede ser polvo para espolvoreo (DP), polvo mojabable (WP), polvo para recubrimiento de semillas (DS), gránulos (GR), microgránulos (MG), gránulos dispersables (WG), emulsiones (aceite en agua EW o agua en



Fotos: Grupo de Investigación Planta Piloto de Bioproductos de Corpoica

Figura 12.2. Prototipos de formulación. a. Polvo mojable; b. Gránulos dispersables; c. Suspensión concentrada; d. Emulsión aceite en agua con vista microscópica de las dos fases estabilizadas.

aceite EO), suspensión concentrada (SC), dispersión en aceite (OD), suspoemulsiones (SE), suspensión de microencapsulados (CS), suspensiones la para aplicación a ultrabajo volumen (ULV), etc. (figura 12.2).

Los polvos para espolvoreo, por ejemplo, se aplican principalmente en seco sobre la superficie del suelo o de las plantas. En estos casos, la materia activa se encuentra dispersa en un vehículo inerte sólido que puede estar acompañado con agentes de fluidez y diversos estabilizantes. Los polvos mojables, por su parte, son aquellos que deben reconstituirse en agua para su aplicación; una vez mojados pueden mantenerse en suspensión durante un periodo de tiempo largo. Los granulados son aglomerados de partículas con tamaños que oscilan entre 0,2 y 1,5 mm; contienen el principio activo, un agente aglutinante, los diluentes y otros coadyuvantes. Dentro de las formulaciones líquidas, se destacan los concentrados emulsionables, que constan de un principio activo suspendido en un medio oleoso apropiado, cuya mezcla con agua produce una emulsión estable.

La mayoría de las formulaciones de bioplaguicidas existentes en el mercado para el control de fitopatógenos y de insectos plaga están basadas en formas secas, polvos mojables, granulados o polvos de reconstitución en vehículos oleosos. Sin embargo, hay aún mucho por

explorar en materia de desarrollo de nuevas formulaciones adaptadas a los requerimientos del usuario. En todo caso, el tipo de formulación por desarrollar depende principalmente de las características del blanco a controlar (insecto o fitopatógeno) y del cultivo en que se va a aplicar. De esta manera, si se controla un insecto que permanece en el suelo, se podría desarrollar un granulado dispersable para aplicación en *drench*; si, por el contrario, se encuentra sobre las hojas, será preferible una emulsión, suspensión o polvo mojable que tenga buenas características de adherencia.

El hecho de que el microorganismo que constituye el principio activo de un bioplaguicida deba permanecer vivo, pero estable genética y fisiológicamente, obliga a que este deba mantenerse en estado latente durante el almacenamiento y a que se active cuando sea aplicado para ejercer su actividad biocontroladora. Esto puede ser un reto para el formulador, quien debe considerar los requerimientos y susceptibilidades específicas de cada microorganismo. Es importante tener en cuenta que varios de los factores que pueden afectar a un microorganismo positiva o negativamente provienen de la fermentación, ya que, al separar el microorganismo de su sustrato de producción, además de la biomasa microbiana, pueden quedar materiales extraños cuya interacción física con el microorganismo afecte su

viabilidad y la actividad biocontroladora. También las características fisicoquímicas de la formulación pueden interactuar con los auxiliares de formulación.

La mayoría de las formulaciones implica el uso de surfactantes, dispersantes y agentes de suspensión. Los tensioactivos empleados en la formulación, que pueden ser iónicos o aniónicos, sirven para humedecer los sólidos y para prevenir la aglomeración de las partículas. En general, los tensioactivos aniónicos son adsorbidos por la superficie de las partículas y llevan una carga eléctrica, de forma que trabajan a distancia cuando dos partículas se aproximan entre sí para impartir la estabilidad electrostática. Por otra parte, los tensioactivos no iónicos en la superficie de la partícula promueven estabilidad estérica.

Los dispersantes pueden ser polímeros solubles en agua o agentes espesantes necesarios para una formulación estable. Dado su alto peso molecular, actúan principalmente como una barrera física entre las partículas en el medio líquido de dispersión. Los dispersantes, en general, les confieren viscosidad a las suspensiones líquidas en el estado estático (almacenamiento). Frecuentemente, se utilizan mezclas de estos con los tensioactivos para darle estabilidad a la formulación resultante.

Los agentes de suspensión —que juegan un papel esencial en las formulaciones— incluyen arcillas (palygorskita y bentonita) y sílice entre otros. En su mayoría, son minerales inorgánicos añadidos al sistema, representados por partículas finas de 1 a 50 μm , que pueden ser hidrófilos o hidrófobos. Ayudan a separar las partículas para que no se aglomeren, a la vez que modifican la reología y mejoran el flujo del sistema.

Otras presentaciones de bioplaguicidas, como los granulados (G) —que tienen aspecto de arenilla, con tamaños de partícula que oscilan entre 0,2 y 1,5 mm—, además del principio activo y el vehículo, contienen un adherente. Los granulados dispersables en agua (WG), además de los auxiliares de formulación mencionados, contienen dispersantes.

De otra parte, la mayoría de las formulaciones de bioplaguicidas requiere el uso de un protector de luz ultravioleta para evitar daños en el ingrediente activo por radiación solar. Dentro de los adyuvantes que actúan como protectores, se encuentran los filtros

solares, como el ácido para-aminobenzoico (PABA), y las pantallas solares, como el óxido de zinc y el dióxido de titanio (Velásquez et al., 1998).

Compatibilidad del ingrediente activo con los excipientes

El objetivo de estos ensayos es seleccionar los excipientes y su concentración, de forma que no tengan un efecto negativo sobre el principio activo. La selección de los excipientes para esta prueba se realiza con base en la función que deben tener en la formulación (tabla 12.1), la disponibilidad para su consecución y su costo. La concentración del excipiente por evaluar varía de acuerdo con sus características y su función dentro de la formulación; dicha concentración generalmente se establece con base en la literatura y en la experticia del formulador. De estas pruebas se deben obtener resultados confiables en el menor tiempo posible, por lo que usualmente se hacen ensayos de almacenamiento (mezclas del principio activo con los excipientes a probar) desde ocho días hasta tres meses a temperaturas mayores a las de refrigeración, con el fin de establecer el efecto sobre el principio activo de manera rápida. Como variable de respuesta, en el caso de los hongos biocontroladores, se evalúa la germinación; en el caso de las bacterias, la viabilidad expresada en unidades formadoras de colonia; y en el caso de los virus, se lleva a cabo un ensayo biológico para determinar la eficacia.

En estas pruebas es necesario resaltar la importancia de los diseños estadísticos experimentales, que pueden reducir el tiempo de la evaluación de acuerdo con el número de tratamientos a evaluar. Algunos de los diseños más utilizados son los siguientes:

1. Mezcla binaria: se mezcla el ingrediente activo con un único excipiente y se evalúan diferentes condiciones que pueden afectar la estabilidad del primero, como temperatura, humedad, luz y oxidación.
2. Diseño factorial $2n-1$: permite la evaluación simultánea del ingrediente activo con n excipientes o mezclas de estos y el análisis estadístico de los resultados facilita la identificación de los efectos y la

Tabla 12.1. Función de los excipientes utilizados en la elaboración de bioplaguicidas

Función del excipiente	Descripción	Tipo de sustancia
Desintegrantes	Facilitan la disgregación en pequeños fragmentos. Así, se produce un aumento de la superficie y una aceleración de la liberación del ingrediente activo.	Almidones, derivados de celulosa, pectina y alginatos
Emulsificantes	Facilitan el proceso de formación de la emulsión durante la fabricación y también su estabilidad durante su vida útil.	Se dividen en cuatro categorías principales de acuerdo con su ionización en soluciones acuosas: aniónicos, no iónicos, catiónicos y anfotéricos. Polisacáridos, ésteres de glicerol, ésteres de sorbitán, polisorbatos y ésteres de celulosa.
Reductores de actividad de agua	Sustancias que reducen la cantidad de agua metabólicamente disponible para ser utilizada por un microorganismo, sin causar su muerte. Además, detienen su crecimiento y reducen su metabolismo, lo que puede otorgarle mayor estabilidad durante el almacenamiento.	Sales o polioles, ya que las sales en agua se disocian y las moléculas de agua libres, disponibles para reacciones químicas, participan en la solvatación de los iones de la sal disuelta. Asimismo, los grupos hidroxilo de los polioles forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua y reducen el número de moléculas de agua libres.
Viscosantes / Adherentes	Aumentan la viscosidad de suspensiones acuosas para brindar mayor homogeneidad y estabilidad. Además, pueden proteger los microorganismos de la desecación y darles mayor adherencia.	Polisacáridos, celulosas hidrosolubles, silicatos hidratados, carbómeros, dióxido de silicio coloidal.
Lubricantes	Disminución del rozamiento al comprimir o del comprimido con la matriz.	Talco siliconado, ácido esteárico y estearatos, estearatos magnésicos y cálcicos.
Reguladores de pH	La función de este excipiente es ajustar y mantener el pH en las condiciones óptimas para el microorganismo.	Sales, ácido y bases conjugados.
Diluentes	Son vehículos inertes que pueden ser líquidos, geles o sólidos.	Agua, arcillas, aceites minerales o vegetales, polímeros.

Fuente: Adaptada de Aulton (2004) y Burges (1998)

- selección de excipientes. Sin embargo, la magnitud del número de tratamientos puede llegar a ser una limitante para $n > 4$.
3. Diseño de Plackett Burman: permite la evaluación del efecto de varios excipientes sobre la viabilidad del ingrediente activo (usualmente con n equivalente a múltiplos de cuatro), en estas pruebas se puede llevar a cabo la selección del auxiliar de formulación más adecuado para una función específica dentro de la formulación, de acuerdo con las operaciones unitarias involucradas en su manufactura. No presenta la limitación en el número de tratamientos de los diseños factoriales.

Formulación

Una formulación está compuesta por un ingrediente activo (microorganismo, extracto vegetal, metabolito, etc.) que ejerce la actividad biológica y un grupo de auxiliares de formulación o excipientes (sustancias inertes que deben proteger y liberar el ingrediente activo). Estos auxiliares deben asegurar la estabilidad del producto, proteger el principio activo de la radiación ultravioleta, asegurar la permanencia sobre el blanco, retener la humedad, protegerlo de la desecación, promover la dispersión del bioproducto y facilitar su aplicación (Boyetchko et al., 2002; Burges, 1998; Ravensberg, 2011). Por tanto, la primera función de una formulación es mantener el propágulo o microorganismo con baja o ninguna actividad metabólica y, al mismo tiempo, mantenerlo viable y virulento por el mayor tiempo posible de almacenamiento (Ravensberg, 2011).

Con base en la información recopilada en la etapa anterior, se definen los posibles componentes de los prototipos de formulación y se establece una composición semicuantitativa. Para este tipo de decisiones es recomendable usar como herramienta de selección de los prototipos de formulación diseños estadísticos experimentales (Huynh-Ba, 2008). Igualmente, durante esta etapa se elaboran las primeras propuestas para el procedimiento de fabricación, así como los estudios de estabilidad y de eficacia para la selección de la posible formulación. Las pruebas realizadas en esta etapa permiten definir factores relacionados con la composición de la formulación, con el proceso de manufactura, el tipo de envase y los estudios de estabilidad (Aulton, 2004). En la tabla 12.2 se presentan algunos ejemplos de estudios de desarrollo de bioplaguicidas realizados con las etapas de preformulación y formulación.

Desarrollo de bioplaguicidas en Colombia: caso Corpoica

Desde hace 24 años, mediante una estrategia de trabajo multidisciplinario, en Corpoica se ha seguido el esquema de desarrollo de bioplaguicidas definido

en la figura 12.1. Este trabajo ha dado como resultado tres productos registrados: dos bioinsecticidas y un biofungicida. Además, ocho bioplaguicidas se encuentran en avanzado estado de desarrollo (tabla 12.3).

Evaluación de la compatibilidad de bioplaguicidas con agroquímicos

Una de las etapas finales en el desarrollo de un bioplaguicida consiste en establecer su compatibilidad con agroquímicos, ya que su incompatibilidad con los insumos usados dentro de las prácticas tradicionales del cultivo es una de las principales limitantes de los productos biológicos empleados en campo (Grijalba et al., 2014). Los agroquímicos comprenden productos de síntesis química de amplio espectro que son usados extensivamente en muchos agroecosistemas y que pueden tener efectos adversos sobre la eficacia de los microorganismos biocontroladores. Los agroquímicos incluyen los fungicidas, que son frecuentemente requeridos para controlar enfermedades de plantas; los insecticidas, que pueden ser necesarios para suprimir una rápida expansión de la población de insectos plaga; y los herbicidas, fertilizantes y reguladores de crecimiento (Karnataka, 2007).

Las pruebas de compatibilidad de bioplaguicidas con agroquímicos tienen como objetivo permitir una adecuada integración del producto desarrollado con otras estrategias de control de plagas, con el fin de obtener un cultivo sano y con la menor perturbación posible del agroecosistema (FAO, 2005), o evitar que un mal uso del bioplaguicida, al mezclarse inadecuadamente con otras sustancias, pierda su eficacia. Solo el uso de los bioplaguicidas dentro de un programa de MIP (que incluya el uso de diferentes métodos de control de insectos plaga y enfermedades) permitirá incrementar la productividad y el rendimiento por unidad de área de los cultivos, disminuir los residuos de insecticidas en los alimentos y promover nuevas alternativas de control ambientalmente sostenible (Marcus, 2009).

Tabla 12.2. Estudios de preformulación y formulación en el desarrollo de bioplaguicidas a base de entomopatógenos

Aislamiento seleccionado	Etapa de preformulación			Etapa de formulación		Referencia
	Caracterización del ingrediente activo	Diseño de prototipos	Compatibilidad con excipientes	Elaboración de prototipos de formulación	Caracterización de prototipos de formulación	
<i>Beauveria bassiana</i> y <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Concentración y germinación	Polvo mojable	- Mezcla binaria, temperatura de almacenamiento entre 8 °C y 28 °C durante dos meses de almacenamiento - La germinación se evalúa cada mes	Composición cuali- cuantitativa de los prototipos y estudio de estabilidad acelerada a 8 °C, 18 °C y 28 °C durante tres meses de almacenamiento	Concentración, germinación, humedad, tamaño de partícula, susceptibilidad a la radiación solar	Villamizar et al. (2006) Grijalba, et al. (2009)
	Tamaño de partícula de los conidios					
	Susceptibilidad frente a la radiación ultravioleta tipo C					
Virus de <i>Spodoptera frugiperda</i> SfNPV003	Morfología y tamaño de los cuerpos de inclusión del virus, caracterización molecular y caracterización biológica	Microcápsulas	- Estudio de compatibilidad con solventes utilizados en la elaboración de las microcápsulas - Evaluación de la actividad biocontroladora - Selección de condiciones para el proceso de formación de microcápsulas mediante la metodología de evaporación de solventes (concentración de tensioactivo y del polímero)	Eficiencia del proceso y concentración de las microcápsulas	Tamaño de partícula y morfología - Efecto de la radiación ultravioleta - Estabilidad en almacenamiento a 8 °C, 18 °C y 28 °C durante 15 meses	Barrera et al. (2012) Villamizar et al. (2012)

Fuente: Elaboración propia

Sin embargo, para que un programa de control sea efectivo, todos los métodos combinados (inclusive los agentes de control biológico) necesitan ser compatibles entre sí (Bardin et al., 2008).

Otro aspecto que resalta la importancia de las pruebas de compatibilidad es que al utilizar dosis subletales de agroquímicos en combinación con microorganismos biocontroladores se puede obtener un efecto positivo, de manera que los insectos y fitopatógenos resulten más susceptibles a la acción de las toxinas de los microorganismos. Por ejemplo, Alves et al. (1998) encontraron que algunas combinaciones de insecticidas con hongos entomopatógenos tienen un efecto aditivo, ya que los insecticidas, en una dosis menor a la recomendada, fueron compatibles con el hongo *M. anisopliae* de forma tal que disminuyeron la inmunidad del insecto y permitieron un incremento en la efectividad del entomopatógeno.

Las pruebas de compatibilidad de bioplaguicidas con agroquímicos son específicas, es decir, deben llevarse a cabo con cada formulación o cepa de microorganismo, aun cuando el género sea el mismo, ya que el efecto de un agroquímico sobre un bioplaguicida varía ampliamente de acuerdo con la especie del microorganismo biocontrolador que sea utilizado como ingrediente activo. El efecto también varía según la naturaleza de la molécula química, el tipo de producto, su modo de acción y la dosis del agroquímico (Alves & Lecuona, 1998; Batista Filho et al., 2001; Grijalba Bernal et al., 2014; Pavone & Dorta, 2010). En los ensayos *in vitro* se evalúa el efecto tóxico del agroquímico sobre la viabilidad del microorganismo biocontrolador en condiciones de laboratorio.

Para el caso de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi* e *Isaria fumosorosea*, la compatibilidad se evidencia sobre el crecimiento vegetativo, la esporulación y la germinación. El crecimiento vegetativo se evalúa generalmente por el efecto sobre el crecimiento diametral del hongo, para lo cual se ajusta la concentración del agroquímico en una caja de Petri con un medio de agar y se coloca en el centro un disco del hongo en estado activo. A este último se le mide el crecimiento diametral cada cierto tiempo hasta completar aproximadamente 10 o 12 días.

Algunos autores utilizan un segmento de este mismo hongo para evaluar la esporulación: mediante el método de barrido de la colonia, se prepara una suspensión de conidios que se utiliza para llevar a cabo el recuento en cámara de Neubauer. En cambio, para el caso de la germinación, se prefiere dejar los conidios en contacto directo con una suspensión del agroquímico a evaluar durante un tiempo determinado, el cual pretende simular las condiciones reales de aplicación. Este contacto generalmente no dura más 12 horas, al cabo de las cuales se toma una muestra de la suspensión, cuya germinación es evaluada después de 24 horas de incubación.

Para el caso de hongos antagonistas (como *Trichoderma harzianum*), la compatibilidad con agroquímicos y extractos vegetales usados para el biocontrol de hongos fitopatógenos se evalúa aplicando técnicas analíticas similares a las mencionadas arriba, basadas en el crecimiento fúngico expresado como diámetro de la colonia y crecimiento micelial promedio.

Para el caso de las bacterias y los virus entomopatógenos, estos microorganismos se dejan en contacto con la suspensión del agroquímico a evaluar. La viabilidad de las bacterias es evaluada mediante recuento en placa, mientras que los virus deben ser purificados retirando los residuos de agroquímico y evaluados mediante un ensayo biológico en el cual se determina su actividad biológica.

Para el caso de las bacterias antagonistas (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, por ejemplo), es usual usar la técnica del “agar envenenado”. En esta, las dosis de agroquímicos se mezclan con agar fundido usado convencionalmente para el crecimiento de la bacteria y se ubican en cajas de Petri por triplicado. Desde el centro de la caja se siembra masivamente o en forma de rejilla un cultivo bacterial activo y se incuba bajo condiciones óptimas de temperatura. Después de 48 horas, se registra el crecimiento y se compara con un testigo sin adición del agroquímico. Otro método evalúa la interacción directa en un caldo nutritivo inoculado con el microorganismo en el que se adiciona la dosis del agroquímico, se incuba y se cuantifica el crecimiento por un método turbidimétrico. Los resultados se contrastan con un control sin adición del químico.

