UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA

ANA CAROLINA FERREIRA MARTINS

EFEITO DE ANTICONTAMINANTES UTILIZADOS NA DIETA ARTIFICIAL DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* SOBRE O VÍRUS SPODOPTERA FRUGIPERDA MULTIPLE NUCLEOPOLYHEDROVIRUS (SfNPV).

Uberlândia
2017

ANA CAROLINA FERREIRA MARTINS

EFEITO DE ANTICONTAMINANTES UTILIZADOS NA DIETA ARTIFICIAL DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* SOBRE O VÍRUS SPODOPTERA FRUGIPERDA MULTIPLE NUCLEOPOLYHEDROVIRUS (SfNPV).

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Prof. Dr. Fernando Juari Celoto
Orientador - UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Prof. Dra. Cecília Czepak
Coorientadora- UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

Uberlândia
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao criador supremo, que em sua infinita bondade criou todos os seres e nos deu a oportunidade de aprender mais uma vez, convivendo nessa escola que se chama Terra.

À minha família, em especial meus pais Carlos e Márcia e meus irmãos Gustavo e Paulo, pelo apoio e por me fazer acreditar que eu chegaria até aqui.

Ao meu orientador, Dr. Fernando Juari Celoto, por ter aceitado esse desafio, por ter me ajudado de tantas formas e pela amizade.

À minha coorientadora, Dra. Cecília Czepak, por ter me recebido em seu laboratório de e ter me disponibilizado todos os meios para que eu pudesse desenvolver esse trabalho.

Ao pessoal do Laboratório Integrado de Pragas da UFG, em especial à Janayne, que me ajudou no desenvolvimento desse trabalho, me ajudou com a montagem e análise dos resultados. O meu muito obrigada!

Em especial, agradeço ao Rafael, pelas horas intermináveis de trabalho sempre ao meu lado, por toda a paciência, disponibilidade e atenção, sendo um grande colaborador desse estudo. Não há palavras que possam expressar todo o meu agradecimento a você.

Aos meus amigos e amigas, por sempre se preocuparem e me ajudarem de tantas formas.

Agradeço, por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Gratidão a todos vocês!

RESUMO

Spodoptera frugiperda (J. Smith) 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) é a principal praga do milho e apresenta grande potencial de dano devido à dificuldade em seu controle, que tem sido feito, principalmente, com inseticidas químicos. Dessa forma, o controle biológico com o baculovírus Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus (SfNPV) pode ser uma alternativa ao uso desses agroquímicos. Para se viabilizar estudos e testes na formulação de bioinseticidas, faz-se necessário a utilização de dieta artificial. Além de uma nutrição ideal ao desenvolvimento do inseto, também é necessário a adição de agentes anticontaminantes, como o formol, Nipagin e tetraciclina, que reduzem ou evitam a contaminação por microrganismos na dieta artificial. Objetivou-se com esse trabalho analisar o efeito de anticontaminantes utilizados na dieta artificial de *S. frugiperda* sobre SfNPV. Foram feitos 8 tratamentos com lagartas infectadas com SfNPV, para analisar a influência dos anticontaminantes na ação do vírus sobre a lagarta e 8 tratamentos com lagartas sadias, para avaliar se existia interferência especificamente sobre a lagarta. Cada tratamento consistiu de 30 repetições, sendo que cada lagarta foi considerada 1 repetição e a avaliação da mortalidade foi feita ao longo de 10 dias. A mistura de Nipagin + formol 10% acarretou um efeito negativo ao vírus, causando a mortalidade de 20 lagartas infectadas por esse baculovírus. Quando todos os tratamentos foram comparados, verificou-se que o formol 10% causou a toxidade às lagartas. Por fim, constatou-se que os anticontaminantes Nipagin + tetraciclina não interferiu no controle pelo SfNPV e não causou toxidade à *S. frugiperda*, sendo a mistura mais indicada para ser adicionada à dieta artificial desse inseto.

Palavras-chave: bioensaio, baculovírus, criação massal.

ABSTRACT

Spodoptera frugiperda (J. Smith) 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) is the main corn pest and presents great potential for damage due to the difficulty in its control, which has mainly been done with chemical insecticides. Thus, biological control with the baculovirus Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus (SfNPV) may be an alternative to the use of agrochemicals. To make feasible studies and tests in the formulation of bioinsecticides, it is necessary to use an artificial diet. In addition to optimal nutrition for insect development, it is also necessary to add antimicrobial, such as formalin, Nipagin and tetracycline, which reduce or prevent contamination by microorganisms in the artificial diet. The objective of this work was to analyze the effect of antimicrobial used in the artificial diet of *S. frugiperda* on SfNPV. It was made 8 treatments with infected caterpillars by SfNPV, to analyze the influence of antimicrobial on the action of the virus on the caterpillar and 8 treatments with healthy caterpillars to evaluate if there was interference specifically on the caterpillar. Each treatment consisted of 30 replicates and each caterpillar consisted of 1 replicate. The mortality assessment made over 10 days. The mixture of Nipagin + formoldehyde 10% caused a negative effect on the virus, causing the lowest mortality rate in the caterpillars infected by this baculovirus. When all the treatments were compared, it has been found that formaldehyde 10%, it is what appears to cause toxicity to caterpillars and somehow potentiate a virus action. Finally, it was found that Nipagin + tetracycline did not interfere without control by SfNPV and did not cause toxicity to *S. frugiperda*, being a mixture more suitable to be added to the artificial diet of this insect.

Key words: biotest, baculovirus, mass rearing.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 7
2. OBJETIVO 10
3. MATERIAL E MÉTODOS 11
4.1 – Local do experimento 11
4.2 – Lagartas de *Spodoptera frugiperda* 11
4.3 – Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus (SfNPV) 11
4.4 – Bioensaio 11
4.5.1 – Preparação da dieta artificial 12
4.5.2 – Infecção das lagartas 14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 15
6. CONCLUSÃO 24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 25
8. ANEXOS 29

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de alimentos se torna ameaçada diante do ataque de pragas, que chegam a acarretar até um terço das perdas calculadas, entre o ciclo e o armazenamento de uma cultura (WARE, 1994). Entre as diversas pragas, destacam-se os insetos, que representam o maior grupo de organismos de nosso planeta (LIMA, E. 1999). Porém, poucas espécies dessa classe adquirem status de praga (SARMENTO et al. 2002).

Dentre as pragas com maior potencial de dano, destaca-se *Spodoptera frugiperda* (J. Smith) 1797 (Lepidoptera: Noctuidae), é considerada uma praga polífaga, mas com relatos de que ataque preferencialmente gramíneas (CRUZ, 1995; POLANCZYK; ALVES 2005; FRANÇA et al. 2012), sendo considerada a principal praga do milho no Brasil (CRUZ; TURPIN, 1982; CRUZ, 1995; HRUSKA; GOULD, 1997).

