

Universidade Federal da Grande Dourados  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais  
Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na  
dieta artificial para criação de insetos

Suélen Cristina da Silva Moreira

Dourados-MS  
Março - 2017

Universidade Federal da Grande Dourados  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais  
Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Suélen Cristina da Silva Moreira

Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na  
dieta artificial para criação de insetos

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE.

Área de Concentração: Entomologia

Orientador: Dr. Harley Nonato de Oliveira  
Co-orientador: Dr Crébio José Ávila

Dourados - MS  
Março - 2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

M827a	<p>Moreira, Suélen Cristina da Silva. Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de insetos. / Suélen Cristina da Silva Moreira. – Dourados, MS : UFGD, 2017. 116f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Harley Nonato de Oliveira. Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Criação massal. 2. Tabela de vida. 3. Características biológicas. I. Título.</p>
-------	--

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**

**“ANTICONTAMINANTES ALTERNATIVOS COMO SUBSTITUTOS AO  
FORMALDEÍDO NA DIETA ARTIFICIAL PARA CRIAÇÃO DE INSETOS”**

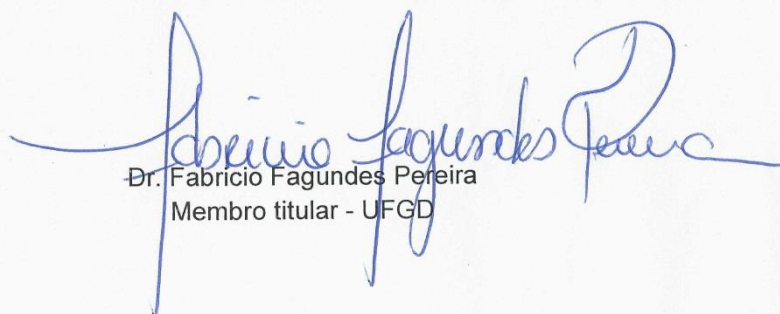
Por

**Suélen Cristina da Silva Moreira**

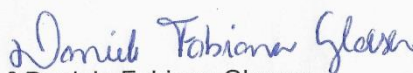
Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),  
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de  
**MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE**  
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação



Dr. Harley Nonato de Oliveira  
Orientador/Presidente - Embrapa



Dr. Fabricio Fagundes Pereira  
Membro titular - UFGD



Dr.ª Daniele Fabiana Glaeser  
Membro titular

Aprovada em: 30 de março de 2017

## **BIOGRAFIA DO ACADÊMICO**

Suélen Cristina da Silva Moreira, natural de Ivinhema-MS, nascida no dia 13 de abril de 1990, filha de Eurides Moreira dos Santos e Sueli Regina Alves da Silva Moreira.

Cursou o ensino fundamental na escola Municipal Professor João de Lima Paes, parte do ensino médio na escola Estadual Nair Palácio de Souza, concluindo o mesmo na escola Estadual Austrílio Capilé Castro.

Bacharela em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados (2009-2014),  
Mestra em Entomologia e conservação da Biodiversidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me dar forças nos momentos difíceis e saúde para prosseguir nessa jornada.

À minha família, em especial aos meus pais Eurides e Sueli, pela minha educação e pelo esforço que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu Orientador Dr. Harley Nonato de Oliveira pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Ao meu Co-orientador Dr. Crébio José Ávila pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados, juntamente com os professores, funcionários e alunos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsa de mestrado.

À Embrapa Agropecuária Oeste pelo apoio na condução dos experimentos, bem como aos colegas: Daniele Fabiana Glaeser, Denner Manthay Potin, Geicielle Karina Gomes, Priscila Laranjeira Rôdas e Vinícios Nunes da Silva, que trabalharam no laboratório de entomologia da Embrapa e prestaram grande auxílio para que esse trabalho fosse realizado.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos bichinhos que fizeram parte dos experimentos.

Muito Obrigada!!!!

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais*

*Eurides Moreira dos Santos e Sueli Regina Alves da Silva Moreira.*

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
<b>RESUMO GERAL</b> .....	11
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	12
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
Criação de insetos com ênfase em dietas artificiais para lepidópteros .....	15
Controle biológico de <i>Diatraea saccharalis</i> na cultura da cana-de-açúcar com os parasitoides <i>Trichogramma galloi</i> e <i>Cotesia flavipes</i> .....	18
<i>Helicoverpa armigera</i> .....	23
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25
<b>CAPÍTULO 1 - Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae)</b> .....	31
<b>ABSTRACT</b> .....	32
<b>RESUMO</b> .....	33
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	34
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
Criação de <i>D. saccharalis</i> .....	35
Preparo da dieta artificial de <i>D. saccharalis</i> .....	35
Avaliação de anticontaminantes na dieta artificial de <i>D. saccharalis</i> .....	38
Tabela de vida de fertilidade de <i>D. saccharalis</i> .....	39
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
Efeito de anticontaminantes na dieta artificial da primeira geração de <i>D. saccharalis</i> .....	40
Efeito de anticontaminantes na dieta artificial da segunda geração de <i>D. saccharalis</i> .....	47
Tabela de vida de fertilidade da primeira geração de <i>D. saccharalis</i> .....	53
Tabela de vida de fertilidade da segunda geração de <i>D. saccharalis</i> .....	55
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	56



<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
<b>CAPÍTULO 2- Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)</b> .....	61
<b>ABSTRACT</b> .....	62
<b>RESUMO</b> .....	63
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	64
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	65
Criação de <i>H. armigera</i> .....	65
Preparo da dieta artificial de <i>H. armigera</i> .....	66
Avaliação de anticontaminantes na dieta artificial de <i>H. armigera</i> .....	68
Tabela de vida de fertilidade de <i>H. armigera</i> .....	70
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	70
Efeito de anticontaminantes na dieta artificial de <i>H. armigera</i> .....	70
Tabela de vida de fertilidade de <i>H. armigera</i> .....	76
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	78
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	79

<b>CAPÍTULO 3 - Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabricius) (Lepidoptera: Crabidae) visando a multiplicação dos parasitoides <i>Trichogramma galloi</i> Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e <i>Cotesia flavipes</i> (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)</b> .....	81
<b>ABSTRACT</b> .....	82
<b>RESUMO</b> .....	83
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	84
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	85
Criação de <i>D. saccharalis</i> .....	85
Criação de <i>T. galloi</i> .....	86
Criação de <i>C. flavipes</i> .....	86
Preparo da dieta artificial de <i>D. saccharalis</i> .....	86

Avaliação de anticontaminantes na dieta artificial para criação de <i>D. saccharalis</i> sobre o parasitoide <i>T. galloi</i> .....	89
Avaliação de anticontaminantes na dieta artificial para criação de <i>D. saccharalis</i> sobre o parasitoide <i>C. flavipes</i> .....	90
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	91
Efeito de anticontaminantes na dieta artificial para criação de <i>D. saccharalis</i> sobre o parasitoide <i>T. galloi</i> .....	91
Efeito de anticontaminantes na dieta artificial para criação de <i>D. saccharalis</i> sobre o parasitoide <i>C. flavipes</i> .....	94
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	100
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	100
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	101
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	102

## LISTA DE TABELAS

**CAPÍTULO 1** - Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae)

Tabela	Página
1	Componentes (g ou mL/dieta) das dietas utilizadas na avaliação do desenvolvimento de <i>D. saccharalis</i> contendo diferentes anticontaminantes .....37
2	Duração (dias) das diferentes fases de desenvolvimento e viabilidade (%) de ovo, de lagarta e de pupa de <i>D. saccharalis</i> quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....42
3	Peso (g) de pupas de <i>D. saccharalis</i> (macho e fêmea), quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....44
4	Longevidade (dias) de adultos de <i>D. saccharalis</i> (machos e fêmeas) quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....45
5	Duração (dias) dos períodos de pré-oviposição, oviposição, pós-oviposição, fecundidade diária e total dos adultos fêmeas de <i>D. saccharalis</i> quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas.....46
6	Duração (dias) das diferentes fases de desenvolvimento e viabilidade (%) de ovo, de lagarta e de pupa da segunda geração de <i>D. saccharalis</i> quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....48

7	Peso de pupas (g) da segunda geração de <i>D. saccharalis</i> (macho e fêmea), quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....49
8	Longevidade (dias) de adultos da segunda geração de <i>D. saccharalis</i> (macho e fêmea) quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 hoas.....50
9	Duração (dias) do período de pré-oviposição, oviposição, pós-oviposição, fecundidade diária e total de adultos fêmeas da segunda geração de <i>D. saccharalis</i> quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....51
10	Taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ), capacidade inata de aumentar em número ( $r_m$ ), razão finita de aumento ( $\lambda$ ), tempo entre cada geração (T) e tempo de duplicação da população (TD) da primeira geração de <i>D. saccharalis</i> quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....54
11	Taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ), capacidade inata de aumentar em número ( $r_m$ ), razão finita de aumento ( $\lambda$ ), tempo entre cada geração (T) e tempo de duplicação da população (TD) da segunda geração de <i>D. saccharalis</i> quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....55

**CAPÍTULO 2** - Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

Tabela	Página
1	Componentes (g ou mL/dieta) das dietas utilizadas na avaliação do desenvolvimento de <i>H. armigera</i> contendo diferentes anticontaminantes.....67
2	Duração (dias) e das diferentes fases de desenvolvimento e viabilidade (%) de ovo, de lagarta e de pupas de <i>H.armigera</i> quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....72
3	Peso (g) de pupas de <i>H.armigera</i> (macho e fêmea) quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas.....74
4	Longevidade (dias) de adultos de <i>H. armigera</i> (macho e fêmea) quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....76
5	Duração (dias) do período de pré-oviposição, oviposição, pós-oviposição, fecundidade diária e total de adultos fêmeas de <i>H. armigera</i> quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....77
6	Taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ), capacidade inata de aumentar em número ( $rm$ ), razão finita de aumento ( $\lambda$ ), tempo entre cada geração ( $T$ ) e tempo de duplicação da população ( $TD$ ) de <i>H. armigera</i> quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....78

**CAPÍTULO 3** - Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) visando a multiplicação dos parasitoides *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)

Tabela	Página
1	Componentes (g ou mL/dieta) das dietas utilizadas para criação de <i>D. saccharalis</i> contendo diferentes anticontaminantes. ....88
2	Parasitismo (%), emergência (%), progênie, razão sexual e longevidade de <i>T. galloi</i> quando criados em ovos de <i>D. saccharalis</i> provenientes de dieta artificial com diferentes anticontaminantes ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....93
3	Estimativa de parasitismo, emergência, progênie e número de parasitoites fêmeas de <i>T. galloi</i> provenientes de cada 100 ovos de <i>D. saccharalis</i> criadas em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas.....94
4	Parasitismo (%), emergência (%), progênie, razão sexual e longevidade de <i>C. flavipes</i> sobre lagartas de <i>D. saccharalis</i> quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes ( $X \pm EP$ ). Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas.....96
5	Estimativa de parasitismo, emergência, progênie e número de parasitoites fêmeas de <i>C. flavipes</i> provenientes de cada 100 lagartas de <i>D. saccharalis</i> criadas em dieta artificial com diferentes anticontaminantes anticontaminantes. Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas.....98

## LISTA DE FIGURAS

**CAPÍTULO 2** - Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

Figura	Página
1	Contaminação nos tubos de dieta de <i>H. armigera</i> contendo diferentes anticontaminantes. Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....71

**CAPÍTULO 3** - Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crabidae) visando a multiplicação dos parasitoides *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)

Figura	Página
1	Fêmeas de <i>T. galloi</i> que parasitaram ovos de <i>D. saccharalis</i> quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura $25 \pm 1$ °C, UR de $70 \pm 10$ % e fotoperíodo de 12 horas .....91

**ANEXOS** .....106

## ANTICONTAMINANTES ALTERNATIVOS COMO SUBSTITUTOS AO FORMALDEÍDO NA DIETA ARTIFICIAL PARA A CRIAÇÃO DE INSETOS

RESUMO GERAL - O formaldeído tem sido amplamente utilizado como anticontaminante em dietas artificiais para criação de insetos, todavia, essa substância apresenta alta toxicidade. Objetivou-se com esse trabalho avaliar a eficiência dos produtos anticontaminantes: AAS (ácido acetilsalicílico) (1g e 2g/dieta), ácido sórbico (1,85g e 3,7g/dieta) e ácido benzóico (1,85g e 3,7g/dieta), além do padrão formaldeído (1,7 mL/dieta) e uma testemunha em substituição ao uso do formaldeído na dieta artificial para a criação de *Diatraea saccharalis* e verificar se há efeito nas suas características biológicas. Os produtos alternativos em substituição ao formaldeído também foram testados na dieta artificial para criação de *Helicoverpa armigera* verificando os efeitos nas suas características biológicas. Ovos e lagartas de *D. saccharalis* foram submetidos ao parasitismo objetivando avaliar o efeito dos anticontaminantes alternativos utilizados em sua dieta nas características biológicas de *Trichogramma galloi* e *Cotesia flavipes*. Lagartas de *D. saccharalis* foram alimentadas com dietas contendo diferentes anticontaminantes, sendo avaliados a contaminação no interior de tubos de criação, e várias características biológicas das diferentes fases de seu desenvolvimento. A mesma metodologia foi realizada para os testes com *H. armigera*. Após a reprodução de *D. saccharalis* criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes ovos e lagartas foram expostos às fêmeas de *T. galloi* e *C. flavipes* para avaliação de parasitismo, emergência, progênie, razão sexual, longevidade e duração do ciclo (ovo-adulto). Os produtos testados podem substituir o formaldeído na dieta artificial de criação de *D. saccharalis*, todavia, considera-se o ácido acetilsalicílico na menor dose testada (1g/dieta) como o mais adequado por ser esse produto de fácil acesso e baixo custo. As maiores doses/concentrações dos produtos testados podem substituir o formaldeído na dieta artificial de *H. armigera* por assegurarem maior eficácia no controle de microorganismos. No entanto, considera-se o ácido benzoico na maior concentração testada (3,7g) como o mais adequado. O uso dos anticontaminantes alternativos ao formaldeído na dieta artificial para criação de *D. saccharalis* é viável para produção dos parasitoides *T. galloi* e *C. flavipes*.