Tabla 12.3. Bioplaguicidas desarrollados por Corpoica

Principio activo	Características del desarrollo	Efecto	Cultivo	Beneficios	Estado de desarrollo
<i>Trichoderma koningiopsis</i> Th003 Nombre comercial: Tricortec	Producción del microorganismo: fermentación sólida Formulación: polvo mojable (WP) Control de calidad: Concentración mínima 1 × 10 ⁹ UFC/g, germinación > 80 %	Control de fitopatógenos: <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium splendens</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Sclerotinia minor</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Oidium lycopersici</i> , <i>Sclerotium cepivorum</i> , <i>Olpidium virulentus</i> , <i>Spongospora subterranea</i> , <i>Plasmodiophora brassicae</i>	Evaluaciones en campo: tomate, arroz, papa, lechuga, cohombro, cebolla, frijol, habichuela, uchuva, mora Uso potencial: palma, algodón, maíz, flores, soya, cacao, aguacate, otros frutales Control de <i>Phytophthora</i> spp., <i>Moniliophthora roreri</i> y otras especies de <i>Fusarium</i> spp.	• Microorganismo endofítico • Promoción de crecimiento vegetal • Eficacia entre 60 % y 85 % en campo • Reemplazo o reducción en aplicaciones de químicos extremada y altamente tóxicos tales como vitavax, flutolanil, validacin, carbenzazim, benomil, tiabendazol, iprodione y procimidona	Producto registrado para su uso en tomate, lechuga y arroz
<i>Lecanicillium lecanii</i> LV026 Nombre comercial: Lecabiol	Producción del microorganismo: fermentación sólida Formulación: granulado dispersable (WG) Control de calidad: Concentración mínima 5 × 10 ⁹ UFC/g, germinación > 80 %	Control de insecto plaga: Moscas blancas (<i>Trialeurodes vaporariorum</i> y <i>Bemisia tabaci</i>)	Evaluaciones en campo: algodón, berenjena, tomate, melón, frijol y soya Uso potencial: frutales, plátano, papa y control de áfidos, trips, royas y otros patógenos foliares	• Eficacia entre el 50 % y el 80 % en campo • Disminución de la pegajosidad en algodón (aumento de calidad) • Reducción en aplicaciones de químicos como buprofezin, imidacloprid, piriproxifen	Producto registrado para su uso en algodón, soya, tomate, berenjena, pimentón, tomate de árbol, uchuva y ají
<i>PhoGV baculovirus</i>	Producción del microorganismo: <i>in vivo</i> Formulación: polvo para espolvoreo Control de calidad: Concentración mínima 5 × 10 ⁶ CI/g	Control de insecto plaga: <i>Tecia solanivora</i> (polilla guatemalteca de la papa)	Papa en almacenamiento	• Eficacia superior al 80 % • Dosis de 2,5 kg/t papa • Categoría toxicológica: IV • Reducción en aplicaciones de químicos como fosfamina	Producto registrado para papa en almacenamiento y papa de consumo

(Continúa)

(Continuación tabla 12.3)

Principio activo	Características del desarrollo	Efecto	Cultivo	Beneficios	Estado de desarrollo
<i>Isaria fumosorosea</i>	Producción del microorganismo: fermentación sólida Formulación: granulado dispersable	Control de insecto plaga: Moscas blancas (<i>Trialeurodes vaporariorum</i> y <i>Bemisia tabaci</i>)	Evaluaciones en campo: algodón, berenjena, tomate, melón. Usos potenciales: control de áfidos, trips, <i>Diaphorina citri</i> , nemátodos, royas y otros patógenos foliares	• Disminución de la pegajosidad en algodón (aumento de calidad) • Reducción en aplicaciones de químicos como buprofezin, imidacloprid, piriproxifen	Producto en fase de desarrollo
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Producción del microorganismo: fermentación líquida Formulación: suspensión concentrada	Control de <i>Botrytis cinerea</i> en precosecha Control de patógenos de poscosecha: <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus stolonifer</i>	Mora Usos potenciales: flores, fresa, banano, cítricos, otras frutas, cacao	Reducción en aplicaciones de químicos en precosecha y menores pérdidas en poscosecha	Producto en fase de desarrollo
<i>Metarhizium rileyi</i>	Producción del microorganismo: fermentación sólida Formulación: suspensión oleosa concentrada Control de calidad: Concentración mínima 1 × 10 ⁹ CI/g	Control de insecto plaga: <i>Spodoptera frugiperda</i> (gusano cogollero)	Evaluaciones en invernadero: maíz Usos potenciales: algodón, sorgo, soja, girasol, pastos, arroz Otros: noctuidos	Reducción en aplicaciones de químicos como lufenuron, cipermetrina y clofuzazuron	Producto en proceso de desarrollo
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Producción del microorganismo: fermentación sólida Formulación: polvo mojable Control de calidad: Concentración mínima 1 × 10 ⁹ CI/g	Control de insecto plaga: <i>Rhammatocerus schistocercoides</i> (langosta llanera) y chizas	Evaluaciones en campo: pastos Usos potenciales: mion de los pastos y de la caña, picudo y crisomélidos	Reducción en aplicaciones de químicos como furadan, abamectina y permetrina	Producto en proceso de registro

(Continúa)

(Continuación tabla 12.3)

Principio activo	Características del desarrollo	Efecto	Cultivo	Beneficios	Estado de desarrollo
<i>Beauveria bassiana</i>	Producción del microorganismo: fermentación sólida Formulación: granulado para espolvoreo	Control de insecto plaga: <i>Premnotrypes vorax</i> (gusano blanco)	Evaluaciones en campo: papa Usos potenciales: control de áfidos, moscas blancas, broca del café, crisomélidos, picudo y trips	Reducción en aplicaciones de químicos como furadan y abamectina	Producto en fase de desarrollo
<i>Beauveria bassiana</i>	Producción del microorganismo: fermentación sólida Formulación: suspensión oleosa concentrada	Control de insecto plaga: <i>Diatrea saccharalis</i>	Evaluaciones en campo: caña panelera Usos potenciales: caña azucarera, arroz, maíz y sorgo Control de áfidos, moscas blancas, broca del café, crisomélidos, picudo y trips	Eficacia superior al 70 % en caña panelera	Producto en fase de desarrollo
Nucleopoliedrovirus SfNPV Nombre comercial: Spobiol	Producción del microorganismo: <i>in vivo</i> Formulación: polvo mojable (WP) Control de calidad: Concentración mínima 1 × 10 ⁹ CI/g	Control de insecto plaga: <i>Spodoptera frugiperda</i> (gusano cogollero)	Evaluaciones en campo: maíz Uso potencial: algodón, sorgo, soja, girasol, pastos y arroz	- Eficacia superior al 70 % - Reducción en aplicaciones de químicos como lufenuron, cipermetrina y clofuzazuron	Producto registrado en maíz

(Continúa)

(Continuación tabla 12.3)

Principio activo	Características del desarrollo	Efecto	Cultivo	Beneficios	Estado de desarrollo
Granulovirus <i>Erinnyis ello</i> Nombre comercial: Erytec	Producción del microorganismo: <i>in vivo</i> Formulación: polvo mojable (WP) Control de calidad: concentración mínima 1 × 10 ⁹ CI/g	Control de insecto plaga: <i>Erinnyis ello</i> (gusano cachón)	Evaluaciones en campo: caucho Uso potencial: yuca y papaya	- Eficacia superior al 80 % en caucho - Tiempo de acción de tres días	Producto en proceso de registro en caucho
Granulovirus <i>Tuta absoluta</i>	Producción del microorganismo: <i>in vivo</i> Formulación: polvo mojable (WP)	Control de insecto plaga: <i>Tuta absoluta</i> (gusano minador)	Evaluaciones en invernadero: tomate Uso potencial: <i>Phthorimaea operculella</i> en papa y tomate	Eficacia superior al 60 % en invernadero	Producto en fase de desarrollo

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 12.4 se presentan algunos ejemplos de trabajos encontrados en la literatura entre 2000 y 2017. Predominan los trabajos realizados con hongos entomopatógenos y antagonistas y con bacterias antagonis-

tas, independientemente de que el microorganismo con actividad biológica se encuentre formulado o no. Sobre bacterias y virus entomopatógenos se encontró la menor cantidad de información.

Tabla 12.4. Trabajos registrados en la literatura en los que se evalúa la compatibilidad de un microorganismo biocontrolador con agroquímicos

Microorganismo	Agroquímicos evaluados	Dosis evaluada	Variables evaluadas	Autor y año
<i>Beauveria bassiana</i> y <i>Verticillium lecanii</i>	Insecticidas, fungicidas y fertilizantes	Dosis recomendada (DR)	Germinación de conidios	Dutta et al. (2016)
<i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	Herbicidas, insecticidas y fungicidas	0,5 (DR) y 0,25 (DR)	Crecimiento diametral y esporulación	Melo et al. (2015)
<i>Isaria fumosorosea</i>	Fungicidas e insecticidas	(DR): 0,5 (DR) y 0,25 (DR)	Germinación y unidades formadoras de colonia	Grijalba Bernal, Gómez Álvarez y Zuluaga Mogollón (2014)
<i>Nucleopoliedrovirus</i>	Insecticidas y fungicidas	2 (DR)	Actividad biológica sobre larvas de <i>S. frugiperda</i>	Santos et al. (2014)
<i>Beauveria bassiana</i>	Insecticidas	0,5 (DR), 1,5 (DR) y 2 (DR)	Crecimiento radial, producción de conidios y germinación de conidios	Ribeiro et al. (2012)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Insecticidas químicos y un extracto natural	0,32; 1,6; 8,0; 40; y 200 ppm	Germinación, crecimiento diametral y esporulación	Schumacher y Poehling (2012)
<i>Nomuraea rileyi</i>	Insecticidas, fungicidas y herbicidas	(DR)	Presencia o ausencia de un halo de inhibición en el crecimiento del hongo	Pavone y Dorta (2010)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Fungicidas	(DR)	Germinación y crecimiento diametral	Bruck (2009)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Fungicidas, insecticidas y herbicidas	(DR)	Crecimiento diametral y tasa de esporulación	Karnakata (2007)
<i>Lecanicillium muscarium</i>	Insecticidas	(DR)	Germinación de conidios	Cuthberson, Walters y Deppe (2005)

(Continúa)

(Continuación tabla 12.4)

Microorganismo	Agroquímicos evaluados	Dosis evaluada	Variables evaluadas	Autor y año
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Fungicidas e insecticidas	(DR), 0,2; 2,0; 20 y 200 mg/(ia) Kg	Crecimiento diametral	Samson, Milner, Sander y Bullard (2005)
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Fungicidas e insecticidas	(DR): 1/10 (DR) y 10 (DR)	Crecimiento radial y germinación de conidios	Kubilay y Gökce (2004)
<i>Beauveria bassiana</i>	Insecticidas	(DR): 0,5 (DR) y 2,0 (DR)	Germinación, crecimiento diametral y esporulación	Oliveira, Oliveira y Sueki (2003)
<i>Aschersonia aleyrodis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , baculovirus anticarsia (VPNAg), <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Hirsutella thompsonii</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Nomuraea rileyi</i> , <i>Paecilomyces farinosus</i> , <i>Sporothrix insectorum</i> , <i>Verticillium lecanii</i>	Insecticida	Mínima y máxima dosis recomendada	Hongos: crecimiento radial y esporulación Bacterias: unidades formadoras de colonia Virus: actividad biológica en invernadero sobre larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	Batista et al. (2001)
<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Paecilomyces</i> sp.	Insecticida	(DR): 0,7 (DR) y 1,3 (DR)	Germinación de conidios, crecimiento diametral y esporulación	Neves, Hirose, Chujo y Moino (2001)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Fungicidas, insecticidas, herbicidas y extractos botánicos	(DR)	Crecimiento diametral	Bagwan (2010)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fungicidas, insecticidas y herbicidas	(DR)	Crecimiento expresado como diámetro del cultivo	Surendran, Kannan, Nayar y Leenakumary (2012)
<i>Trichoderma viride</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Insecticidas, fungicidas, fertilizantes	(DR)	Hongo: crecimiento diametral Bacteria: crecimiento expresado mediante una escala de puntuación (Vidhya et al., 2012)	Dhanya, Anjumol, Murugan y Deepthy (2016)

Fuente: Elaboración propia

No hay una única fórmula que estime el efecto que los agroquímicos pueden tener sobre un microorganismo biocontrolador. En la literatura, los resultados sobre los hongos se han expresado con diferentes índices que integran las variables evaluadas. Algunos de los más citados por diferentes autores son los siguientes:

1. Kumar y Ramya (2014) lo expresaron como porcentaje de inhibición celular (IM) para *Paecilomyces lilacinus*:

$$IM = CCT - CCF / CCT \times 100 \%,$$

Donde CCT es la variable del tratamiento testigo y CCF es la variable con el agroquímico evaluado (Uribe, 2015).

2. Santos et al. (2013) evaluaron el efecto de los agroquímicos sobre la germinación y la viabilidad de *Lecanicillium lecanii*, y lo expresaron como concentración inhibitoria (CI₁₀), definida como la concentración del agroquímico que reduce la germinación del hongo en un 10%; para esto se realizó un análisis de regresión lineal en el que se correlacionaron las concentraciones evaluadas para cada agroquímico.

3. Reyes et al. (2012) evaluaron el efecto de agroquímicos sobre el crecimiento diametral de *Trichoderma asperellum* y lo expresaron con la siguiente escala de clasificación: 1 significa compatible e indica que se presenta un efecto de menos del 10% sobre el crecimiento del micelio; 2 es moderadamente compatible e indica un efecto entre el 10% y el 30% sobre el crecimiento del micelio; y 3 es no compatible, con un efecto mayor al 30% sobre el crecimiento del micelio.

4. Con el mismo propósito de clasificación, Rossi-Zalaf et al. (2008) propusieron una fórmula en la cual, además del crecimiento vegetativo y la esporulación, se tiene en cuenta la germinación de los conidios tanto de *Metarhizium anisopliae* como de *Beauveria bassiana*. La compatibilidad, denominada como índice biológico (IB), fue descrita así:

$$IB = \{(47 \times VG + 43 \times SP + 10 \times GER) / 100\}$$

Donde VG es el porcentaje de crecimiento vegetativo de la colonia en relación con el tratamiento control,

SP es el porcentaje de esporulación de la colonia con respecto al control y GER es el porcentaje de germinación de los conidios también con relación al control. Valores de 0 a 41 indican que el producto es tóxico, de 42 a 66 es moderadamente tóxico y mayor de 66 es compatible.

5. Con el fin de integrar las diferentes variables evaluadas, Alves y Leucona (1998) propusieron una fórmula para establecer la clasificación de toxicidad de los agroquímicos con los hongos entomopatógenos (T), la cual también podría ser aplicada a los microorganismos biocontroladores de fitopatógenos. En esta fórmula se relacionó el crecimiento vegetativo y la esporulación con el tratamiento control:

$$T = \{(20 \times VG + 80 \times SP) / 100\}$$

Al respecto, en los trabajos de Neves et al. (2001) se propuso el siguiente rango para clasificar los agroquímicos en función de su toxicidad: valores de 0 a 30 indican que el producto evaluado es muy tóxico, de 31 a 45 es tóxico, de 46 a 60 es moderadamente tóxico, y mayor a 60 es compatible.

En los ensayos *in vivo* que se realizan en condiciones de invernadero o campo, generalmente se hace la aplicación del bioplaguicida o del agente de control biológico sobre las plantas del cultivo que se quiere proteger de determinado insecto o patógeno, y después se aplica el agroquímico que se desea evaluar (Islam & Omar, 2012). Al cabo de 24, 48 o 72 horas, se toman muestras de las hojas y se lavan para recuperar el microorganismo y evaluar, como variable-respuesta, el número de unidades formadoras de colonia (UFC) mediante recuento en placa. Para algunos bioplaguicidas comerciales, se cuenta con información acerca de la compatibilidad biológica y física de las formulaciones con diferentes fungicidas, insecticidas, herbicidas y fertilizantes líquidos. Sin embargo, generalmente estos resultados son producto de ensayos de compatibilidad *in vitro*, realizados en los tanques de mezcla con las metodologías descritas previamente, por tanto, es usual que sea responsabilidad del usuario llevar a cabo una prueba de tolerancia del bioplaguicida para evaluar la fitotoxicidad y residualidad de la mezcla sobre un determinado cultivo cuando se hacen las combinaciones por primera vez.

Hay diferentes opiniones respecto a qué tanto los ensayos *in vitro* pueden asemejar los resultados que se obtienen *in vivo*. Batista et al. (2001) evaluaron el efecto del insecticida Tiametoxam sobre varios microorganismos entomopatógenos, y encontraron que los resultados obtenidos *in vivo* (en campo) confirmaban los resultados obtenidos *in vitro* cuando se hacía la clasificación de toxicidad. Sus resultados sugirieron que la aplicación de Tiametoxam no interfería con inóculos de *B. thuringiensis*, *B. bassiana* y *M. anisopliae*. No obstante, otros estudios registran que los ensayos *in vitro* tienen un mayor impacto negativo sobre los microorganismos en comparación con los ensayos *in vivo*.

Dada la importancia de los estudios de compatibilidad para la adecuada implementación de programas de manejo integrado de plagas, se hace necesario estandarizar a nivel nacional e internacional la metodología utilizada en estos ensayos en condiciones *in vitro* e *in vivo*. También es necesario estandarizar la forma de expresar sus efectos, con el fin de obtener resultados de calidad, que tengan credibilidad y fortalezcan, así, las recomendaciones de uso de los bioplaguicidas a base de microorganismos entomopatógenos.

Control de calidad de bioplaguicidas

Uno de los aspectos cruciales para la aceptación, adopción y comercialización de agentes de control biológico (ACB) es la implementación de un sistema de control de calidad que permita asegurar la máxima eficacia en campo y cumplir con los requerimientos del agricultor (Jenkins & Grzywacz, 2000).

Unas especificaciones del producto bien definidas, respaldadas por procedimientos de control de calidad, ayudan a reducir los costos de manufactura, a maximizar los rendimientos, a certificar la seguridad del producto y a reducir los riesgos por fallas, lo cual genera la confianza de los usuarios (Ravensberg, 2011). Un proceso de producción que no implemente un sistema de calidad es un proceso no controlado, que posiblemente dará lugar a lotes de bioplaguicidas con concentraciones de agente activo variable y de calidad deficiente. Esto se traduce en bioproductos de bajos ren-

dimientos y en la pérdida de credibilidad por parte de los agricultores (Jenkins & Grzywacz, 2000; Kumar et al., 2014). El estricto control de calidad es esencial para generar respetabilidad, confiabilidad y seguridad en el bioplaguicida. Por esta razón, la implementación de un sistema de control de calidad debe incluirse desde el inicio de la producción hasta la obtención del producto final (Gaugler et al., 2000; Jenkins & Grzywacz, 2000; Muñoz-Paredes et al., 2017; Ravensberg, 2011).

Diferentes autores han descrito la importancia del control de calidad. Burges, (1998), por ejemplo, identifica como dos aspectos importantes la identidad del agente biológico y el nivel de contaminantes. Jenkins y Grzywacz (2000) establecieron la necesidad de procedimientos de control de calidad físicos y microbiológicos para agentes fúngicos y virales, tanto en la producción como en los productos finales. Sin embargo, la mayoría de los requerimientos implementados de control de calidad para formulaciones a base de bacterias, hongos y virus se restringen a los solicitados por los entes de control (Arora, Mehnaz, & Balestrini, 2016).

En Colombia, el ente regulador para producir, importar o evaluar bioproductos es el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), entidad que genera los requisitos de control de calidad para los bioplaguicidas. Entre dichos requisitos se incluyen los siguientes: contar con un laboratorio de control de calidad registrado (nacional o internacional), que respalde los resultados de estabilidad del producto; presentar un plan de análisis del control de calidad de muestras por lote, y contar con un procedimiento documentado de muestreo y control de calidad de la cepa usada como ingrediente activo del bioinsumo (Resolución 000698, 2011). El alcance de las técnicas y procedimientos a aplicar depende del ingrediente activo del bioproducto; es responsabilidad del productor su adecuada selección, implementación y análisis. A continuación, se describen los requerimientos de control de calidad de bioplaguicidas.

Identificación del agente biocontrolador

El agente de control biológico utilizado debe ser correctamente identificado de forma macroscópica,

microscópica y por medio de análisis moleculares. De esta manera se asegura que el agente utilizado sea el mismo para todo el proceso de producción. Generalmente, esta identificación se hace al principio del desarrollo del producto (desde la prueba de concepto) y no como parte del procedimiento de control de calidad de cada lote. Sin embargo, el principio activo siempre debe ser controlado visualmente en cuanto a deformaciones u otras desviaciones (cambios genéticos o fenotípicos), para asegurarse de que el organismo utilizado mantenga sus características especiales (Ravensberg, 2011).

Concentración y viabilidad del agente biocontrolador

La concentración es la cantidad del agente biocontrolador existente en un producto formulado. Esta información es fundamental para la aplicación del producto en campo, razón por la cual debe especificarse en la etiqueta (Gómez, Guevara, Cuartas, Espinel, & Villamizar, 2013). El recuento del principio activo puede hacerse dependiendo del tipo de microorganismo y del tipo de formulación. Sin embargo, la concentración no refleja necesariamente la viabilidad y la virulencia del agente de control biológico (Santos et al., 2012).

En el caso de productos a base de hongos y bacterias, es necesario determinar la viabilidad mediante pruebas de germinación o recuento en placa para establecer el número de unidades formadoras de colonia (UFC). En el caso de productos a base de virus, dadas las dificultades para distinguir estos de las partículas de la formulación (o incluso en los casos en que se pueden contar, como los nucleopoliedrovirus), no se pueden diferenciar las partículas viables de las no viables, por lo que se necesita de un bioensayo para evaluar la actividad biocontroladora del producto (Jenkins & Grzywacz, 2000; Ravensberg, 2011).

Contenido de contaminantes (pureza)

La pureza se define por el número total o el porcentaje de contaminantes microbianos (bacterias, mohos

y levaduras) en un lote de bioplaguicida. Esta característica puede influir negativamente en la calidad del producto en términos de su vida útil, eficacia e incluso características fisicoquímicas. Además, los contaminantes pueden ser un riesgo para el agricultor y el consumidor. Por lo tanto, el número total de contaminantes no debe superar un cierto límite o porcentaje respecto del ingrediente activo. La norma depende de lo que decida la empresa productora y de lo que exijan los requisitos de registro (Ravensberg, 2011).

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por su sigla en inglés) insiste en la ausencia de microorganismos patógenos como *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *Vibrio* spp. en el producto terminado, sin embargo, son muy pocos los laboratorios que realizan este tipo de análisis en bioproductos, lo que en algunas ocasiones trae como consecuencia la no implementación de estos (Jenkins & Grzywacz, 2000). Las especificaciones para determinar un nivel aceptable de contaminantes en un producto final dependen en gran medida de los métodos de producción masiva, fermentación, formulación y empaque. El punto más crítico de posible contaminación es la etapa de producción masiva, debido a que los contaminantes, ya sean hongos o bacterias, pueden crecer rápidamente sin ningún tipo de restricción. Además, es necesario tener en cuenta que los procesos de formulación de productos microbianos generalmente no se realizan en condiciones de esterilidad, por lo que es inevitable la contaminación en este punto de la cadena de producción (Jenkins & Grzywacz, 2000; Jenkins et al., 1998; Kumar et al., 2014). En Colombia, es requisito obligatorio que cualquier bioproducto comercializado deba tener una pureza $\geq 95\%$ y que no contenga microorganismos contaminantes ni patógenos a humanos, plantas y animales (Resolución 000698, 2011).