Na cultura do milho, no início do estágio larval, a lagarta raspa as folhas, deixando áreas transparentes e somente à medida que cresce, é que consegue fazer perfurações (CRUZ, 1995). Com o seu desenvolvimento, abrigam-se dentro do cartucho do milho, consumindo grande parte das folhas, antes mesmo destas abrirem. Entretanto, a lagarta-do-cartucho, como é conhecida popularmente, pode também provocar severos danos em outras fases de desenvolvimento da planta, inclusive na fase reprodutiva, durante a formação da espiga e dos grãos (CRUZ et al. 2002). Quando o ataque acontece nos primeiros estádios da cultura, ocorre a morte das plantas, reduzindo o stand inicial (LIMA, J. et al., 2008).

O controle deste inseto no campo tem sido realizado essencialmente com inseticidas químicos (VALICENTE; TUELHER, 2009), que geralmente tem alta eficiência, são de custo relativamente baixo e atuação rápida (CRUZ, 1995). Entretanto, a maioria apresenta efeitos adversos a inimigos naturais (PAIVA, 2016), favorecem o aparecimento de pragas mais resistentes (CASIDA; QUISTAD, 1998; NAUEN; DENHOLM, 2005), além de colocar em risco a saúde humana e provocar um desequilíbrio ambiental.

Desta forma, o controle biológico, surge como alternativa ao uso massivo de produtos químicos, podendo ser utilizado no manejo integrado de *Spodoptera frugiperda*. A utilização de entomopatógenos como os baculovírus pode controlar eficientemente esse inseto no campo, se usados de forma adequada (VALICENTE; TUELHER, 2009). Algumas características os tornam desejáveis no controle de pragas, principalmente da ordem Lepidoptera. Entre elas estão a sua especificidade e seletividade, compatibilidade

com outros inimigos naturais, são seguros para os humanos e sua proteção em cristais proteicos permite a formulação de biopesticidas com fácil tecnologia de aplicação (ENTWISTLE; EVANS, 1985; CASTRO et al., 1999; SILVA, A. et al., 2008). O vírus *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfNPV) é específico à lagarta-do-cartucho e a larva é a fase suscetível à sua infecção (CRUZ, 2000).

No Brasil, a Embrapa Milho e Sorgo em parceria com a empresa VitaeRural, irão lançar, com comercialização prevista para atender a safra 2017/2018, o primeiro inseticida à base de Baculovirus Spodoptera contra a lagarta-do-cartucho. A recomendação de aplicação do produto na lavoura é após as 16 horas, já que a luz do sol destrói o baculovírus, tornando-o ineficaz contra a lagarta e o pH da calda deve estar entre 5 e 7, pois o pH alcalino também destrói o SfNPV. De acordo com a Embrapa, as avaliações de campo comprovaram a eficiência do produto, apresentando taxa de mortalidade entre 75% e 95% das lagartas com até cinco dias de idade (até quase 1 cm de comprimento) e como diferenciais, apresenta baixo número de aplicações (em geral duas), além da preservação de inimigos naturais e recursos hídricos (EMBRAPA, 2017).

Os baculovirus são classificados como vírus específicos a artrópodes. Possuem nucleocapsídeo no formato de bastão de 30-60 nm x 250-300 nm. Dois gêneros de virions são normalmente encontrados, os occlusion-derived virions (ODV) e os budded virions (BV). Os ODVs ficam oclusos em uma matriz proteica cristalina (poliedrina ou granulina), que recebe o nome de corpo de oclusão (Occlusion Body – OB), o qual inicia a infecção no hospedeiro através das células epiteliais do mesêntero dos insetos. Já os BVs são produzidos depois da infecção inicial e proliferam através da membrana plasmática de células infectadas para outras não infectadas. Normalmente o BV contém apenas um nucleocapsídeo dentro de um envelope derivado da membrana plasmática do hospedeiro que é modificada por uma ou mais proteínas virais. Os ODVs podem conter um ou vários nucleocapsídeos sendo classificados como simples ou de múltiplos nucleocapsídeos. Dessa forma, os BVs transmitem a infecção de célula a célula e os ODVs de inseto para inseto (JEHLE et al., 2006).

Para viabilizar estudos e testes utilizando o baculovírus, visando o aprimoramento da formulação do bioinseticida e tornando-o disponível no mercado para o controle de *S. frugiperda*, torna-se imprescindível a criação massal dessa lagarta em laboratório e a realização de bioensaios. Para isso, faz-se necessário a utilização de dieta artificial (HENSLEY; HAMMOND 1968). Segundo Parra (1991) a quantidade e qualidade do

alimento consumido por uma lagarta afetam sua performance (taxa de crescimento, tempo de desenvolvimento, peso final e sobrevivência). Sendo assim, é necessário que a dieta artificial forneça uma nutrição ideal para que o inseto consiga se estabelecer e para que seja possível a realização destes testes.

Além dos nutrientes exigidos pelo inseto, também é necessário a adição de agentes anticontaminantes, como antibióticos ou substâncias fungistáticas em dietas artificiais, que reduzem ou evitam a contaminação por microrganismos (SINGH; HOUSE, 1970; ALVES; MOINO Jr., 1998). São comumente utilizados, o Nipagin (nome comercial), que é um metilparabeno e tem função de conservante antimicrobiano; o formol, que é o aldeído mais simples existente e produzido a partir de um gás, o metanol, normalmente utilizado em substância aquosa, é também um conservante antimicrobiano; e a tetraciclina, que é um grupo de antibióticos naturais ou semissintéticos, usados no tratamento de um amplo espectro de bactérias, tanto gram-negativas quanto gram-positivas, alguns protozoários e até alguns fungos (GREENE et al., 1976; PARRA, 2015). Entretanto, não se sabe ao certo qual a o efeito que essas substâncias podem ter sobre as lagartas em bioensaios, sendo relatados casos em que houve aumento da sobrevivência e casos em que os anticontaminantes causaram efeitos prejudiciais ao desenvolvimento dos insetos (DUNKEL; READ, 1991).

Para verificar o controle de *S. frugiperda* pelo SfNPV em laboratório, é recomendado que não se faça o uso de anticontaminantes na dieta, pois podem inibir a ação do vírus (CRUZ, 2000; KUSS et al. 2016). No entanto, nenhum estudo foi feito para quantificar se realmente existe uma interação, entre os anticontaminantes e a ação do vírus sobre a lagarta em dieta artificial e a que ponto esses agentes antimicrobianos podem interferir nesse controle.

2. OBJETIVO

Analisar o efeito de anticontaminantes adicionados na dieta artificial para a criação de *Spodoptera frugiperda* sobre o vírus Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus (SfNPV).

3. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Local do experimento

O experimento foi realizado e analisado no laboratório de Manejo Integrado de Pragas (MIP), da Universidade Federal de Goiás (UFG), durante o período de agosto a setembro de 2017.

4.2 – Lagartas de *Spodoptera frugiperda*

As lagartas utilizadas no experimento, foram provenientes de ovos oriundos da criação massal mantida no próprio laboratório de MIP da UFG. Esses insetos foram criados a sucessivas gerações em condições controladas de temperatura (28 ± 2^0 C), umidade relativa ($60 \pm 10\%$) e fotofase de 14h em vasilhas plásticas fechadas e devidamente identificadas. Essas lagartas encontravam-se na geração F34. Foram utilizadas apenas lagartas neonatas para o experimento.

