

BOLETIM TÉCNICO: DESENVOLVIMENTO DE UM BIOINSETICIDA PARA O CONTROLE DAS LAGARTAS DA SOJA

Rodrigo J. S. Jacques¹, Adriano Arrué Melo², Isac Aires de Castro³, Valdemir Bittencourt Soares⁴
Jerson Vanderlei Carús Guedes²

¹ Professor do Departamento de Solos, Universidade Federal de Santa Maria.
rodrigo@ufsm.br

² Professor do Departamento de Defesa Fitossanitária, Universidade Federal de Santa Maria.
adrianoarrue@hotmail.com, jerson.guedes@gmail.com

³ Mestrando em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Santa Maria.
isacaires@yahoo.com.br

⁴ Estudante do Curso de Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria.
bittencourtagro@gmail.com

ÍNDICE

1 Importância econômica das lagartas da soja no Brasil

2 Alternativas biológicas para o controle de lagartas da soja no Brasil

3 Desenvolvimento de bioinseticidas à base de fungos entomopatogênicos produtores de quitinases

3.1 Coleta de lagartas doentes em lavouras

3.2. Isolamento de fungos entomopatogênicos

3.3 Produção de fungos em fermentação em estado sólido ou submerso

3.4 Testes em laboratório para seleção de fungos entomopatogênicos

3.5 Formulação de bioprodutos contendo esporos

4 Tecnologia de aplicação de bioprodutos

5 Eficiência de bioinseticidas no controle de lagartas no campo

6 Referências bibliográficas

1. Importância econômica das lagartas da soja no Brasil

A cultura da soja apresentou importante aumento de área, regiões e épocas de cultivo no Brasil, ocupando mais de 30 milhões de hectares na safra 2016/2017 (CONAB, 2017). Fato este que permite condições favoráveis ao desenvolvimento e ao intercâmbio de pragas. De outro lado, as mudanças no sistema de cultivo, tais como, o uso de cultivares de ciclo mais curto, de hábito de crescimento indeterminado, com menores Índices de Área Foliar (IAFs) e período reprodutivo mais longo pioraram este cenário.

Com o cultivo da soja RR tolerante ao glifosato e a presença da ferrugem asiática da soja, consolidou-se a ampliação do uso de agrotóxicos, que contribuíram para a utilização de um calendário de pulverizações. Estas pulverizações estão submetidas a datas/calendário independente das necessidades de controle, desfocando-o do alvo (pragas) e contribuindo para o abandono do correto manejo integrado de pragas.

As lagartas desfolhadoras estão entre as principais pragas da soja. Elas, consomem principalmente as folhas, reduzindo a área foliar da planta, desde a sua emergência até a senescência. Em desfolhamentos mais severos, consomem nervuras, pecíolos e até ramos laterais. Além disto, há espécies que alternam o comportamento desfolhador, passando às estruturas reprodutivas, como flores e legumes. A capacidade de desfolhamento ou danos às estruturas reprodutivas varia com a espécie e com o desenvolvimento das lagartas e da planta. Dependendo da espécie, uma pode lagarta consumir entre 90 e 181 cm² de folha durante o seu desenvolvimento larval.

Na maioria das lavouras do Brasil, o controle das lagartas na cultura da soja é feito com inseticidas sintéticos. Há no mercado um grande número de ingredientes ativos e produtos comerciais, que controlam a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*), a lagarta-helicoverpa (*Helicoverpa armigera*) e as lagartas-pretas (*Spodoptera eridania*), em contraposição a lagarta-falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*), que amplia sua importância, devido principalmente a falta de inseticidas sintéticos eficientes para o seu controle. Assim, o controle desta lagarta é o mais difícil, pois a espécie é mais tolerante às doses normalmente utilizadas para outras lagartas e há eficiência insatisfatória da maioria dos inseticidas.

Com isto tem se observado uma mudança na proporção das espécies de lagartas que ocorrem em soja. Isto porque as doses dos inseticidas comumente utilizados para o controle da lagarta-da-soja não controlam as lagartas-falsa-medideira, o que resulta em uma pressão de seleção da espécie mais tolerante sobre a espécie mais suscetível. Por tudo isto, há a necessidade de se buscar alternativas mais sustentáveis para o manejo das lagartas desfolhadoras, em especial da lagarta-falsa-medideira e uma destas alternativas é o uso de bioprodutos gerados pelos microrganismos.