Los niveles de contaminación de bioproductos pueden ser cuantificados usando la técnica de recuento en placa y con los medios de cultivo apropiados para la detección de bacterias y hongos. Esta metodología provee un nivel de contaminantes expresado en UFC por mL o g de producto terminado. Con el fin de estandarizar el proceso de producción del microorganismo biocontrolador, es necesario determinar los niveles de aceptabilidad de contaminación de microorganismos durante la producción, formulación y empaque del

producto. Sin embargo, para asegurar el rendimiento del bioproducto y la aceptación en el mercado, es necesario estandarizar su eficacia. Si un producto presenta una alta viabilidad y virulencia/patogenicidad, su eficacia es la deseada (Jenkins & Grzywacz, 2000).

Características fisicoquímicas

El control de calidad fisicoquímico permite establecer si el bioplaguicida cumple con las especificaciones que garanticen su calidad, estabilidad y eficacia durante procesos de almacenamiento, embalaje, transporte y aplicación.

Para cada tipo de formulación existen características particulares que deben comprobarse y evaluarse. Estas pruebas están basadas en reacciones químicas y fenómenos físicos que ponen de manifiesto características de los diferentes tipos de formulaciones. Para plaguicidas en general, los protocolos aprobados internacionalmente por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) son elaborados por entidades como el Consejo Internacional para la Colaboración en los Análisis de Plaguicidas (Cipac) y la Asociación Internacional de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC). Con respecto a esto, en Colombia se exige una prueba de estabilidad del bioproducto realizada por un laboratorio registrado en el ICA, que contenga la evaluación de al menos dos lotes (cada uno al tiempo cero y al final del periodo de vigencia) y que incluya determinaciones físicas o químicas como pH, densidad, humedad, granulometría y otras que correspondan a la naturaleza y tipo de formulación del producto (Resolución 000698, 2011).

Eficacia

La eficacia determinada mediante bioensayos es la herramienta de mayor importancia en el control de calidad durante la producción de bioplaguicidas. Los valores de virulencia o patogenicidad que se obtengan con estas pruebas deberán estar dentro de los límites previamente establecidos por los productores durante su manufactura (Jenkins & Grzywacz, 2000). En las siguientes páginas

se detallan los conceptos y metodologías asociados a los estudios de eficacia para bioplaguicidas.

Estabilidad de bioplaguicidas en condiciones de almacenamiento

La estabilidad de un bioplaguicida bajo condiciones de almacenamiento es uno de los requisitos principales para su registro y comercialización. La estabilidad depende de factores externos (temperatura, humedad relativa y tipo de empaque utilizado) y de factores intrínsecos (características de la cepa, sistema de producción y tipo de formulación), todos los cuales determinan el tiempo durante el cual se conserva la actividad biocontroladora del producto (Santos et al., 2012). A dicho tiempo se le denomina *vida útil* y se determina experimentalmente con base en la evaluación de las características del producto a través del tiempo, en diferentes condiciones de almacenamiento y de acuerdo con el ajuste de los resultados a modelos matemáticos que interpretan el comportamiento (Bruckner, Albrecht, Petersen, & Kreyenschmidt, 2013; Kinay & Yildiz, 2008).

Durante el almacenamiento, los microorganismos pueden sufrir alteraciones debido a factores del proceso de manufactura del producto, como el medio de cultivo, el proceso de separación y secado y la utilización de agentes protectores de secado (Abadias, Usall, Teixidó, & Viñas, 2003). Sin embargo, dependiendo del microorganismo biocontrolador, existen diferentes problemas durante el almacenamiento. Por ejemplo, Elzein, Kroschel y Müller-stöver (2004) sugirieron que la estabilidad de un producto puede ser prolongada si se utilizan las estructuras de resistencia de los hongos como principio activo, ya que estas tienen una estabilidad inherente para su formulación.

Factores ambientales como la temperatura, la humedad relativa y los sistemas de empaque pueden afectar la viabilidad y actividad del agente biocontrolador (Hynes & Boyetchko, 2006). La humedad relativa y el control de la actividad de agua son importantes en el almacenamiento de microorganismos (Faria, Hotchkiss, Hajek, & Wraight, 2010). Muchas investigaciones han reportado que la longevidad de los conidios de hongos formulados aumenta en humedades relativas bajas (Friesen, Holloway, Hill,

& Pugsley, 2006). Por ejemplo, el hongo *Alternaria alternata*, en una formulación almacenada durante 24 meses con una humedad relativa del 12 % y del 75 %, presentó una mayor longevidad de los conidios en la humedad relativa del 12 % (Leland, Mullins, Vaughan, & Warren, 2005).

La temperatura también juega un papel importante en la estabilidad de una formulación, ya que para cada microorganismo hay una temperatura óptima y unos límites diferentes. En algunas ocasiones, las bajas temperaturas detienen el crecimiento del microorganismo, pero mantienen su actividad biocontroladora (Yadav & Chandra, 2014). Por el contrario, las temperaturas altas pueden inactivar los microorganismos biocontroladores si estos no son protegidos, además, pueden afectar también los aditivos de la formulación (Lacey, Headrick, & Arthurs 2008; Pavone, Díaz, Trujillo, & Dorta, 2009; Santos et al., 2012). Generalmente, entre más prolongada sea la exposición a altas temperaturas, mayor es el efecto negativo sobre la formulación, por tal razón es recomendable seleccionar microorganismos que presenten un alto rango de tolerancia a diferentes temperaturas (Copping, 2009; Ravensberg, 2011). Santos et al. (2012), por ejemplo, encontraron que para dos prototipos de formulación a base de *T. koningiopsis* Th003 y *T. asperellum* Th034, los mayores tiempos de vida útil se presentaron en bajas temperaturas de almacenamiento (8 °C y 18 °C) con valores entre 10,8 y 14,4 meses. En contraste, con una temperatura de 28 °C, el rango de vida útil estuvo entre 2,9 y 5,2 meses.

De acuerdo con lo anterior, la estabilidad durante el almacenamiento depende de una adecuada formulación, la cual debe mantener la viabilidad y la actividad del agente biocontrolador durante el mayor tiempo posible, con el fin de disminuir los costos de producción y comercialización.

Estudios de eficacia

Un bioplaguicida microbiano está constituido por uno o varios microorganismos, y cada uno de ellos ejerce múltiples modos de acción, expresados sucesivamente, simultáneamente o sinérgicamente, los cuales en gran medida dependen de las condiciones ambientales.

Por ejemplo, *Bacillus subtilis* controla enfermedades de plantas mediante la acción combinada de los metabolitos antimicrobianos (Romero et al., 2007) y la competencia por espacio y nutrientes con los patógenos de la rizosfera (Huang et al., 2014). En el caso de los baculovirus, estos matan a los insectos plaga aprovechando procesos metabólicos del insecto huésped que les permiten su multiplicación. Esta forma de acción implica que el virus esté activo, replicante y que, en la interacción con el insecto, se produzcan varias enzimas y proteínas que conduzcan a la infección y muerte de los insectos (Rohrmann, 2013). Por lo tanto, la química y la bioquímica relacionadas con los modos de acción desempeñan un papel indispensable en el funcionamiento de los bioplaguicidas, lo cual implica que la eficacia de un microorganismo biocontrolador esté estrechamente relacionada con que este encuentre las condiciones adecuadas para ejercer su efecto.

Es importante resaltar que en campo los biocontroladores frecuentemente ejercen una eficacia inconsistente que suele atribuirse a las variaciones climáticas (temperatura, humedad y radiación ultravioleta), a la falta de competencia ecológica (supervivencia y capacidad de colonización) del agente de biocontrol, a los rasgos intrínsecos del microorganismo biocontrolador (producción variable de los metabolitos requeridos o enzimas), a la calidad inestable del producto formulado (Elad & Stewart, 2007; Mark et al., 2006; Ruocco et al., 2011) y a la diversidad en la sensibilidad de los patógenos o de los insectos plaga. Por lo tanto, gran parte del efecto que se tenga en campo dependerá de la calidad de la formulación para brindarle al microorganismo condiciones que favorezcan su supervivencia y actividad.

De acuerdo con la norma EPPO PP1/214 (European and Mediterranean Plant Protection Organization [EPPO], 2014), la eficacia es el resultado neto de los efectos positivos y negativos de la aplicación de un producto. Dicha eficacia debe ser tal que genere un beneficio agrícola que justifique su uso, de forma que se cumpla con las reivindicaciones del producto. Las evaluaciones de eficacia deben desarrollarse según los principios de buenas prácticas experimentales (EPPO, 2017), para garantizar que los ensayos se hagan conforme a altos estándares de calidad y que los resultados derivados de ellos sean comparables y fiables.

Los estudios de eficacia pueden ser de dos tipos: los preliminares, que generan información útil durante el proceso de desarrollo de bioplaguicidas, y los ensayos de eficacia supervisados por la entidad competente con miras a la obtención del registro del producto. En el primer caso, estos se clasifican como ensayos piloto, semicomerciales o de escala comercial.

Ensayos preliminares de eficacia

Los ensayos piloto se usan para evaluar diferentes prototipos de formulación o métodos de aplicación, así como para determinar las consecuencias que ejercen las modificaciones en el proceso tecnológico de producción de un bioplaguicida sobre su eficacia. Entre dichas modificaciones se encuentran, por ejemplo, los cambios en el medio de cultivo o en el sistema de producción masiva del microorganismo, los cambios en la separación del principio activo o en su formulación. Por lo general, los ensayos piloto proporcionan orientación para el desarrollo del producto y permiten generar las recomendaciones para su uso, pero resultan insuficientes para fines de registro. Estos ensayos pueden realizarse en condiciones de semicampo, por ejemplo, al aire libre, pero con ambiente protegido o en jaulas, de forma tal que se asegure la presencia del fitopatógeno o el insecto plaga para producir el efecto deseado.

Los estudios semicomerciales usualmente se llevan a cabo con el producto formulado final, el cual debe aplicarse según las instrucciones propuestas en la etiqueta. A menudo son ensayos en campo repetidos en pequeña escala. Estos proporcionan una evidencia valiosa para realizar las pruebas de eficacia posteriores, además de proporcionar datos para la realización de ensayos a escala comercial (parcelas demostrativas). Los ensayos deben ser desarrollados por el productor con los equipos comercialmente disponibles y las prácticas agronómicas recomendadas para el cultivo. Por esta razón, antes de su realización, es necesario registrar todas las prácticas disponibles y hacer estudios de compatibilidad con los agroquímicos o bioinsumos a utilizar, de forma que se puedan hacer todas las recomendaciones para el uso del bioplaguicida.

Debido a que los ensayos a escala comercial rara vez se replican a causa de su dimensión y costo, los resultados obtenidos son solo indicativos para su aplicación práctica. Estos ensayos deben realizarse únicamente en cultivos con una historia conocida de infestación por parte de insectos plaga o incidencia de enfermedades objetivo del control. Las condiciones culturales (por ejemplo, el tipo de suelo, el pH, los fertilizantes, la labranza, las distancias de siembra, etc.) deben ser uniformes para todas las parcelas del ensayo y cumplir con las prácticas agrícolas locales.

Ensayos de eficacia con fines de registro

El principal objetivo de la evaluación de eficacia con fines de registro de un bioplaguicida es el de determinar los beneficios que se derivan de su uso en la dosis mínima recomendada para definir sus condiciones de uso. Estos ensayos permiten garantizar que las reivindicaciones propuestas para el bioplaguicida y las recomendaciones de uso en la etiqueta están respaldadas por datos comprobados, lo cual significa un beneficio para los usuarios.

Los efectos positivos del bioplaguicida pueden expresarse en términos de 1) reducción de un insecto plaga o del desarrollo de una enfermedad, 2) reducción de los daños en los cultivos, 3) protección o aumento de los rendimientos de los cultivos, 4) mejora de la calidad de los cultivos o 5) protección de los productos en poscosecha.

Los efectos negativos de un bioplaguicida en un cultivo pueden incluir la fitotoxicidad del cultivo objetivo o de los cultivos adyacentes, la reducción del rendimiento, los efectos nocivos sobre los cultivos posteriores, los efectos adversos sobre los polinizadores o sobre los enemigos naturales, el desarrollo de resistencia u otros efectos que puedan reducir la sostenibilidad del sistema de producción. Finalmente, además de la eficacia de un producto, es necesario considerar la sostenibilidad de su aplicación y su impacto económico (EPPO, 2001; 2004a; Organisation for Economic Co-operation and Development [OECD], 2001; Pest Management Regulatory Agency [PMRA], 1993).

Eficacia biológica directa

La eficacia directa del bioplaguicida se refiere tanto al efecto de este sobre la plaga objetivo (insecto o fitopatógeno) como a sus posibles efectos negativos sobre el cultivo o sobre el producto mismo durante el almacenamiento. Los datos obtenidos deben llevar a determinar la duración, coherencia del control o efecto deseado, rendimiento y calidad del producto. También a partir de los datos debe ser posible establecer las condiciones de uso, tales como la dosis mínima efectiva, los umbrales de plagas (si están disponibles), la frecuencia y el método de aplicación. Otra información importante que se debe discriminar dentro de la eficacia tiene que ver con la tolerancia del cultivo al bioplaguicida, la cual incluye la fitotoxicidad que el producto pueda causar, la posible reducción del rendimiento, los efectos sobre la calidad del producto (incluidos los procesos de transformación) y cualquier posible efecto sobre plantas o partes de estas utilizadas para la propagación.

Sostenibilidad agronómica

La evaluación de la sostenibilidad agronómica del bioplaguicida es un criterio fundamental. De acuerdo con esta, el bioplaguicida no debe afectar la sostenibilidad del sistema de producción ni de ningún otro sistema de producción sucesivo o adyacente. Dentro de los efectos indeseables en los cultivos, se encuentra el desarrollo de la resistencia al producto (fenómeno poco frecuente en el caso de bioplaguicidas). Sin embargo, varias especies han llegado a desarrollar resistencia en campo cuando se aplican formulaciones a base de *B. thuringiensis* contra insectos lepidópteros como *Plutella xylostella* (Tabashnik, 1994), *Trichoplusia ni* (Janmaat & Myers, 2003) y *Plodia interpunctella* (McGaughey, 1985). También se ha registrado resistencia en el caso de *Bacillus sphaericus* usado para el control de dípteros (Charles et al., 1996) y de baculovirus aplicados contra lepidópteros tales como *Anticarsia gemmatalis* (Abot et al., 1996), *Phthorimaea operculella* (PhopGV) (Briese, 1986), *Spodoptera frugiperda*, (Reichelderfer & Benton, 1974)

y *Cydia pomonella* (Sauphanor et al., 2006; Schmitt et al., 2013). Otras situaciones que se presentan son los efectos sobre cultivos sucesivos o sustitutivos, sobre cultivos adyacentes, sobre organismos no objetivo (impacto sobre polinizadores o sobre el proceso de polinización, por ejemplo) y efectos sobre enemigos naturales de las plagas objetivo o de plagas secundarias. Además de los efectos negativos, también deben observarse los efectos positivos del bioplaguicida sobre plagas diferentes al objeto de evaluación.

Es necesario, igualmente, determinar si el bioplaguicida es compatible con las prácticas de producción comúnmente usadas por los agricultores o con los programas existentes de manejo integrado de plagas (MIP) o de manejo integrado del cultivo (MIC).

Beneficios económicos

El uso de un bioplaguicida debe representar un beneficio económico positivo para el productor, es decir, los rendimientos o ingresos de los agricultores deben superar los costos tanto directos como indirectos derivados del uso del producto. Puede hacerse una comparación entre el uso del bioplaguicida y el testigo absoluto. Sin embargo, cuando ya se hayan utilizado productos fitosanitarios para el manejo de la plaga en cuestión, es más adecuado comparar el bioplaguicida con los productos fitosanitarios registrados. También debe evaluarse el uso de bioplaguicidas en comparación con enfoques alternativos como medidas culturales o agronómicas, cultivos resistentes o tolerantes a las plagas o a malezas, y con otros componentes del programa MIP.

Principios generales para el diseño de ensayos de eficacia

Los ensayos de eficacia son el paso más importante para determinar el efecto de nuevos agentes biocontroladores o bioplaguicidas, pues permiten validar todos los supuestos hechos en las etapas anteriores. Estos incluyen diferentes etapas que se amplían a continuación.

Dosis mínima efectiva

Uno de los objetivos fundamentales de las pruebas de eficacia es determinar la dosis mínima efectiva (EPPO, 2004b; PMRA, 2003), la cual debe recomendarse en la etiqueta del producto. Para establecerla es necesario demostrar que proporciona uno o varios efectos en comparación con una dosis más baja, por ejemplo, un mayor nivel de efectividad, una mayor persistencia o un rendimiento más consistente en condiciones variables, entre otros.

Ubicación de los ensayos

Los ensayos deben llevarse a cabo en lugares representativos tanto del sistema de producción como de las plagas objeto de control. Si existe la posibilidad de que los tipos de suelos puedan afectar a la eficacia del bioplaguicida, los diferentes sitios de ensayo deben elegirse de manera que sean representativos de los tipos de suelos en los que se desarrolle el cultivo. Dentro de cada sitio de ensayo, las condiciones ambientales y agronómicas deben ser lo más uniformes posibles.

Número de ensayos

Para demostrar la eficacia de un bioplaguicida, es necesario llevar a cabo una serie de ensayos en diferentes regiones, con condiciones ambientales distintas y, de ser posible, en diferentes épocas y estados fenológicos de las plantas. Esto se conoce como “serie de ensayos”, “ensayos en múltiples sitios” o “ensayos en varios años”. El número de ensayos que se requiere en una serie no es fijo, pues depende de factores tales como la importancia general del cultivo o de la plaga, la gravedad de los daños, los diferentes cultivares, el impacto del suelo y el clima. El número de ensayos ideal es de diez, desarrollados en dos años, aunque se pueden desarrollar menos ensayos en los casos siguientes: en lugares con poca variación climática, para aquellas plagas que presentan muchos antecedentes de control con el agente de control biológico, cuando se trate de cultivos menores o cuando las plagas tengan ocurrencia esporádica (EPPO, 2004c). Asimismo, cuando se someta a registro un cambio en el proceso de producción o de formulación de un bioplaguicida con el mismo ingrediente activo, es posible limitar considerablemente el número de ensayos de eficacia (“datos de transición”).

Tipo de diseño

Los ensayos de eficacia deben diseñarse de manera que se pueda realizar un análisis estadístico apropiado. Los principales diseños utilizados son completamente al azar o bloques al azar: el primero solo puede aplicarse si el entorno del ensayo es completamente homogéneo, mientras que el segundo es, en general, el más apropiado para las pruebas de eficacia. Un bloque es un grupo de parcelas dispuestas en un área dentro de la cual el ambiente es homogéneo. Usualmente, cada tratamiento aparece solo una vez en cada bloque. La disposición de los bloques debe ser tal que la heterogeneidad del entorno o de las condiciones de tratamiento se controlen tanto como sea posible (es decir, que la variabilidad entre las parcelas dentro de los bloques sea menor que entre bloques). En algunos casos, se necesita un diseño multifactorial si se evalúan varias dosis del mismo producto. También se utiliza un diseño de parcela dividida, en el que las parcelas principales se subdividen en subparcelas. Sin embargo, el tamaño de las subparcelas debe ser suficiente para permitir un tratamiento y una evaluación fiables (EPPO, 1999).

Como regla general, un ensayo debe incluir al menos cuatro repeticiones por tratamiento. El número exacto depende de la potencia requerida y de la variabilidad en las poblaciones de los organismos objetivo, entre otros factores. Como se mencionó anteriormente, la elección del diseño experimental también influye en la potencia del ensayo para detectar una diferencia significativa. Generalmente se considera que, para un análisis estadístico útil, el número de grados residuales de libertad en el diseño experimental debe ser de al menos doce (EPPO, 1999; Mead et al., 2002).

Para los ensayos de eficacia, el tamaño de la parcela depende de muchos factores, como la movilidad del organismo objetivo (por lo general se necesitan parcelas mayores para organismos más móviles), la técnica de aplicación (las técnicas de aplicación que depositan el producto de una manera más precisa y localizada requieren parcelas más pequeñas), el tamaño, el tipo del cultivo, el tipo de planta y la técnica de cosecha.

Condiciones para el ensayo

En los ensayos de eficacia siempre deben registrarse las condiciones meteorológicas: la temperatura ambiente,

la humedad relativa, la precipitación, la velocidad y la dirección del viento. También deben conocerse las condiciones básicas del suelo: el pH, el contenido de materia orgánica, la humedad y el tipo de suelo.

Evaluación de la eficacia biológica

Las variables que deben evaluarse para determinar la eficacia del bioplaguicida dependerán en gran medida del cultivo y de la plaga objeto de estudio. Dentro de estas están la densidad o incidencia de la plaga, los niveles de infestación, el porcentaje de mortalidad o control, la severidad de los síntomas o de daño al cultivo, el rendimiento y la calidad del producto. Parámetros como la reducción de la población (expresada como porcentaje de mortalidad) deben ser corregidos para tener en cuenta la mortalidad en las parcelas del testigo no tratado.