PALAVRAS-CHAVE: Criação massal, tabela de vida, características biológicas.



## ALTERNATIVE ANTICONTAMINANTS AS SUBSTITUTES OF FORMALDEHYDE IN THE ARTIFICIAL DIET FOR REARING INSECTS

GENERAL ABSTRACT – Formaldehyde has been widely used as an anticontaminant in artificial diets for insect breeding; however, this substance has high toxicity. The objective of this work was to evaluate the efficiency of anticontaminant products: AAS (acetylsalicylic acid) (1g and 2g/diet), sorbic acid (1,85g and 3.7g/diet) and benzoic acid (1,85g and 3,7g/diet), in addition to the standard formaldehyde (1,7mL/diet) and a control to replace the use of formaldehyde in the artificial diet for the creation of *Diatraea saccharalis* and to verify if there is effect in their biological characteristics. Alternative products replacing formaldehyde and the same doses/concentrations were also tested in the artificial diet for the creation of *Helicoverpa armigera* by verifying the effects on their biological characteristics. Eggs and caterpillars of *D. saccharalis* were submitted to parasitism in order to evaluate the effect of the alternative anticontaminants used in their diet on the biological characteristics of *Trichogramma galloi* and *Cotesia flavipes*. *D. saccharalis* caterpillars were fed diets containing different contaminants, being evaluated the contamination inside breeding tubes, and several biological characteristics of the different phases of their development. The same methodology was used for the tests with *H. armigera*. After reproducing *D. saccharalis* on artificial diet with different anticontaminants eggs and caterpillars were exposed to *T. galloi* and *C. flavipes* females for evaluation of parasitism, emergence, progeny, sex ratio, longevity and cycle length (egg-adult). The products tested may replace formaldehyde in the artificial diet of *D. saccharalis*, however, acetylsalicylic acid is considered the lowest dose tested (1g / diet) as the most adequate since this product is easily accessible and inexpensive. The higher doses / concentrations of the products tested may replace formaldehyde in the artificial diet of *H. armigera* because they ensure greater efficiency in the control of microorganisms. However, benzoic acid at the highest tested concentration (3.7 g) is considered to be the most suitable. The use of alternative antioxidants to formaldehyde in the artificial diet for the creation of *D. saccharalis* is feasible for the production of the parasitoids *T. galloi* and *C. flavipes*.

KEY-WORDS: Mass rearing, life table, biological characteristics.

## INTRODUÇÃO GERAL

O Controle biológico de insetos consiste na ação de predadores, parasitoides e patógenos, que interagem com as populações de suas presas ou hospedeiros. Os dois primeiros grupos são referidos como entomófagos, enquanto que o terceiro é chamado de entomopatígeno (Costa et al., 2006). No entanto, o equilíbrio entre essas populações pode ser desfeito devido às ações do homem para produzir grandes quantidades de alimento ou bens de consumo. Isso pode ser comprovado pelo uso indiscriminado de inseticidas (Parra & Zucchi, 1997).

O controle biológico aplicado é um importante componente do Manejo Integrado de Pragas, que considera aspectos ecológicos, econômicos, toxicológicos e sociais para a tomada de decisão de controle (Gravena, 1992). Trata-se de liberações inundativas de predadores e parasitoides, após a criação massal em laboratório, visando controlar rapidamente a população da praga e retomada do seu nível de equilíbrio, sendo esse tipo de controle bem aceito pelo usuário, pois tem um tipo de ação rápida, muito semelhante à de inseticidas convencionais (Parra, 2002).

Essa tática de manejo ganhou aceitação a partir da década de 70, com o desenvolvimento de técnicas de criações de insetos que evoluiu a partir do desenvolvimento de dietas artificiais, ou seja, alimentos fornecidos pelo homem na tentativa de substituir o alimento natural por outro conveniente sob o ponto de vista técnico e econômico (Parra, 2015).

O desenvolvimento de dietas artificiais proporcionaram avanços para as pesquisas relacionadas à Entomologia, já que desta forma, os trabalhos podem ser realizados continuamente e não dependem de ocorrência natural do inseto objeto de estudo (Parra, 2015).

Nos últimos 50 anos, o desenvolvimento de técnicas de criação de insetos, em dieta artificial, permitiu grande avanço no manejo de pragas, com a implementação de programas de criação massal para estudos de controle (Nava et al., 2008).

Para diminuir os danos causados pela *D. saccharalis* na cultura da cana de açúcar, um dos métodos de controle mais utilizado é o biológico, o qual é normalmente realizado com o parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) e com o parasitoide de ovos *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Braconidae) (Parra, 1992; Pinto et al., 2006), sendo necessária para isso, a criação

massal desses parasitoides em condições de laboratório (Parra, 2002). Para a criação massal desses inimigos naturais é também necessária a criação de lagartas de *D. saccharalis*

A manutenção de colônias de inseto é imprescindível para o desenvolvimento de estratégias efetivas de controle de pragas (Parra, 2015). Para a tomada de decisão no controle de *H. armigera*, por exemplo, informações sobre a bioecologia podem servir de auxílio no seu manejo para mantê-la abaixo do nível de dano econômico (Razmjou & Naseri, 2014), já que as lagartas de *H. armigera* podem também causar grandes prejuízos em diversas culturas de importância econômica (Ávila et al., 2013).

As dietas artificiais devem conter todos os nutrientes exigidos pelo inseto em proporções balanceadas para obtenção de crescimento e desenvolvimento ótimos, como por exemplo, proteínas, vitaminas, sais minerais, carboidratos, lípidos, esteróis e agentes fagoestimulantes. Além disso, as dietas devem conter agentes anticontaminantes como antibióticos e antifúngicos, entretanto tais anticontaminantes devem ser estudados antes de serem acrescentados na dieta, pois podem apresentar efeitos deletérios na população de insetos, dependendo da concentração utilizada (Parra & Zucchi, 1997).

O formaldeído tem sido amplamente utilizado como anticontaminante em dietas artificiais para criação de insetos (Hensley & Hammond 1968), todavia, essa substância apresenta alta toxicidade, quando manipulada inadequadamente, podendo causar problemas à saúde humana, como irritação das vias respiratórias, sensibilidade imunológica imediata, mutagênese e até mesmo carcinogênese (Nicon, 2017), sendo o risco do formol em sua aplicação indevida maior, quanto maior a concentração e frequência do uso (Anvisa, 2017).

Com a finalidade de restringir o acesso da população ao formaldeído a sua comercialização foi proibida em estabelecimentos como drogarias, farmácias, supermercados, empórios e lojas de conveniência. (Anvisa, 2017).

Assim, há necessidade de buscar produtos alternativos ao uso de formaldeído livre de risco à saúde humana e avaliar a sua eficácia, bem como seu efeito nos parâmetros biológicos dos insetos. Objetivou-se com esse trabalho avaliar a eficiência dos produtos: ácido acetilsalicílico, ácido sórbico e ácido benzoico em substituição ao uso do formaldeído na dieta artificial para a criação de *D. saccharalis* e verificar se há efeito nas suas características biológicas. Os produtos alternativos em substituição ao formaldeído também foram testados na dieta artificial para criação de *H. armigera* verificando os efeitos nas suas características biológicas. Ovos e lagartas de *D.*

*saccharalis* foram submetidos ao parasitismo objetivando avaliar o efeito dos anticontaminantes alternativos utilizados em sua dieta nas características biológicas de *T. galloi* e *C. flavipes*.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Criação de insetos com ênfase em dietas artificiais para lepidópteros**

Grandes progressos na história da Entomologia foram obtidos com o sucesso de cientistas ao conseguirem criar um número quase ilimitado de insetos a baixo custo, sendo o tema criação de insetos de grande relevância, já que esse assunto se tornou imprescindível na ciência entomológica moderna (Singh & Moore, 1985).

Os grandes avanços nas técnicas de criação de insetos surgiram a partir da década de 1960 especialmente nos países desenvolvidos, no Brasil o primeiro inseto fitófago a ser criado em dieta artificial foi à broca-da-cana-de-açúcar, por meio da dieta artificial desenvolvida por Hensley e Hammond, (1968), em um programa visando seu controle.

Muitas dietas foram desenvolvidas também para criação de parasitoides e predadores, no entanto 85% delas foram desenvolvidas para os insetos fitófagos, pertencentes às ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, sendo referidas dietas artificiais para mais de 1.300 espécies de insetos (Parra, 1991).

Entre os insetos com maior sucesso de criação em dieta artificial, destacam-se os da ordem Lepidoptera com 40% do total dos grupos taxonômicos criados. As famílias Noctuidae e Tortricidae estão entre as que apresentam maior número de dietas para criação (Nava et al., 2008).

Na agricultura brasileira, os lepidópteros constituem a ordem de insetos com maior número de espécies nocivas, cuja fase larval pode danificar todas as partes das plantas cultivadas, dentre elas encontram-se representantes das famílias Crambidae, Noctuidae, Cosmopterigidae, Pyralidae, Saturnidae e Arctiidae (Nava et al., 2008).

Para estabelecimento de estratégias de controle de pragas é imprescindível o estudo da bioecologia das espécies entre outros aspectos. Nos últimos 50 anos, o desenvolvimento de técnicas de criação de insetos, em dieta artificial, permitiu grande avanço no manejo de pragas, com a implementação de programas de criação massal para estudos de controle (Nava et al., 2008).

As técnicas de criações de insetos tornaram possíveis não somente a realização de pesquisas aplicadas, como também daquelas básicas, que exigem suprimento contínuo de insetos para realização das mesmas (Parra, 1991). As vantagens da criação artificial vão desde a redução na mão-de-obra para a criação de insetos, até a conveniência econômica na sua produção (Parra, 1991).

Importantes estudos sobre as exigências nutricionais dos insetos são realizados com dietas artificiais devido à impossibilidade de controlar a composição química de seus hospedeiros naturais, mesmo com os avanços da biotecnologia (Rosseto, 1980).

Uma dieta nutricionalmente completa deve conter todos, ou pelo menos a maioria, dos elementos necessários ao desenvolvimento do inseto, tais como: proteínas ou aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, sais minerais, carboidratos, lipídeos, esteróis e agentes fagoestimulantes, os quais devem ser adequadamente balanceados (Smith, 1996).

Embora vantagens tenham sido alcançadas, em decorrência do desenvolvimento de técnicas sofisticadas de criação de insetos, problemas relacionados à contaminação e controle de qualidade podem surgir (Smith, 1996) tornando necessária a utilização de anticontaminantes para controlar leveduras, fungos, bactérias, vírus, protozoários, etc., e se não eliminados podem dizimar populações de insetos em laboratórios devido ao fato de serem facilmente dispersados nesse tipo de ambiente (Parra, 2015).

As dietas semilíquidas utilizadas para criação de insetos fitófagos mastigadores são facilmente contaminadas por microorganismos se não forem tomadas as devidas medidas preventivas, elas são as mais comumente utilizadas em programas de Controle Biológico (Parra, 2015).

Os agentes químicos anticontaminantes mais utilizados no meio artificial de criação de insetos são: formaldeído de 0,03 a 0,3%; metilparahidroxibenzoato (nipagin), de 0,04% a 2%, butil e propilparahidroxibenzoato, hipoclorito de sódio, 0,01%, 0,2% e 1%, ácido propiônico, benzoato de sódio, ácido benzóico, sorbato de potássio, ácido sórbico, de 0,005% a 0,15%, estreptomicina penicilina e aureomicina (Parra, 2015). Sendo esses produtos agentes fungistáticos, antibacterianos e antioxidantes (Parra, 1991).

A eficácia de anticontaminantes por si só não deve ser um critério avaliado isoladamente, devendo os produtos além de ser efetivo no controle de microorganismos na dieta, também não prejudicar o desenvolvimento do inseto (Alverson & Cohen, 2002).

A ação de alguns antimicrobianos no desenvolvimento do inseto pode ser fortemente influenciada pelo pH da dieta. Nos lepidópteros, algumas espécies sensíveis a altas doses de anticontaminantes que interferem na acidez da dieta foram encontradas nas seguintes famílias: Galleriidae, Gelechiidae e Pyralidae (Dunkel & Read, 1991).

A contaminação microbiana foi controlada pelo ácido sórbico e seus sais em 42 dietas, por formaldeído em 18 dietas e por benzoato de sódio em 6 dietas. No entanto, poucos foram os estudos publicados sobre os efeitos negativos desses agentes sobre o desenvolvimento dos insetos, sendo o ácido sórbico o mais estudado (Dunkel & Read, 1991).

Sigh & House, (1970) testaram 21 compostos com atividades antimicrobianas a fim de detectar níveis de concentração seguros, dentre eles formaldeído, sorbato de potássio e benzoato de sódio em dieta artificial e observou que cada composto exerce efeitos prejudiciais de acordo com a concentração utilizada. Estes efeitos incluem o prolongamento do período larval, a inibição do desenvolvimento e aumento da mortalidade nas fases larval e pupal.

Os ácidos lipofílicos, incluindo neste grupo os ácidos sórbico e benzoico, atuam sobre os fungos afetando negativamente o tráfego de moléculas através da membrana citoplasmática, poucos estudos foram realizados para investigar como tal potencial pode prejudicar o desenvolvimento dos insetos (Alverson & Cohen, 2002).

Bass & Barnes, (1969) enfatizaram em seus estudos a elevada importância de se determinar toxicidade de um agente antimicrobiano na criação de uma determinada espécie de inseto antes de adicioná-lo à dieta.