2. Alternativas biológicas para o controle de lagartas da soja no Brasil

Atualmente um dos maiores desafios da agricultura brasileira é desenvolver sistemas agrícolas sustentáveis, que possam produzir alimentos e fibras em quantidade e qualidade suficientes, com reduzido impacto sobre os recursos ambientais e com eficiência técnica. Nos últimos anos, diferentes tipos de bioprodutos têm sido pesquisados e comercializados, ganhando mercado devido a sua baixa toxicidade e eficiência.

Exemplo disto é a utilização das toxinas *Bt*, formuladas ou inseridas em plantas geneticamente modificadas. Estas toxinas possuem baixa especificidade, controlando a maioria das espécies de lagartas desfolhadoras. Entretanto, sua toxicidade não é idêntica entre as lagartas, havendo suscetibilidade diferente de cada espécie para cada proteína *Bt*. Isto se deve às diferenças entre receptores no intestino dos insetos para as diversas proteínas Cry (BRAVO et al., 2007). Outra alternativa biológica é o uso do baculovírus, que possui como característica a maior especificidade, controlando a espécie-praga ou algumas espécies de um gênero. Como exemplo, o baculovírus *Helicoverpa zea nucleopolyhedrovirus* (HzNPV) possui toxicidade em larvas de *H. zea* e *H. armigera*. O manejo de *H. armigera* em soja, com baculovírus e *B. thuringiensis*, combina eficiência de controle, com seletividade e segurança aos insetos benéficos e humanos.

Outra alternativa biológica é o uso dos fungos entomopatogênicos, que podem substituir os inseticidas sintéticos por serem eficientes no controle das pragas. Exemplo disto é o fungo *Metarhizium anisopliae* que é utilizado no Brasil para a formulação de biopesticidas comerciais no controle de cigarrinhas em cerca de 750.000 ha de cana e 250.000 ha de pastagens (LI et al., 2010).

Com o recente crescimento das tecnologias biológicas, o controle das lagartas da soja nos próximos anos deve vir da associação de todas as estratégias disponíveis, integrando o uso de plantas geneticamente modificadas à base de *Bt*, inseticidas químicos e inseticidas biológicos, resultando em um manejo de pragas mais sustentável.

3. Desenvolvimento de bioinseticidas à base de fungos entomopatogênicos produtores de quitinases

Nos insetos, a quitina é um componente da cutícula, constitui parte do exoesqueleto e recobre parcialmente linhas ao longo dos órgãos internos, incluindo o trato digestivo. Além disso, é um componente da membrana peritrófica que cobre o intestino médio dos insetos. As enzimas quitinases são capazes de degradar a quitina, por isso, os fungos entomopatogênicos produtores de quitinases são agentes potenciais para o controle biológico de pragas. O fungo entomopatogênico produz a quitinase, que degrada a quitina do exoesqueleto e da membrana peritrófica, favorecendo a penetração do próprio fungo e de outros agentes entomopatogênicos, que desenvolvem um processo infeccioso que levará a morte do inseto.

A colonização do hospedeiro inicia com a adesão do esporo à cutícula do inseto. Em seguida o esporo germina e forma uma estrutura de penetração na cutícula, constituída do grampo de penetração e do apressório. Nesta etapa diversas enzimas (lipases, proteinases e quitinases) são produzidas pelo apressório, que juntamente com uma força física formada pelo grampo, possibilitam o rompimento da cutícula e a colonização do hospedeiro. Após a morte do inseto, o fungo emite hifas e produz uma grande quantidade de esporos para iniciar outro ciclo de infecção (ALVES, 1998).

A seguir serão discutidas as principais etapas de desenvolvimento de um bioinseticida a base de fungos entomopatogênicos, abordando desde a prospecção do novo organismo até os testes finais de campo, um trabalho científico exigente e demorado.

3.1 Coleta de lagartas doentes em lavouras

O primeiro passo no desenvolvimento de um novo bioinseticida é a busca de microrganismos entomopatogênicos que estão presentes naturalmente na lavoura e que atacam os insetos-praga. A melhor estratégia para coleta dos insetos no campo é por meio de pano-de-batida-vertical, que permite que a maioria dos insetos seja recolhido no pano. Para que a coleta seja eficiente é necessário que a amostragem seja realizada de maneira homogênea na área. Por isso, é importante que as coletas sejam realizadas de acordo com um esquema de amostragem, com o objetivo de amostrar a área central da lavoura e também a bordadura.