Durante el ensayo de eficacia, deben hacerse otras observaciones para determinar la tolerancia de los cultivos al producto aplicado. Se debe analizar la fitotoxicidad, los efectos adversos sobre el rendimiento y la calidad de los cultivos, cualquier efecto sobre las plantas o las partes de las plantas utilizadas para la propagación, los efectos sobre cultivos sucesivos y los efectos secundarios sobre organismos benéficos. Del mismo modo, se recomienda analizar si el tratamiento con el bioplaguicida produce efectos negativos sobre el color, olor o sabor del producto cosechado o sobre su procesamiento.

En Colombia, el ICA es la entidad encargada de regular y garantizar la calidad de los insumos agrícolas y las semillas que se usan en el país. Esta entidad, mediante la Resolución 000698 del 4 de febrero de 2011, estableció los requisitos para las pruebas de eficacia de bioplaguicidas, las cuales deben llevarse a cabo por parte los departamentos técnicos registrados ante esta entidad. En dicha resolución están definidos los requisitos para registrarse como departamento técnico y para desarrollar dichas pruebas. El artículo 8 especifica el trámite para realizar los ensayos de eficacia agronómica con miras a la obtención del registro de un bioplaguicida (Resolución 000698, 2011):

El interesado en registrar un producto debe presentar ante el ICA, con mínimo treinta (30) días calendario a la fecha de iniciación de los ensayos

de eficacia, el protocolo con fines de registro o ampliación de uso de bioinsumos para su aprobación, por cultivo y blanco biológico, basado en el método científico, el cual debe contener la siguiente información: Nombre del ensayo, Introducción, Reseña del problema, Revisión de la literatura, Justificación, Objetivos específicos, Información general del producto, Materiales y métodos, Diseño experimental, Número de tratamientos, Número de replicaciones, Análisis estadístico, Desarrollo, Área de parcela o unidad experimental, Área de cosecha o área útil, Escalas de evaluación a utilizar, Épocas de aplicación según fenología del cultivo, Épocas y métodos de evaluación, Datos a tomar, Número de plantas por parcela, Rendimiento en kg/parcela y kg/ha cuando proceda, Medidas de las evaluaciones, Definir otros componentes de rendimiento o eficacia que procedan, Nombre del profesional responsable de la ejecución del ensayo, Recibo de pago de la tarifa establecida por el ICA.

Al protocolo se debe anexar la siguiente información: Domicilio del Departamento Técnico. Composición garantizada del producto, incluyendo ingredientes activos y aditivos si los requiere, Condiciones de almacenamiento y mantenimiento del producto, Indicar las condiciones previas a la aplicación del producto según la actividad biológica a evaluar.

El ICA, mediante oficio, dentro de los quince (15) días hábiles siguientes a la radicación del protocolo lo aprobará o rechazará. Si es del caso, solicitará la adición o modificación de la información presentada, para lo cual se otorgará un término máximo de treinta (30) días calendario. Vencido este término si el interesado no ha aclarado la información o enviado los documentos requeridos se considerará que desiste de la solicitud procediendo mediante oficio a la devolución del mismo dentro de los quince (15) días hábiles siguientes con sus anexos, sin perjuicio de que pueda presentarla de nuevo con el cumplimiento de los requisitos establecidos en este artículo.

Una vez aprobado, el protocolo tendrá una vigencia de tres (3) años, término durante el cual debe realizar la prueba de ensayo de eficacia en dos (2) zonas agroecológicas diferentes.

El ICA emitirá concepto de eficacia agronómica aprobado o rechazado según corresponda y se dejará una copia al interesado. Cuando el concepto sea aprobado, el interesado debe registrar el producto dentro del año siguiente al desarrollo del ensayo de eficacia. Vencido este término si no registra el producto o cuando el concepto sea rechazado debe realizar nuevamente el ensayo de eficacia.

y sus relaciones, permite expresar la lógica mediante la cual una compañía intenta ganar dinero generando y ofreciendo valor a uno o varios segmentos de clientes, la arquitectura de la firma, su red de aliados para crear, mercadear y entregar este valor, y el capital relacional para generar fuentes de ingresos rentables y sostenibles” (Osterwalder, 2004). Existen diferentes tipos de modelo de negocios, pero uno de los más recientemente empleados es el modelo de negocio diseñado por Alexander Osterwalder. Este modelo incluye nueve módulos que cubren las cuatro áreas principales de un negocio: clientes, oferta, infraestructura y viabilidad económica (figura 12.3) (Osterwalder & Pigneur, 2010).

Modelo de negocios

Un modelo de negocios es “una herramienta conceptual que, mediante un conjunto de elementos

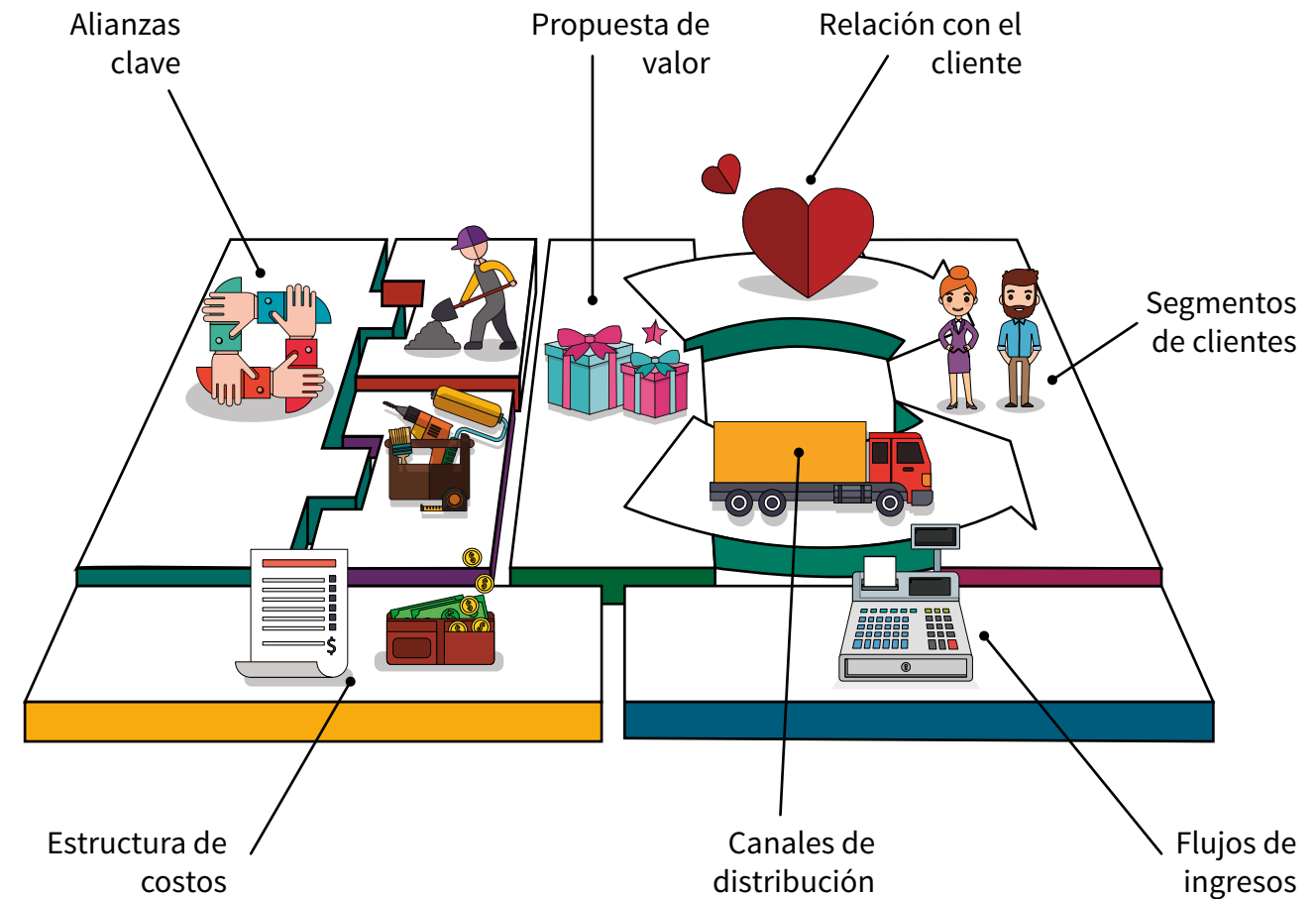


Figura 12.3. Modelo de negocio Canvas.

Fuente: Adaptado de Osterwalder y Pigneur (2010)

En el módulo de *segmentos de clientes* se listan los diferentes tipos de consumidores del producto a quienes se quiere llegar (grandes y pequeños productores, agremiaciones, etc.), con base en las necesidades particulares de estos, la forma de acceder a ellos, el tipo de relación y la rentabilidad, entre otros. Después, se procede a describir en mayor detalle a cada uno de ellos, según variables demográficas, geográficas y psicográficas (regiones de producción, formación académica, género, edad del productor, etc.), entre otras.

El segundo módulo es la *propuesta de valor* de la oferta, en la cual se evidencia lo que atrae a los clientes, es decir, aquello por lo que están dispuestos a pagar: eficacia, mayor producción por hectárea, mejor calidad de la cosecha, reducción de costos de manejo, etc. Puede haber una oferta única o varias ofertas y estas pueden dirigirse a un segmento en particular o a varios de ellos (Márquez, 2010).

El tercer módulo son los *canales de distribución y comunicación*. En este módulo se identifican los medios a través de los cuales se accede a los clientes para comunicarse con ellos y para ofrecer la propuesta de valor (fuerza de ventas, puntos de venta, afiliaciones, publicidad, reuniones, sitios web, etc.) (Márquez, 2010).

El cuarto módulo es *tipo de relaciones con los clientes*, en el cual se establece la clase de contactos que se van a mantener con los segmentos atendidos: presenciales, portales web o de voz, entre otros (Márquez, 2010).

El módulo de *fuentes de ingresos* se refiere a los medios por los cuales se captan ingresos por la propuesta de valor que se ofrece, por ejemplo, ventas, servicios y licenciamientos, entre otros (Márquez, 2010).

En el módulo de *recursos clave* se tiene en cuenta el capital que la compañía debe invertir para hacer que el negocio funcione: recursos físicos, intelectuales (transferencia de *know how*), humanos y financieros. Estos recursos pueden ser propios, arrendados o adquiridos de sus aliados más importantes.

El séptimo módulo, *actividades clave*, se refiere a todo lo que se debe hacer para producir la oferta de valor y gestionar las relaciones con clientes y aliados. La *red de aliados*, por su parte, el octavo módulo, tiene que ver con proveedores o socios que deben encontrarse para

establecer relaciones. Para lograr ciclos de innovación más rápidos y exitosos, cada vez es más importante apalancarse en recursos y actividades con terceros, con los que se puede construir o complementar la oferta de valor u optimizar costos (Márquez, 2010).

El último módulo, la *estructura de costos*, se refiere al listado de los rubros más significativos del modelo de negocio (Márquez, 2010). Es importante conocer la estructura de costos e ingresos, ya que, con la evaluación financiera del modelo, es posible tomar decisiones estratégicas y comercialmente apropiadas. Es por eso que hoy por hoy existen diferentes modelos de funcionamiento, ya sea mediante la tercerización de una parte o de todo el proceso de producción, distribución, licenciamiento de tecnologías, creación de nuevas líneas de categorías de productos o compra de empresas.

Para el desarrollo de bioproductos, es indispensable identificar cada uno de estos bloques y definir las acciones a tomar. No es suficiente contar con una propuesta de valor diferenciadora y un segmento claramente identificado, sino que todos los demás aspectos deben evaluarse. Es necesario conocer, por ejemplo, si la capacidad instalada permite producir la cantidad de producto requerido para cubrir la demanda y atender el mercado o si es necesario contar con un aliado estratégico para tal fin. Adicionalmente, es fundamental conocer la forma de interactuar con los clientes y la forma de hacer disponibles los productos, de lo contrario, no es posible transferir (vincular) los productos al mercado.

Potencial de mercado

La demanda de un producto es el volumen total que podrá comprar un grupo de clientes en una determinada área geográfica, durante un cierto periodo de tiempo, en un medio comercial definido y según un programa comercial determinado. Así, el potencial de mercado es el límite alcanzado por la demanda al aumentar lo más posible el esfuerzo comercial en un determinado ambiente (Quintana-Navarro, 2010).

Para lograr atender un mercado específico, es necesario segmentar el mercado, es decir, dividir el mercado potencial en un determinado número de subgrupos con

características lo más homogéneas posibles. Segmentar no es únicamente dividir un mercado más amplio en otros más pequeños, sino hacerlo de modo que esta división dé lugar a submercados con un comportamiento comercial diferente (Quintana-Navarro, 2010). Por ejemplo, el mercado de bioplaguicidas se puede segmentar por el tipo de acción (bioinsecticidas, biofungicidas, bionematicidas y bioherbicidas), por área geográfica, por tipo de principio activo, por tipo de cultivo, por tipo de formulación, etc.

Los bioplaguicidas siguen siendo productos de nicho. El tamaño del mercado se determina por la importancia de la plaga, el número de cultivos en los cuales la plaga es un problema serio y la extensión de estos cultivos. Para lograr una estimación acertada del tamaño de mercado objetivo se debe estudiar el tamaño del mercado en hectáreas, el número de temporadas para cultivar, la competencia y los costos de aplicación. Las cifras de daño causado por las plagas no se pueden transferir directamente al posible potencial de mercado. El poco conocimiento sobre las plagas, los clientes, los cultivos, las prácticas de control, los precios, la competencia y los requisitos para promover un nuevo producto pueden conducir a errores y, seguramente, a una lenta penetración en el mercado (Ravensberg, 2011).

Escalamiento piloto de bioplaguicidas

En esta fase se realiza la optimización de medios de cultivo, el escalamiento y la validación a nivel piloto de las operaciones unitarias relacionadas con la producción del bioplaguicida. Estas operaciones incluyen el proceso de fermentación, las operaciones “aguas abajo” (como separación y purificación) y el proceso de formulación. En todo el proceso es crucial determinar cómo las diferentes etapas pueden afectar la actividad biocontroladora del microorganismo y, por supuesto, determinar la eficacia del bioplaguicida escalado. Además, se realiza el primer acercamiento al modelo de negocio, lo que incluye los beneficios estimados, el análisis de mercado (segmentos, competencia y mercado meta) y el listado de actividades y recursos.

Optimización de medios de cultivo

La optimización de medios de cultivo continúa siendo uno de los aspectos más investigados y con mayores desafíos en los procesos de producción de microorganismos o de sus metabolitos a gran escala. Antes de 1970, la optimización de medios de cultivo se llevaba a cabo mediante el uso de métodos clásicos, que eran costosos, demandaban tiempo, implicaban un gran número de experimentos y eran poco eficientes. Sin embargo, con la llegada de técnicas matemáticas y estadísticas modernas, la optimización de los medios de cultivo se ha vuelto más dinámica, eficaz, económica y robusta en sus resultados. Está ampliamente aceptado que, para mejorar un medio de cultivo a partir de un diseño experimental, se requiere la selección idónea de la técnica de optimización (figura 12.4). Como se mencionó previamente, el DOE define las variantes del medio a ser evaluadas, el número de réplicas y el arreglo de evaluaciones. Con base en los resultados experimentales, se escoge la técnica de optimización para generar un modelo matemático que permita hacer ajustes en la composición del medio y aumentar los rendimientos. Entre los diseños de experimentos para la optimización de medios de cultivo más usados se encuentran el central compuesto (CCD, por su sigla en inglés) y el Box-Behnken (Singh, Yadav et al., 2016).

Diseño central compuesto (CCD)

Diseños de selección como el Plackett Burman o el factorial fraccionado no consideran las interacciones de los componentes en el medio de cultivo, de modo que en la fase de optimización se deben utilizar diseños experimentales que identifiquen estos fenómenos y los modelen. Los CCD fueron descritos por Box y Wilson (1951), y fueron muy utilizados con técnicas de superficie de respuesta (RSM, por su sigla en inglés) para identificar combinaciones óptimas en espacios experimentales previamente definidos. Estos diseños contienen en sí un diseño factorial completo o un factorial fraccionado con puntos centrales más puntos estrella, que permiten la estimación de la curvatura. Si

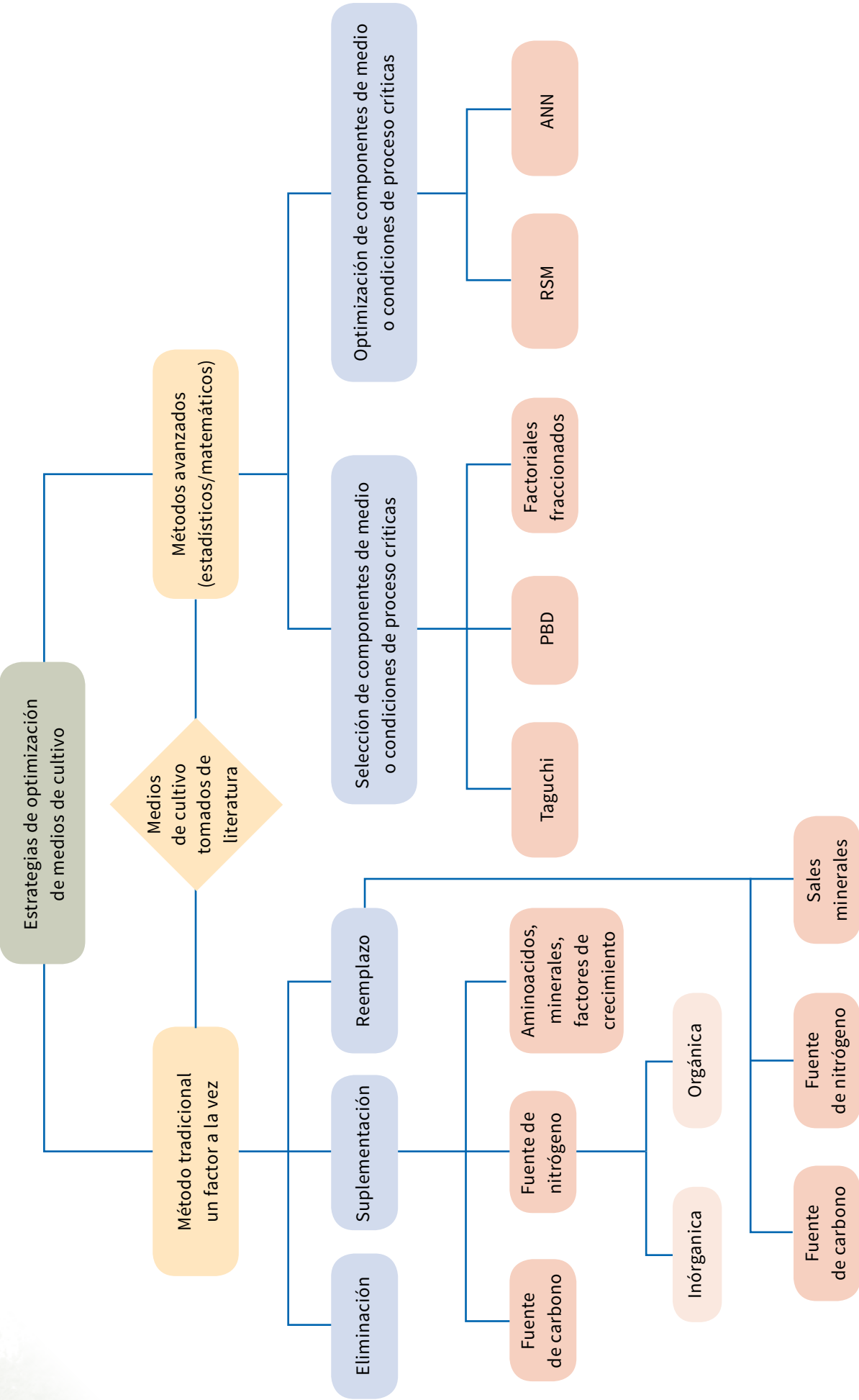


Figura 12.4. Esquema de estrategias usadas en la optimización de medios de cultivo. Fuente: Adaptada de Singh, Haque et al. (2016)

la distancia del centro del diseño al punto factorial es ± 1 unidades para cada factor, la distancia del centro del diseño hasta el punto estrella es $\pm \alpha$ con $|\alpha| > 1$. El valor preciso de α depende de ciertas propiedades deseadas para el diseño y del número de factores involucrados (Singh, Yadav et al., 2016). El punto central “0” se suele ejecutar en réplicas con el propósito de mejorar la precisión del modelo generado. Además, se estiman eficientemente los términos de primer orden y de segundo orden. De acuerdo con el número de experimentos y los niveles de los factores, los diseños CCD pueden ser de tres tipos: central circunscrito, inscrito y centrado en las caras. Por último, los diseños centrales compuestos pueden ser aplicados en experimentos secuenciales, ya que, una vez se ejecuta un experimento factorial, este se puede ampliar insertando los puntos axiales y centrales faltantes. En la tabla 12.5 se presentan algunos ejemplos de aplicación.

Diseños Box-Behnken

Los diseños Box-Behnken (BBD, por su sigla en inglés) son una alternativa al diseño central compuesto (CCD) y son independientes de un diseño cuadrático: no contienen en sí un diseño factorial o factorial fraccionado, por lo que no son adecuados para experimentos secuenciales (Ferreira et al., 2007). Los diseños de Box-Behnken son más efectivos cuando se tiene más certeza de la zona segura para optimización. Estos diseños no tienen puntos axiales (por lo que se puede estar seguro de que todos los puntos de diseño se encuentran dentro de la zona de optimización), en contraste con los CCD, que suelen tener puntos axiales fuera del “cubo”, los cuales podrían no estar en la región de interés o podrían ser imposibles de realizar.