4.3 – Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus (SfNPV)

O produto contendo SfNPV, utilizado no experimento, é um produto que ainda está em fase de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), com número de RET 6315, desenvolvido pela empresa AgBitech Controle Biológico LTDA. É um inseticida microbiológico com concentração de 404g/L (mínimo de $7,5 \times 10^9$ poliedros/mL).

A concentração utilizada no estudo, foi obtida através da curva de dose resposta fornecida pela empresa detentora do produto, sendo a concentração de 5×10^6 poliedros/mL, a mais recomendada para o controle da lagarta em estudo.

4.4 – Bioensaio

O delineamento foi inteiramente casualizado. Foram utilizados 8 tratamentos com lagartas infectadas com o vírus SfNPV, para analisar a influência dos anticontaminantes na ação do vírus sobre a lagarta e os mesmos tratamentos foram feitos com lagartas sadias, para avaliar se existia interferência especificamente sobre a lagarta, totalizando16 tratamentos (Tabela 1). Cada tratamento foi feito com 30 repetições, sendo que cada repetição consistiu de uma lagarta, totalizando 480 lagartas analisadas. A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente por 10 dias.

Tabela 1 – Tratamentos para se testar o efeito de anticontaminantes da dieta de *S. frugiperda* na ação do vírus SfNPV sobre essa espécie de lagarta.

Tratamentos	Anticontaminante(s) adicionado(s)
T1	Tetraciclina + Nipagin + Formol 10%
T2	Tetraciclina + Formol 10%
T3	Nipagin + Formol 10%
T4	Tetraciclina + Nipagin
T5	Nipagin (Metilparabeno)
T6	Tetraciclina
T7	Formol 10%
T8	Sem anticontaminantes

Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico Bioestat, versão 5.3, sendo feito a análise de sobrevivência, através do teste de log-rank, com dados censurados do tipo I, que é a censura em que o estudo terminará após um período pré-estabelecido de tempo, assim como no presente estudo.

A análise de sobrevivência é uma das áreas da estatística que mais cresceu nas últimas décadas. A variável resposta é o tempo até a ocorrência de um evento de interesse. O referido tempo é denominado de tempo de falha, podendo ser o tempo até a morte do paciente, bem como a cura ou recidiva de uma enfermidade. Dentro do contexto da Agronomia, podem ser citados os estudos envolvendo germinação de sementes, tempo até a morte de insetos praga e vida útil pós-colheita (SOUZA, 2010). O teste log-rank (MANTEL, 1966) é o mais utilizado em análise de sobrevivência, principalmente quando as razões das funções de risco a serem comparadas são aproximadamente constantes e tem o objetivo de comparar as curvas de sobrevivência. As hipóteses para esse teste são: Sejam S1(t) e S2(t) as funções de sobrevivência dos grupos 1 e 2. A hipótese nula será: $H0:S1(t) = S2(t)$, enquanto a hipótese alternativa pode ser uma das três indicadas abaixo: $H1: S1(t) > S2(t)$; $H1: S1(t) < S2(t)$; $H1: S1(t) \neq S2(t)$ (SOUZA, 2010).

4.5.1 – Preparação da dieta artificial

A dieta artificial para S. *frugiperda* foi realizada com base na dieta artificial modificado de Greene e colaboradores (1976).

Para a preparação da dieta, foi usado ¼ da quantidade total de ingredientes usados em uma dieta completa, uma vez que a aquela quantidade era suficiente para a execução do trabalho (Tabela 2.1 e 2.2).

Tabela 2.1 – Ingredientes sólidos usados na dieta artificial de *S. frugiperda.*

Ingredientes sólidos	Quantidade para ¼ de dieta (g)
Feijão	18,750 g
Germe de trigo	15,000 g
Proteína da soja	7,500 g
Caseína	7,500 g
Levedura de cerveja	9,375 g
Ágar	5,625 g
Ácido ascórbico	0,990 g
Ácido sórbico	0,495 g
Tetraciclina	0,031 g
Nipagin (Metilparabeno)	0,825 g

Tabela 2.2 – Ingredientes líquidos usados na dieta artificial de *S. frugiperda.*

Ingredientes líquidos	Quantidade para ¼ de dieta (mL)
Água	300 mL
Complemento vitamínico	2,5 mL
Formol 10%	4,0 mL

Para a dieta artificial, de todos os tratamentos, o feijão, variedade Carioquinha, foi previamente cozido. A quantidade de água utilizada foi dividida em duas partes: uma para a dissolução do ágar (150 mL) e a outra para a dissolução e mistura dos demais ingredientes (150 mL). Quando o ágar estava dissolvido, acrescentou-se o feijão batido em liquidificador junto com a levedura de cerveja, germe de trigo, proteína da soja e caseína. Depois, toda essa mistura foi mantida em banho-maria, e acrescentado ácido ascórbico, ácido sórbico e os anticontaminantes (tetraciclina, nipagin e formaldeído) foram adicionados de acordo com os tratamentos especificados na tabela 1. Após o preparo, a dieta foi transferida para os copos plásticos de 30 mL, preenchendo-se aproximadamente um terço do seu volume. Os frascos, depois de resfriados, foram deixados novamente na câmara de fluxo, sob luz ultravioleta, por 10 minutos, para a esterilização do exterior, já que a dieta, além de atingir altas temperaturas, foi feita em condições assépticas.

Foram utilizados copos plásticos com tampa de acrílico, para receber a dieta artificial, que consistiram em 30 copos por bandejas e cada bandeja representou 1

tratamento. Copos e bandejas passaram primeiramente por um processo de assepsia, por um período de 10 minutos sob luz UV na câmara de fluxo.

4.5.2 – Infecção das lagartas

Para a infecção das lagartas neonatas, fez-se uma diluição seriada do produto (contendo poliedros do vírus SfNPV) de 1 para 9, chegando-se na dose recomendada de 100 mL/ha, que é a concentração de 5 x10^6 poliedros/mL, acrescida de 10 % de corante azul e 5% da solução de sacarose a 30%.

Com o auxílio de uma micropipeta foram transferidas alíquotas de 0,5 µL dessa suspensão, para a superfície de uma placa de Petri (60 mm). Durante a disposição das gotas sobre a placa de Petri, foram feitos dois círculos externos e um círculo interno menor (Figura 1A). Aproximadamente 50 lagartas neonatas foram colocadas para se alimentar, durante 15 minutos, nas gotas distribuídas em placas de Petri (LACEY, 1997), sendo dessa forma infectadas com o vírus SfNPV (Figura 1B).

Após o tempo de alimentação as lagartas que apresentaram o tubo digestivo colorido pelo corante foram selecionadas e distribuídas nos copos plásticos de 30 mL (Figura 1C). As lagartas destinadas à não contaminação pelo vírus, receberam apenas a solução açucarada com o corante, de forma a padronizar o experimento e também foram colocadas em dieta artificial.