Alguns aspectos devem ser levados em consideração no momento da escolha do anticontaminante a ser adicionado como, a dose utilizada, a umidade da dieta, o pH e formulação do produto utilizado, estágio de exposição do inseto, e seus efeitos no crescimento, na geração de estudo e na geração subsequente (Parra, 2015).

Para muitos compostos considerados anticontaminantes, os efeitos prejudiciais sobre os insetos criados em dieta artificiais são ainda considerados desconhecidos (Dunkel & Read, 1991). Além disso, cada composto exerce efeitos prejudiciais diferenciados sobre os insetos como prolongamento do período larval, inibição do desenvolvimento e aumento da mortalidade nas fases larval e pupal, de acordo com a concentração utilizada (Sigh & House, 1970).

Dependendo do tipo de contaminação observada em dietas artificiais, uma série de sintomas podem se manifestar nos insetos, como uma resposta comportamental. Os

fungos tornam as larvas mais lentas, ocorre à diminuição do crescimento, mudanças na coloração do inseto, células com levedura na hemolinfa, tendência à mumificação e esporulação na superfície do tegumento (Soares, 1992).

No caso de contaminação por bactérias o desenvolvimento também é prejudicado, os movimentos tornam-se lentos, as larvas contaminadas podem apresentar disenteria e a coloração mais escura e corpo flácido. Os vírus cessam à alimentação de larvas de lepidópteros, ocorre à liquefação da larva morta infectada e paralisia, além de mudanças na sua coloração (Soares, 1992).

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 e monitoramento da qualidade do inseto (Soares, 1992).

Para ser considerada adequada uma dieta artificial ideal é aquela que proporciona alta viabilidade na fase larval, produza insetos com duração da fase larval semelhante a que ocorre na natureza, origine adultos com alta capacidade reprodutiva, servindo em alguns casos para mais de uma espécie e tenha em sua composição componentes de baixo custo (Parra, 2009). Segundo as recomendações de Parra, (2015) uma dieta artificial pode ser considerada adequada quando propiciar uma viabilidade total igual ou superior a 75%.

Portanto para avaliação de uma dieta artificial para criação de insetos vários critérios tais como, morfológicos, biométricos, nutricionais e tabela de vida devem ser estudados (Parra, 2009).

### **Controle biológico de *Diatraea saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar com os parasitoides *Trichogramma galloi* e *Cotesia flavipes***

A cultura da cana-de-açúcar é uma importante alternativa para o setor de bio combustíveis. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma área de 8,7 milhões de hectares plantada durante a safra 2015/16. A produtividade estimada para a atual temporada da safra 2016/17 é de 76.313 kg/ha. Mato Grosso do Sul ocupa a quinta posição entre os estados brasileiros ficando atrás de São Paulo, o maior produtor, seguido por Goiás, Minas Gerais e Paraná (Conab, 2016).

Um dos maiores problemas fitossanitários encontrados na cultura da cana-de-açúcar é sua suscetibilidade a infestação da broca-da-cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) (Silva et al., 2012) considerada principal praga dessa cultura, podendo causar grandes prejuízos econômicos (Gallo et al., 2002).

Os adultos de *D. saccharalis* apresentam coloração amarelo-palha, com manchas escuras nas asas anteriores, enquanto as posteriores são esbranquiçadas. Já as fêmeas possuem asas menos pigmentadas, e os machos são um pouco menores, sendo mais escuros que as fêmeas. A oviposição é feita nas folhas verdes da planta, sendo que os ovos ficam agrupados de maneira imbricada. As lagartas recém-eclodidas somente raspam as folhas, aproximadamente duas semanas após a eclosão dos ovos, elas passam então a perfurar o colmo e nele penetram, construindo galerias verticais, que podem cobrir toda a sua extensão. As lagartas são branco-amareladas, com a cápsula cefálica marrom escura, possuem manchas marrons dispostas em linha ao longo do dorso, antes de empuparem abrem orifícios por onde saem os adultos, a pupa é de cor marrom-clara, e escurece à medida que se aproxima do estágio adulto (Gallo et al., 2002). A fêmea pode depositar em média 780 ovos (Parra & Mihsfeldt, 1992).

As lagartas de *D. saccharalis* podem causar danos diretos e indiretos, no caso dos danos diretos podem levar a perda de peso devido à abertura de galerias nos colmos, falhas na germinação, tombamento de plantas, encurtamento do entrenó, enraizamento aéreo e morte das gemas apicais. Enquanto os danos indiretos são causados pela ação de microorganismos oportunistas, como os fungos *Fusarium moniliforme* e *Colletotricum falcatum*, responsáveis pela podridão vermelha, prejudicando o processo de produção de açúcar e álcool pela inversão da sacarose em glicose. Esse inseto pode estar presente em todas as fases fenológicas da cultura da cana-de-açúcar (Gallo et al., 2002, Botelho & Macedo, 2002). Os danos ocorrem em menor incidência quando a cana é jovem e aumentam consideravelmente à medida que a planta se desenvolve (Silva et al., 2012).

Diante da crescente conscientização de preservar os recursos naturais e evitar os desequilíbrios ambientais no controle de pragas, o controle biológico natural e de maneira mais expressiva o aplicado, são importantes.

O controle biológico, se utilizado adequadamente, apresenta inúmeras vantagens, tais como especificidade em relação às espécies-alvo de insetos e menor risco de impacto ambiental, já que não contamina o solo, as águas superficiais e



subterrâneas (Oliveira & Ávila, 2010), além de não oferecer risco à saúde humana (Oliveira et al., 2012).

O Brasil conta com um dos maiores programas de Controle biológico do mundo especificamente para a cultura da cana-de-açúcar, com metade da área plantada submetida ao controle biológico aplicado (Parra, 2015), sendo essa tática considerada uma das formas mais eficiente de controle de *D. saccharalis* devido à grande diversidade de parasitoides e predadores que atuam sobre as fases de larva e de ovo deste inseto-praga (Pinto et al., 2006).

A ineficiência do controle químico de *D. saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar se deve principalmente devido a hábito de a lagarta manter-se protegida no interior do colmo, além disso, esse método tem um custo oneroso devido ao porte da cultura (Conceição & Silva, 2011).

Os trabalhos para controle de *D. saccharalis* tiveram início em 1973, objetivando conhecer seus hábitos, sua biologia e seus inimigos naturais (Botelho, 1992). O responsável pela introdução do Controle biológico de pragas-da-cana-de-açúcar no Brasil, foi o Dr. Domingos Gallo, chefe do Departamento de Entomologia da Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), em uma tentativa de multiplicar taquinídeos sobre *D. saccharalis* visando seu controle, e os liberou em grandes áreas plantadas com cana-de-açúcar (Parra, 2015), no entanto, como os resultados com essas espécies não surtiram os efeitos desejados, gradativamente houve uma mudança na utilização desses insetos e concomitantemente procurou-se estudar outros agentes de controle de *D. saccharalis* (Botelho, 1992).

Embora o Brasil conte com excelentes programas de controle de pragas, principalmente no que diz respeito à cultura da cana-de-açúcar, os entraves são caracterizados pelas extensas áreas de monocultura, que dificulta a aceitação do agricultor, quando falamos em termos de monitoramento e liberação (Parra, 2015).

Dentre os casos de sucesso do controle biológico aplicado de *D. saccharalis* no Brasil e no mundo, destaca-se a utilização de *Trichogramma* spp (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) (Parra 1992, Pinto et al., 2006).

Os insetos do gênero *Trichogramma* são os mais comumente utilizados em todo o mundo (Parra & Zucchi, 1997). As pesquisas com esses parasitoides tiveram início a partir do ano de 1986, nesse momento vislumbrou-se boas perspectivas de uso desse parasitóide devido ao fato de atacar a praga no estágio de ovo, considerado o fator

chave do crescimento populacional da broca-da-cana-de-açúcar (Botelho, 1992), prevenindo a ocorrência de injúrias (Pinto et al., 2006).

As espécies do gênero *Trichogramma* pertencem à superfamília Chalcidoidea e distinguem-se de qualquer outra pelo número de tarsos trímeros, são endoparasitoides primários, holometábolos, solitários ou gregários, de tamanho diminuto com comprimento variando de 0,2 a 1,5 mm, corpo compacto de coloração não metálica (Parra & Zucchi, 1997).

As fêmeas de *T. galloi* depositam seus ovos no interior dos ovos hospedeiros e após a eclosão, as larvas passam a se alimentar do vitelo e ou do embrião, passam pelas fases de pré-pupa, pupa até a eclosão dos adultos parasitoides, sendo possível identificar ovos parasitados daqueles não parasitados, pois em decorrência do desenvolvimento do parasitoide os ovos do hospedeiro tornam-se escurecidos, devido à deposição de grânulos de urato próximos da superfície do córion (Grenier, 1997; Cònsoli et al., 1999). Esses parasitoides atacam inúmeras espécies da Ordem Lepidoptera, e vem sendo utilizado para controlar diferentes pragas em diversas culturas (Hassan, 1997), através de liberações inundativas (Smith, 1996).

*Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é o parasitoide de ovos de *D. saccharalis* mais estudado, são liberados 200.000 parasitoides por hectares, as liberações devem ser realizadas no momento em que aparecerem os primeiros ovos de *D. saccharalis* em intervalos semanais num total de três liberações (Lopes, 1988; Botelho 1999).

Liberações de *T. galloi* realizadas por três semanas consecutivas, em áreas infestadas com ovos de *D. saccharalis*, podem proporcionar níveis elevados de parasitismo, quando liberados cerca de 150.000 e 175.000 parasitoides/ha (Broglioni-Micheletti et al., 2007).

Esse parasitoide ocorre naturalmente nos canaviais do nosso país, todavia estudos com *T. galloi* relataram índices de parasitismo superior a 90% após as liberações (Pinto et al. 2006), e o interesse por *Trichogramma* vem crescendo, devido a facilidade de produzir grandes quantidades desses indivíduos em laboratórios, com baixo custo de produção (Parra & Zucchi, 1997), que tornou-se ainda mais viável a partir do desenvolvimento de técnicas de criação do seu hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Botelho, 1992).

Devido à presença da praga em todos os estágios de desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar e a impossibilidade de uso de inseticidas para controlar esta broca, foi

estabelecido no Brasil um programa de controle biológico através da liberação do parasitóide *Cotesia flavipes* (Cam.), resultando em redução considerável das perdas na produção e na melhoria da matéria-prima produzida (Yamauchi et al., 1997).

Com o objetivo de reduzir as perdas causadas pela broca-da-cana-de-açúcar, foram realizados estudos sobre a possibilidade de associar parasitoides de ovos com parasitoides de lagartas, tal associação pode ser economicamente viável já que o custo de produção de *T.galloi* para 1 hectare é de cerca de metade do valor do custo de *C. flavipes* (Botelho & Macedo, 2002).

Quando *T. galloi* é liberado na base de 200.000 parasitoides por hectare, a intervalos semanais, em um total de três liberações associado a *C. flavipes* a redução da intensidade de infestação pode chegar a 60% (Parra et al., 2002).

Com a associação de *T. galloi* e *C. flavipes* em áreas onde a infestação supera 15%, a liberação por três semanas seguidas de *T. galloi* e, logo após, por duas semanas *C. flavipes*, pode evitar perdas de R\$ 935,00 por hectare, descontando o investimento. Caso o agricultor opte por usar apenas *C. flavipes*, a redução de perda cairia para R\$ 674,00 por hectare, levando em consideração apenas os valores sobre o açúcar refinado amorfo, produto adquirido pela indústria alimentícia (Vasconcelos, 2012).

O parasitoide larval *C. flavipes* foi importado de Trinidad e Tobago no ano de 1971 e vem sendo estudado, nos seus diversos aspectos, ao lado de *D. saccharalis*. Face aos modestos resultados obtidos em condições de campo linhagens de *C. flavipes* foram então introduzidas primeiramente nos canaviais de São Paulo, no ano de 1976 (Botelho, 1992).

Quando adulto, esse inseto holometábolo, mede aproximadamente 4 mm. As fêmeas de *C. flavipes* depositam seus ovos no interior no hospedeiro, onde ocorre a eclosão das larvas, essas passam a se alimentar do interior das lagartas dos lepidópteros, após esse período de alimentação tornam-se pupas, essa fase é facilmente identificada pela formação de casulos de coloração branca que ficam agrupadas formando uma massa ao redor da lagarta parasitada (Botelho & Macedo, 2002).

Para a produção de *C. flavipes*, cerca de 30 pessoas produzem em laboratórios de 10 a 20 milhões de *C. flavipes*/mês para liberações inundativas (Silva & Brito, 2015). Para o controle de lagartas de *D. saccharalis* no Brasil cerca de 6.000 vespínhas *C. flavipes* são liberados por hectare, em aproximadamente três milhões de hectares, essas liberações são consideradas eficientes desde que seja realizada no momento adequado,

ou seja, quando a população da praga atingir o nível de 3% de intensidade da infestação (Lopes, 1988; Botelho, 1999).

Para os programas de Controle Biológico envolvendo parasitoides e predadores há a necessidade de criação de duas espécies de insetos, a praga e ou hospedeiro alternativo e o agente de controle biológico (Parra, 2015), todavia são poucos os estudos que verificam a toxicidade dos anticontaminantes no desenvolvimento de parasitoides (Parra & Zucchi, 1997).

A produção de agentes de controle biológico e de seus hospedeiros está diretamente relacionada com a qualidade da dieta utilizada (Bueno, 2009). Assim há necessidade de testar os efeitos dos anticontaminantes adicionados ao meio de criação, nas características biológicas dos insetos e de seus parasitoides (Parra & Zucchi, 1997), uma vez que se for produzido um hospedeiro de má qualidade, os inimigos naturais produzidos podem não ser competitivos com os da natureza (Parra, 1992).

### ***Helicoverpa armigera***

*Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) é um lepidóptero da família Noctuidae, subfamília Heliiothinae, que foi constatada no Brasil no ano de 2013, causando danos em diversos cultivos (Czepak et al., 2013). Até então, essa praga não havia sido registrada no continente americano e era considerada praga quarentenária no Brasil (Ávila et al., 2013).