Para un BBD, los puntos de diseño se sitúan en combinaciones de los niveles altos y bajos de los factores, y sus puntos medios se ubican en los bordes del espacio experimental, lo que les confiere la propiedad de rotabilidad, con el requerimiento de al menos tres factores continuos. No obstante, los BBD tienen limitadas capacidades para un bloqueo ortogonal comparados con los CCD; pero, dado que los BBD requieren menos puntos de diseño, su realización

puede ser menos costosa que la de los CCD con el mismo número de factores. En la tabla 12.5 se presentan algunos ejemplos de aplicación.

Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficies de respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas robustas, que incluyen diseños de experimentos y análisis de regresiones. Las RSM son útiles para modelar y analizar problemas en los cuales la respuesta buscada es el resultado de la interacción de diversas variables y, además, se busca optimizar dicha respuesta.

La RSM emplea varias fases de optimización (Gupte & Kulkarni, 2003), que son llevadas a cabo en tres pasos básicos: una fase de selección de factores, una de técnica de paso ascendente/descendente (*steepest ascent/descent*) y, finalmente, una de ajuste y optimización mediante regresión cuadrática con análisis de regresiones canónicas. Uno de los principales resultados es la representación en gráfica de superficie de la variable obtenida (Zhang & Gao, 2007). El análisis de RSM ha sido utilizado frecuentemente para la optimización de medios de cultivo en la producción de bioplaguicidas. Díaz et al. (2005), por ejemplo, llevaron a cabo la optimización del medio de cultivo para la producción de biomasa de la levadura *Pichia onychis*, usada para el control de patógenos en poscosecha, mediante la aplicación de una estrategia secuencial que incluyó un diseño factorial fraccionado seguido de un diseño central compuesto rotacional que generó superficies de respuesta. Este análisis permitió mejorar en un 42 % el rendimiento en biomasa de la levadura. En la tabla 12.5 se resumen otras aplicaciones exitosas.

Redes neuronales artificiales

Una red neuronal artificial (ANN, por su sigla en inglés) es un modelo matemático o computacional que está influenciado por los aspectos estructurales o funcionales de las redes neuronales biológicas. Una ANN imita la capacidad de aprendizaje del cerebro (Bhagat, 1990). Consiste en una entrada (como la

sinapsis), que se pondera por pesos (fuerza de las respectivas señales) y luego es calculada por una función matemática que determina la activación de la neurona. Las ANN han sido ampliamente aplicadas con gran éxito para el diseño, modelado, optimización y control de sistemas, principalmente, debido a su capacidad para detectar y filtrar señales de ruido y generalizar información a través de un procedimiento

de entrenamiento sistemático (Foster & Katz, 1981). Este análisis ha sido utilizado para la optimización de las condiciones tanto de crecimiento como de producción de enzimas (celulasas y xilanasas) en *Trichoderma reesei* (Singh et al., 2008) y para la producción de componentes antifúngicos por parte de *Bacillus amyloliquefaciens* (Caldeira et al., 2011) (tabla 12.5).

Tabla 12.5. Resumen de diseños de experimentos y técnicas de optimización utilizadas en el desarrollo de medios de cultivo para ingredientes activos de bioplaguicidas

Diseño	Técnica de optimización	Microorganismo	Tipo de fermentación	Referencia
PBD	CCD-RSM	<i>Coniothyrium minitans</i>	SmF	Chen et al. (2005)
Taguchi	CCD-RSM	<i>Beauveria bassiana</i>	SSF	Petlamul y Prasertsan (2014)
BBD	RSM	<i>Aschersonia placentae</i>	SmF	Qiu et al. (2013)
PBD	RSM	<i>Colletotrichum truncatum</i>	SSF	Silman et al. (1991)
PBD	PBD	<i>Colletotrichum coccodes</i>	SmF	Yu et al. (1997)
PBD	BBD	<i>Trichoderma harzianum</i>	SmF	Li et al. (2016)
Taguchi	Orthogonal	<i>Trichoderma harzianum</i>	SmF	Zhang y Yang (2015)
PBD	CCD-RSM	<i>Bacillus subtilis</i>	SmF	Chen et al. (2010)
Regresión lineal		<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i>	SmF	Ennouri et al. (2013)
PBD	CCD-RSM	<i>Bacillus subtilis</i>	SmF	Posada-Urbe et al. (2015)
PBD	CCD-RSM	<i>Bacillus subtilis</i>	SmF	Sreekumar y Krishnan (2010)
PBD	CCD-RSM	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	SmF	Trakunjae et al. (2015)
FFD	CCD-RSM	<i>Verticillium lecanii</i>	SSF	Shi et al. (2009)
	CCD-RSM	<i>Metarhizium anisopliae</i>	SSF	Bhanu Prakash et al. (2008)
PBD	CCD-RSM	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	SmF	Wang et al. (2011)
ANN	ANN	<i>Trichoderma reesei</i>	SSF	Singh et al. (2008)
ANN	ANN-RSM	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	SmF	Caldeira et al. (2011)

Fuente: Elaboración propia

Escalamiento del proceso de producción masiva de los microorganismos biocontroladores

El éxito en la implementación comercial de un bioplaguicida está dado, en buena medida, por la capacidad técnica y tecnológica de llevar a cabo su producción en una escala viable desde el punto de vista industrial. En general, esta escala es del orden de miles de litros o miles de kilogramos de biomasa del microorganismo, que se constituye como ingrediente activo de un bioproducto comercializado. Sin embargo, para alcanzar estos niveles de producción, el investigador cuenta, en la mayoría de los casos, con una cantidad limitada de información experimental, generada en una escala menor, ya sea a nivel de laboratorio (hasta 10 litros) o a nivel de planta piloto (hasta 100 litros).

El núcleo o corazón de cualquier proceso de producción de un ingrediente activo de un bioplaguicida es el biorreactor (figura 12.5). El biorreactor es un equipo complejo que permite el ajuste de los parámetros operacionales adecuados (temperatura, oxígeno disuelto, agitación y pH, entre otros), para llevar a cabo la fermentación del microorganismo bajo las condiciones establecidas en las etapas previas. Por tanto, el ingeniero de producción debe tener el conocimiento y la capacidad para aplicar una estrategia de escalamiento acorde con las posibilidades logísticas y operativas de los biorreactores disponibles en cada una de las escalas evaluadas. Si el tipo de fermentación es líquida (SmF), el diseño más popular es el biorreactor de tanque agitado (STR, por su sigla en inglés), seguido del biorreactor *airlift*, que usa solamente aire forzado y no tiene agitación mecánica. Si el tipo de fermentación es en estado sólido (SSF), los diseños más usados son los biorreactores de bandejas, las columnas o lechos empacados y, en menor medida, los biorreactores con agitación mecánica, como el biorreactor de paletas y el tambor rotatorio.



Figura 12.5. Biorreactores de tanque agitado (STR) usados para la producción de bioplaguicidas. a. Biorreactor escala laboratorio de 10 litros; b. Biorreactor escala piloto de 100 litros.

Fotos: Grupo de Investigación Planta Piloto de Bioproductos de Corpoica

En concordancia con lo mencionado anteriormente, el propósito del escalamiento o escalado hacia arriba es determinar las variables críticas de un proceso y, en función de estas, seleccionar las condiciones de diseño y de operación para asegurar que el efecto de dichas variables se pueda predecir o modelar. De esta manera, se deberían obtener rendimientos similares independientemente de la escala de producción (Harada et al., 2014). Para alcanzar esta meta, el ingeniero de proceso cuenta no solo con su experiencia, sino también con herramientas y conceptos de física e ingeniería.

Similitud geométrica

La similitud geométrica se refiere a la semejanza que existe entre las magnitudes de las relaciones geométricas de los biorreactores usados a escala de laboratorio y planta piloto (Anaya-Durand & Pedroza-Flores, 2008). Si se supone un sistema modelo (escala laboratorio) con dimensiones x_1 , y_1 y z_1 y un sistema prototipo (escala planta piloto) con dimensiones x_2 , y_2 y z_2 , estos son geométricamente similares si se cumple con que cada par de puntos esté relacionado entre sí por un factor de escala geométrico (de forma que haya correspondencia entre cada punto). Esto quiere decir que se puede aplicar el principio de similitud, representado a continuación:

$$\frac{x_2}{y_2} = \frac{x_1}{y_1} = \lambda_1, \Lambda, \frac{y_2}{z_2} = \frac{y_1}{z_1} = \lambda_2, \Lambda, \dots, \lambda_n$$

Donde λ_1 , λ_2 y λ_n son los factores de escala geométricos.

Debido a que el cociente altura/diámetro de un biorreactor es la variable geométrica más importante para el diseño de este tipo de equipos, generalmente dicho cociente es usado como criterio de similitud geométrica principal para realizar el escalado hacia arriba, dado que a partir de este se deriva la mayoría de las relaciones geométricas del equipo.

Criterios de escalamiento convencionales

Para obtener una similitud completa entre dos sistemas de fermentación se deberían cumplir, idealmente, además de la similitud geométrica, las similitudes cinéticas, cinemáticas y bioquímicas. Esto se relaciona con el perfil de velocidades y presiones de los fenómenos de transferencia y con la velocidad de las reacciones bioquímicas del microorganismo involucrado en el bioproceso de fermentación. Sin embargo, satisfacer todas las similitudes es imposible, y dado el grado de complejidad asociado a la determinación de las velocidades de todas las reacciones bioquímicas llevadas a cabo por un microorganismo, la mayoría de los autores se han orientado hacia la aplicación de un segundo criterio de escalamiento de tipo fisicoquímico como el siguiente:

- Consumo de potencia por unidad de volumen (P/V)
- Velocidad de punta del impulsor ($n \cdot D_i$)
- Coeficiente volumétrico de transferencia gas-líquido ($k_L a$)

Un ejemplo clásico es la aplicación exitosa del consumo de potencia constante como parámetro de escalamiento en uno de los procesos de fermentación pionero a nivel industrial para la obtención de penicilina (P/V = 1 hp/galón). Método que también ha sido usado más recientemente para fermentaciones que requieren bajos consumos de potencia. No obstante, su aplicación se ve muy limitada en fermentaciones con altos requerimientos energéticos como los cultivos recombinantes de *Escherichia coli* (Kim, Rao, Youn, & Rhee, 2003).

El escalamiento basado en la velocidad de punta del impulsor puede ser aplicado en casos específicos en los que el microorganismo sea altamente sensible al daño mecánico generado por el impulsor, especialmente, en sistemas en los cuales el medio de cultivo tenga características de viscosidad no newtonianas. El escalamiento basado en el tiempo de mezcla constante no puede ser aplicado en la práctica, debido a la ausencia de una correlación adecuada entre el tiempo

de mezcla y la eficiencia de la aireación. Podría ser más interesante y más útil obtener información del tiempo de mezcla o de la velocidad de punta del impulsor en un sistema no newtoniano viscoso.

El coeficiente volumétrico de transferencia gas-líquido ($k_L a$) es actualmente el criterio de escalamiento físico más usado, ya que intrínsecamente incluye los parámetros más relevantes que afectan el suministro de oxígeno dentro del proceso, tales como la agitación, la aireación y la velocidad superficial del gas:

$$k_L a = a'(P/V)^b v_G^c$$

Donde P es la potencia entregada al sistema; V es el volumen de reacción; v_G es la velocidad superficial del gas; a' , b y c son constantes específicas del fluido que deben ser determinadas experimentalmente.

Algunos ejemplos de aplicación exitosa del $k_L a$ como criterio de escalamiento incluyen la producción de ácido docosahecanoico en fermentación *fed-batch* por *Schizochytrium* sp. (Qu et al., 2013), la obtención de polihidroxialcanoato (PHA) en biorreactores de 14 y 120 litros por *Halomonas campisalis* (Kshirsagar et al., 2013) y el escalamiento de Erlenmeyer a biorreactor de la producción de biosurfactante a partir de *Bacillus subtilis* (que aumentó en un 28 % la producción máxima: hasta 2,5 g/l, en 44 horas) (Amani et al., 2010). Por otro lado, el $k_L a$ también puede ser usado como componente de números adimensionales para el escalamiento de procesos (Yawalkar et al., 2002).

En lo que se refiere a la producción de agentes de biocontrol fúngicos, Verma, Brar, Tyagi, Surampalli y Valéro (2006) evaluaron varios parámetros de desempeño para la fermentación líquida del hongo biocontrolador *Trichoderma viride* mediante Erlenmeyer y fermentador STR de siete litros. Se demostró que el parámetro crítico del proceso fue el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$), que se asoció directamente al perfil de oxígeno disuelto (DO) durante la fermentación. Se evidenció que a bajas concentraciones de oxígeno (30 %), se aumentó la concentración de conidios, su entomotoxidad y el índice de inhibición calculado

durante los bioensayos de control de calidad del ingrediente activo. Adicionalmente, los autores estimaron el consumo de potencia del sistema en términos de la agitación y la aireación a través del tiempo, y plantearon una estrategia de operación novedosa que podría ser aplicada con otros hongos biocontroladores.

Uso de los números adimensionales como criterio de escalamiento

Una aproximación matemática para generar estrategias de escalamiento es la aplicación de coeficientes o números adimensionales que pueden ser construidos por el método pi de Buckingham (Hubbard, 1987). Se debe tener en cuenta siempre la selección y ajuste apropiado de las variables de proceso que más afectan la producción del ingrediente activo durante la fermentación. Ejemplos bien establecidos y que han demostrado su aplicabilidad en procesos de escalamiento son los siguientes:

- Número de potencia adimensional:

$$NPo = [P/\rho n^3 d_i^5]$$

Donde P es la potencia, ρ es la densidad del caldo de fermentación, n es la velocidad de agitación y d_i es el diámetro del impulsor. Esta ecuación tiene aplicaciones y limitaciones similares a las mencionadas con el consumo de potencia, pero como no incluye el volumen del reactor, permite trabajar con escalas más amplias, sin aumentos tan significativos en la potencia de entrada requerida por el proceso.

- Número de Reynolds:

$$Re = [n d_i^2 \rho / \eta]$$

Donde η es la viscosidad cinemática del caldo de fermentación. Se recomienda su aplicación en fermentaciones con alta viscosidad o en caldos no newtonianos, como los generados por algunos hongos filamentosos.

- Número de gaseo

$$N_{Qg} = [q_g / nd_i]$$

Donde q_g es el caudal de gas suministrado al proceso de fermentación. Es un criterio muy útil para fermentaciones aerobias, se puede correlacionar con el nivel de oxígeno disuelto crítico del proceso y permite la integración directa con los sistemas de control tipo cascada de los biorreactores, especialmente, a escala de laboratorio.

- Tiempo de mezcla adimensional

$$T_m 'n = [T_m \eta / d_f^2 \rho]$$

Donde T_m es el tiempo de mezcla ($T_m = [V / N_n nd_i^3]$)

N_n es el número de bombeo, d_f es el diámetro interno del biorreactor. Es un criterio útil cuando la homogeneidad del sistema es un factor crítico, como en las fermentaciones que requieren de control continuo del pH, de adición de sustrato en sistemas tipo *fed batch* o continuo y de adición de antiespumante, entre otros. Su uso se hace más relevante cuando el cambio de escala se aplica a biorreactores piloto o industriales en los que los tiempos de mezcla intrínsecamente aumentan.

Cualquiera de estos parámetros y coeficientes pueden ser combinados con otras variables para fijar y crear nuevas correlaciones, coeficientes, términos, grupos o curvas características para un proceso de fermentación específico (Wang et al., 1997).

Escalamiento de fermentaciones sólidas

Como se mencionó antes, la fermentación sólida es uno de los sistemas de producción más común para la obtención de microorganismos biocontroladores, especialmente, de hongos filamentosos; sin embargo, su monitoreo, modelamiento y escalamiento continúa siendo hoy en día uno de los mayores retos de la ingeniería bioquímica debido a limitantes técnicas como las siguientes:

- Elevada heterogeneidad del sistema, a causa de la dificultad para obtener un perfil homogéneo y definido de presiones, temperaturas, oxígeno disuelto y nutrientes dentro de las matrices sólidas.
- Elevados volúmenes de inóculos requeridos para obtener un sistema inicial homogéneo, lo que implica tener un sistema de producción de inóculos líquidos (fermentador semilla) de un volumen acorde con la capacidad del fermentador sólido.
- Los tiempos de esterilización de las matrices sólidas son considerablemente más largos que los requeridos para medios líquidos.
- La agitación mecánica es difícil de implementar y se deben aplicar velocidades muy bajas para disminuir al mínimo la posibilidad de daños en las estructuras fúngicas.
- Limitado desarrollo tecnológico de sensores o sondas específicas para el monitoreo de parámetros claves de la fermentación sólida.
- La implementación de operaciones unitarias “aguas abajo” (tales como separación, purificación o concentración) es costosa y no siempre es viable debido a la colonización de la matriz sólida por parte del hongo.
- Baja disponibilidad de diseños comerciales a nivel mundial de biorreactores para fermentación sólida y elevado costo de estos.
- Escaso acceso a la información técnica de punta relacionada con geometrías y tipo de biorreactores, componentes internos, sistemas de esterilización y muestreo y demás aspectos técnicos del diseño de biorreactores que están sujetos a patentes y protección industrial.

Por las razones expresadas, el escalamiento de procesos de fermentación sólida presenta dificultades importantes. Para abordar el análisis del escalado de procesos SSF se han planteado estrategias similares a las descritas anteriormente para sistemas SmF: generar inicialmente criterios asociados a la similitud geométrica entre biorreactores de diferentes escalas y luego plantear, analizar y modelizar en función de un segundo criterio de similitud, ya sea cinético, cinemático o bioquímico.

Entre los criterios de escalamiento más usados para SSF se encuentran los siguientes (Lonsane et al., 1992):

- **Aproximación por ensayo y error.** Esta metodología es la más simple. Implica continuos intentos o ensayos, con rectificaciones puntuales o cambios en variables específicas en cada etapa hasta alcanzar el objetivo. La gran desventaja es el consumo en tiempo y recursos para alcanzar el éxito. Esta técnica se usó a principios del siglo xx, pero prácticamente ha sido descartada en la actualidad.
- **Mantenimiento de la similaridad geométrica.** Esta técnica trabaja sobre la base de usar las mismas proporciones geométricas durante el escalado de planta piloto a nivel industrial. El método fue muy usado especialmente para SmF a partir de 1948, pero ha sido desplazado por otros más eficientes, ya que no aseguraba una adecuada reproducibilidad. Actualmente se usa como primer criterio en conjunto con la aplicación de uno o varios criterios de escalamiento adicionales y simultáneos.
- **Mantenimiento de balances de calor e hídricas constantes.** Este método está basado en el uso de aireación forzada por medio de aire previamente humidificado, para controlar el calentamiento por evaporación generado durante el proceso y asegurar una temperatura relativamente homogénea en la matriz sólida. La humidificación del aire y la recirculación de los gases de salida enfriados también aseguran el control simultáneo de la humedad de los sólidos y aseguran que la velocidad de aireación sea la suficiente para satisfacer la demanda de oxígeno por parte del microorganismo. Esta estrategia fue evaluada para la producción de etanol por *Schwanniomyces castellii* en biorreactores tipo columna, mediante el uso de bagazo de caña como sustrato inerte para absorber los nutrientes en medio líquido. Los tamaños de los fermentadores empleados involucraron un factor de escala gravimétrico de 6-410 a partir de 10 g de sustrato húmedo. Los resultados obtenidos demostraron la aplicabilidad y simplicidad de la técnica propuesta (Saucedo-Castaneda et al., 1992).
- **Modelamiento del crecimiento basado en fenómenos intraparticulares.** Estos modelos hacen uso de ecuaciones mecanicistas y se enfocan

en la interacción entre el crecimiento microbiano y la difusión intraparticular de enzimas, productos de la hidrólisis y el oxígeno dentro de las partículas que forman la matriz sólida. Estos modelos dan una visión de cómo estos procesos a microescala pueden potencialmente limitar el desempeño global de un biorreactor SSF. Por ejemplo, el modelo de Rottenbacher, Schossler y Bauer (1987) describe un sistema SSF poco convencional, que incluye *pellets* prensados de *Saccharomyces cerevisiae* dentro de un biorreactor de lecho fluidizado en el que se nebuliza glucosa a presión para la obtención de etanol. El modelo se enfoca en la difusión intraparticular y la reacción de la glucosa con el resultante crecimiento y producción de etanol.

Un modelo para hongos filamentosos que fue desarrollado por Nopharatana, Howes, y Mitchell (1998) describe el crecimiento de las hifas fúngicas por encima de la superficie de la partícula sólida. El modelo predice cómo cambia con el tiempo la distribución de la biomasa hifal con respecto a la altura por encima de la superficie, y cómo esta depende, a su vez, de la difusión de glucosa desde la superficie del sustrato hacia los extremos hifales que se extienden en el espacio libre rico en oxígeno.