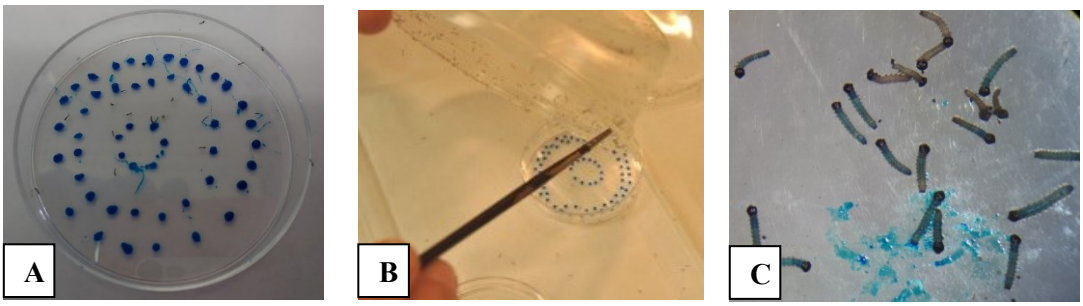

Figura 1 – Etapas do processo de infecção das lagartas de *S. frugiperda* pelo vírus SfNPV. Em A, as alíquotas de 0,5 µL da diluição seriada distribuídas em círculo; em B lagartas neonatas sendo colocadas no interior do primeiro círculo; em C lagartas que foram selecionadas por apresentar o tubo digestivo em azul.

Os copos foram mantidos em câmara climatizada tipo B.O.D regulada a 28 ± 2ºC e fotofase de 14 h. A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente por dez dias. Os indivíduos que não responderam ao toque do estilete com movimentos vigorosos e coordenados foram considerados mortos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lagartas de *S. frugiperda* infectadas com o SfNPV tiveram uma taxa de 74,58% de mortalidade, independente do tratamento, enquanto as lagartas sadias chegaram a 15,83% de indivíduos mortos nos 10 dias avaliados (Figura 2, anexos 1 e 2). Também foi quantificado que a mortalidade das lagartas infectadas ocorreu, principalmente, entre o 2º e 4º dia, sendo que 63,74% do total de lagartas para esses tratamentos (240 lagartas), não sobreviveram (Figura 3 e anexo 2).

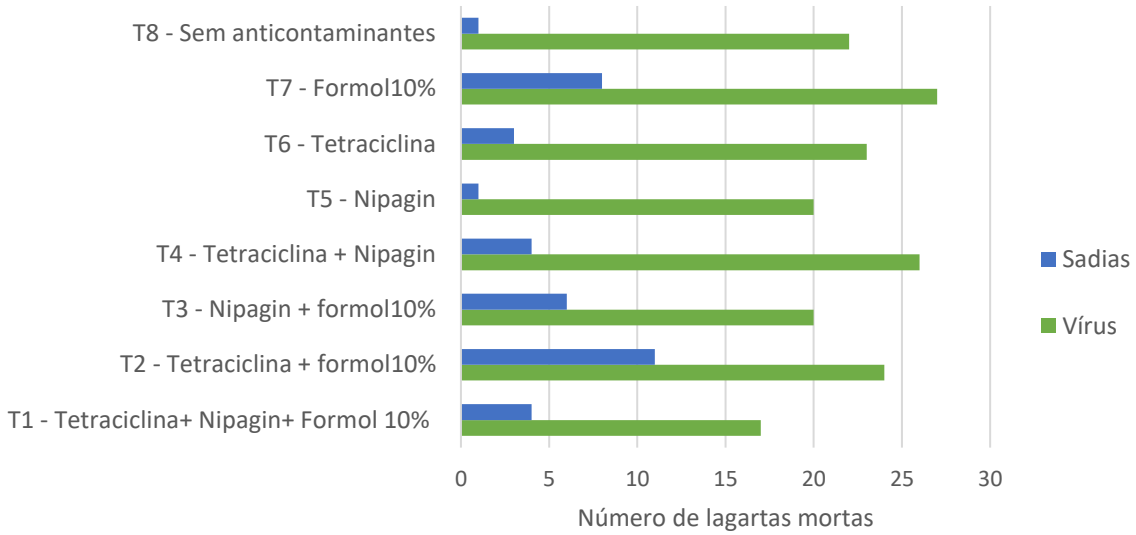

Figura 2 – Comparativo entre a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* sadias e infectadas por SfNPV alimentadas com dietas contendo diferentes anticontaminantes e avaliadas ao longo de 10 dias.