Uma vez que todas as lagartas são coletadas no pano, é feita a seleção somente daquelas que apresentam sintomas de infecção por microrganismos. Estas devem ser manipuladas com pinça e acondicionados individualmente em microtubos do tipo Eppendorf® ou tubos Falcon de 15 mL em caixas de isopor com gelo para o transporte até o laboratório. Recomenda-se a identificação das amostras com informações do local e data da coleta, planta e cultivar, coordenadas geográficas, etc.

3.2 Isolamento de fungos entomopatogênicos

A obtenção de resultados satisfatórios nesta etapa demanda conhecimento técnico e infraestrutura adequada, caso contrário, ocorrerá o crescimento de microrganismos contaminantes e o isolamento resultará em fungos sem nenhuma atividade entomopatogênica. Para que isto não aconteça, a atividade deve ser realizada por técnicos com experiência em manipulação de microrganismos e em um laboratório de microbiologia.

No laboratório, os insetos com sintomas de crescimento de fungos coletados nas lavouras devem ser armazenados na geladeira (4°C) por um tempo inferior a 7 dias. Em uma capela de fluxo laminar, uma pequena quantidade da massa de esporos desenvolvida em um inseto deve ser coletada com auxílio de uma alça de platina estéril. Estes esporos são inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura esterilizado em autoclave. Existem diversos meios de cultura para o crescimento de fungos, dentre eles o meio Batata Dextrose Ágar (BDA). Normalmente utiliza-se uma placa de Petri para a inoculação dos esporos de um inseto. Assim, o número de insetos coletados será igual ao número de placas de Petri utilizadas.

As placas de Petri inoculadas são incubadas em uma estufa de crescimento dos fungos na temperatura de 25 a 30°C. O período de incubação depende de cada fungo, podendo variar de 3 a 15 dias. Por isto, uma verificação diária do crescimento dos fungos se faz necessário. Em todas as etapas do isolamento, as placas de Petri devem ser vedadas com filme plástico para evitar o crescimento de microrganismos contaminantes.

Após a incubação, as placas de Petri que apresentam crescimento de mais de um tipo de fungo devem ser novamente repicadas no mesmo meio de cultura, até a obtenção de culturas puras. Mesmo a placas que apresente o crescimento de somente um tipo de fungo, deve ser repicada pelo menos mais uma vez para confirmar a presença das culturas puras. As placas com os fungos devem ser armazenadas a 4°C até sua utilização, porém com frequência mensal devem ser novamente repicadas e incubadas, para que os fungos se mantenham viáveis.

Neste aspecto, salienta-se que o cultivo do fungo repetido por diversas vezes no meio de cultura pode ocasionar a perda da sua capacidade entomopatogênica. Por isto, recomenda-se que outros métodos de preservação dos fungos sejam utilizados, como o cultivo em tubos inclinados com água estéril ou óleo mineral, o congelamento em ultra freezer ou em nitrogênio líquido, a liofilização, entre outros. A escolha do método mais adequado vai depender do fungo a ser preservado e maiores informações devem ser obtidas na literatura, que é vasta sobre este assunto.

3.3 Produção de fungos em fermentação em estado sólido ou submerso

A utilização de produtos biológicos a base de fungos na agricultura somente é possível se houver a produção nas indústrias fornecedoras de grandes quantidades de biomassa fúngica, enzimas, metabólitos ou esporos, dependendo do tipo de bioproduto a ser obtido. Para esta finalidade, utilizam-se processos fermentativos sólidos ou submersos (também denominado de fermentação líquida) conduzidos em biorreatores. O desenvolvimento de um processo fermentativo economicamente viável e eficiente para produzir grandes quantidades de fungos é uma barreira significativa na obtenção de produtos de origem biológica, como os bioinseticidas, por isto a necessidade de utilização de infraestrutura e recursos humanos qualificados.

Uma etapa crítica é a escolha do processo fermentativo, que pode ser sólido ou submerso. Na fermentação em estado sólido, o crescimento microbiano ocorre na ausência de água livre, sendo mais indicado para o cultivo de fungos. O meio de cultura é composto de substratos sólidos com baixos níveis de umidade, porém suficientes para possibilitar o crescimento fúngico. Os componentes do meio de cultura são esterilizados em autoclave e os fungos são inoculados e cultivados em sacos ou bandejas. Porém, a fermentação sólida é difícil de ser escalonada na indústria. Um dos motivos é a exigência de grandes incubadoras para o crescimento dos fungos. Por isto, outra possibilidade é a utilização de biorreatores de leito fixo, que ocupam menor espaço, mão-de-obra e permitem melhor controle das variáveis como temperatura, umidade e oxigenação do processo fermentativo.