Otros criterios de escalamiento

Según el tipo de fermentación, el microorganismo empleado, los requerimientos de este para el crecimiento, los fenómenos limitantes del bioproceso y otros numerosos factores, es posible diseñar una estrategia de escalamiento específica o “personalizada” que tenga aplicabilidad práctica. Por ejemplo, uno de los limitantes menos analizados en el escalado hacia arriba es la “capacidad de control” de los biorreactores usados en las diferentes escalas de investigación. En general, los biorreactores de laboratorio poseen numerosos lazos de control que permiten tanto el monitoreo como el ajuste minucioso, preciso y automático de todas las principales variables involucradas: temperatura, agitación, aireación, nivel de oxígeno disuelto, presión, control de espuma y pH, entre otros. A medida que se aumenta la escala

(laboratorio ==> piloto ==> industrial), el número de lazos de control disminuye considerablemente, incluso, algunas variables deben ser controladas de forma manual. Esta situación es crítica también cuando se va a transferir un *know-how* a un potencial cliente industrial que no cuente con equipos de fermentación con alto nivel de automatización y control. En estos casos, se puede generar una estrategia de escalamiento robusta que debe ser “simplificada” para que pueda tener aplicación en la escala más alta.

Díaz, García y Mejía (2015), por ejemplo, desarrollaron una estrategia de escalamiento para la rizobacteria *B. amyloliquefaciens*, que se basó en los criterios convencionales de similitud geométrica y velocidad de punta del impulsor asociado a la identificación de un factor crítico sobre el crecimiento microbial, en este caso, la concentración mínima de oxígeno disuelto. Con esto, se generaron todas las cinéticas asociadas al microorganismo (crecimiento, consumo de sustrato, oxígeno disuelto y pH) y los perfiles asociados al control tipo cascada del proceso a escala de laboratorio, con el fin de satisfacer la concentración mínima de oxígeno disuelto. Los datos cinéticos de las variables operacionales de agitación y caudal de aire se transformaron mediante la aplicación de un análisis del tipo de área bajo la curva. Lo anterior permitió obtener una estrategia tipo delta o escalón (figura 12.6), que se pudo implementar en un biorreactor a nivel piloto y que es posible implementar a nivel industrial, aun si se cuenta solamente con un control manual del bioproceso.

Cuando esta estrategia de escalamiento se aplicó para la producción de biomasa de la rizobacteria *B. amyloliquefaciens* Bs006 a nivel piloto (100 L), se obtuvo una biomasa seca de 1,95 g/l, una productividad de 0,08 g/L·h, un rendimiento de 4,94 g/g y un porcentaje de esporulación mayor al 97 %. Estos valores estuvieron en un rango inferior a un cv del 10 % con respecto a los obtenidos a nivel de laboratorio (10 L), lo que demostró la factibilidad y aplicabilidad de dicha estrategia.

Cambio de escala de operaciones unitarias “aguas abajo”

Las operaciones unitarias “aguas abajo” se refieren a todas las operaciones o procesos que se realizan después del proceso de fermentación. Por lo general, incluyen las operaciones de concentración, separación, y purificación del ingrediente activo, mezcla, secado y empaque del bioproducto formulado (figura 12.7).

La estandarización de estas operaciones unitarias es clave para la obtención de un ingrediente activo (biomasa húmeda y caldo de fermentación) con las características (humedad, concentración, pureza química, pH, etc.) que se requieren para operaciones unitarias de formulación como la mezcla y la granulación. Sin embargo, la documentación sobre la estandarización de estas operaciones es muy escasa en la literatura científica, debido a los requisitos de equipos necesarios a escala piloto y a la reserva propia de la información generada a escala industrial. Por ejemplo, para la obtención de un bioproducto para el control de fitopatógenos en hortalizas a base del hongo *Trichoderma koningiopsis*, en Corpoica se llevó a cabo el escalamiento de las operaciones unitarias de lavado y separación de la biomasa obtenida mediante un proceso de fermentación sólida sobre un sustrato natural. Inicialmente, se estandarizaron las dos operaciones a escala de laboratorio con el fin de identificar parámetros claves de cada proceso (volúmenes, tiempos, velocidades y esfuerzos cortantes) y así generar límites de aceptación asociados a la calidad del ingrediente activo (concentración, viabilidad y humedad, entre otros). La validez de esta información experimental se comprobó usando equipamiento a escala piloto y demostrando la reproducibilidad de los resultados con la aplicación en varios lotes de producción en tiempos distintos. En los casos requeridos, fue necesario llevar a cabo ajustes secuenciales para satisfacer los límites de aceptación determinados previamente (Gómez, Díaz, & Cruz, 2011).

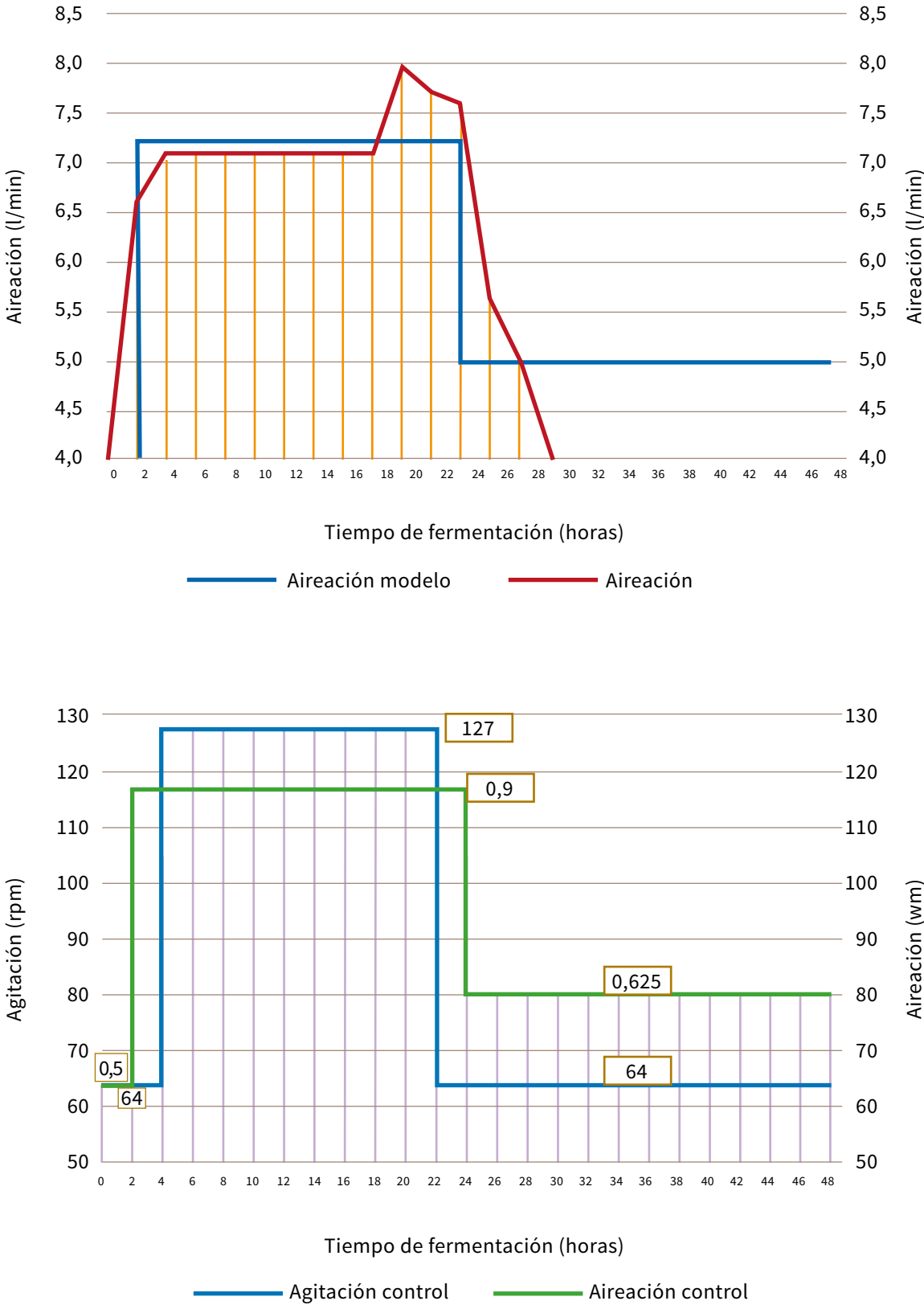


Figura 12.6. Estrategia de escalamiento basada en la capacidad de control del sistema. a. Cinética de control del caudal de aire para *B. amyloliquefaciens* Bs006 en un biorreactor STR a nivel de laboratorio (10 litros) y correspondencia de ajuste a un modelo tipo delta; b. Estrategia de control manual tipo delta para los parámetros operacionales de agitación y aireación para *B. amyloliquefaciens* Bs006 a nivel piloto (100 litros).

Fuente: Díaz, García y Mejía (2015)



Fotos: Grupo de Investigación Planta Piloto de Bioproductos de Corpoica

Figura 12.7. Etapas típicas para la obtención de un bioplaguicida granulado en piloto. a. Mezcla del ingrediente activo con excipientes; b. Granulación en granulador oscilante; c. Secado por fluidización; d. Aspecto de un granulado.

Ajuste y cambio de escala de las formulaciones

En esta etapa se realiza la optimización del prototipo, se determina su actividad en pruebas controladas o de campo y se lleva a cabo el escalamiento de laboratorio a nivel de planta piloto. También en esta etapa se desarrolla el perfeccionamiento del modelo de negocio y se evalúan las ecuaciones de valor para validar los beneficios del bioproducto. Se realiza, además, un acercamiento más detallado al mercado (segmentos objetivo, evaluación de costos y precio, canales y relación con el cliente), la planificación de recursos y actividades, la selección de aliados y el flujo de ingresos y costos.

Para ilustrar lo mencionado, se refiere la experiencia llevada a cabo en Corpoica con el escalamiento de dos formulaciones a base del hongo *Trichoderma koningiopsis*: un granulado dispersable (wg) y un polvo mojable (wp). Se analizaron las operaciones unitarias con cuatro lotes de producción piloto. Para el granulado dispersable se identificaron tres puntos críticos: humedad de la mezcla, pérdidas totales y el rendimiento de lotes de producción. Para el polvo mojable se identificaron cuatro puntos críticos: rendimiento en la separación, concentración de la mezcla, pérdidas totales y el rendimiento de lotes de producción. Con esta información se procedió a generar la fórmula maestra de producción de los dos productos, la cual contiene todos los protocolos operativos estándar de las diferentes operaciones involucradas en el proceso de manufactura (incluyendo el proceso de fermentación) y tiene por objeto definir las especificaciones de todos los materiales y métodos de fabricación e inspección. También sirve como guía para el personal relacionado con el proceso general de manufactura del bioproducto (Gómez et al., 2010).

Costos de producción

La determinación de los costos de producción permite definir el precio de venta del producto en el mercado. El precio se puede establecer de dos maneras: la primera es a partir del margen que se requiere para obtener un

beneficio sobre el producto y la segunda es ver cuál es el valor en el mercado y a qué precio será aceptado (Ravensberg, 2011).

El precio de venta depende de la demanda del producto en el mercado y del precio de otras medidas de control de la competencia. El precio del producto es a menudo alto en los primeros años, después de su lanzamiento, con el fin de obtener el retorno de la inversión en un periodo corto.

Lamentablemente, las otras propiedades favorables de los productos de control biológico (seguridad para el ser humano, carencia de residualidad, seguridad con el medio ambiente, etc.) son difíciles de explotar en un precio de venta. La competencia se basa principalmente en factores tradicionales como la eficacia y los costos (Ravensberg, 2011).

Los costos de producción pueden dividirse en costos fijos y variables o en costos directos e indirectos. Los costos fijos suelen ser los gastos de producción: las instalaciones y los equipos de producción. Estos últimos incluyen los biorreactores y los equipos de formulación y envasado. Los costos de instalación y de equipos son calculados normalmente mediante un factor de depreciación. Adicionalmente, los costos de investigación y desarrollo, como se realizan antes de lanzar el producto, son considerados también costos fijos (Ravensberg, 2011).

Cuando una empresa tiene personal permanente en I+D, los costos son vistos como fijos, y parte de ellos puede atribuirse a un determinado producto. Después de la producción comercial de un producto, si la investigación es necesaria para mejorar el producto o su uso, estos costos se considerarán como variables. En el caso de los bioplaguicidas, los costos de registro pueden ser un factor importante y pueden ser contabilizados como costos fijos, ya que se consideran como una inversión y pueden ser calculados con un factor de depreciación (Ravensberg, 2011).

Los costos variables incluyen los costos de las materias primas (medios de producción e ingredientes de formulación): energía, combustible, agua, vapor, costos de materiales de empaque y embalaje y costos laborales de mano de obra. Los costos de control de calidad y eliminación de residuos dependen del nivel de producción (FAO, 1998; Ravensberg, 2011).

Estrategias de mercadeo

Una estrategia de mercadeo es la creación de acciones o tácticas para lograr los objetivos comerciales de la empresa en un mercado específico. El desarrollo de una estrategia de mercadeo suele dividirse en cinco aspectos generales: el análisis del consumidor final, entrega final del producto al consumidor (empaqué, dosis, etc.), la definición de precios, la marca, las ventas y la distribución (Union, 2017).

El análisis del consumidor final consiste en descifrar la manera como piensan los clientes y todos los aspectos que podrían influenciar sus decisiones de compra. Los segmentos de clientes en el sector agrícola se pueden clasificar en función de distintos criterios: su tamaño como segmento, el tipo de cultivo que trabajan, la forma en que consultan la información, el modelo preferencial de compra de insumos (ya sea a través de un ejecutivo, un almacén u otro mecanismo) (PMG, 2017).

En el diseño de la estrategia de ventas y distribución, se desarrolla la red de representantes y se gestionan los canales de distribución para tener

una participación en el mercado (Union, 2017). Debido a que los bioplaguicidas requieren de un conocimiento previo para su aplicación, es necesario capacitar no solo al usuario final, sino también a los distribuidores seleccionados. La selección de la estrategia de distribución depende del tamaño y la naturaleza del fabricante. Una gran empresa agroquímica, por ejemplo, puede utilizar sus propios puntos de venta para su distribución, mientras que una pequeña puede necesitar otras compañías como sus distribuidores. El uso de grandes empresas agroquímicas como distribuidores no ha dado como resultado ventas exitosas de bioplaguicidas (CPL Business Consultants, 2006), mientras que la alianza con pequeñas empresas ha tenido mayor éxito, aunque con un volumen de ventas menor. Para el productor es de gran importancia tener conciencia sobre el rol de los distribuidores, quienes deben saber sobre el modo de uso del plaguicida y, por lo tanto, ser entrenados periódicamente. Además de esta función, las instalaciones de almacenamiento, el seguimiento de las fechas de caducidad de los productos y el transporte son una tarea relevante para los distribuidores (Ravensberg, 2011).



Fotos: Grupo de Investigación Planta Piloto de Bioproductos de Corpoica

Figura 12.8. Productos bioplaguicidas registrados por AGROSAVIA. a. Tricotec®; b. Baculovirus®; c. Lecabiol®.

Registro y transferencia de la tecnología

En esta etapa se debe cumplir con la reglamentación vigente en el país para el registro de bioproductos y se deben generar e implementar estrategias de vinculación y mercadeo específicas y adecuadas, que conduzcan a que la tecnología desarrollada y escalada en las etapas previas sea efectivamente adoptada por los clientes.

Registro

El tiempo de desarrollo de un producto y el tiempo de registro deben ser estimados de forma tan precisa como sea posible. El primero está en manos del fabricante, al menos en gran medida, razón por la cual se puede hacer una estimación. El segundo depende de las autoridades regulatorias y es, por tanto, difícil de predecir. En Europa, el registro de un bioinsumo puede tardar más de cinco años (Ravensberg, 2011). En Colombia, se estima un tiempo aproximado de dos a tres años, y el trámite de solicitud de registro de venta de bioinsumos se realiza a través del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), específicamente, del Departamento de Inocuidad e Insumos Agrícolas, de acuerdo con el cumplimiento de los requisitos de la Resolución 0698 del 4 de febrero de 2011. En el capítulo 15 se amplía la información sobre los requerimientos para el registro de bioplaguicidas.

Corpoica cuenta con tres bioplaguicidas registrados: Tricotec, Lecabiol y Baculovirus-Corpoica (figura 12.8). Tricotec (a base de *Trichoderma koningiopsis*) para el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* en tomate, de *Sclerotinia minor* y *S. sclerotiorum*

en lechuga y de *Rhizoctonia solani* en arroz. Lecabiol (a base de *Lecanicillium lecanii*) para el control de la mosca blanca en algodón. Baculovirus para el control de *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella* en papa en almacenamiento.

Implementación del modelo de negocio

La implementación del modelo de negocio consiste en llevar el diseño del modelo a la realidad, a través de acciones claras y datos específicos. La implementación debe tener en cuenta los eslabones que conforman la cadena de valor (proveedores, distribuidores, productores, clientes, etc.) y las interacciones entre estos. En Corpoica, el diseño del modelo y su implementación se realizan a la par del desarrollo de cada bioproducto. La propuesta de valor, que inicia como una hipótesis, se va definiendo de manera específica con el desarrollo de pruebas en campo y con el acercamiento que se tiene con el segmento del mercado. También durante el desarrollo de las pruebas se identifican los recursos y actividades requeridas de producción, distribución u otras, y se realiza la búsqueda de aliados, con quienes se formaliza la relación a través de contratos de producción, maquila, transferencia, distribución u otra modalidad que permita definir la relación comercial. La interacción con los clientes normalmente se hará a través de un aliado en distribución, con quien se define la forma de hacer llegar el producto a los clientes y el acercamiento con estos. Por último, la definición de la estructura de costos e ingresos se hace teniendo en cuenta los requerimientos de producción del bioinsumo y las relaciones con los aliados, a partir de lo cual se distribuyen los costos y flujos de acuerdo con los márgenes establecidos para cada eslabón

Conclusiones y perspectivas

La diferencia entre los plaguicidas químicos y los bioplaguicidas microbiales es que estos últimos están constituidos por organismos vivos que tienen la capacidad de proliferar en el campo y que responden al medioambiente de diferentes maneras. Por esta razón, es difícil predecir sus reacciones intrínsecas en la interacción con las plantas objeto de control, las plagas, el microbioma circundante y los demás factores bióticos o abióticos con los que se relacionan.

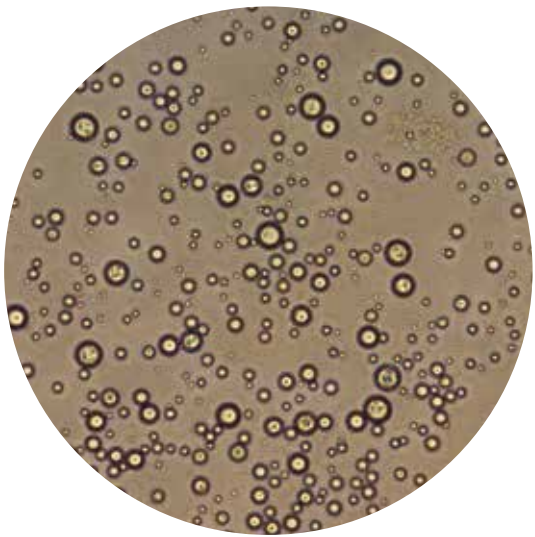
La necesidad de un desarrollo sostenible de la agricultura ha fomentado muchas iniciativas que han estimulado el desarrollo de métodos alternativos que permitan reducir el uso de plaguicidas químicos en el control de plagas. Los bioplaguicidas microbianos representan, por tanto, una de las alternativas más prometedoras y, aunque su comercialización sigue siendo marginal, la demanda está aumentando constantemente en todas partes del mundo. Este significativo aumento coincide con el crecimiento del control biológico de plagas en cultivos de alto valor como hortalizas producidas en invernadero, cultivos frutícolas, viñedos y forestales entre otros. De otra parte, a pesar de que el control biológico ha mostrado un importante desarrollo en agricultura orgánica, el futuro más prometedor de los bioplaguicidas se encuentra en los programas de manejo integrado de plagas (MIP).

A pesar de que hay avances significativos en el conocimiento científico y tecnológico sobre el desarrollo de bioplaguicidas, son pocos los casos en que se han producido formulaciones con una alta y consistente actividad biocontroladora, que además tengan un amplio espectro de uso y respondan a los desafíos económicos. Aunque se han desarrollado muchos bioproductos, varios de ellos han sido retirados del mercado antes de lograr éxito comercial. En los últimos años, ha habido importantes avances en el desarrollo y producción industrial de bioplaguicidas, pero estos aún siguen ocupando un pequeño porcentaje de los productos usados para protección de cultivos. En muchos casos, los centros de investigación o las empresas desarrollan excelentes bioplaguicidas, pero no logran posicionarlos ante los productores. Por esta razón, un producto solo es efectivo si genera impacto en condiciones de campo y si es respaldado por una sólida estrategia de mercado, que garantice la confiabilidad y rentabilidad.

La producción de un bioplaguicida no solo requiere del conocimiento detallado de la microbiología y fisiología del microorganismo biocontrolador, sino del conocimiento de la biología de la plaga, de los aspectos epidemiológicos que definen su efecto nocivo sobre el cultivo, así como de la fisiología de la planta. Además de esto, se debe abordar una serie de desafíos tecnológicos relacionados con el proceso de fermentación, el tipo de formulación, la población de plagas frente a la población microorganismos biocontroladores y los sistemas de aplicación utilizados. Por lo tanto, antes del desarrollo y la aplicación de una formulación, es necesario comprender la ecología de la interacción entre el microorganismo biocontrolador, la planta hospedera y la plaga. Así mismo, en el desarrollo de bioplaguicidas se debe considerar cada paso: la selección del microorganismo, el método de producción, el sistema de entrega, la tecnología de aplicación, los factores que afectan su desarrollo y persistencia en el medio ambiente y, en última instancia, la disponibilidad del producto en el mercado y las diversas acciones de posicionamiento de este para lograr el reconocimiento y aceptación por parte de los agricultores.