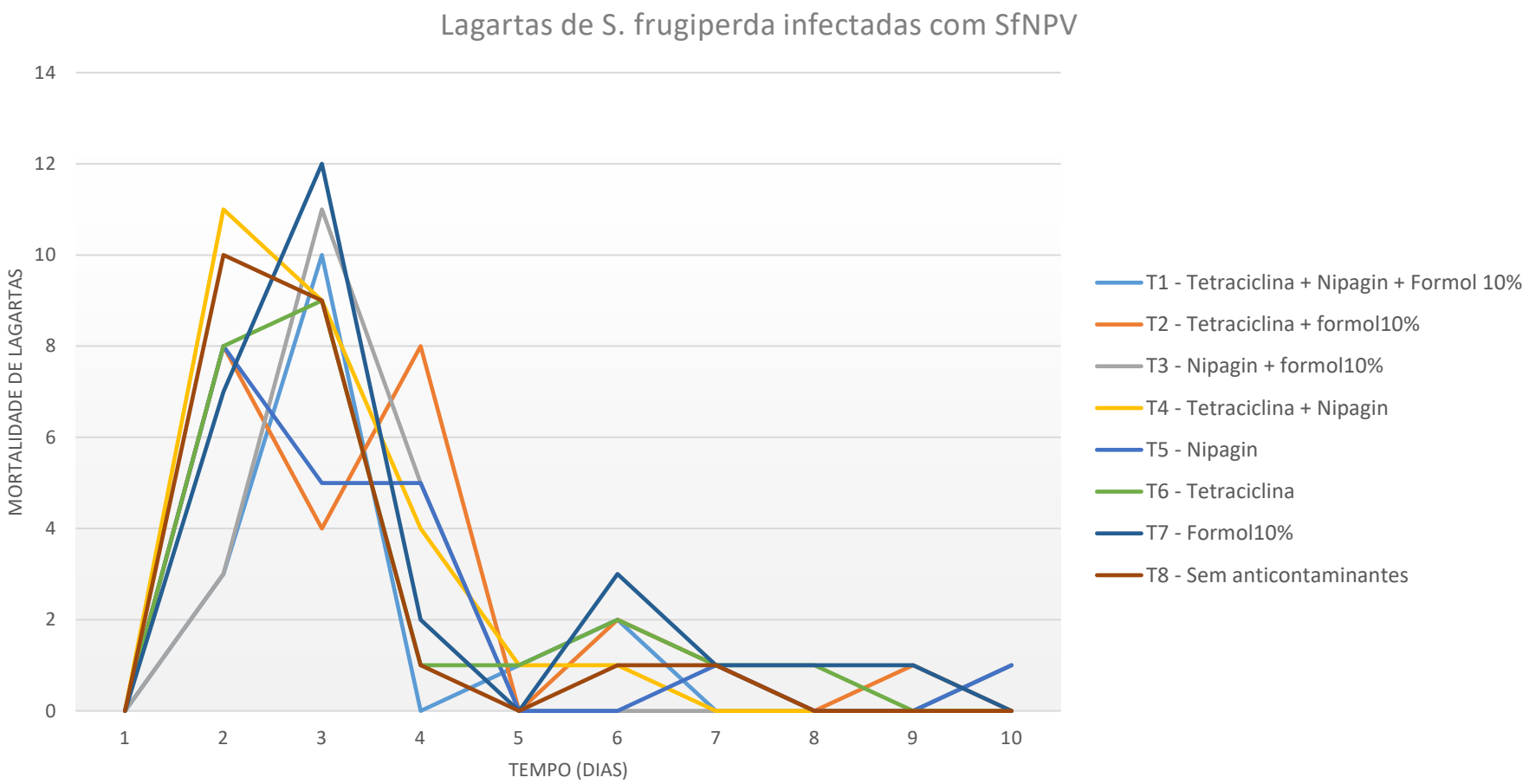

Figura 3 –Mortalidade de *S. frugiperda* infectadas com SfNPV, alimentadas com dietas contendo diferentes anticontaminantes e avaliadas ao longo de 10 dias.

Cruz (1995) em seu estudo, também verificou que a mortalidade larval de *S. frugiperda* pelo SfNPV ultrapassou 71 %, a partir de uma dose de 2 x 10^5 poliedros/mL, atingindo a totalidade na dose de 2 x 10^6 poliedros/mL, na utilização de produto com formulação em pó molhável. Sujii e colaboradores (2002), também constataram uma mortalidade de aproximadamente 76% de lagartas pequenas de *Anticarsia gemmatalis* com aplicação de Baculovirus anticarsia, mas em condição de campo.

Contudo, os dados obtidos pela análise das curvas de sobrevivência, podem indicar que essa taxa de mortalidade pode ser maior ou menor dependendo dos anticontaminantes presentes na dieta (Figura 4).

Na comparação dos tratamentos, os resultados apresentaram-se significativos em todos eles, de acordo com a curva de sobrevivência calculada pelo teste de log-rank, quando lagartas infectadas foram comparadas às lagartas sadias, mostrando que o vírus foi eficiente no controle da lagarta (Figura 4 e tabela 3).

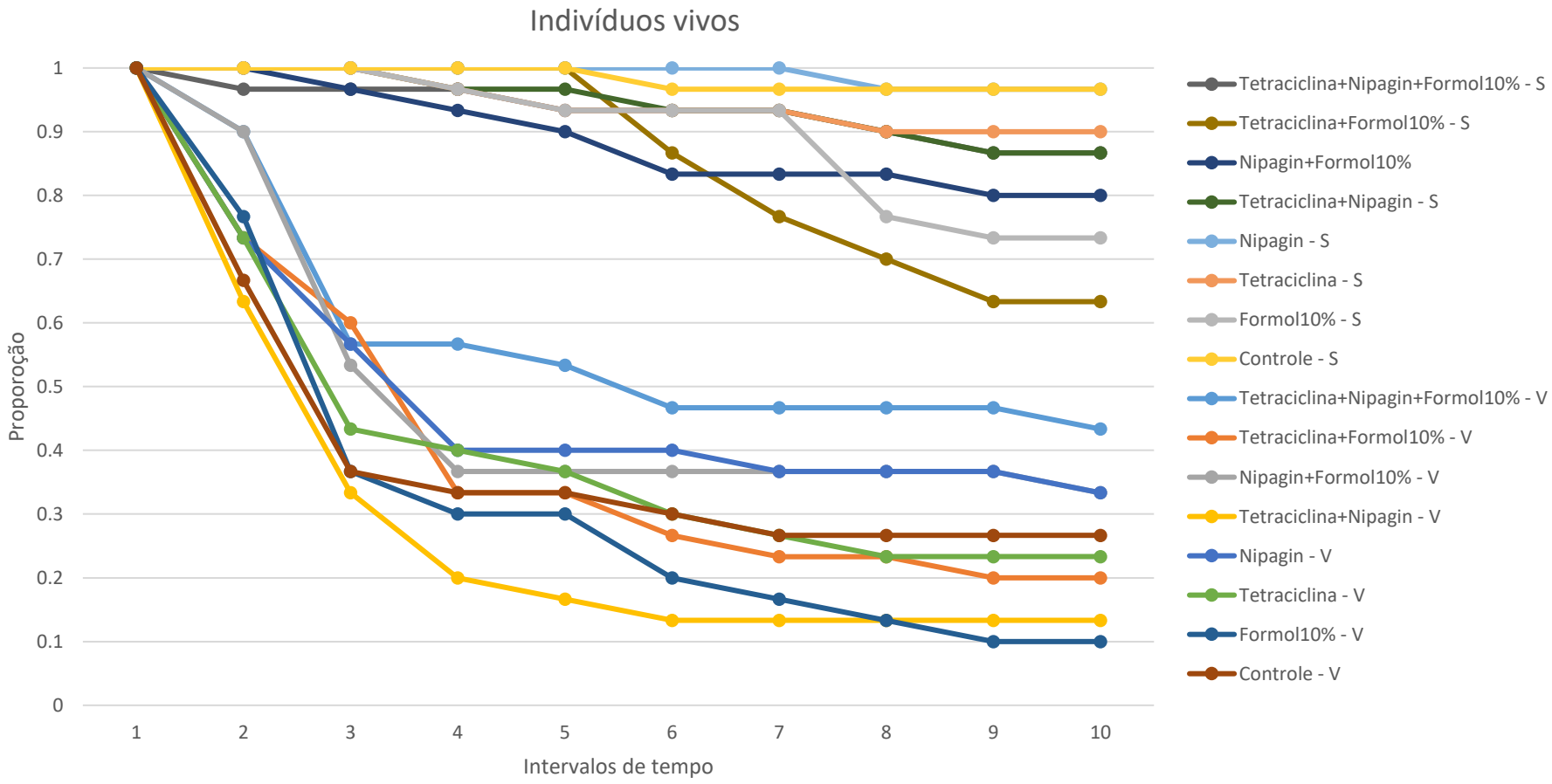

Figura 4 – Curvas de sobrevivência de *S. frugiperda* sadias e infectadas por SfNPV submetidas à 8 tratamentos e avaliadas ao longo de 10 dias. Os tratamentos com a letra "S" significam que foram realizados em lagartas sadias e com a letra "V", significam que os tratamentos foram realizados em lagartas infectadas por SfNPV.