Essa espécie pode afetar altos valores de colheita em várias culturas de importância econômica no Brasil e no mundo, decorrente do ataque em detrimento da sua alimentação, uma vez que pode estar dispersa em todas as regiões agrícolas do país (Ávila et al., 2013)

Estima-se que esta espécie esteja atualmente presente em praticamente todos os estados brasileiros, pelo fato de o Brasil estar localizado em uma região tropical que permite o cultivo de diversos hospedeiros ao longo do ano (Ávila et al., 2013).

As lagartas podem estar presentes em culturas de algodão, milho, soja, feijão, tomate e sorgo e se alimentar das folhas, hastes e estruturas reprodutivas como, botões florais, frutos, maçãs, espigas e inflorescências, causando deformações ou podridões nas estruturas ou até mesmo a sua queda (Ávila et al., 2013).

A espécie *H. armigera* é um inseto holometábolo, sendo o seu desenvolvimento influenciado pela qualidade nutricional do alimento e por fatores ambientais, como temperatura e umidade (Guedes et al., 2013).

Nos primeiros ínstaes, a lagarta de *H. armigera* apresenta corpo com cerdas escuras abundantes com a sua base brilhante, demonstrando certa semelhança com lagartas de outras espécies da subfamília Heliothinae. A partir de o quarto instar, a lagarta começa a exibir inúmeros pelos esbranquiçados, inclusive na cápsula cefálica, uma saliência escura no quarto segmento abdominal e tegumento com aspecto coriáceo (Albernaz et al., 2014). À medida que a larva cresce, ela passa da coloração amarelo-palha ao verde, podendo ocorrer variações dependendo do tipo de alimentação utilizado pela lagarta (Ali & Choudhury, 2009).

As mariposas fêmeas de *H. armigera* apresentam as asas dianteiras amareladas, enquanto as dos machos são cinza-esverdeadas com uma banda ligeiramente mais escura no terço distal e uma pequena mancha escurecida no centro da asa, em formato de rim. As asas posteriores são mais claras, apresentando uma borda marrom na sua extremidade apical (Ali & Choudhury, 2009).

O controle de *H. armigera* empregando-se inseticidas químicos tem sido o mais utilizado, em razão de ser, muitas vezes consideradas, uma alternativa de controle de ação rápida, confiável e econômica, enquanto o controle biológico de *H. armigera* ainda necessita ser explorado nas condições brasileiras (Ávila et al., 2013).

Parasitoides do gênero *Trichogramma* apresentam associação com ovos de espécies da subfamília Heliothinae, a qual abrange *H. armigera* (Ávila et al., 2013).

Para a tomada de decisão no controle de *H. armigera*, informações sobre a bioecologia podem servir de auxílio no seu manejo para mantê-la abaixo do nível de dano econômico (Razmjou & Naseri, 2014). Um dos fatores que podem influenciar no ciclo de vida e no potencial de reprodução de uma praga é o alimento (Parra, 1991).

Importantes estudos sobre as exigências nutricionais dos insetos são realizados com dietas artificiais (Rosseto, 1980). As dietas artificiais, além de conter todos os nutrientes exigidos pelo inseto devem estar livres de agentes de contaminação, entretanto os anticontaminantes devem ser estudados antes de serem acrescentados, pois podem apresentar efeitos sobre a população de insetos quando utilizados em concentrações inadequadas (Parra & Zucchi, 1997).

## REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. 2017. Cosmético: Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/cosmeticos>, Acesso em 10 de janeiro 2017.

Albernaz, K. C., Czepak C., Costa J., Zuntini B. & Borges M. 2014. Guia de Identificação – *Helicoverpa armigera* – Escola de Agronomia – UFG e Nufarm. (Guia de identificação).

Ali, A. & Choudhury R. A.. 2009. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. Tunisian Journal of Plant Protection, Tuniscie, v. 4, n. 1, p. 99-106.

Alverson. J. & Conhen A. C. 2002. Effect of Antifungal Agents on Biological Fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae) Journal of economic entomology, v. 95, n. 2, p. 256- 260.

Ávila, C. J., Vivan L. M. & Tomquelski G. V. 2013. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. Dourados: Embrapa. (Circular Técnica, 23).

Bass, M. H. & Barnes E. E. 1969. Toxicidade de agentes antimicrobianos Agentes para as larvas de besouro com franjas brancas e a eficácia de certos agentes contra agentes microbianos crescimento. Journal of economic entomology, v. 62. n. 3, p. 718-719.

Botelho, P. S. M. 1992. Quinze anos de controle biológico de *Diatraea saccharalis* utilizando parasitoides. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v 27, p. 255-256.

Botelho, P. S. M. 1999. Associação do parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. v. 28, n. 3, p.491-496.

Botelho, P. S. M. & Macedo N.. 2002. Descrição e bioecologia de *D. saccharalis*. In: Parra, J. R. P.; P. S. M. Botelho, B. S. C. Ferreira, J. M. S. Bento. Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores. São Paulo: Manole, cap. 25, p. 409-426.

Broglio-Micheletti, S. M. F., Pereira-Barros J. L., dos Santos A. J. N., Carvalho L. W. T. de, Carvalho L. H. T. de & Oliveira C. J. T. de 2007. Efeito do número de adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) liberados em semanas sucessivas, para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) Ciência e Agrotecnologia, v. 31, n. 1, p.53-58, 2007.

Bueno, V. H. P. 2009. Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. Lavras: Editora UFLA. 2 ed. p. 430.

Conab. 2015. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar Safra: 2014/2015. Monitoramento agrícola, segundo levantamento, agosto de 2015. Brasília DF, v 2, p. 1-33, 2015. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_08\\_13\\_15\\_58\\_44\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_2o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_08_13_15_58_44_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_15-16.pdf). Acesso em: 18/09/2015.

Cônsoli, F. L., Rossi M. M. & Parra J. R. P. 1999. Developmental time and characteristics of the immature stages of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). Revista Brasileira de Entomologia, v. 43, p. 271-275.

Czepak, C., Albernaz K. C., Vivan L. M., Guimarães H. O. & Carvalhais T. 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 110-113, 2013.

Costa, V. A., Berti Filho E., Sato M. E. 2006. Parasitóides e predadores no controle de pragas, p. 25-34. In: Pinto, A. S.; Nava, D. E.; Rossi, M. M.; Malerbo-Souza, D. T. (Eds.). Controle Biológico na Prática. ESALQ/USP, Piracicaba: CP 2, 287p.

Dunkel, F. V. & Read N. R. 1991. Review of the Effect of Sorbic Acid on Insect Survival in Rearing Diets with Reference to Other Antimicrobials. American Entomologisty, v. 37, n. 3, p. 172-178.

Gallo, D., Nakano O., Silveira Neto S., Carvalho R. P. L., Baptista G. C., Berti Filho E., Parra J. R. P., Zucchi R. A., Alves S. B., Vendramim J. D., Marchini L. C., Lopes J. R. S. & C. Omoto, 2002. Entomologia Agrícola. Piracicaba, FEALQ. p. 474.

Gravena, S. 1992. Controle Biológico no Manejo Integrado de Pragas. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 27, S/N: 281:299.

Grenier, S. A. 1997. Desenvolvimento e produção in vitro de *Trichogramma*. In: Parra, J. R. P & R. A. Zucchi. (eds.). *Trichogramma* e o controle biológico aplicado. Piracicaba: FEALQ, p. 235-258.

Guedes, J. V. C., Arnemann J. A., Pirini C. R., Mello A. A., Rohrig A., Stacke R. F. & Machado M. R. R. 2013. *Helicoverpa armigera*: da invasão ao manejo da soja. Revista Plantio Direto, Passo Fundo, v. 137/138, p. 24- 35.

Hensley, S. D. & Hammond A. H. 1968. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. Journal of Economic Entomology, Lanham, v. 61, n. 6, p. 1742-1743.



Hassan, S. A. 1997. Seleção de espécies de *Trichogramma* pra o uso em programas de controle biológico. In: Parra, J. R. P. & R. A. Zucchi, (Eds). *Trichogramma* e o controle biológico aplicado. Piracicaba: Fealq/Fapesp. p. 324.

Lopes, J. R. S. 1988. Estudos bioetológicos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Pyralidae). (Dissertação de Mestrado) ESALQ, Piracicaba-SP, p. 141.

Nava, D. E., Diez-Rodriguez G. I., Melo M. & Afonso A. P. S. 2008. Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Hypercompe indecisa* em dieta artificial. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 43, n. 12, p.1665-1669.

Nicrom Química Ltda. 2017. Ficha de Informação e Segurança do Produto Químico – Formaldeído. Disponível em: <http://nicromquimica.com.br/produtos/cosmeticos/#wpcf7-f156-p597>-Acesso em 10 de janeiro 2017.

Oliveira, H. N. & Ávila C. J. 2010. Controle biológico de pragas no Centro-Oeste brasileiro. g.bio: revista de controle biológico, Piracicaba, p. 11-13, abr. 2010.

Oliveira, H. N., Bellon P. P. & Glaeser D. F. 2012. Recomendações para obter um controle mais eficaz da broca da cana-de-açúcar. Comunicado técnico 181 Dourados MS.

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

Parra, J. R. P. 1992. Situação atual e perspectivas do controle biológico através de liberações inundativas, no Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 27, p. 271-279.

Parra, J. R. P., Mihsfeldt L. H. 1992. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: Anderson, T. E.; Leppla, N. C (Ed.) Advances in insect rearing for research and pest management. San Francisco: Westview Press, p. 195-209.

Parra, J. R. P. & Zucchi R. A. 1997. *Trichogramma* e o controle biológico aplicado. Piracicaba: ESALQ/FEALQ SP p.324.

Parra, J. R. P., Botelho P. S. M., Corrêa-Ferreira B. S. & Bento J. M. S. 2002. Controle biológico uma visão inter e multidisciplinar, p.125-142. In: J. R. P. Parra; P. S. M. Botelho; B. S. Corrêa-Ferreira & J. M. S. BENTO (eds.). Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo, Manole, v. 3 p. 635.

Parra, J. R. P. 2009. A evolução das dietas artificiais e suas interações em ciência e tecnologia. In: Panizzi, A. R. & J. R. P. Parra. (Ed.). Bioecologia e nutrição de insetos: Base para o manejo integrado de pragas. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica, p. 91-174.

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

Pinto, A. S., M. A. V. Cano & E. M. Santos. 2006. A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* In: Pinto, A. S. (ed.). Controle de pragas da cana-de-açúcar. Sertãozinho: Biocontrol, (Boletim técnico Biocontrol, n.1) p. 64.

Razmjou, J. & Naseri B. 2014. Comparative performance of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants. Journal Pest Science, Netherlands, v. 87, p. 29–37.

Rosseto, C. J. 1980. Requisitions nutricionais de insetos fitófagos. Campinas: Instituto agronomico. P.30 (IAC. Circular técnica, 105)

Conceição, L. L. & Silva C. M. 2011. O controle biológico e suas aplicações na cultura da cana-de-açúcar. Campo digital. v. 6, n.1, p. 14-25, Campo Mourão.

Silva, A. B. da. & Brito J. M. de. 2015. Controle biológico de insetos pragas e suas perspectivas para o futuro. *Revista Agropecuária Técnica*. v. 36, n. 1, p. 248-258.

Silva, C. C. M. da, Marques E. J., Oliveira V. J.. & Valente E. C. N. 2012. Preference of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) for *Diatraea* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Scientiarum. Agronomy. Maringá*, v. 34, n. 1, p. 23-27.

Singh, P. & House H. L. 1970. Antimicrobials: 'Safe' levels in a synthetic diet of an insect, *Agriaaffinis*. *Journal of Insect Physiology*, v. 16, n. 9, p. 1769-1782

Sinhg, P. & Moore. 1985. *Handboock of insects rearing*. (Eds) Elsevier, v 2.

Smith, C. N. 1996. *Insect colonization and mass production*. New York; Academic, p. 618.

Soares Junior, G. G. 1992. Problems with entomopatogens in insects rearing. In: Anderson, T. E.; Leppa, N. C. (Ed) *Advances in insentc rearing for research & management*. Boulder: Westview, p. 289-322.

Vasconcelos, Y. 2012. Inseto contra inseto. *Revista Pesquisa Fapesp*, v.195, p.68-73.

Yamauchi, M. N., Gobbi N., Chaud-Netto J. & Campos-Farinha A. E. 1997. Relationship between number of ovipositions of *Cotesia flavipes* (Cam.) and number of descendants emerged from its host *Diatraea saccharalis* (Fabr.). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Jaboticabal*, v. 26, n. 1, p. 87-91.

## CAPÍTULO 1

Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae)

Suélen Cristina da Silva Moreira<sup>a</sup>, Crébio José Ávila<sup>b</sup>, Harley Nonato de Oliveira<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados

<sup>b</sup>Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Caixa Postal 322, 79804-980 Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. E-mail: [suelenbiotec@hotmail.com](mailto:suelenbiotec@hotmail.com)

\*O trabalho segue as normas da revista Brasileira de Entomologia com adaptações as normas de redação da dissertações e teses do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade.