Agradecimientos

Los autores agradecen a AGROSAVIA, al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, a Colciencias, a todas las agencias nacionales e internacionales que han financiado las investigaciones desarrolladas en el tema. Asimismo, a sus grupos de trabajo y a sus aliados por haber contribuido significativamente al logro de muchos de los resultados y estrategias de trabajo aquí planteados.



Referencias

Abadias, M., Usall, J., Teixidó, N., & Viñas, I. (2003). Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. *Phytopathology*, 93(4), 436-442. doi:10.1094/PHYTO.2003.93.4.436.

Abot, A., Moscardi, F., Fuxa, J., Sosa-Gómez, D., & Richter, A. (1996). Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear Polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. *Biological Control*, 7(1), 126-130. doi:10.1006/bcon.1996.0075.

Adinarayana, K., & Ellaiah, P. (2002). Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 272-278.

Aggarwal, A., & Singh, H. (2005). Optimization of machining techniques - A retrospective and literature review. *Sadhana*, 30(6), 699-711.

Aguilera, A. A. (2014). *Vigilancia Tecnológica*. Recuperado de http://huila.gov.co/documentos/V/vigilancia_tecnologica_prioridades.pdf.

Al-Hamdani, A., & Cooke, R. (1987). Effects of water potential on accumulation and exudation of carbohydrates and glycerol during sclerotium formation and myceliogenic germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 89(1), 51-60. doi:10.1016/S0007-1536(87)80057-8.

Aldasoro Alustiza, J. C., Cantonnet Jordi, M. L., & Cilleruelo Carrasco, E. (2012). *La vigilancia tecnológica y la inteligencia competitiva en los estándares de gestión de la calidad en I+D+i*. Recuperado de http://adingor.es/congresos/web/uploads/cio/cio2012/SP_04_Gestion_Innovacion_Tecnologica_y_Organizativa/1162-1168.pdf.

Álvarez, F., Castro, M., Príncipe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., & Jofre, E. (2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of *Sclerotinia* stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 159-174. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x.

Alves, S. B., & Lecuona, R. E. (1998). Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. En S. B. Alves (Ed.), *Controle microbiano de insetos* (pp. 97-170). Piracicaba, Brasil: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ).

Alves, S. B., Moino, A., & Almeida, J. E. M. (1998). Produtos fitossanitários e entomopatógenos. En S. B. Alves (Ed.), *Controle microbiano de insetos* (pp. 97-170). Piracicaba, Brasil: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ).

Alves, L. F. A, Alves, S. B., Pereira, R. M., & Capalbo, D. M. F. (1997). Production of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* grown in alternative media. *Biocontrol Science and Technology*, 7(3), 377-383. doi:10.1080/09583159730785.

Amani, H., Mehrnia, M. R., Sarrafzadeh, M. H., Haghighi, M., & Soudi, M. R. (2010). Scale up and application of biosurfactant from *Bacillus subtilis* in enhanced oil recovery. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 510-523.

Anaya-Durand, A., & Pedroza-Flores, H. (2008). Escalamiento, el arte de la ingeniería química: Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 23(1), 31-39.

Arora, N. K., Mehnaz, S., & Balestrini, R. (Eds.). (2016). *Bioformulations: For sustainable agriculture*. Nueva Delhi, India: Springer.

Aulton, M. E. (2004). *Farmacia: la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. Madrid, España: Elsevier.

Auria, R., Ortiz, I., Villegas, E., & Revah, S. (1995). Influence of growth and high mould concentration on the pressure drop in solid state fermentations. *Process Biochemistry*, 30(8), 751-756. doi:10.1016/0032-9592(95)00004-6.

Bardin, M., Fargues, J., & Nicot, P. (2008). Compatibility between biopesticides used to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato. *Biological Control*, 46(3), 476-483. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.05.012.

Barrera, G., Simón, O., Caballero, P., Cuartas, P., Gómez, J., & Villamizar, L. (2012). Caracterización morfológica, genética y biológica de tres aislamientos colombianos de nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda*. En L. Villamizar, J. Guevara, C. Espinel, M. Gómez, J. Gómez, P. Cuartas, ... A. M. Cotes, *Desarrollo de un bioplaguicida a base de nucleopoliedrovirus para el control del gusano cogollero del maíz Spodoptera frugiperda* (pp. 21-36). Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).

Batista Filho, A., Almeida, J. E., & Lamas, C. (2001). Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*, 30(3), 437-447. doi:10.1590/S1519-566X2001000300017.

Bagwan, N. B. (2010). Evaluation of *Trichoderma* compatibility with fungicides, pesticides, organic cakes and botanicals for integrated management of soil borne diseases of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *International Journal of Plant Protection*, 3(2), 206-209. Recuperado de <http://www.researchjournal.co.in/online/IJPP/IJPP-3-2-2010.htm>.

Bhagat, P. (1990). An introduction to neural nets. *Chemical Engineering Progress*, 86(8), 55-60.

Bhanu Prakash, G. V. S., Padmaja, V., & Siva Kiran, R. R. (2008). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 99(6), 1530-1537. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.031.

Box, G. & Wilson, K. (1951). On the experimental attainment of optimum condition. *Journal of the Royal Statistical Society*, 13(1), 270-310.

Boyetchko, S., Rosskopf, E., Caesar, A., & Charudattan, R. (2002). Biological weed control with pathogens: search for candidates to applications. *Applied Mycology and Biotechnology*, 2, 239-274.

Briese, D. T. (1986). Insect resistance to baculoviruses. En E. F. A. Granados (Ed.), *The biology of baculoviruses* (pp. 89-108). Boca Raton, EE. UU.: CRC Press.

Bruck, D. J. (2009). Impact of fungicides on *Metarhizium anisopliae* in the rhizosphere, bulk soil and *in vitro*. *BioControl*, 54(4), 597-606. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s10526-009-9213-1>.

Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B., & Kreyenschmidt, J. (2013). A predictive shelf life model as a tool for the improvement of quality management in pork and poultry chains. *Food Control*, 29(2), 451-460. doi:10.1016/j.foodcont.2012.05.048.

Burges, H. D. (1998). Formulation of mycoinsecticides. En *Formulation of microbial biopesticides* (pp. 131-185). Dordrecht, Holanda: Springer. doi:10.1007/978-94-011-4926-6.

Caldeira, A. T., Arteiro, J. M., Roseiro, J. C., Neves, J., & Vicente, H. (2011). An artificial intelligence approach to *Bacillus amyloliquefaciens* ccm1 1051 cultures: Application to the production of anti-fungal compounds. *Bioresource Technology*, 102(2), 1496-1502. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.080.

Chaparro, A., Cardona, C. A., Orrego, C. E., Yépes, F. C., Serna, L., & Ospina, S. A. (2013). *Plan Global de Desarrollo 2010-2012. Prospectiva UN - Agendas de conocimiento. Agenda: Biotecnología*. Recuperado de <https://goo.gl/upvqBo>.

Charles, J.-F., Nielson-LeRoux, C., & Delecluse, A. (1996). *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annual Review of Entomology*, 41, 451-472. doi:10.1146/annurev.en.41.010196.002315.

Chen, L., Yang, X., Raza, W., Luo, J., Zhang, F., & Shen, Q. (2011). Solid-state fermentation of agro-industrial wastes to produce bioorganic fertilizer for the biocontrol of *Fusarium* wilt of cucumber in continuously cropped soil. *Bioresource Technology*, 102(4), 3900-3910. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.126.

Chen, X., Li, Y., Du, G., & Chen, J. (2005). Application of response surface methodology in medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(4), 593-599.

Chen, Z.-M., Li, Q., Liu, H.-M., Yu, N., Xie, T.-J., Yang, M.-Y., ... Chen, X.-D. (2010). Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1353-1360. doi:10.1007/s00253-009-2162-x.

Chong-Rodríguez, M. J., Maldonado-Blanco, M. G., Hernández-Escareño, J. J., Galán-Wong, L. J., & Sandoval-Coronado, C. F. (2011). Study of *Beauveria bassiana* growth, blastospore yield, desiccation-tolerance, viability and toxic activity using different liquid media. *African Journal of Biotechnology*, 10(30), 5736-5742. doi:10.5897/AJB10.2264.

Chung, S., & Kim, S.-D., (2005). Biological control of phytopathogenic fungi by *Bacillus amyloliquefaciens* 7079; suppression rates are better than popular chemical fungicides. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(5), 1011-1021.

Coca, P., García, A., Santos, D., & Fernández, A. (2010). *Guía de vigilancia estratégica proyecto Centinela: vigilancia estratégica al alcance de las empresas asturianas*. Recuperado de <https://goo.gl/Ms4J1C>.

Copping, L. (2009). *The manual of biocontrol agents, the biopesticide manual* (4.ª edición). Hampshire, Reino Unido: The British Crop Protection Council.

Corpoica (2015). *Guía ampliada para la pertinencia del mercado*. Recuperado de <http://intranet.corpoica.org.co/>

- GestionOrganizacional/_layouts/15/OSSSearchResults.aspx?k=guia%20ampliada&cs=Esta%20lista&u=http%3A%2F%2Fintranet.corpoica.org.co%2FGestionOrganizacional%2FDocumentacin.
- CPL Business Consultants. (2006). *A how to do it guide to biopesticides with historical examples*. Recuperado de <https://goo.gl/wr3gjt>.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., & Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*, 223(4637), 701-704. doi:10.1126/science.223.4637.701.
- Cruz, R. D. (2013, noviembre). *Vigilancia tecnológica e innovación*. Documento presentado en Foro Académico Nacional “La competitividad para enfrentar mercados globales”, Medellín, Colombia.
- Cuthbertson, A. G., Walters, K. F., & Deppe, C. (2005). Compatibility of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and insecticides for eradication of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Mycopathologia*, 160(1), 35-41. doi:10.1007/s11046-005-6835-4.
- Desgranges, C., Vergoignan, C., Léréec, A., Riba, G., & Durand, A. (1993). Use of solid state fermentation to produce *Beauveria bassiana* for the biological control of european corn borer. *Biotechnology Advances*, 11(3), 577-587. doi:10.1016/0734-9750(93)90026-J.
- Dhanya, M. K., Anjumol, K. B., Murugan, M., & Deepthy, K. B. (2016). Compatibility of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* with plant protection chemicals and fertilizers in cardamom. *Journal of Tropical Agriculture*, 54(2), 129-135. Recuperado de <http://jtropag.kau.in/index.php/ojs2/article/view/380>.
- Díaz, A., Flórez, J., & Cotes, A. M. (2005). Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura *Pichia onychis* (Lv027). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(1), 51-58.
- Díaz, A., García, J., & Mejía, C. (2015). Development and application of a scale up strategy for the production of native strain of *Bacillus amyloliquefaciens*. En A. T. Caldeira, A. Candeias, A. Pereira, & M. Rosario (Eds.), *MicroBiotec 15 Congress of Biotechnology and Microbiology*. Évora, Portugal: Greca.
- Díaz, A., García, J., & Zapata-Narváez, J. (2015). Improvement of sporulation conditions of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* in liquid fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6(4), 302-310. doi:10.4236/abb.2015.64029.
- Doelle, H. W., Mitchell, D. A., & Rolz, C. E. (1992). *Solid substrate cultivation*. Londres, Inglaterra: Springer.
- Dutta, P., Battacharyya, P. N., Sarmah, S. R., Madhab, M., Sandilya, S. P., Gogoi, D., ... Pathak, S. K. (2016). *In vitro* studies on the compatibility assessment of certain agrochemicals with microbial biopesticides used in tea [Camelia sinensis (L.) O. Kuntze] of Assam, Northeast India. *Two and a Bud*, 63(1), 13-16. Recuperado de <http://www.worldcat.org/title/two-and-a-bud/oclc/1772745>.
- Ejiofor, A. O. (1991). Production of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 as bioinsecticide using a mixture of ‘spent’ brewer’s yeast and waste cassava starch as the fermentation medium. *Discovery Innovation*, 3(2), 85-88. Recuperado de <https://www.ajol.info/index.php/dai>.
- Elad, Y. & Stewart, A. (2007). Microbial control of *Botrytis* spp. En Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 223-241). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Elzein, A., Kroschel, J., & Müller-stöver, D. (2004). Optimization of storage conditions for adequate shelf-life of “pesta” formulation of *Fusarium oxysporum* “foxy 2”, a potential mycoherbicide for Striga: Effects of temperature, granule size and water activity. *Biocontrol Science and Technology*, 14(6), 545-559. doi:10.1080/09583150410001682278.
- Ennouri, K., Ben Hassen, H., & Zouari, N. (2013). Optimization of bioinsecticides overproduction by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* using linear regression. *Polish Journal of Microbiology*, 62(3), 287-293.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (1999). Design and analysis of efficacy evaluation trials. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 42(3), 297-317.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2001). Principles of acceptable efficacy. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 31(2), 331-336. doi:10.1111/j.1365-2338.2001.tb01003.x
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2004a). Introduction to the efficacy evaluation of plant protection products. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 34(1), 25-29. doi:10.1111/j.1365-2338.2004.00694.x.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2004b. Minimum effective dose. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 34(1), 35-36. doi:10.1111/j.1365-2338.2004.00696.x.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2004c. Number of efficacy trials. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 34(1), 37-39.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2014). Principles of acceptable efficacy. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 44(3), 274-277. doi:10.1111/epb.12135.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2017). *Good Experimental Practice (GEP)*. Recuperado de https://www.eppo.int/PPPRODUCTS/gep/good_experimental_practice.htm.
- Faria, M., Hotchkiss, J. H., Hajek, A. E., & Wraight, S. P. (2010). 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*, 105(1), 74-83. doi:10.1016/j.jip.2010.05.011.
- Feng, K.-C., Liu, B.-L., & Tzeng, Y.-M. (2002). Morphological characterization and germination of aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(3), 217-224.
- Feng, K. C., Liu, B. L., & Tzeng, Y. M. (2000). *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. *Bioprocess Engineering*, 23(1), 25-29.
- Ferreira, S. C., Bruns, R., Ferreira, H., Matos, G., David, J., Brandao, G., ... Souza, A. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186. doi:10.1016/j.aca.2007.07.011.
- Fisher, R. A. (1992). The arrangement of field experiments. En S. Kotz & N. L. Johnson (Eds.), *Breakthroughs in statistics* (Vol. 2, pp. 82-91). Nueva York, EE. UU.: Springer.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (1998). 4. Costos de producción. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/003/v8490s/v8490s06.htm#TopOfPage>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2005). *Manejo integrado de plagas en zonas extensas*. Recuperado de <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0506sp1.htm>.
- Foster, J. W., & Katz, E. (1981). Control of actinomycin D biosynthesis in *Streptomyces parvullus*: regulation of tryptophan oxygenase activity. *Journal of Bacteriology*, 148(2), 670-677.
- Friesen, T. J., Holloway, G., Hill, G. A., & Pugsley, T. S. (2006). Effect of conditions and protectants on the survival of *Penicillium bilaiae* during storage. *Biocontrol Science and Technology*, 16(1), 89-98. doi:10.1080/09583150500258263.
- Gaugler, R., Grewal, P., Kaya, H. K., & Smith-Fiola, D. (2000). Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 17(1), 100-109. doi:10.1006/bcon.1999.0768.
- Gervais, P., & Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 85-101. doi:10.1016/S1369-703X(02)00122-5.
- Glare, T. R., & Moran-Diez, M. E. (2016). *Microbial-Based Biopesticides: Methods and Protocols*. Nueva York, EE. UU.: Springer.
- Gómez, M. I., Moreno, C. A., Cotes, A. M., Smith, A., Villamizar, L. F., Beltrán, C., ... Uribe, L. A. (2010). *Desarrollo y ajuste de los procesos tecnológicos requeridos para el registro de dos formulaciones a base de Trichoderma koningiopsis (Th003) para los cultivos de tomate (Lycopersicon esculentum) y lechuga (Lactuca sativa)* [Informe técnico final]. Mosquera, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).
- Gómez, M. I., Díaz, A., & Cruz, F. M. (2011). Escalamiento de la producción del bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003. En M. I. Gómez, & A. M. Santos (Eds.), *Uso de Trichoderma koningiopsis Th003 para el control de fitopatógenos en hortalizas* (pp. 27-42). Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).
- Gómez, J., Guevara, J., Cuartas, P., Espinel, C., & Villamizar, L. (2013). Microencapsulated *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: insecticidal activity and effect on arthropod populations in maize. *Biocontrol Science and Technology*, 23(7), 829-846. doi:10.1080/09583157.2013.802288.
- González, R., Islas, L., Obregón, A. M., Escalante, L., & Sánchez, S. (1995). Gentamicin formation in *Micromonospora purpurea*: stimulatory effect of ammonium. *Journal of Antibiotics*, 48(6), 479-483. doi:10.7164/antibiotics.48.479.
- Grijalba Bernal, E. P., Gómez Álvarez, M. I., & Zuluaga Mogollón, M. V. (2014). Compatibilidad *in vitro* de *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown y Smith (Hypocreales: *Clavicipitaceae*) con plaguicidas comerciales. *Acta Agronómica*, 63(1), 48-54. doi:10.15446/acag.v63n1.37895.
- Grijalba, E. P., Villamizar, L. R., & Cotes, A. M. P. (2009). Evaluation of the stability of *Paecilomyces* sp. and *Beauveria bassiana* under ultraviolet radiation. *Revista Colombiana de Entomología* 35(1), 1-6.
- Gupte, M., & Kulkarni, P. (2003). A study of antifungal antibiotic production by *Thermomonospora* sp. MTCC 3340 using full factorial design. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(6), 605-610.
- Hallsworth, J., & Magan, N. (1994a). Effects of KCl concentration on accumulation of acyclic sugar alcohols and trehalose in conidia of three entomopathogenic fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 18(1), 8-11. doi:10.1111/j.1472-765X.1994.tb00785.x.
- Hallsworth, J. E., & Magan, N. (1994b). Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiology*, 140(10), 2705-2713.
- Harada, Y., Sakata, K., Sato, S., & Takayama, S. (2014). Chapter 1. Fermentation Pilot Plant. En C. M. Todaro & H. C. Vogel (Eds.), *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook* (3.ª Ed., pp. 3-15). Boston, EE. UU.: William Andrew Publishing.
- Harbert, A. P. (2012). *Mind map and demonstration of the quicklook methodology for technology commercialization* (tesis de maestría). University of Texas at Austin, Texas, United States.
- Harman, G., Jin, X., Stasz, T., Peruzzotti, G., Leopold, A., & Taylor, A. (1991). Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. *Biological Control*, 1(1), 23-28. doi:10.1016/1049-9644(91)90097-J.

Hasanain, A. M. (2017). Development of a cheap media for *Bacillus thuringiensis* growth. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 3(6), 216-223. doi:10.25141/2475-3432-2017-6.0216.

Hölker, U., & Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation — are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, 8(3), 301-306. doi:10.1016/j.mib.2005.04.006.

Huang, X.-F., Chaparro, J. M., Reardon, K. F., Zhang, R., Shen, Q., & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*, 92(4), 267-275. doi:10.1139/cjb-2013-0225.

Hubbard, D. W. (1987). Scaleup strategies for bioreactors containing non-Newtonian Broths. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 506, 600-607.

Huynh-Ba, K. (2008). *Handbook of stability testing in pharmaceutical development: regulations, methodologies, and best practices*. Nueva York, EE. UU.: Springer Science & Business Media.

Hynes, R. K., & Boyetchko, S. M. (2006). Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(4), 845-849. doi:10.1016/j.soilbio.2005.07.003.

Ibrahim, L., Butt, T. M., & Jenkinson, P. (2002). Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 106(6), 705-715. doi:10.1017/S0953756202006044.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (4 de febrero de 2011). *Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones*. [Resolución 000698 de 2011]. Recuperado de <https://www.ica.gov.co/getattachment/225bd110-d1c4-47d7-9cf3-43745201e39a/2011R698.aspx>.

Instituto Vasco de Estadística (Eustat). (s. f.). Investigación científica y desarrollo tecnológico (I+D). Recuperado de http://www.eustat.eus/documentos/opt_0/tema_426/elem_1698/definicion.html.

Islam, M. T., & Omar, D. B. (2012). Combined effect of *Beauveria bassiana* with neem on virulence of insect in case of two application approaches. *Journal of Animal & Plant Sciences*. 22(1), 77-82. <http://www.thejaps.org.pk/>.

Jackson, M. A. (1997). Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(3), 180-187.

Jackson, M. A., & Schisler, D. A. (1992). The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by the nutritional environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(7), 2260-2265.

Jackson, M. A., Cliquet, S., & Iten, L. B. (2010). Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Science and Technology*, 13(1), 23-33. <http://dx.doi.org/10.1080/0958315021000054368>.

Janmaat, A. F., & Myers, J. (2003). Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1530), 2263-2270. doi:10.1098/rspb.2003.2497.

Jenkins, N. E., & Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents-assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10(6), 753-777. doi:10.1080/09583150020011717.

Jenkins, N. E., Heviefó, G., Langewald, J., Cherry, A. J., & Lomer, C. J. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*, 19(1), 21N-31N.

Jin, X., Harman, G. E., & Taylor, A. G. (1991). Conidial biomass and desiccation tolerance of *Trichoderma harzianum* produced at different medium water potentials. *Biological Control*, 1(3), 237-243. doi:10.1016/1049-9644(91)90072-8.