Tabela 3 – Comparação do tempo de sobrevivência de lagartas de *S. frugiperda* submetidas à diferentes tratamentos com e sem a presença do vírus SfNPV. O *p-valor* indica significância à 5% de confiabilidade, sendo considerado significativo para valores menores que esse índice. T1: Tetraciclina + Nipagin + Formol 10%; T2: tetraciclina+formol 10%; T3: Nipagin + formol; T4: Tetraciclina + formol 10%; T5: Nipagin; T6: Tetraciclina; T7: Formol 10%; T8: dieta sem anticontaminantes; S: sem a presença do vírus. V: com a presença do vírus.

Tratamentos	p-valor
T1V-T1S	0.0001
T2V-T2S	0.0001
T3V-T3S	0.0001
T4V-T4S	0.0001
T5V-T5S	0.0001
T6V-T6S	0.0001
T7V-T7S	0.0001
T8V-T8S	0.0001

Pela análise do efeito dos anticontaminantes da dieta artificial de *S. frugiperda* infectadas com SfNPV, observou-se que o tratamento com todos os anticontaminantes (T1) e a mistura Nipagin + Formol 10% (T3) foi o que mais prejudicou a ação do vírus sobre a lagarta, quando comparado ao tratamento controle (T8) (Tabela 4 e anexo 3). Indicando que o Nipagin (metilparabeno), em mistura com o formol 10%, é o composto químico que mais tem efeito negativo sobre a eficiência do baculovírus no controle de *S. frugiperda*, pois é a mistura presente tanto no T1 como no T3 (Tabela 4 e anexo 3).

Tabela 4 – Comparação do tempo de sobrevivência de lagartas de *S. frugiperda* submetidas à diferentes tratamentos com e sem a presença do vírus SfNPV. O *p-valor* indica significância à 5% de confiabilidade, sendo considerado significativo para valores menores que esse índice. T1S: Tetraciclina + Nipagin + Formol 10%; T2: tetraciclina + formol 10%; T3: Nipagin + formol 10%; T4: Tetraciclina + formol 10%; T5: Nipagin; T6: Tetraciclina; T7: Formol 10%; T8: dieta sem anticontaminantes; S: sem a presença do vírus. V: com a presença do vírus.

Tratamentos	*p-valor*	Tratamentos	*p-valor*
T1S-T2S	0.0291	T1V-T2V	0.0243
T1S-T3S	0.4703	T1V-T3V	0.2512
T1S-T4S	0.9902	T1V-T4V	0.0001
T1S-T5S	0.1535	T1V-T5V	0.2773
T1S-T6S	0.6939	T1V-T6V	0.0156
T1S-T7S	0.1677	T1V-T7V	0.0001
T1S-T8S	0.1574	T1V-T8V	0.0067
T2S-T3S	0.1752	T2V-T3V	0.2534
T2S-T4S	0.0270	T2V-T4V	0.0172
T2S-T5S	0.0006	T2V-T5V	0.2352
T2S-T6S	0.0126	T2V-T6V	0.9696
T2S-T7S	0.3472	T2V-T7V	0.0979
T2S-T8S	0.0007	T2V-T8V	0.7713
T3S-T4S	0.4477	T3V-T4V	0.0002
T3S-T5S	0.0382	T3V-T5V	0.9682
T3S-T6S	0.2682	T3V-T6V	0.1843
T3S-T7S	0.5673	T3V-T7V	0.0008
T3S-T8S	0.0385	T3V-T8V	0.0772
T4S-T5S	0.1535	T4V-T5V	0.0013
T4S-T6S	0.7036	T4V-T6V	0.0239
T4S-T7S	0.1646	T4V-T7V	0.3818
T4S-T8S	0.1582	T4V-T8V	0.0666
T5S-T6S	0.2861	T5V-T6V	0.2751
T5S-T7S	0.0063	T5V-T7V	0.0055
T5S-T8S	0.9904	T5V-T8V	0.1697
T6S-T7S	0.0816	T6V-T7V	0.0899
T6S-T8S	0.2925	T6V-T8V	0.7542
T7S-T8S	0.0077	T7V-T8V	0.1843

Estudos sobre efeitos de anticontaminantes sobre baculovírus, não são encontrados na literatura. Em contrapartida, estudos com a utilização de misturas químicas, como

inseticidas químicos, não afetaram a eficácia do vírus sobre hospedeiros (CRUZ; VALICENTE, 1992) e em alguns casos até aumentou o controle do inseto com o uso de subdosagens (SILVA, M. 1995).

Para os demais tratamentos, T8, T6, T2, T4 e T7 não houve diferença significativa entre as curvas de sobrevivência (Tabela 4). Comprovando mais uma vez que a mistura de Nipagin (metilparabeno) e formol 10%, é que causou o efeito negativo ao vírus. Diante dos resultados, ainda podemos verificar que o formol 10% isolado e o antibiótico tetraciclina, isolado ou em mistura com os demais compostos, não interferiu na virulência do agente SfNPV sobre as lagartas em uma comparação com o controle (T8) (Tabela 4 e anexo 3).

Nos tratamentos com lagartas não infectadas, os tratamentos T7 (formol 10%), T3 (Nipagin + formol 10%) e T2 (Tetraciclina + formol 10%) mostraram-se mais tóxicos às lagartas quando comparados ao tratamento controle (T8) (Tabela 4 e anexo 4). Já os tratamentos T5 (Nipagin), T6 (Tetraciclina), T1 (Tetraciclina + Nipagin + Formol 10%) e T4 (Tetraciclina + Nipagin) mostraram-se menos tóxicos à lagarta, de acordo com a curva de sobrevivência, quando comparados ao tratamento controle (T8). Sendo assim, o que podemos observar é que o formol 10% é o agente antimicrobiano que causa toxidade à lagarta, tanto em mistura com tetraciclina e Nipagin, como também isolado (Tabela 4 e anexo 4).

Quando esse resultado é comparado aos resultados obtidos para as lagartas infectadas pelos baculovírus (Tabela 4), podemos observar que a mortalidade constatada de *S. frugiperda* não ocorreu somente pela ação do vírus, mas também devido a toxidade às lagartas causado pelo formol 10%, uma vez que foi constatado o efeito desse conservante antimicrobiano desfavorecendo a sobrevivência desses insetos (Tabela 4 e anexo 4).

O formol, pode causar diversos riscos à saúde humana, dependendo do tempo de exposição e da concentração utilizada. Em 2004, a IARC (International Agency of Research on Cancer), classificou este composto como carcinogênico (Grupo 1), tumorogênico e teratogênico por produzir efeitos na reprodução para humanos e em estudos experimentais demonstraram ser também, para algumas espécies de animais (IARC, 2006). É uma prática comum usar compostos antimicrobianos, separadamente ou em misturas, para prevenir a contaminação microbiana em dietas sintéticas para insetos

(GREENE et al., 1976; PARRA, 2015). Mas em alguns casos, estes compostos mostraram-se prejudiciais aos insetos (SINGH; HOUSE, 1970).