Alternative anticontaminants as substitutes of formaldehyde in the artificial diet for rearing *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae)

**ABSTRACT** - Formaldehyde has been widely used as an anticontaminant in artificial diets for breeding insects. However, this substance presents high toxicity to the human being, being of fundamental importance studies that aim at its substitution by alternative products in artificial diets for insect breeding. The objective of this work was to evaluate the efficiency of anticontaminants products and their respective doses/concentrations evaluated: AAS (acetylsalicylic acid) (1g and 2g/diet), sorbic acid (1,85g and 3,7 g/diet) and benzoic acid (1,85g and 3,7g/diet), in addition to the standard formaldehyde (1,7 mL/diet) and a control to replace the use of formaldehyde in the artificial diet for the creation of *Diatraea saccharalis* and to verify if there is effect in their biological characteristics . The experimental design was completely randomized with 10 replicates, each replicate consisting of 10 caterpillars. The contamination inside the breeding tubes containing artificial diet of *D. saccharalis*, the period and the larval and pupal viability of this species as well as the weight of pupae were evaluated. During adulthood, 20 couples from each treatment were individualized in oviposition cages for reproductive and longevity studies. The studies were repeated in order to evaluate the effects of the anticontaminants in the second generation of *D. saccharalis* when created in these diets. The products tested can replace formaldehyde in the diet. However, among the different anticontaminates studied, acetylsalicylic acid is considered the lowest dose tested (1g / diet) as the most suitable for the creation of *D. saccharalis* because it is easy to access and low cost, when compared to other anticontaminantes.

**KEYWORDS:** Biological control, life table, mass rearing

RESUMO - O formaldeído tem sido amplamente utilizado como anticontaminante em dietas artificiais para criação de insetos. Todavia, essa substância apresenta alta toxicidade para o ser humano, sendo de fundamental importância estudos que visam a sua substituição por produtos alternativos em dietas artificiais para criação de insetos. Objetivou-se com esse trabalho avaliar a eficiência dos produtos anticontaminantes e suas respectivas doses/concentrações avaliadas: AAS (ácido acetilsalicílico) (1g e 2g/dieta), ácido sórbico (1,85g e 3,7g/dieta) e ácido benzóico (1,85g e 3,7g/dieta), além do padrão formaldeído (1,7 mL/dieta) e uma testemunha em substituição ao uso do formaldeído na dieta artificial para a criação de *Diatraea saccharalis* e verificar se há efeito nas suas características biológicas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo cada repetição constituída por 10 lagartas. Avaliou-se a contaminação no interior dos tubos de criação contendo dieta artificial de *D. saccharalis*, o período e a viabilidade larval e pupal desta espécie bem como o peso de pupas. Durante a fase adulta, 20 casais de cada tratamento foram individualizados em gaiolas de oviposição para estudos da fase reprodutiva e longevidade. Os estudos foram repetidos visando avaliar os efeitos dos anticontaminantes na segunda geração de *D. saccharalis* quando criadas nessas dietas. Os produtos testados podem substituir o formaldeído na dieta. Todavia, dentre os diferentes anticontaminantes estudados considera-se o ácido acetilsalicílico na menor dose testada (1g/dieta) como o mais adequado para criação de *D. saccharalis* por ser esse produto de fácil acesso e baixo, custo quando comparado aos demais anticontaminantes.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, criação massal, tabela de vida



## Introdução

A broca-da-cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) é considerada a principal praga dessa importante cultura no Brasil (Gallo et al., 2002). As lagartas de *D. saccharalis* podem causar danos diretos nas plantas de cana-de-açúcar, decorrentes da alimentação do inseto, e indiretos por favorecer a entrada de microorganismos oportunistas que invadem o interior do colmo através do orifício feito pela lagarta, provocando a inversão da sacarose, interferindo na produção de açúcar e etanol, causando assim grandes prejuízos econômicos aos produtores de cana (Botelho & Macedo, 2002). Esses danos ocorrem em menor incidência quando a cana é jovem e aumentam consideravelmente a medida que a planta se desenvolve (Silva et al., 2012).

Para diminuir os danos causados pela *D. saccharalis* na cultura da cana de açúcar, um dos métodos de controle mais utilizado é o biológico, o qual é normalmente realizado com o parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) e com o parasitoide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Braconidae) (Parra 1992, Pinto et al. 2006), sendo necessária para isso, a criação massal desses parasitoides em condições de laboratório (Parra, 2002).

Para a criação massal desses inimigos naturais é também necessária a criação de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas em dieta artificial que deve conter todos os nutrientes exigidos pelo inseto, além de agentes anticontaminantes de dieta (Parra, 2009, 2015).

O formaldeído tem sido o agente anticontaminante mais utilizado em dietas artificiais para criação de insetos (Hensley & Hammond 1968). No entanto, o formaldeído quando manipulado inadequadamente, pode causar problemas a saúde humana, sendo essa substância proibida de ser comercializadas (Nicon, 2017).

A exposição à mesma pode causar irritações na pele, dores de garganta, queimaduras e até mesmo favorecer o surgimento de câncer no aparelho respiratório, sendo que altas concentrações e exposição prolongada pode causar danos irreversíveis (Anvisa, 2017).

Assim é importante priorizar a produção de insetos em condições de laboratório de forma efetiva, porém segura à saúde humana (Bueno, 2009). Objetivou-se com esse trabalho avaliar a eficácia dos ácidos acetilsalicílico, sórbico e benzóico como anticontaminantes em substituição ao uso do formaldeído e verificar se há efeitos destes produtos sobre as características biológicas de *D. saccharalis*, em duas gerações.



## **Material e Métodos**

Os trabalhos foram realizados nos Laboratórios de Entomologia e de Controle Biológico da Embrapa Agropecuária Oeste em Dourados, MS.

### **Criação de *D. saccharalis***

Adultos de *D. saccharalis* (ANEXO I, fig. A) (20 machos e 30 fêmeas) foram criados em gaiolas de PVC (10 cm x 22 cm) (ANEXO I, fig. B) fechadas com tecido do tipo “voil” e mantidos em sala climatizada na temperatura de  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotofase de 12 horas. Essas gaiolas foram revestidas internamente com folhas de papel pardo umedecido, onde as fêmeas, após o acasalamento realizaram as suas posturas (ANEXO I, fig. C). Os ovos oriundos dessas posturas foram retirados diariamente das gaiolas de PVC e colocados em placas de Petri (9 cm de diâmetro x 2 cm altura) (ANEXO I, fig. D), onde permaneceram até eclosão das lagartas. As lagartas obtidas foram colocadas em tubos de vidro (8,5 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro) (ANEXO I, fig. E), contendo a dieta artificial recomendada por Parra, (2015), que é constituída basicamente de farelo de soja, germe de trigo, vitaminas, sais minerais e anticontaminantes, onde permaneceram até a transformação em pupas. As pupas (ANEXO I, fig. F) foram retiradas dos tubos de vidro, sexadas de acordo com a metodologia de Butt e Cantu, (1962) e mantidas em gerbox até a formação de adultos, reiniciando-se assim um novo ciclo do inseto (Parra, 2015).

### **Preparo das dietas para criação de *D. saccharalis***

O preparo de dietas para criação de lagartas de *D. saccharalis* teve como base a metodologia proposta por Parra, (2015) como segue: Inicialmente, pesou-se o germe de trigo, o farelo de soja, o açúcar e os sais de Wesson, sendo esses ingredientes acondicionados em um primeiro recipiente. Em um segundo recipiente, pesou-se o ágar e em um terceiro recipiente o ácido ascórbico, cloreto de colina, tetraciclina e o nipagin. Em um quarto recipiente adicionou-se a solução vitamínica e formadeído.

A água destilada (2L) foi levada ao fogo até que começou a ferver e depois foi dividida em duas partes. Com uma das partes de água, procedeu-se à homogeneização dos componentes do primeiro recipiente em liquidificador e com outra parte de água, adicionou-se o ágar que foi homogeneizado e mantido no fogo até ferver. Nesse momento, o conteúdo do liquidificador foi adicionado ao ágar no fogo, esta mistura foi homogeneizada constantemente até o que conteúdo do recipiente fervesse novamente e engrossasse. O conteúdo do terceiro e do quarto recipiente foram adicionados somente depois que o fogo foi desligado, e quando a mistura resfriada atingiu a temperatura próxima dos 60°C.

A dieta pronta foi colocada em tubos de vidro com fundo chato de 8,5 cm x 2,5 cm, em quantidade suficiente para o desenvolvimento da fase larval de uma lagarta (10mL). Em seguida, os tubos foram tampados com algodão, estes tubos foram previamente esterilizados em estufa a 200°C durante quatro horas. Quando não se observou mais condensação no interior dos tubos procedeu-se à transferência de lagartas recém-eclodidas, colocando-se uma lagarta em cada tubo com um pincel de cerdas macias. Os tubos foram deixados em suportes na posição vertical, onde as lagartas permaneceram até a transformação em pupa. (O esquema do preparo da dieta pode ser observado no Anexo II).

A quantidade dos componentes das dietas (g ou mL/dieta) com os diferentes anticontaminantes foram detalhados na Tabela 1.

**Tabela 1**Componentes (g ou mL/dieta) da dieta utilizadas na avaliação do desenvolvimento de *D. saccharalis* contendo diferentes anticontaminantes.

Componentes	Diets							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Germe de trigo (g)	70	70	70	70	70	70	70	70
Farelo de soja (g)	120	120	120	120	120	120	120	120
Açúcar (g)	120	120	120	120	120	120	120	120
Sais de wesson <sup>1</sup> (g)	17	17	17	17	17	17	17	17
Ácido Ascórbico (g)	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
Cloreto de colina (g)	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Solução Vitamínica <sup>2</sup> (mL)	25	25	25	25	25	25	25	25
Metil-p-hidroxibenzoato (Nipagin) (g)	7	7	7	7	7	7	7	7
Tetraciclina 500 mg (g)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Ágar (g)	25	25	25	25	25	25	25	25
Água destilada (mL)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Formaldeído (37%) (mL)	-	1,7	-	-	-	-	-	-
Ácido acetilsalicílico 500mg (g)	-	-	1	2	-	-	-	-
Ácido sórbico (g)	-	-	-	-	1,85	3,7	-	-
Ácido benzoico (g)	-	-	-	-	-	-	1,85	3,7

<sup>1</sup>Carbonato de cálcio: 21,000; Fosfato de cálcio: 14,900; Sulfato de cobre X 5H<sub>2</sub>O: 0,039; Fosfato férrico: 1,470; Sulfato de magnésio: 9,000; Sulfato manganoso: 0,020; Sulfato de potássio e alumínio: 0,009; Cloreto de potássio: 12,000; Iodeto de potássio: 0,005; Monofosfato de potássio: 31,000; Cloreto de sódio: 10,500; Fluoreto de sódio: 0,057. Quantidade em porcentagem.

<sup>2</sup> Niacinamida: 0,5g; Pantotenato de cálcio: 0,5g; Riboflavina: 0,25g; Tiamina: 0,125g; Piridoxina: 0,125g; Ácido fólico: 0,5g; Biotina: 0,02 mg; Vitamina B12 - Cianocobalina 1mg, Água destilada QSP 500ml. Quantidade para 500mL de solução

1-Testemunha; 2-Formaldeído; 3-AAS 1,85g; 4- AAS 3,7g; 5-Ácido sórbico 1,85g; 6-Ácido sórbico 3,7g, 7-Ácido Benzoico 1,85; 8-Ácido benzoico 3,7g.

## **Avaliação de anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído em dieta artificial para criação de *D. saccharalis***

Foram testados duas doses/concentrações de três diferentes anticontaminantes disponíveis no mercado na dieta de *D. saccharalis*, sendo o formaldeído na concentração de 2,7 mL/dieta (37%) o tratamento padrão. Os três anticontaminantes e suas respectivas doses/concentrações avaliadas foram: AAS (ácido acetilsalicílico) (1g e 2g/dieta), ácido sórbico (1,85g e 3,7g/dieta) e ácido benzóico (1,85g e 3,7g/dieta), além do padrão formaldeído (1,7 mL/dieta) e uma testemunha onde nenhum desses anticontaminante foi adicionado na dieta.

Os produtos anticontaminantes testados: ácido benzoico (DL50 para ratos de >2000 mg/kg) ácido sórbico (DL50 para ratos de 3800 a 4300mg/kg) apresentam toxicidade aguda pelo menos dez vezes menor que a do formaldeído (DL50 para ratos de 800 mg/kg) e as doses foram estabelecidas considerando-se a literatura (Eduardo, 2015). Para o AAS (DL para ratos 200mg/kg) (Oswaldo Cruz, 2003), procedeu-se alguns testes em laboratório que foram considerados satisfatórios para incluir este ácido no ensaio.

Todas as fases de desenvolvimento de *D. saccharalis* foram mantidas em sala climatizada, com temperatura de  $25 \pm 1$  °C, UR  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas. O desenvolvimento das lagartas foi acompanhado diariamente, registrando-se a ocorrência de contaminações nos tubos de ensaio, duração em dias e viabilidade em percentagem da fase larval. A contaminação foi avaliada visualmente, anotando-se quando ocorria no interior dos tubos de dieta, o crescimento de fungos e a formação de colônias de bactérias.

Quando as lagartas transformaram-se em pupas, estas foram retiradas da dieta cerca de 24 horas após a sua pupação, e seu peso registrado com uma balança analítica de precisão. É importante que todas sejam pesadas com mesma idade, pois com o passar do tempo há perda de água pela pupa o que pode levar a erros grosseiros (Parra, 2015). Em seguida, as pupas foram separadas por sexo sob estereomicroscópio de acordo com a metodologia de Butt e Cantu, (1962) e individualizadas em copos transparentes descartáveis de polietileno com capacidade de 50 mL, sendo assim determinada a duração em dias e a viabilidade em percentagem da fase pupal.

Após a emergência dos adultos de *D. saccharalis*, 20 casais com a mesma idade foram individualizados para copularem em gaiolas de tubo PVC medindo 10 cm de diâmetro por 22 cm de altura, as quais eram internamente revestidas com papel sulfite umedecido com água destilada. Mel diluído a 10% em água foi fornecido às mariposas através de rolo dental de algodão imerso na solução, esse alimento foi renovado diariamente, pois segundo Parra, (2009) as soluções açucaradas podem fermentar e prejudicar o desenvolvimento do inseto. A extremidade superior da gaiola era forrada com tecido tipo “voile” para permitir aeração do interior das gaiolas. Diariamente as folhas de papel pardo que revestiam o interior das gaiolas eram retiradas para a contagem dos ovos, registrando-se o número de ovos colocados no papel, e eventualmente a morte das mariposas para estudos da fase reprodutiva e longevidade.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), constituído dos oito tratamentos avaliados e 10 repetições, sendo cada repetição representada por 10 lagartas de *D. saccharalis* mantidas em dieta nos tubos de criação.