A fermentação submersa é o sistema mais utilizado na indústria para a produção de uma variedade de bioprodutos, pois apresenta maior facilidade de escalonamento. Nela, o crescimento do fungo ocorre na presença de água livre, formando um caldo devido a mistura da água com os componentes do meio de cultura, o qual é agitado mecanicamente para oxigenação. Para tanto, são utilizados biorreatores em fase aquosa (tipo tanque, comumente denominados de STR), que podem realizar o controle das variáveis, como velocidade de agitação (oxigenação) e temperatura.

A composição do meio de cultura nos dois processos pode ser semelhante, basicamente variando na quantidade de água. A utilização de resíduos agroindustriais no meio de cultura objetiva reduzir o custo de produção, uma vez que são baratos e tem alta disponibilidade. Estes materiais servem como suporte físico e ainda são fontes de carbono e outros nutrientes para o crescimento do fungo. Exemplos de resíduos agroindustriais utilizados para esta finalidade são: bagaço de cana, farelo de trigo, farelo de soja, água de maceração de milho, resíduos de arroz, entre outros. Além dos substratos, nos meios de cultura são adicionadas fontes de nutrientes inorgânicos (N, P, K, Ca, Mg, etc) e, algumas vezes, pequenas quantidades de fontes mais solúveis de nutrientes orgânicos, como sacarose, para promover um crescimento fúngico mais rápido.

Salienta-se, no entanto, que a definição da composição do meio de cultura e a otimização das variáveis ambientais (umidade, temperatura, pH, oxigenação, etc) do processo fermentativo sólido ou submerso não é uma tarefa fácil. Para que isto seja realizado com rapidez e baixo custo recomenda-se o treinamento ou contratação de técnicos com conhecimento em bioprocessos.

Se o objetivo for a obtenção de esporos, o processo fermentativo deve ser conduzido por mais tempo que aquele destinado a produção de biomassa. Se o cultivo está sendo realizado por processo fermentativo sólido em bandejas ou sacos, pode-se tentar reduzir o período de cultivo com a utilização de fotoperíodo de 12 horas, que funciona como um indutor da esporulação.

Outro ponto crucial do processo é a extração e a purificação do material fúngico de interesse, uma vez que a biomassa, enzimas, metabólitos ou esporos produzidos pelos fungos encontram-se misturados ao meio de cultura. Se o processo fermentativo for sólido pode-se “lavar” o meio de cultura com uma solução de 0,01% (v/v) de Tween® 80, obtendo-se uma suspensão pela mistura do fungo, seus metabólitos e Tween®. Uma suspensão também é obtida quando se finaliza o processo fermentativo submerso, devido a mistura do fungo com o meio de cultura líquido. Nos dois casos, os componentes sólidos (biomassa e/ou esporos fúngicos) da suspensão poderão ser separados dos componentes líquidos (enzimas e metabólitos) por centrifugação.

Se o produto a ser obtido são os esporos, estes podem ser comercializados como produtos do tipo pó molhável ou suspensão de esporos. A formulação destes será detalhada no abaixo. Se o produto a ser obtido são enzimas ou metabólitos, a separação do componente líquido obtido após a centrifugação poderá ser realizada através de processos de separação. É comum o uso de membranas para remoção do material insolúvel (filtração) e/ou de solventes (purificação), os quais deverão ser selecionados de acordo com as características do produto a ser extraído. As etapas do processo de extração, filtração e purificação são, em grande parte, determinadas pela natureza dos metabólitos que serão obtidos, pela presença ou não de partículas em suspensão e pelas características do produto final que se deseja obter.

3.4 Testes em laboratório para seleção de fungos entomopatogênicos

Os testes iniciais de eficiência dos fungos entomopatogênicos devem ser realizados em laboratório. Os procedimentos utilizados devem seguir os protocolos internacionais de testes de inseticidas. Recomenda-se a utilização de 40 lagartas de terceiro e quarto instares para testar cada bioinseticida. As lagartas devem ser divididas em grupos de 10 por repetição, de acordo com instar de desenvolvimento. Após a aplicação dos bioinseticidas, as lagartas são secas em papel toalha e colocadas individualmente em copos de 50 mL com tampa de acrílico transparente, contendo dieta artificial como fonte de alimento. As lagartas são armazenadas em estufa tipo B.O.D, com fotoperíodo, temperatura e umidade relativa controlados durante toda a execução do experimento.