Moreira (2017) testou anticontaminantes alternativos na criação de *Diatrae saccharalis*, em substituição ao formaldeído e obteve sucesso com o ácido acetilsalicílico na menor dose testada (1g/dieta) e na criação de *Helicoverpa armigera,* o ácido benzoico na maior concentração testada (3,7g) mostrou-se como o mais adequado. Assim, a eficácia de anticontaminantes por si só não deve ser um critério avaliado isoladamente, devendo os produtos além de serem efetivos no controle de microrganismos na dieta, também não prejudicar o desenvolvimento do inseto (ALVERSON; COHEN, 2002).

Durante a avaliação do experimento, observou-se nos tratamentos com lagartas infectadas pelo SfNPV, sintomas típicos dessa infecção, já descrito por Cruz (1995), em seu estudo com SfNPV no controle de *S. frugiperda.* Como, o amarelecimento e aparência oleosa da pele, a perda de mobilidade, a mudança de cor do tegumento, tornando-se mais escuro devido à desintegração dos tecidos internos. Além disso, as lagartas paravam de se alimentar e algumas dirigiam-se para a tampa acrílica dos copos, ficando dependuradas de cabeça para baixo, fixadas à tampa pelas patas traseiras. A partir desse ponto, quando eram tocadas, seu corpo se desintegrava. Já outras lagartas não apresentavam tais sintomas, o que pode nos levar a crer que eram lagartas intoxicadas pelo formol, como já discutido anteriormente, não sendo a ação do vírus a provocar a morte do inseto.

Outro aspecto observado, com os resultados obtidos, é que a dieta sem adição de anticontaminantes foi bastante satisfatória, já que tanto nos tratamentos com lagartas infectadas e em lagartas sadias, a curva de sobrevivência apontou que o tratamento controle não interferiu na ação do vírus e nem mesmo na sobrevivência das lagartas não infectadas. Isso pode ter uma explicação nos componentes da dieta utilizados, já que o ácido ascórbico apesar de ser fonte de vitamina C, também é um antioxidante que auxilia na ação antagônica de microrganismos e funciona como um fagoestimulante (ITO, 1961; KANAFI et al., 2007).

Algumas medidas podem ser preconizadas para evitar contaminações com patógenos em criações de insetos, dentre elas o uso de colônias iniciais isentas de doenças, quarentena para o material coletado no campo, planejamento do local de criação adequado, uso de práticas e instalações sanitárias adequadas e monitoramento da

qualidade do inseto (SOARES, 1992), podendo dessa maneira, reduzir a quantidade e concentração de anticontaminantes adicionados.

Sendo assim, o efeito que esses anticontaminantes causam sobre a ação do vírus no controle da lagarta, pode nos fornecer resultados equivocados. Isso pode interferir diretamente na obtenção de curvas de dose resposta do bioinseticida em estudo. O que também intervém na eficiência do produto aplicado no campo, visto que a concentração recomendada para a aplicação não controla a lagarta na cultura de interesse, da mesma forma que se controla no laboratório. Principalmente, pode causar efeito negativo na criação massal de lagartas, para produção de baculovírus para comercialização.

6. CONCLUSÃO

Para estudos de *S. frugiperda* com SfNPV utilizando dieta artificial, é recomendado que não seja adicionado o formol 10%, tanto em mistura com tetraciclina e/ou com Nipagin, como também de forma isolada.

Portanto, os anticontaminantes que podem ser utilizados, são tetraciclina em mistura com Nipagin, o que garante não só à ação do vírus sobre a lagarta, como também evita a contaminação do inseto por fungos e bactérias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVERSON, J.; COHEN, A. C. Effect of antifungal agents on biological fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). **Jounal Economy Entomologic**. p.256-60, 2002.

ALVES, S. B.; MOINO Jr., A. Manutenção de insetos livres de agentes patogênicos, p.799-814. In: Alves, S. B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: Past, Present, or Future? **Annu. Rev. Entomol**. Environmental Chemistry and Toxicology Laboratory, Department of Environmental Science, Policy and Management, University of California, Berkeley, California v.43, p.1–16, 1998.

CASTRO, M. E. B.; DE SOUZA, M. L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J. C. M. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa agropecuária brasileira,** Brasília, v. 34, n. 10, p. 1733-1761, 1999.

CRUZ, I**. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS. p. 45, 1995. (Embrapa-CNPMS. Circular técnica, 21).

CRUZ, I. Utilização do baculovírus no controle da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, cap. 8, p. 201-230. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Efeitos da Spodoptera frugiperda em diferentes estádios de crescimento da cultura do milho. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.17, n 3, p.355-359, 1982.

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H. Efeito da mistura Baculovirus e herbicida no controle da lagarta-do-cartucho, Spodoptera frugiperda. In: SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3, 1992, Águas de Lindóia. **Anais...** Jaguariuna: EMBRAPA-CNPDA, 1992. p. 269.

CRUZ, I.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. **Cultivo do milho: pragas da fase vegetativa e reprodutiva**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 49).

DUNKEL, F. V.; READ, R. N. Review of the effect of sorbic acid on insect survival in rearing diets with reference to other antimicrobials. **American Entomologist**, v. 37, p. 172 – 178, 1991.

EMBRAPA. **Notícias**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/23088635/inseticida-biologico-cartuchovit-chega-na-proxima-safra>. Acesso em: 10 out. 2017.

ENTWISTLE, P. F.; EVANS, H. F. Viral control. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. p.347-412. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology.** Oxford: Pergamon, v. 13, 1985.

FRANÇA, L. F. T.; SILVA, D. M.; MANTOVANI, M. A. M.; STECCA, S. C.; LEITE, N.; BUENO, A. F.; MOSCARDI, F. **Preferência de oviposição de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae) em diferentes plantas hospedeiras.** Jornada Acadêmica da Embrapa soja, n. 7, p. 115-118. Resumos expandidos. Londrina: Embrapa Soja, 2012. (Embrapa Soja. Documentos, 333).

GREENE, G. L.; LEEPLA, N. C.; DICKERSON W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium**. Journol. Economy Entomologic**, v. 69 p. 487-488, 1976.

HENSLEY, S.D.; HAMMOND, A. H. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. **Journol Economy Entomologic**. V. 61 p. 1742-1743, 1968

HRUSKA, A. J.; GOULD, F. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea lineolata* (Lepidoptera: Pyralidae): impact of larval population level and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 90, n. 2, p. 611- 622, 1997.

IARC, 2006. Disponível em www.monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-29.pdf. Acesso em: 15 de out. 2017.

ITO, T. Effects of dietary ascorbic acid on the silkworm *B. mori*. **Nature**, London, v.192, p.951-952, 1961.

JEHLE, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; CORY, J. S.; HERNIOU, E. A.; ROHRMANN, G. F.;VLAK, J. M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. **Archives of virology**, Austria, v. 151, n. 7, p. 1257-1266, 2006.