Quando as fêmeas de *D. saccharalis* fizeram a segunda postura, cerca de 50 ovos de cada casal foram separados e acondicionados em tubos de vidro de 2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de comprimento, vedados com filme de PVC, sendo registrado o período de incubação dos ovos e o número de lagartas que eclodiram dos ovos para determinar a duração em dias e a viabilidade em percentagem dessa fase desenvolvimento. Esta padronização de posturas é recomendada por Parra para estudos de biologia comparando dietas Parra, (2015).

Durante a fase reprodutiva foi determinado os períodos de pré-oviposição, oviposição, pós-oviposição, número diário e total de ovos ovipositados pelas fêmeas. Com ovos provenientes de cada um dos respectivos tratamentos utilizou-se a mesma metodologia descrita previamente nesta primeira geração para estudar os efeitos dos anticontaminantes colocados na dieta sobre a segunda geração de *D. saccharalis*. Os dados foram submetidos à análise de variância, e quando constatado efeito significativo de tratamento, as médias foram comparadas pelo teste de Skott-knott a 5% de probabilidade.

### **Tabela de vida de fertilidade de *D. saccharalis***

Para comparação da adequação de diferentes dietas na criação de insetos, tem sido utilizada a análise de tabela de vida e de fertilidade. Para obtenção dos dados da

tabela de vida de fertilidade da primeira e segunda geração, utilizou-se adultos fêmea de *D. saccharalis* baseando-se em Silveira Neto et al., (1976), calculando-se os seguintes parâmetros:

$$R_o = \sum mx \cdot lx$$

$$T = \sum (mx \cdot lx \cdot x) / (\sum mx \cdot lx)$$

$$rm = \ln R_o / T$$

$$TD = \ln (2) / rm$$

$$\lambda = e^{rm}$$

Onde,

**R<sub>o</sub>** é a taxa líquida de reprodução, que corresponde ao número de vezes que a população aumenta durante o ciclo de vida; **T** é o intervalo de tempo entre cada geração (dias); **rm** é a capacidade inata de aumentar em número; **TD** é o tempo que leva para a população duplicar em número;  $\lambda$  é a razão finita de aumento populacional, que corresponde ao número de indivíduos adicionados á população/fêmea/dia que darão origem a fêmeas; **mx** é o número de descendentes produzidos/fêmea no estágio x (fertilidade específica) e que produzirão fêmeas; **lx** é a taxa de sobrevivência e **mx.lx** é o total de fêmeas produzidas/fêmea durante o intervalo de tempo. Para calcular **mx** usou-se a razão sexual, que foi determinada dividindo-se o número de fêmeas pelo somatório do número de fêmeas + machos (Silveira Neto et al., 1976).

## Resultados e discussão

### Efeito de anticontaminantes na dieta artificial da primeira geração de *D. saccharalis*

Apesar da contaminação nos tubos de dieta artificial de criação de *D. saccharalis* tenha sido de 4% no tratamento testemunha e nula nos tubos de dieta tratada com os anticontaminantes AAS e ácido benzoico, nas menor dose e concentração testada, não houve diferença significativa dos tratamentos com anticontaminantes em relação à testemunha, sendo a média geral de contaminação observada nos tubos de dieta de 1,25± 0,80 % (F= 1.321 p = 0,2967).

O uso de nipagin (antifúngico) e tetraciclina (antibiótico) nas dietas podem ter sido suficientes para controlar o crescimento de microorganismos no interior dos tubos

com dieta em especial na testemunha, além disso, a desinfecção de ovos de *D. saccharalis* que foi realizada com sulfato de cobre (2%) certamente contribuiu para minimizar a contaminação do meio de criação. Soares, (1992) preconizou a lavagem de ovos, o uso de boas práticas de assepsia e instalações sanitárias apropriadas, bem como o monitoramento da contaminação. Convém ressaltar que as criações em pequena escala são menos suscetíveis a contaminação (Parra, 2015).

O período embrionário, referentes aos ovos advindos da reprodução de *D. saccharalis*, após sua criação em dietas com diferentes anticontaminantes foi significativamente maior no tratamento com ácido sórbico, na menor concentração, e semelhantes à testemunha nos tratamentos com formaldeído, ácido sórbico e benzoico nas maiores concentrações utilizadas (Tabela 2).

**Tabela 2**

Duração (dias) das diferentes fases de desenvolvimento e viabilidade (%) de ovo, de lagarta e de pupa de *D. saccharalis*, quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	Duração (dias)			Viabilidade (%)		
	Ovo	Lagarta	Pupa	Ovo	Lagarta	Pupa
Testemunha	6,10±0,2 d <sup>1</sup>	24,84±0,1 a	9,58± 0,2 a	20,50 b	83,00 b	94,14 a
Formaldeído	6, 00 ±0,0 d	24,83±0,1 a	9,71±0,1 a	30,95 b	92,00 a	100,00 a
AAS 1g	6, 00±0,0 d	24,99±0,2 a	9,70±0,1 a	50,50 a	96,00 a	96,00 a
AAS 2g	6,25±0,2 c	24,47±0,0 b	9,66±0,1a	23,90 b	95,00 a	95,51 a
Ácido sórbico 1,85	7,15±0,2 a	24,48±0,1 b	9,56±0,1 a	41,30 a	96,00 a	96,64 a
Ácido sórbico 3,7g	6,00±0,0 d	24,76±0,1 a	9,68±0,3 a	42,30 a	87,00 b	94,26 a
Ácido benzoico 1,85g	6,50±0,2 b	25,26±0,1 a	9,52±0,3 a	54,10 a	79,00 b	92,45 a
Ácido benzoico 3,7g	6,00±0,0 d	24,57±0,1 b	9,64±0,3a	54,90 a	92,00 a	95,75 a

<sup>1</sup>Médias± EP seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Skott-knott ( $p<0,05$ ).



Na literatura o período de incubação de ovos de *D. saccharalis* encontra-se acima de 6 dias, sendo semelhantes aos encontrados neste estudo (Wongsiri, 1962; Bowling, 1967; Parra & Mihsfeldt, 1992; Melo & Parra, 1988). Já a viabilidade de ovos foi superior à testemunha para a maioria dos tratamentos, exceto para os tratamentos com formaldeído e AAS na maior dose avaliada (Tabela 2). Embora baixa contaminação tenha sido observada no interior dos tubos de dieta, ela pode ter ocorrido de maneira que não foi possível identificar visualmente, ou seja, sem ajuda de equipamentos, especialmente no tratamento testemunha, prejudicando o desenvolvimento do inseto e consequentemente a viabilidade de ovos. Sikorowski & Thompson, (1984) ao estudar bactérias contaminantes em dieta artificial para criação de *Heliothis virescens* (Fabricius), observaram efeitos prejudiciais dos anticontaminantes testados na eclosão dos ovos.

A menor duração na fase larval de *D. saccharalis* foi observada nos tratamentos com maior dose de AAS e ácido benzoico na maior concentração e com ácido sórbico, na menor concentração testada (Tabela 2). Nos demais tratamentos a duração deste estágio de desenvolvimento não diferiu significativamente do observado na testemunha. Parra et al. (1983), Melo & Parra, (1988) e Souza, (1999) obtiveram uma duração larval de *D. saccharalis* variando de 22,5 a 28,7 dias, resultados próximos ao observado nesta pesquisa.

A viabilidade larval foi significativamente semelhante à testemunha nos tratamentos contendo o ácido sórbico na maior concentração o ácido benzoico na menor, enquanto os demais tratamentos apresentaram viabilidade superior à testemunha, sem diferirem significativamente entre si (Tabela 2).

A duração e a viabilidade da fase de pupa não foram afetadas pelo uso dos anticontaminantes na dieta de *D. saccharalis* (Tabela 2). Os resultados obtidos por Parra e Mihsfeldt, (1992), Melo e Parra, (1988), Souza, (1999) e Lima, (2011) para essas características biológicas de *D. saccharalis* alimentadas com dieta artificial são semelhantes aos observados neste ensaio, sendo o valor da viabilidade acima de 90%.

O peso de pupas macho foi menor nos tratamentos com AAS na maior dose e com ácido benzoico na menor concentração testada, ao passo que nos demais tratamentos esse parâmetro foi significativamente superior sem diferir significativamente entre si (Tabela 2). Já o peso de pupas fêmeas foi inferior nos tratamentos contendo ácido benzoico na menor concentração, ácido sórbico na maior e

com AAS em ambas as doses utilizadas, enquanto os demais tratamentos apresentaram maior peso de pupas fêmeas semelhante à testemunha, sem diferirem entre si (Tabela 3).

### Tabela 3

Peso (g) de pupas de *D.saccharalis*, (macho e fêmea), quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	Peso de pupas (g)	
	Macho	Fêmea
Testemunha	0,195±0,01 a <sup>1</sup>	0,269±0,01 a
Formaldeído	0,221±0,00 a	0,264±0,00 a
AAS 1g	0,202±0,00 a	0,253±0,00 b
AAS 2g	0,160±0,00 b	0,252±0,00 b
Ácido sórbico 1,85g	0,199±0,00 a	0,278± 0,00 a
Ácido sórbico 3,7g	0,202±0,00 a	0,248±0,00 b
Ácido benzoico 1,85g	0,171±0,01 b	0,246±0,01 b
Ácido benzoico 3,7g	0,202±0,01 a	0,270±0,01 a

<sup>1</sup>Médias± EP seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Skott-knott ( $p<0,05$ ).

O peso de pupas fêmeas é acaracterística biológica que tem maior importância em termos biológicos, por estar intimamente relacionado à fecundidade. Sendo assim as pupas fêmeas geralmente são mais pesadas que as pupas machos (Melo & Parra 1988) o que ficou evidente no presente estudo.

A longevidade de adultos machos foi maior em relação à testemunha nos tratamentos AAS e ácido sórbico na maior dose e concentração e ácido benzoico na menor concentração testada, enquanto que a longevidade de fêmeas não foi influenciada pelos anticontaminantes colocados na dieta (Tabela 4).

**Tabela 4**

Longevidade de adultos, de *D. saccharalis* (macho e fêmea), quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	Longevidade de adultos	
	Machos	Fêmeas
Testemunha	4,8± 0,3 b	7,1± 0,8 a
Formaldeído	5,2± 1,1 b	7,3± 0,6 a
AAS 1g	4,9± 0,3 b	7,0± 0,7 a
AAS 2g	6,4± 0,6 a	8,0± 0,6 a
Ácido sórbico 1,85g	4,6± 0,8 b	6,3± 0,8 a
Ácido sórbico 3,7g	6,5± 0,8 a	7,0± 0,5 a
Ácido benzoico 1,85g	6,2± 0,5 a	8,0± 0,5 a
Ácido benzoico 3,7g	5,4± 0,2 b	6,6± 1,0 a

<sup>1</sup>Médias± EP seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Skott-knott ( $p<0,05$ ).

A literatura relata longevidade de 7,30 a 8,64 dias para machos e 6,8 a 8,7 dias para fêmeas, quando as lagartas foram criadas em dietas de Hensley e Hammond (1968) ou modificada a partir desta (Parra & Mihsfeldt, 1992, Melo & Parra, 1988; Souza, 1999). No entanto a longevidade isolada não deve ser uma característica conclusiva para criações de insetos, pois a função primordial dos insetos na fase adulta é a sua reprodução, sendo desta forma a capacidade de oviposição do inseto o fator mais importante nessa fase de desenvolvimento (Eduardo et al., 2015).

Nenhum dos parâmetros avaliados na fase reprodutiva, tais como o período de pré-oviposição, de oviposição e pós-oviposição, bem como fecundidade diária e total das fêmeas de *D. saccharalis* foram influenciados pelo uso dos anticontaminantes na dieta quando comparados ao tratamento testemunha. (Tabela 5).

**Tabela 5**

Duração (dias) dos períodos de pré-oviposição, oviposição, pós-oviposição, fecundidade diária e total de *D. saccharalis*, quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	Pré-oviposição(dias)	Oviposição (dias)	Pós-oviposição(dias)	Fecundidade	
				Diária	Total
Testemunha	3,60±0,2 a <sup>1</sup>	3,15±0,3 a	1,10±0,3 a	61,73±10,5 a	433,25±70,4 a
Formaldeído	3,20±0,5 a	3,40±0,6 a	1,75±0,5 a	98,99±14,0 a	674,95±97,9 a
AAS 1g	3,10±0,5 a	4,00±0,6 a	1,10±0,8 a	99,97±10,4 a	731,35±199,0 a
AAS 2g	3,40±0,0 a	4,10± 0,4 a	1,45±0,3 a	80,99±13,0 a	592,05±106,1 a
Ácido sórbico 1,85g	3,00±0,5 a	3,60±0,3 a	1,85±0,3 a	111,18±40,0 a	650,60± 267,4 a
Ácido sórbico 3,7g	3,15±0,0 a	3,45±0,4 a	1,10±0,2 a	86,89±25,4 a	563,70±152,3 a
Ácido benzoico 1,85g	3,60±0,2 a	3,60±0,5 a	1,95±0,3 a	94,03±19,9 a	646,75±161,8 a
Ácido benzoico 3,7g	2,30±0,4 a	4,05±0,8 a	1,50±0,8 a	100,30±31,8 a	637,85±166,6 a

<sup>1</sup>Médias± EP seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Skott-knott ( $p<0,05$ ).

### **Efeito de anticontaminantes na dieta artificial da segunda geração de *D.saccharalis***

A contaminação dos tubos de dieta artificial para criação de *D. saccharalis* foi maior no tratamento testemunha ( $7 \pm 0 \%$ ) seguido daquele com ácido benzoico ( $1,5 \pm 2\%$ ) na menor concentração testada, enquanto os demais tratamentos com anticontaminantes do ensaio, que não apresentaram contaminação alguma na dieta artificial.