As avaliações são realizadas aos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 Dias Após o Tratamento (DAT). Na avaliação são contadas o número de lagartas total, lagartas vivas, mortas e que apresentam esporulação do fungo, número de pupas e número de adultos emergidos.

3.5 Formulação de bioprodutos contendo esporos

A etapa de formulação de produtos biológicos é fundamental para o desempenho do bioproduto em campo. A escolha dos equipamentos para formulação, dos métodos e dos inertes da formulação devem ser definidos a partir de uma vasta revisão da literatura, bem como considerando-se a disponibilidade de equipamentos e reagentes. As formulações podem ser constituídas por duas fases, sendo a primeira aquosa e a segunda oleosa, as quais são avaliadas individualmente e depois em mistura. Para tal, se busca formular o produto inicialmente em uma fase aquosa (com base água) e após misturar essa base aquosa em uma fase oleosa (com base óleo). A mistura da fase aquosa + fase oleosa resulta em formulações que são testadas para diversas variáveis fundamentais para o sucesso das formulações. As principais variáveis a serem avaliadas são a formação de espuma, a estabilidade e a viabilidade de esporos.

Formação de espuma

A formação da espuma é quantificada durante e após o processo de agitação e formação da emulsão. As medições podem ocorrer a cada 30 segundos durante os 5 minutos do procedimento de agitação, atribuindo-se uma nota visual a quantidade de espuma presente e nos 5 minutos subsequentes a agitação, medindo-se a espessura da camada de espuma com régua posicionada no exterior do frasco.

Para uma adequada formulação, é importante que não ocorra formação de grande quantidade de espuma, tanto durante, quanto após o processo de agitação. Caso ocorra, se faz necessário a adição de agentes antiespumantes, que impeçam a formação de espumas, sendo que agentes de base siliconada estão entre os mais utilizados.

Estabilidade da formulação

Após a avaliação da formação da espuma, pode-se avaliar a estabilidade da formulação, considerando-se a separação em fases, a mudança de cor e a germinação dos esporos fúngicos. Os parâmetros avaliados podem ser determinados de forma visual 0, 24, 48 e 72 horas após o armazenamento da formulação no escuro, em frascos de vidro transparente. Também pode-se fazer registros fotográficos, os quais auxiliam na comparação dos resultados. É recomendável que a formulação não apresente uma separação de fases, pois isso pode ocorrer no momento da aplicação, o que pode resultar em uma baixa eficiência do produto em campo. Dessa maneira, são necessários componente compatibilizantes na formulação, podendo estes agirem de maneira química ou elétrica.

Viabilidade dos esporos

Para atestar sobre a viabilidade dos esporos, pode-se realizar diluições do produto formulado em água (normalmente 1:50, 1:100, 1:200). Uma alíquota de 20 µL desta diluição é dosada com micropipeta e colocada sobre lâminas de microscópio. Utiliza-se no mínimo 4 repetições para cada tratamento. Também é recomendável que sejam previstas testemunhas, tendo-se unicamente a água misturada aos esporos, ao invés da formulação.

As lâminas contendo as diluições dos esporos são colocadas sobre papel filtro umedecidos dentro de placas de Petri. Para incubação das placas, recomenda-se que anteriormente sejam vedadas com filme plástico para evitar a desidratação e a contaminação por microrganismos oportunistas.

As placas de Petri contendo as lâminas são incubadas em estufa tipo B.O.D. em temperatura favorável ao crescimento fúngico (entre 25 e 30°C) por aproximadamente 48 horas. Ao final deste período, as placas são analisadas em microscópio ótico invertido com aumento de 400x. É importante que a porcentagem de germinação dos esporos seja elevada (próxima a 100%), indicando que os componentes da formulação preservam e não prejudicam a viabilidade dos esporos. A viabilidade dos esporos é fundamental para a eficiência do produto em campo. Dependendo da natureza do microrganismo podem ser usados alguns óleos ou até mesmo biopolímeros para manter essa viabilidade.

4 Tecnologia de aplicação de bioprodutos

A tecnologia de aplicação de bioprodutos é um dos aspectos mais importantes para que os mesmos apresentem eficiência em campo. Nesse contexto, os produtos podem ser avaliados quanto ao pH, densidade específica, tensão superficial e o efeito deletério da chuva.

Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH da formulação é avaliado em intervalos de tempo, que podem ser de 24 em 24 horas por vários dias. É possível avaliar o pH da formulação pura e de suas diluições em água. É recomendável que o pH das formulações seja próximo ao pH utilizado para o crescimento do microrganismo, pois nessa condição o produto pode ter uma durabilidade maior. Quando necessário podem ser utilizados compostos básicos ou ácidos de baixo custo para correção do pH.

Densidade específica

A densidade específica da formulação pode ser determinada em aparelhos denominados densímetros. Para realizar as avaliações das densidades deve-se realizar leituras em triplicata ou com maior número de repetições e na temperatura de 25 °C. É recomendável que a formulação tenha densidade semelhante à da água pura ou a dos óleos, dependendo do tipo de formulação utilizado.

Tensão superficial

A avaliação da tensão superficial é realizada em equipamentos denominados de tensiômetros ou goniômetros. Para a análise das formulações do bioprodutos podem ser feitas diluições em água na proporção de 1:100, seguidas de 10 medições. A tensão superficial das formulações deve ter menores valores que a da água pura, que é de 72 mN.m⁻¹. Essa característica é desejável, especialmente em bioinseticidas, pois confere a calda de aplicação maior poder de molhabilidade, espalhamento e consequente melhor recobrimento e

distribuição dos esporos sobre a superfície tratada. Dessa forma, a eficiência de controle pode ser aumentada, pois aumentam as chances da contaminação do inseto com os esporos, tanto pela via de contato quanto pela via de ingestão.

Efeito deletério da chuva

Uma característica importante das formulações é avaliá-las quanto ao efeito deletério de chuva. Para isto utiliza-se câmaras de aplicação que produzem chuva artificial em intensidades definidas. Para realização do teste são utilizadas três plantas em vasos individuais por formulação a ser testada. As folhas devem ser desinfestadas com uma solução de hipoclorito de sódio à 2,5 % (v/v). Após as folhas estarem secas, é realizada a aplicação do bioinseticida nas plantas com diferentes formulações. A simulação da chuva ocorre em intervalos de tempo após a aplicação (0,5; 1; 2; 4 horas).

São coletadas três folhas por planta, antes da aplicação, após a aplicação do bioinseticida e após a chuva artificial. Essas folhas são levadas para o laboratório e com auxílio de algodão esterilizado em autoclave os esporos são removidos da superfície da folha. Este algodão é pressionado contra um meio de cultura sólido esterilizado em placas de Petri. As placas são identificadas, vedadas com plástico filme e incubadas por 48 horas. Ao final deste período é realizada a avaliação visual da germinação dos esporos do fungo com auxílio de uma lupa.

Os resultados têm demonstrado que as formulações variam quanto a susceptibilidade à chuva. Fato que está relacionado com as características de cada formulação, demonstrando que a escolha dos componentes tem influência direto sobre a tecnologia de aplicação de bioinseticidas.

5 Eficiência de bioinseticidas no controle de lagartas no campo

Uma etapa fundamental da avaliação do bioinseticida são os testes de campo. O ideal é que os teste de campo sigam as recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que por meio da Instrução Normativa nº 36, de 24 de novembro de 2009, rege o registro de novos produtos agrícolas no país. Dessa maneira, pode-se ter uma confiabilidade dos dados do novo bioproduto.

Além disso, é importante que o novo bioproduto seja testado em diferentes regiões, com o objetivo de se ter uma amplitude de solos e climas distintos. A utilização de mais de uma cultura também é fundamental, pois é possível avaliar se o produto apresenta capacidade para ser utilizado contra diferentes grupos de pragas e outras culturas. Nesse contexto, os ensaios de campo são a etapa final do desenvolvimento de um novo bioproduto, sendo o seu resultado uma consequência do correto desenvolvimento de todas as etapas anteriores, e a confirmação de que realmente o produto tem potencial para ser utilizado na agricultura.

6 Referências bibliográficas

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2ª ed. São Paulo: Editora Fealq, 1998.

BRAVO, A., GILL, S.S., SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, p. 423-435, 2007.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**, Brasília, 2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php/conteudos.php?a=1252&t=>>>. Acesso em: 19 abr. 2017.

LI, Z. et al. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their success using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, p. 117-136, 2010.