KANAFI, R. R.; EBADI, R.; MIRHOSSEINI, S. Z.; SEIDAVI, A. R.; ZOLFAGHARI, M.; ETEBARI, K. A review on nutritive effect of mulberry leaves enrichment with vitamins on economic traits and biological parameters of silkworm *Bombyx mori* L. **Invertebrate Survival Journal**, Modena, v.4, n. 2, p.86-91, 2007.

KUSS, C. C.; ROGGIA, R. C. R. K.; BASSO, C. J.; OLIVEIRA, M. C. N. de; PIAS, O. H. de C.; ROGGIA, S. Controle de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) em soja com inseticidas químicos e biológicos. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v. 51, n. 5, p. 527-536, 2016.

LACEY, L. A. **Manual of techniques in insect pathology**. Academic Press, 1 ed., 1997, 409 p.

LIMA, E. R. A. **Importância dos insetos.** Ação ambiental, Brasília, v.2, n.4, p.19-21, 1999.

LIMA, J. F. M.; GRÜTZMACHER, A. D.; CUNHA, U. S DA.; PORTO, M. P.; MARTINS, J. F. S.; DALMAZO, G. O. Ação de inseticidas naturais no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho cultivado em agroecossistema de várzea. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p. 607-613, 2008.

MANTEL, N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. **Cancer Chemotherapy Reports**, p. 163-170, 1966.

MOREIRA, S. C. da S. **Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de insetos.** 2017. 116 f. Dissertação. (Mestrado em Ecologia e Conservação da Biodiversidade) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2017.

NAUEN, R.; DENHOLM, I. Resistance of Insect Pests to Neonicotinoid Insecticides: Current Status and Future Prospects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, n. 58, p. 200–215, 2005.

PAIVA, P. M. **Ocorrência de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e parasitoides em milho Bt.** 2016. 41 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Agronômica) – Universidade Federal de São João Del Rei. Sete Lagoas, 2016.

PARRA, J. R. P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. In: PANIZZI, A. R., PARRA, J. R. P. (Eds.), p. 9-65. **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas.** Manole, São Paulo, 1991.

PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. 6 ed. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 2015.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B. Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatógenos no controle de *Spodoptera frugiperda*. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, n.74, p. 24-33, 2005.

SARMENTO, R. A.; AGUIAR, R. W. S.; AGUIAR, R. A. S. S.; VIEIRA, S. M. J.; OLIVEIRA, H. G.; HOLTZ. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, v.18, n.2, p.41-48, 2002.

SILVA, A. B.; BESERRA, E. B.; DANTAS, J. P. Utilização de *Metarhizium anisopliae* e extratos vegetais para o controle de *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea* (Lepdoptera: Noctuidae) em milho. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 5, n. 1, p. 077- 085, 2008.

SILVA, M. T. B. da. Associação de Baculovirus aniticarsia com subdosagens de inseticidas no controle de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818). **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 353-358, 1995.

SINGH, P.; HOUSE H. L. Antimicrobials: 'Safe' levels in a synthetic diet of an insect, *Agria affinis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 16, n. 9, p. 1769-1782, 1970.

SOARES Jr., G. G. Problems with entomopatogens in insects rearing. In: ANDERSON, T. E., LEPPA, N. C. (Ed). **Advances in insentc rearing for research & management.** Westview Press, Booulder, p. 289-322, 1992.

SOUSA, J. C. R. de. Análise de sobrevivência não paramétrica aplicada à pós-colheita - Mossoró, 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia: Área de concentração em Agricultura Tropical) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2010.

SUJII, E. R. et al. Controle biológico de insetos-praga na soja orgânica do distrito federal. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 19, n. 2, p.299-312, 2002.

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. de S. Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* com baculovírus. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, p. 14, 2009 (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 114).

WARE, G. W. Pesticides: chemical tools. In: SAUER, H. F. G. **The pesticides book.** 4 ed. Freson. Thompson, p. 19-56, 1994.

8. ANEXOS

Anexo 1 – Número de lagartas infectadas por SfNPV mortas por dia ao longo de 10 dias de avaliação e submetidas à 8 tratamentos.

	Número de lagartas mortas/dia									
Tratamentos com lagartas infectadas com SfNPV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1 - Tetraciclina + Nipagin + formol 10%	0	3	10	0	1	2	0	0	0	1
T2 - Tetraciclina + formol 10%	0	8	4	8	0	2	1	0	1	0
T3 - Nipagin + formol 10%	0	3	11	5	0	0	0	0	0	1
T4 - Tetraciclina + Nipagin	0	11	9	4	1	1	0	0	0	0
T5 - Nipagin	0	8	5	5	0	0	1	0	0	1
T6 - Tetraciclina	0	8	9	1	1	2	1	1	0	0
T7 – Formol 10%	0	7	12	2	0	3	1	1	1	0
T8 - Sem anticontaminantes	0	10	9	1	0	1	1	0	0	0

Anexo 2 – Número de lagartas sadias mortas por dia ao longo de 10 dias de avaliação e submetidas à 8 tratamentos.

	Número de lagartas mortas/dia									
Tratamentos com lagartas sadias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1 - Tetraciclina + Nipagin + formol 10%	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
T2 - Tetraciclina + formol 10%	0	0	0	0	0	4	3	2	2	0
T3 - Nipagin + formol 10%	0	0	1	1	1	2	0	0	1	0
T4 - Tetraciclina + Nipagin	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
T5 - Nipagin	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
T6 - Tetraciclina	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
T7 – Formol 10%	0	0	0	1	1	0	0	5	1	0
T8 - Sem anticontaminantes	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Anexo 3 – Mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* infectadas com SfNP, avaliada ao longo de 10 dias, submetidas à 8 tratamentos e classificada de acordo com a análise das curvas de sobrevivência, utilizando o teste de log-rank.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE LAGARTAS MORTAS	GRUPO LOG-RANK
T1 - Tetraciclina + Nipagin + formol 10%	17	a
T3 - Nipagin + formol	20	ab
T5 - Nipagin	20	abc
T8 - Sem anticontaminantes	22	cd
T6 - Tetraciclina	23	cd
T2 - Tetraciclina + formol	24	cd
T4 - Tetraciclina + Nipagin	26	d
T7 - Formol	27	d

* Letras diferentes denotam diferença estatística significativa ($p < 0,05$), obtidas pelos p-valores das curvas de sobrevivência.

Anexo 4 – Mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* sadias, avaliada ao longo de 10 dias, submetidas à 8 tratamentos e classificada de acordo com a análise das curvas de sobrevivência, utilizando o teste de log-rank.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE LAGARTAS MORTAS	GRUPO LOG-RANK
T5 - Nipagin	1	a
T8 - Sem anticontaminantes	1	a
T6 - Tetraciclina	3	a
T1 - Tetraciclina + Nipagin + formol 10%	4	ab
T4 - Tetraciclina + Nipagin	4	ab
T7 – Formol 10%	8	bc
T3 - Nipagin + formol 10%	6	bc
T2 - Tetraciclina + formol 10%	11	c

* Letras diferentes denotam diferença estatística significativa ($p < 0,05$), obtidas pelos p-valores das curvas de sobrevivência.