A literatura relata índices de contaminação semelhantes ao observado na testemunha e no tratamento com ácido benzoico na menor concentração, mesmo com a adição de nipagin e formaldeído na composição dessas dietas. Quando avaliada a porcentagem de contaminação nos tubos de criação Lima, (2011) observou 10% de contaminação. Semelhante a encontrada por Hensley e Hammond, (1968) que encontram 11%, maior que as encontradas por Melo e Parra, (1988) que observaram uma contaminação de 6,5% em dietas semelhante à utilizada neste trabalho.

O período embrionário dos ovos advindos da reprodução de *D. saccharalis* da segunda geração após a sua criação em dietas com os diferentes anticontaminantes foi significativamente menor no tratamento com formaldeído e com ácido sórbico na menor concentração testada, enquanto os demais tratamentos apresentaram valores superiores para esta características biológica, em especial para o tratamento com o ácido benzoico e sórbico na maior concentração testada (Tabela 6).

**Tabela 6**

Duração (dias) das diferentes fases de desenvolvimento e viabilidade (%) da segunda geração de *D. saccharalis*, quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	Duração (dias)			Viabilidade (%)		
	Ovo	Lagarta	Pupa	Ovo	Lagarta	Pupa
Testemunha	6,75±0,3 b <sup>1</sup>	27,61±0,5 b	9,28± 0,2 a	37,45 b	87,00 a	78,75 a
Formaldeído	6,45±0,6c	27,93±0,7 b	9,49±0,4 a	43,80 a	89,00 a	90,16 a
AAS 1g	7,20±0,2b	29,19±0,7 b	8,87±0,5 a	57,20 a	91,00 a	89,64 a
AAS 2g	6,60±0,0 b	28,20±0,5 b	9,68±0,1 a	25,60 b	84,00 a	85,84 a
Ácido sórbico 1,85	6,00±0,0 c	29,89±1,1 a	8,97±0,4 a	29,65 b	92,00 a	79,30 a
Ácido sórbico 3,7g	8,00±0,0 a	27,89±0,4 b	9,37±0,4 a	48,90 a	89,00 a	91,42 a
Ácido benzoico 1,85g	6,75±0,4 b	30,58±0,3 a	8,64±0,1 a	46,60 a	88,00 a	75,33 a
Ácido benzoico 3,7g	8,30±0,4 a	31,41±0,7 a	8,97±0,4 a	22,20 b	90,00 a	92,01 a

<sup>1</sup>Médias± EP seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Skott-knott ( $p<0,05$ ).

O prolongamento do período embrionário pode ocorrer à medida que aumenta a concentrações de produtos anticontaminantes utilizados (Parra & Zucchi, 1997; Silva 2012), justificando assim maiores valores para esse período observado nos tratamentos contendo a maior concentração de ácido sórbico e benzoico. A viabilidade dessa fase foi superior no tratamento com formaldeído, com AAS na menor dose, com ácido sórbico na menor concentração e com ácido benzoico na maior, enquanto os demais tratamentos não diferiram da testemunha (Tabela 6).

A duração da fase de lagarta foi influenciada, embora essa diferença tenha sido pequena, sendo superior no tratamento com ácido benzoico em ambas as concentrações utilizadas e ácido sórbico na menor concentração, nos demais tratamentos com anticontaminantes a duração larval não diferiu da testemunha (Tabela 6). Ao passo que a viabilidade dessa fase de desenvolvimento não foi influenciada pelos tratamentos com anticontaminantes adicionados na dieta (Tabela 6).

O peso de pupas macho da segunda geração de *D. saccharalis* foi maior na testemunha e no tratamento contendo a maior dose de AAS, e menor nos tratamentos com ácido sórbico (Tabela 7). Já o peso de pupas fêmeas foi significativamente maior no tratamento com a maior dose de AAS e no tratamento testemunha em comparação aos demais tratamentos do ensaio (Tabela 7).

**Tabela 7**

Peso (g) de pupas da segunda geração de *D. saccharalis* (macho e fêmea), quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	Peso de pupas (g)	
	Macho	Fêmea
Testemunha	0,212±0,01 a <sup>1</sup>	0,275±0,02 a
Formaldeído	0,181±0,01 b	0,234±0,04 b
AAS 1g	0,187±0,01 b	0,224±0,05 b
AAS 2g	0,205±0,00 a	0,277±0,01 a
Ácido sórbico 1,85g	0,161±0,00 c	0,215±0,02 b
Ácido sórbico 3,7g	0,163±0,01 c	0,237±0,01 b
Ácido benzoico 1,85g	0,183±0,00 b	0,245±0,00 b
Ácido benzoico 3,7g	0,184±0,01 b	0,214±0,02 b

<sup>1</sup>Médias± EP seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Skott-knott ( $p < 0,05$ ).

Os resultados encontrados para pesos de pupas neste ensaio são superiores aos observados na literatura (Eduardo et al., 2015; Lima 2011; Silva, 2012), sendo o peso das pupas fêmeas maior em relação as pupas macho em todos os tratamentos.

A longevidade de macho foi significativamente superior no tratamento com ASS na maior dose testada, enquanto nos demais tratamentos foram semelhantes sem diferirem entre si. (Tabela 8). Já a longevidade de fêmeas não foi influenciada pelos tratamentos.

### Tabela 8

Longevidade de adultos da segunda geração de *D. saccharalis* (macho e fêmea), quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminante	Longevidade (dias)	
	Macho	Fêmea
Testemunha	3,9±0,8 b	6,3±0,9 a
Formaldeído	3,6±0,0 b	6,1±0,2 a
AAS 1g	3,9±0,4 b	6,1±0,8 a
AAS 2g	5,7±5,7 a	7,1±7,1 a
Ácido sórbico 1,85	4,1±4,1 b	5,0±5,0 a
Ácido sórbico 3,7g	3,4±0,2 b	5,5±0,9 a
Ácido benzoico 1,85g	4,3±0,9 b	6,1±0,6 a
Ácido benzoico 3,7g	3,6±0,8 b	6,9±1,6 a

<sup>1</sup>Médias± EP seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Skott-knott ( $p < 0,05$ ).

Milano et al. (2010) verificaram que a diminuição da longevidade não afetou a fecundidade das *D. sacchralis*. Portanto, a capacidade de oviposição é a característica biológica que mais merece atenção na fase adulta do inseto, quando falamos em termos de criação.

O período de pré-oviposicão foi maior no tratamento testemunha e com ácido sórbico na maior concentração testada, enquanto nos demais tratamentos esse período foi inferior e semelhante entre os mesmos (Tabela 9).



**Tabela 9**

Duração (dias) do período de pré-oviposição, oviposição, pós-oviposição, fecundidade diária e total de adultos fêmeas da segunda geração de *D.saccharalis* quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	Pré-oviposição(dias)	Oviposição (dias)	Pós-oviposição (dias)	Fecundidade	
				Diária	Total
Testemunha	2,55±0,7 a	3,20±0,5 b	1,10±0,9 b	58,90±16,95 b	303,40±186,68 b
Formaldeído	2,15±0,2 b	3,15±0,6 b	1,10±0,0 b	72,91±11,79 a	346±61,20 b
AAS 1g	2,00±0,0 b	2,45±0,3 c	2,40±0,6 a	77,86±12,96 a	440,6±96,42 a
AAS 2g	1,95±0,2 b	4,20±0,4 a	1,55±0,3 b	63,87±11,87 b	407,95±33,64 a
Ácido sórbico 1,85g	1,75 ±0,2 b	4,00±0,2 a	1,35±0,2 b	93,48±22,96 a	520,75±114,24 a
Ácido sórbico 3,7g	2,25±0,2 a	2,30±0,2 c	1,50±0,3 b	96,37±14,00 a	443,60±121,15 a
Ácido benzoico 1,85g	2,00±0,0 b	3,05±0,4 b	1,20±0,2 b	89,22±12,28 a	410,45±65,69 a
Ácido benzoico 3,7g	2,00±0,0 b	1,45±0,4 d	2,15±0,0 a	43,33±18,29 b	204,60±47,32 b

<sup>1</sup>Médias± EP seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Skott-knott ( $p<0,05$ ).

Neste ensaio as fêmeas ovipositaram com aproximadamente dois dias de idade, como também observou Silva, (2002) por duas gerações de *D. saccharalis* criadas em dietas com diferentes anticontaminantes.

Já o período de oviposição foi maior nos tratamentos com a maior dose de AAS e com ácido sórbico na menor concentração testada, enquanto o menor período de oviposição foi observado no tratamento com a maior concentração de ácido benzoico (Tabela 9).

O período de pós-oviposição foi maior para os tratamentos com a maior concentração de ácido benzoico e com AAS na menor dose testada, os quais não diferiram entre si, mas superaram os demais tratamentos do ensaio (Tabela 9).

O número de ovos depositados diariamente por fêmea foi maior no tratamento com ácido sórbico em ambas as concentrações testadas, com ácido benzoico e AAS na menor e com o formaldeído, os quais superaram o tratamento testemunha bem como o AAS e ácido benzoico nas maiores concentrações testadas no ensaio.

Com relação ao número total de ovos depositados por fêmea de *D. saccharalis*, verificou-se que o menor valor foi observado no tratamento com a maior concentração de ácido benzoico, com formaldeído e com a testemunha em comparação aos demais tratamentos com anticontaminantes no ensaio (Tabela 9).

No tratamento com ácido benzoico na maior concentração utilizada observou-se que as fêmeas apresentaram menor período de oviposição e conseqüentemente maior período de pós-oviposição, apresentando o menor número diário e total de ovos/fêmea.

Os resultados observados nos tratamentos com ácido benzoico na segunda geração indicam que pode ter havido um efeito deletério cumulativo desses anticontaminantes testados sobre o potencial reprodutivo de *D. saccharalis*, embora mais estudos devam ser realizados para constatação desta hipótese.

Dunkel & Read, (1991) relataram que o ácido benzoico pode apresentar atividades prejudiciais aos insetos, sendo estes efeitos fortemente relacionados à concentração e também a fase de vida, a Ordem e a espécie a que pertencem o inseto.

Nos estudos de Eduardo et al., (2015) os índices de posturas e número de ovos depositados por fêmeas não foram afetados quando estudaram apenas uma geração de *D. saccharalis* criada em dieta artificial contendo benzoato de sódio (derivado do ácido benzoico- 3,7g), mostrando ser esse produto adequado para a substituição do formaldeído na dieta de criação de *D. saccharalis*. Alverson & Conhen, (2002)

evidenciaram que o ácido benzóico não influenciaram o período de oviposição e o número de ovos produzidos por fêmea de *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae) também por apenas uma geração estudada.

É importante ressaltar que há necessidade da realização de estudos com gerações subsequentes antes da tomada de decisão de substituição de um produto para fazer parte da composição das dietas (Bueno, 2009), visando sempre à qualidade e sanidade dos insetos produzidos, bem como o custo da produção e segurança na utilização desse produto pelo profissional que manuseia a dieta artificial.

### **Tabela de vida de fertilidade da primeira geração *D. saccharalis* quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes**

A taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ) de fêmeas de *D. saccharalis* na primeira geração foi maior para os insetos alimentados com dieta artificial contendo as menores doses de ASS e concentração de ácido sórbico e com a maior concentração de ácido benzoico (Tabela 10). Já a taxa intrínseca de crescimento ( $r_m$ ) e a razão finita de aumento ( $\lambda$ ) foram maiores com a maior concentração de ácido benzoico e para o tratamento testemunha. O intervalo de tempo entre as gerações (T) e tempo gasto para a população de *D. saccharalis* duplicar em número (TD) foi inferior com a maior concentração de ácido benzoico e superior com a maior de ácido sórbico (Tabela 10).

**Tabela 10**

Taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ), capacidade inata de aumentar em número ( $rm$ ), razão finita de aumento ( $\lambda$ ), tempo entre cada geração ( $T$ ) e tempo de duplicação da população ( $TD$ ) da primeira geração de *D. saccharalis*, quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	$R_0$	$rm$	$\lambda$	$T$	$TD$
Testemunha	234,65	0,170	1,185	31,35	3,97
Formaldeído	335,73	0,190	1,210	29,58	3,52
AAS 1g	346,55	0,189	1,210	30,48	3,61
AAS 2g	275,26	0,180	1,200	30,05	3,69
Ácido sórbico 1,85	355,91	0,190	1,210	29,93	3,52
Ácido sórbico 3,7g	229,20	0,167	1,180	31,63	4,03
Ácido benzoico 1,85g	267,00	0,182	1,201	29,63	3,63
Ácido benzoico 3,7g	345,21	0,194	1,216	29,16	3,45

Com resultados apresentados nas características biológicas da tabela de vida podemos inferir que todos os grupos, ou seja daqueles insetos criados em dietas com diferentes anticontaminantes, estão crescendo, além disso esses valores foram próximos entre os tratamentos. No entanto a maioria dos tratamentos com anticontaminantes superaram aquele com formaldeído e testemunha.

**Tabela de vida de fertilidade da segunda geração *D.saccharalis* criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes**

A taxa líquida de reprodução ( $R_o$ ) de fêmeas de *D. saccharalis* na segunda geração, taxa intrínseca de crescimento ( $r_m$ ) e a razão finita de aumento ( $\lambda$ ) foram maiores para os insetos alimentados com dietas contendo a menor dose de ASS. O intervalo de tempo entre as gerações (T) de *D. saccharalis* foi menor nos tratamentos com AAS na menor dose e ácido sórbico na maior concentração, enquanto o maior tempo entre as gerações foi observado com ácido benzoico na maior concentração. Da mesma forma o tempo gasto para a população de *D. saccharalis* duplicar em número (TD), também foi menor nos tratamentos com AAS na menor concentração utilizada e maior no tratamento com ácido benzoico quando utilizada a maior concentração desse anticontaminante (Tabela 11).