Karnataka, J. (2007). Effect of agrochemicals on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 20(2), 410-413.

Kennedy, M., & Krouse, D. (1999). Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 456-475.

Keskin Gündoğdu, T., Deniz, İ., Çalışkan, G., Şahin, E. S., & Azbar, N. (2016). Experimental design methods for bioengineering applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 368-388. doi:10.3109/07388551.2014.973014.

Kim, C. H., Rao, K. J., Youn, D. J., & Rhee, S. K. (2003). Scale-up of recombinant hirudin production from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(5), 303-305. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02949222>.

Kinay, P., & Yildiz, M. (2008). The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. *Biological Control*, 45(3), 433-440. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.03.001.

Kshirsagar, P. R., Suttar, R., Nilegaonkar, S. S., Pradhan, S., & Kanekar, P. P. (2013). Scale up production of polyhydroxyalkanoate (PHA) at different aeration, agitation and controlled dissolved oxygen levels in fermenter using *Halomonas campisalis* мсм B-1027. *Journal of Biochemical Technology*, 4(1), 512-517.

Kubilay, M., & Gökce, A. (2004). Effects of selected pesticides used against glasshouse tomato pests on colony growth and conidial germination of *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biological Control*, 31(3), 398-404. doi:10.1016/j.biocontrol.2004.06.001.

Kumar, G., & Ramya, V. (2014). Compatibility of agrochemical with entomopathogenic fungi *Paecilomyces lilacinus*, a biological nematicide. *Journal of Global Biosciences*, 3(2), 406-410.

Kumar, S., Thakur, M., & Rani, A. (2014). Trichoderma: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. *African Journal of Agricultural Research*, 9(53), 3838-3852.

Lacey, L. A., Headrick, H. L., & Arthurs, S. P. (2008). Effect of temperature on long-term storage of codling moth granulovirus formulations. *Journal of Economic Entomology*, 101(2), 288-294. doi:10.1603/0022-0493(2008)101[288:EOTOLS]2.0.CO;2.

Lane, B. S., Trinci, A. P. J., & Gillespie, A. T. (1991). Endogenous reserves and survival of blastospores of *Beauveria bassiana* harvested from carbon- and nitrogen-limited batch cultures. *Mycological Research*, 95(7), 821-828. doi:10.1016/S0953-7562(09)80045-2.

Larroche, C., Theodore, M., & Gros, J. B. (1992). Growth and sporulation behaviour of *Penicillium roqueforti* in solid substrate fermentation: effect of the hydric parameters of the medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(2), 183-187. doi:10.1007/BF00174465.

Leland, J. E., Mullins, D. E., Vaughan, L. J., & Warren, H. L. (2005). Effects of media composition on submerged culture spores of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, Part 1: Comparison of cell wall characteristics and drying stability among three spore types. *Biocontrol Science and Technology*, 15(4), 379-392. doi:10.1080/09583150400016928.

Leymone, J. P. (2016). Los nuevos pasos del Laboratorio Farroupilha Lallemand. *New AG International* (octubre/noviembre), 32-33.

Li, Y.-Q., Song, K., Li, Y.-C., & Chen, J. (2016). Statistical culture-based strategies to enhance chlamydospore production by *Trichoderma harzianum* SH2303 in liquid fermentation. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 17(8), 619-627.

Lonsane, B. K., Saucedo-Castaneda, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzalez, G., Ghildyal, N. P., ... Krishnaiah, M. M. (1992). Scale up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochemistry*, 27(5), 259-273. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003295929285011P>.

López, M. E., González, N., Osobampo, S., Cano, A., & Gálvez, R. (2013). *Estudio Técnico. Elemento indispensable en la evaluación de proyectos de inversión*. Recuperado de http://moodle2.unid.edu.mx/dts_cursos_md/licit/ET/EP/S05/EP05_Lectura.pdf.

Marcus, M. S. (2009). *Perspectives and challenges for biopesticide industry*. Ponencia presentada en 4th Annual Biocontrol Industry Meeting (ABIM), Lucerne, Switzerland.

Marín-Cervantes, M. C., Matsumoto, Y., Ramírez-Coutiño, L., Rocha-Pino, Z., Viniegra, G., & Shirai, K. (2008). Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases. *Process Biochemistry*, 43(1), 24-32. doi:10.1016/j.procbio.2007.10.009.

Mark, G. L., Morrissey, J. P., Higgins, P., & O'Gara, F. (2006). Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), 167-177.

Márquez, J. (2010). Innovación en modelos de negocio: la metodología de Osterwalder en la práctica. *Revista MBA Eafit*, 1, 30-47.

Marvier, M., McCreedy, C., Regetz, J., & Kareiva, P. (2007). A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates. *Science*, 316(5830), 1475-1477. doi:10.1126/science.1139208.

Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Kabori, N. N., Behle, R. W., & Delalibera Júnior, Í. (2015). Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *Journal of Invertebrate Pathology*, 127, 11-20. doi:10.1016/j.jip.2014.12.001.

McGaughey, W. H. (1985). Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 229(4709), 193-196.

Mead, R., Curnow, R. N., & Hasted, A. M. (2002). *Statistical methods in agriculture and experimental biology*. Boca Raton, EE. UU.: CRC Press.

Melo, A., Ariza, P., Lissbrant, S., & Tofiño, A. (2015). Evaluación de agroquímicos-bioinsumos para el manejo sostenible del frijol en la costa Caribe colombiana. *Agronomía Colombiana*, 33(2), 203-211. doi:10.15446/agron.colomb.v33n2.49858.

Miranda, J. J. M. (2005). *El ciclo del proyecto. Gestión de proyectos: identificación, formulación, evaluación financiera-económica-social-ambiental*. Bogotá, Colombia: MM Editores.

Muñiz-Paredes, F., Miranda-Hernández, F., & Loera, O. (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 57. doi:10.1007/s11274-017-2229-2.

Neves, P., Hirose, E., Chujo, P. T., & Moino, A. (2001). Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotropical Entomology*, 30(2), 263-268. doi:10.1590/S1519-566X2001000200009.

Nopharatana, M., Howes, T., & Mitchell, D. A. (1998). Modelling fungal growth on surfaces. *Biotechnology Techniques*, 12(4), 313-318. doi:10.1023/A:1008810500243.

Oliveira, C.N., Oliveira, P.M., & Sueki, L. (2003). Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Scientia Agricola*, 60(4), 663-667. doi:10.1590/S0103-90162003000400009.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2001). *Guidance for industry data submissions on plant protection products and their active substances (Dossier guidance)*. Recuperado de <https://www.oecd.org/chemicalsafety/pesticides-biocides/34870180.pdf>.

Osterwalder, A. (2004). *The business model ontology: A proposition in a design science approach* (tesis de doctorado). École des Hautes Études Commerciales de l'Université de Lausanne, Lausana, Suiza.

Osterwalder, A., & Pigneur, Y. (2010). *Business model generation: a handbook for visionaries, game changers, and challengers*. New Jersey, EE. UU.: John Wiley & Sons.

Observatorio Virtual de Transferencia Tecnológica (OVTT). (s. f.). *Vigilancia tecnológica e inteligencia*. Recuperado de <http://www.ovtt.org/vigilancia-tecnologica>.

Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84. doi:10.1016/S1369-703X(02)00121-3.

Pandey, A., Fernandes, M., & Larroche, C. (Eds.). (2008). *Current developments in solid-state fermentation*. Nueva Delhi, India: Springer.

Paul, B., Paul, S., & Khan, M. A. (2011). A potential economical substrate for large-scale production of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* for caterpillar control. *Biocontrol Science and Technology*, 21(11), 1363-1368. doi:10.1080/09583157.2011.605942.

Pavone, D., Díaz, M., Trujillo, L., & Dorta, B. (2009). Agranular formulation of *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson) for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Interciencia*, 34(2), 130-134. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442009000200011&script=sci_abstract.

Pavone, D., & Dorta, B. (2010). Efecto de agroquímicos sobre el desarrollo del hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* y su virulencia sobre *Spodoptera frugiperda*. *Bioagro*, 22(2), 1-11.

Pest Management Regulatory Agency (PMRA). (1993). *Assessment of the economic benefits of pesticides*. Recuperado de <http://publications.gc.ca/collections/Collection/H113-3-18E.pdf>.

Pest Management Regulatory Agency (PMRA). (2003). *Efficacy guidelines for plant protection products*. Recuperado de <https://goo.gl/r1TkFy>.

Petlamul, W., & Prasertsan, P. (2014). Spore production of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* BNBCRC for biocontrol: Response surface optimization of medium using decanter cake from palm oil mill. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57(2), 201-208.

Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305-325. doi:10.1093/biomet/33.4.305.

PMG. (2017). *Mercado de clientes agrícolas y desafío de proveedores y distribuidores*. Recuperado de <https://www.pmgchile.com/mercado-de-clientes-agricolas-y-desafio-de-proveedores-y-distribuidores/>.

Poopathi, S., Kumar, K. A., Kabilan, L., & Sekar, V. (2002). Development of low-cost media for the culture of mosquito larvicides, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(3), 209-216. doi:10.1023/A:1014937311839.

Posada-Uribe, L. F., Romero-Tabárez, M., & Villegas-Escobar, V. (2015). Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 38(10), 1879-1888. doi:10.1007/s00449-015-1428-1.

Qiu, J., Song, F., Qiu, Y., Li, X., & Guan, X. (2013). Optimization of the medium composition of a biphasic production system for mycelial growth and spore production of *Aschersonia placenta* using response surface methodology. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112(2), 108-115. doi:10.1016/j.jip.2012.10.010.

Qu, L., Ren, L.-J., & Huang, H. (2013). Scale-up of docosahexaenoic acid production in fed-batch fermentation by *Schizochytrium* sp. based on volumetric oxygen-transfer coefficient. *Biochemical Engineering Journal*, 77(15), 82-87. doi:10.1016/j.bej.2013.05.011.

Quintana-Navarro, A. B. (2010). *Análisis del mercado. Dirección de Marketing*. Recuperado de <https://goo.gl/k5kApw>.

Ravensberg, W. J. (2011). *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods*. Dordrecht, Holanda: Springer Science & Business Media.

Reichelderfer, C., & Benton, C. (1974). Some genetic aspects of the resistance of *Spodoptera frugiperda* to a nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 23(3), 378-382. doi:10.1016/0022-2011(74)90105-0.

Reyes, Y., Infante, D., García-Borrego, J., Del Pozo, E., Cruz, A., & Martínez, B. (2012). Compatibilidad de *Trichoderma asperellum* Samuels con herbicidas de mayor uso en el cultivo del arroz. *Revista de Protección Vegetal*, 27(1), 45-53.

Ribeiro, L. P., Blume, E., Borgoni, P. C., Dequech, S. T. B., Brand, S. C., & Junges, E. (2012). Compatibility of *Beauveria bassiana* commercial isolate with botanical insecticides utilized in organic crops in southern Brazil. *Biological Agriculture & Horticulture*, 28(4), 223-240. doi:10.1080/01448765.2012.735088.

Rohrmann, G. F. (2013). *Baculovirus molecular biology*. Corvallis, EE. UU.: Oregon State University.

Romero, D., De Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., Arrebola, E., ... Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 20(4), 430-440.

Rossi-Zalaf, L. S., Alves, S. B., Lopes, R. B., Silveira, S., & Tanzini, M. R. (2008). Interacao de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doencas. En S. B. Alves & R. B. Lopes (Eds.), *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios Piracicaba* (pp. 279-302). Piracicaba, Brazil: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ).

Rottenbacher, L., Schossler, M., & Bauer, W. (1987). Modelling a solid-state fluidized bed fermenter for ethanol production with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Engineering*, 2(1), 25-31. doi:10.1007/BF00369223.

Ruocco, M., Woo, S., Vinale, F., Lanzuise, S., & Lorito, M. (2011). Identified difficulties and conditions for field success of biocontrol. 2. Technical aspects: factors of efficacy. En P. C. Nicot (Ed.) *Classical and augmentative biological control against diseases and pests: critical status analysis and review of factors* (45-57). Zurich; Suiza: International Organisation for Biological and Integrated Control/West Palaearctic Regional Section (IOBC/WPRS).

Santos, A., García, M., Cortes, A. M., & Villamizar, L. (2012). Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(3), 150-156. doi:10.1016/j.riam.2011.11.002.

Santos, A., Grijalba, E., Zuluaga, M. V., Gómez, M., & Villamizar, L. (2013). Compatibilidad *in vitro* de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Clavicipitaceae) con agroquímicos empleados en los cultivos de algodón y berenjena. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 132-142. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.38025.

Santos, A. M., Uribe, L. A., Ruiz, J. C., Tabima, L., Gómez, J. A., & Villamizar, L. F. (2014). Nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* SfNPV003: Compatibilidad con agroquímicos y estabilidad en condiciones de almacenamiento. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(2), 219-228. Recuperado de <http://revista.corpoica.org.co/index.php/revista/article/view/361>.

Sauphanor, B., Berling, M., Toubon, F., Reyes, M., Delnatte, J., & Allemoz, P. (2006). Cases of resistance to granulosis virus in the codling moth. *Phytoma*, (590), 24-27.

Samson, P. R., Milner, R. J., Sander, E. D., & Bullard, G. K. (2005). Effect of fungicides and insecticides applied during planting of sugarcane on viability of *Metarhizium anisopliae* and its efficacy against white grubs. *BioControl*, 50(1), 151-163. Recuperado de <https://link.springer.com/journal/10526>.

Saucedo-Castaneda, G., Lonsane, B. K., Krishnaiah, M. M., Navarro, J. M., Roussos, S., & Raimbault, M. (1992). Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid state fermentation system. *Process Biochemistry*, 27(2), 97-107. doi:10.1016/0032-9592(92)80016-V.

Schisler, D., Jackson, M., & Bothast, R. (1991). Influence of nutrition during conidiation of *Colletotrichum truncatum* on conidial germination and efficacy in inciting disease in *Sesbania exaltata*. *Phytopathology*, 81(6), 458-461.

Schmitt, A., Bisutti, I., Ladurner, E., Benuzzi, M., Sauphanor, B., Kienle, J., ... Huber, J., (2013). The occurrence and distribution of resistance of codling moth to *Cydia pomonella* granulovirus in Europe. *Journal of Applied Entomology*, 137(9), 641-649. doi:10.1111/jen.12046.

Schumacher, V., & Poehling, H. M. (2012). *In vitro* effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Biology*, 116(1), 121-132. doi:10.1016/j.funbio.2011.10.007

Shi, Y., Xu, X., & Zhu, Y. (2009). Optimization of *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5), 921-927. doi:10.1007/s00253-009-1874-2.

Silman, R. W., Nelsen, T., & Bothast, R. (1991). Comparison of culture methods for production of *Colletotrichum truncatum* spores for use as a mycoherbicide. *FEMS Microbiology Letters*, 79(1), 69-74.

Singh, A., Tatewar, D., Shastri, P., & Pandharipande, S. (2008). Application of ANN for prediction of cellulase and xylanase production by *Trichoderma reesei* under ssf condition. *Indian Journal of Chemical Technology*, 15(1), 53-58.

Singh, D., Yadav, D. K., Chaudhary, G., Rana, V. S., & Sharma, R. K. (2016). Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial wilt of tomato incited by *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 7(1), 2. doi:10.4172/2157-7471.1000327.

Singh, N., Rai, V., & Tripathi, C. K. M. (2012). Production and optimization of oxytetracycline by a new isolate *Streptomyces rimosus* using response surface methodology. *Medicinal Chemistry Research*, 21(19), 3140-3145.

Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleri, M., & Tripathi, C. (2016). Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2087. doi:10.3389/fmicb.2016.02087

Soberón, M., Gill, S. S., & Bravo, A. (2009). Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(8), 1337-1349. doi:10.1007/s00018-008-8330-9.

Soccol, C., Ayala, L. A., Thomaz-Soccol, V., Krieger, N., & Dos Santos, H. R. (1997). Spore production by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* from declassified potatoes by solid-state fermentation. *Revista de Microbiología*, 28(Suppl. 1), 34-42.

Sreekumar, G., & Krishnan, S. (2010). Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 9(47), 8078-8084. doi:10.5897/AJB10.1283.

Surendran, M., Kannan, G. S., Nayar, K., & Leenakumary, S. (2012). Compatibility of *Pseudomonas fluorescens* with agricultural chemicals. *Journal of Biological Control*, 26(2), 190-193. <http://www.informaticsjournals.com/index.php/jbc/article/viewFile/3517/2602>.

Tabashnik, B. E. (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 39, 47-79. doi:10.1146/annurev.en.39.010194.000403.

Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81(15), 146-161. doi:10.1016/j.bej.2013.10.013.

Trakunjae, C., Sukkhum, S., & Kitpreechavanich, V. (2015). Enhanced of high level of β -xylosidase with β -xylanase production by co-culturing of *Bacillus* strains from rice straw using response surface methodology. *Chiang Mai Journal of Science*, 42(4), 822-839.

Tripathi, C. K. M., Praveen, V., Singh, V., & Bihari, V. (2004). Production of antibacterial and antifungal metabolites by *Streptomyces violaceusniger* and media optimization studies for the maximum metabolite production. *Medicinal Chemistry Research*, 13(8), 790-799. doi:10.1007/s00044-004-0118-3.

Tunga, R., Banerjee, R., & Bhattacharyya, B. C. (1998). Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation. *Bioprocess Engineering*, 19(3), 187-190.

Union, G. B. (2017). *Estrategias del mercado*. Recuperado de <http://www.globalbusinessunion.com/spanish/market-strategies.php>.

Uribe, L. (2015). *Estudio de la compatibilidad de un bioplaguicida a base de la levadura Rhodotorula glutinis Lv316 con fungicidas empleados en el cultivo de mora* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Velásquez, Z., Uribe, D., & Zuluaga, A. (1998). *Fundamentos de medicina: Terapia dermatológica*. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).

Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., & Valéro, J. R. (2006). Dissolved oxygen as principal parameter for conidia production of biocontrol fungi *Trichoderma viride* in non-Newtonian wastewater. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 941-952. doi:10.1007/s10295-006-0164-6.

Viccini, G., Mannich, M., Capalbo, D. M. F., Valdebenito-Sanhueza, R., & Mitchell, D. A. (2007). Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. *Process Biochemistry*, 42(2), 275-278. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.07.006>.

Villamizar, L., Grijalba, E., & Cotes, A. M. (2006). *Desarrollo de un bioplaguicida para el control de la mosca blanca Bemisia tabaci*. Mosquera, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).

Villarreal, Y. L. (2013). *Estudio de estabilidad para la selección de una formulación de un producto probiótico* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Wang, D., Cooney, C., Demain, A., Dunnill, P., Humphrey, A., & Lilly, M. (1997). *Translation of laboratory, pilot, and plant scale data. Fermentation and enzyme technology*. Nueva York, EE. UU.: Wiley.

Wang, P., Liu, X., Wang, Y., Ruan, H., & Zheng, X. (2011). Statistical media optimization for the biomass production of postharvest biocontrol yeast *Rhodosporidium paludigenum*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 41(4), 382-397. doi:10.1080/10826068.2011.552143.

Wells, J. (2004). Preformulación farmacéutica: propiedades físicoquímicas de las sustancias farmacológicas. En M. E. Aulton (Ed.), *Farmacía: la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas* (pp. 114-139). Madrid, España: Elsevier.

Xu, X., Yu, Y., & Shi, Y. (2011). Evaluation of inert and organic carriers for *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, 33(4), 763-768. doi:10.1007/s10529-010-0496-1.

Yadav, A. K., & Chandra, K. (2014). Mass production and quality control of microbial inoculants. *Proceedings of Indian National Science Academy*, 80(2), 483-489. doi:10.16943/ptinsa/2014/v80i2/5.

Yawalkar, A. A., Heesink, A., Versteeg, G. F., & Pangarkar, V. G. (2002). Gas—liquid mass transfer coefficient in stirred tank reactors. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 80(5), 840-848.

Yu, G., Sinclair, J., Hartman, G., & Bertagnolli, B. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(7), 955-963. doi:10.1016/S0038-0717(02)00027-5.

Yu, X., Hallett, S., Sheppard, J., & Watson, A. (1997). Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(3), 301-305.

Yu, X., Hallett, S. G., Sheppard, J., & Watson, A. K. (1998). Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(6), 333-338.

Zhang, J., & Gao, N.-F. (2007). Application of response surface methodology in medium optimization for pyruvic acid production of *Torulopsis glabrata* TP19 in batch fermentation. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8(2), 98-104.

Zhang, J., & Yang, Q. (2015). Optimization of solid-state fermentation conditions for *Trichoderma harzianum* using an orthogonal test. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 1771-1781. doi:10.4238/2015.March.13.4.

Zhang, W., Zou, H., Jiang, L., Yao, J., Liang, J., & Wang, Q. (2015). Semi-solid state fermentation of food waste for production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(6), 1123-1132.

Zhu, Y., Knol, W., Smits, J. P., & Bol, J. (1996). Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(2), 108-112. doi:10.1016/0141-0229(95)00082-8.

Zhu, Y., Smits, J. P., Knol, W., & Bol, J. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnology Letters*, 16(6), 643-648. doi:10.1007/BF00128615.

Zhuang, L., Zhou, S., Wang, Y., Liu, Z., & Xu, R. (2011). Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: Effects of heavy metals. *Bioresource Technology*, 102(7), 4820-4826. doi:10.1016/j.biortech.2010.12.098.