**Tabela 11**

Taxa líquida de reprodução ( $R_o$ ), capacidade inata de aumentar em número ( $r_m$ ), razão finita de aumento ( $\lambda$ ), tempo entre cada geração (T) e tempo de duplicação da população (TD) da segunda geração de *D. saccharalis*, quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	$R_o$	$R_m$	$\lambda$	T	TD
Testemunha	125,29	0,140	1,150	33,31	4,77
Formaldeído	138,04	0,142	1,156	33,06	4,65
AAS 1g	196,83	0,159	1,170	32,74	4,29
AAS 2g	150,24	0,142	1,155	33,65	4,64
Ácido sórbico 1,85	172,17	0,149	1,160	33,88	4,55
Ácido sórbico 3,7g	153,64	0,150	1,160	32,82	4,51
Ácido benzoico 1,85g	138,37	0,138	1,149	34,95	4,91
Ácido benzoico 3,7g	143,72	0,130	1,140	36,12	5,04

Os resultados apresentados nas características biológicas da tabela de vida na segunda geração evidenciaram o crescimento dos diferentes grupos de insetos que foram próximos entre os tratamentos, no qual a maioria desses, superam os tratamentos com formaldeído e testemunha, assim como na primeira geração.

Os produtos testados podem substituir o formaldeído na dieta. Todavia, dentre os diferentes anticontaminantes estudados considera-se o ASS na menor dose testada (1g/dieta) como o mais adequado para criação de *D. saccharalis* por ser esse produto de fácil acesso e baixo custo, quando comparado a outros anticontaminantes.

### **Agradecimentos**

À Universidade Federal da grande Dourados, Embrapa agropecuária Oeste e a CAPES pelo apoio financeiro.

## Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. 2017. Cosmético: Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/cosmeticos>, Acesso em 10 de janeiro 2017.

Alverson. J. & Conhen A. C. 2002. Effect of Antifungal Agents on Biological Fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae) Journal of economic entomology, v. 95, n. 2, p. 256- 260.

Botelho, P. S. M. & Macedo N. 2002. Descrição e bioecologia de *D. saccharalis*. In: Parra, J. R. P., P. S. M Botelho, B. S. C Ferreira, J. M. S Bento. Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores. São Paulo: Manole, cap. 25, p. 409-426.

Bowling, C. C. 1967. Rearing of two lepidopterous pest of rice on a common artificial diet. Annals of the Entomological Society of America, College Park, v. 60, n. 6, p. 1215-1216.

Butt, B. A & Cantu E. 1962. Sex determination of lepidopterous pupae. Washington: United States Department of Agriculture, p.7.

Bueno, V. H. P. 2009. Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. Lavras: Editora UFLA. 2 ed. p. 430.

Dunkel, F. V. & Read N. R. 1991. Review of the Effect of Sorbic Acid on Insect Survival in Rearing Diets with Reference to Other Antimicrobials. American Entomologisty, v. 37, n. 3, p. 172-178.

Eduardo, W. L., Almeida L. F. V., Moraes R. F. de O., Santos J. A. dos, Martin C. C. & Bortoli S. A. de. 2015. Alternativa ao uso de formaldeído em dieta artificial para *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera:Crambidae). Congresso Brasileiro de Fitossanidade. Águas de Lindóia-SP.

Gallo, D., Nakano O., Silveira Neto S., Carvalho R. P. L., Baptista G. C., Berti Filho E., Parra J. R. P., Zucchi R. A., Alves S. B., Vendramim J. D., Marchini L C, Lopes J. R. S. & Omoto, C. 2002. Entomologia Agrícola. Piracicaba, FEALQ. p. 474.

Hensley, S. D. & Hammond A. H. 1968. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. Journal of Economic Entomology, Lanham, v. 61, n. 6, p. 1742-1743.

Lima, A. A. 2011. Comparação de dietas artificiais para a criação de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e avaliação da qualidade de *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) em criações massais. (Dissertação de Mestrado) Instituto biológico -SP, p. 87.

Melo, A. B. P. & Parra J. R. P. 1988. Biologia de *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) em diferentes temperaturas. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 23, n. 7, p. 663-680.

Milano, P., Berti Filho E., Parra J. R. P., Oda M. L. C. Consoli., F. L.. 2010. Efeito da alimentação da fase adulta na reprodução e longevidade de espécies de Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elasmobranchidae. Neotropical Entomology, Londrina, v. 39, n. 2, p. 172-180.

Nicrom Química Ltda. 2017. Ficha de Informação e Segurança do Produto Químico – Formaldeído. Disponível em: <http://nicromquimica.com.br/produtos/cosmeticos/#wpcf7-f156-p597>-Acesso em 10 janeiro.

Oswaldo Cruz. 2017. Ácido acetilsalicílico. Disponível em: <https://www.oswaldocruz.br/download/fichas/%C3%81cido%20acetilsalic%C3%ADlico2003.pdf>, Acesso em 24 de janeiro de 2017.

Parra, J. R. P, Melo A. B. P., Magalhães B. P., Silveira neto S., Botelho P. S. M.. 1983. Efeito do fotoperíodo no ciclo biológico de *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794)



(Lepidoptera: Pyralidae). Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 18, n. 5, p. 463-472.

Parra, J. R. P, Mihsfeldt L. H. 1992. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: Anderson, T. E.; Leppla, N. C (Ed.) Advances in insect rearing for research and pest management. San Francisco: Westview Press, p. 195-209.

Parra, J. R. P. & R. A. Zucchi. 1997. *Trichogramma* e o controle biológico aplicado. Piracicaba: ESALQ/FEALQ SPp. 324.

Parra, J. R. P. 2002. Controle biológico: uma visão inter e multidisciplinar. In: Parra, J. R. P.; P. S. M. Botelho, B. S. Correa-Ferreira, J. M. S. Bento. (eds.) Controle biológico no Brasil. São Paulo: Manole, Cp.8, p. 125-142.

Parra, J. R. P. 2009. A evolução das dietas artificiais e suas interações em ciência e tecnologia. In: Panizzi, A. R. & J. R. P. Parra. (Ed.). Bioecologia e nutrição de insetos: Base para o manejo integrado de pragas. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica, p. 91-174.

Parra, J. R. P. 2015. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. 6 ed. Piracicaba: Esalq/Fealq.

Pinto, A. S., Cano M. A. V. & Santos E. M.. 2006. A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis*In: PINTO, A. S. (ed.). Controle de pragas da cana-de-açúcar. Sertãozinho: Biocontrol, (Boletim técnico Biocontrol, n.1) p. 64.

Sikorowski, P. P. & Thompson A. C. 1984. Effects of bacterial contamination on development and blood chemistry of *Heliothis virescens*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, v. 77, n. 2, p. 283-285.

Silveira Neto, S., Nakano O., Barbin D. & Villa Nova N. A. 1976. Manual de ecologia dos insetos. Piracicaba: Ceres, p. 419, 1976.

Silva, C. C. M. da, Marques E. J., Oliveira V. J. & Valente E. C. N. 2012. Preference of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) for *Diatraea* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Scientiarum. Agronomy. Maringá*, v. 34, n. 1, p. 23-27.

Silva, M. G. M. F. 2012. Replacement of formaldehyde in the artificial diet for rearing *diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae): Effect on the biology of the host and its parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). São Paulo. Dissertation (Mestrado em Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e o Ambiente) – Instituto Biológico.

Soares Junior, G. G. 1992. Problems with entomopatogens in insects rearing. In: Anderson, T. E., Leppa, N. C. (Ed) *Advances in insentc rearing for research & management*. Westview Press, Boulder, p. 289-322.

Souza, A. M. L. 1999. Adequação de recipientes, para criação em dietas artificiais, de pragas com comportamentos variáveis. Dissertação (Mestrado em Entomologia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba.

Wongsiri, T., N. M. A. Randolph. 1962. Comparison of the biology of the sugarcane borer on artificial and natural diets. *Journal of Economic Entomology*, Lanham, v. 55, n. 4, p. 472-477, 1962.

## CAPÍTULO 2

Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

Suélen Cristina da Silva Moreira<sup>a</sup>, Crébio José Ávila<sup>b</sup>, Harley Nonato de Oliveira<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados

<sup>b</sup>Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Caixa Postal 322, 79804-980 Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. E-mail: suelenbiotec@hotmail.com

\*O trabalho segue as normas da revista Brasileira de Entomologia com adaptações as normas de redação da dissertações e teses do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade.

Alternative anticontaminants as substitutes of formaldehyde in the artificial diet for rearing *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

**ABSTRACT** - *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) is a polyphagous species that has caused damages in several cultures of Brazil and the world. The maintenance of colonies is essential for the development of effective strategies to control this pest. Formaldehyde has been widely used as anticontaminants in artificial diets for breeding insects. The objective of this study was to evaluate the anticontaminants and its respective doses/concentrations: AAS (acetylsalicylic acid) (1g and 2g/diet), sorbic acid (1,85g and 3,7g/diet) and benzoic acid (1,85 and 3,7 g/diet), replacing the use of formaldehyde in artificial diets for the creation of *H. armigera*, also having the standard treatment (formaldehyde) and a control, in which the effect of these products on the biological characteristics of this insect-plague. The experimental design was a completely randomized design with eight treatments and 10 replicates, each replicate consisting of 10 caterpillars. The *H. armigera* caterpillars were fed diets containing different pollutants, and the contamination inside the tubes was evaluated, the period and the embryonic, larval and pupal viability and pupal weight. When they became adults, 20 couples of each treatment were individualized in oviposition cages for reproductive and longevity studies. The higher doses/concentrations of the products tested may substitute for formaldehyde in the diets because they ensure greater effectiveness in the control of microorganisms. However, among the different anticontaminants studied, benzoic acid was considered at the highest concentration (3.7 g) as the most suitable for the creation of *H. armigera*.

**KEY WORDS:** Biological characteristics, insect breeding, life table

RESUMO - *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie polífaga que tem causado danos em diversas culturas do Brasil e do mundo. A manutenção de colônias é imprescindível para o desenvolvimento de estratégias efetivas de controle dessa praga. O formaldeído tem sido amplamente utilizado como anticontaminante em dietas artificiais para criação de insetos. Objetivou-se com esse trabalho avaliar os anticontaminantes e suas respectivas doses/concentrações avaliadas: AAS (ácido acetilsalicílico) (1g e 2g/dieta), ácido sórbico (1,85g e 3,7g/dieta) e ácido benzoico (1,85g e 3,7g/dieta), em substituição ao uso de formaldeído em dietas artificiais para a criação de *H. armigera*, tendo também no ensaio o tratamento padrão (formaldeído) e uma testemunha, verificando-se o efeito desses produtos sobre as características biológicas desse inseto-praga. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com oito tratamentos e 10 repetições, sendo cada repetição constituída por 10 lagartas. As lagartas de *H. armigera* foram alimentadas com dietas contendo diferentes anticontaminantes, sendo avaliada a contaminação no interior dos tubos, o período e a viabilidade embrionária, larval e pupal e peso de pupas. Quando se tornaram adultos, 20 casais de cada tratamento foram individualizados em gaiolas de oviposição para estudos da fase reprodutiva e longevidade. As maiores doses/concentrações dos produtos testados podem substituir o formaldeído nas dietas por assegurarem maior eficácia no controle de microorganismos. Todavia, dentre os diferentes anticontaminantes estudados considera-se o ácido benzoico na maior concentração testada (3,7g) como o mais adequado para criação de *H. armigera*.

PALAVRAS-CHAVE: Tabela de vida, características biológicas, criação de inseto

## Introdução

*Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é um lepidóptero da família Noctuidae, subfamília Heliothinae, que foi constatada no Brasil no ano de 2013, causando danos em diversos cultivos de importância econômica na região do cerrado brasileiro (Czepak et al., 2013). Até então, essa praga não havia sido registrada no continente americano e era considerada praga quarentenária A1 no Brasil (Ávila et al., 2013). Essa espécie pode afetar negativamente altos valores de colheita em várias culturas de importância econômica, decorrente do seu ataque em detrimento da sua alimentação especialmente nas estruturas reprodutivas das plantas, podendo estar dispersa em praticamente todas as regiões agrícolas do país (Ávila et al., 2013)

As lagartas podem causar danos nas culturas de algodão, milho, soja, feijão, tomate e sorgo, quando se alimentam das folhas, hastes e estruturas reprodutivas das plantas causando deformações ou podridões nestas estruturas ou até mesmo a sua queda (Ávila et al., 2013).

O controle de *H. armigera* empregando-se inseticidas químicos tem sido o mais utilizado, em razão de ser, muitas vezes, uma alternativa de controle de ação rápida, confiável e econômica. No entanto, o controle biológico de *H. armigera* necessita ser explorado nas condições brasileiras (Ávila et al., 2013).

Para a tomada de decisão no controle de *H. armigera*, informações sobre a bioecologia podem servir de auxílio no seu manejo para mantê-la abaixo do nível de dano econômico (Razmjou & Naseri, 2014). Dessa forma, a manutenção de colônias de inseto é imprescindível para o desenvolvimento de estratégias efetivas de controle dessa praga, não somente para realização de pesquisas aplicadas, como também daquelas básicas, as quais exigem suprimento contínuo de insetos para a realização dos experimentos (Parra, 2015).

Os grandes avanços nas técnicas de criação de insetos surgiram a partir da década de 1960 especialmente nos países desenvolvidos, sendo que 85% das dietas foram desenvolvidas para os insetos fitófagos pertencentes às Ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, sendo referidas dietas artificiais para mais de 1.300 espécies de insetos (Parra, 2015).

Uma dieta nutricionalmente completa deve conter todos, ou pelo menos a maioria dos elementos necessários ao desenvolvimento dos insetos e devem ser adequadamente balanceados (Smith, 1996). No entanto, as dietas semilíquidas utilizadas para criação de insetos fitófagos mastigadores são facilmente contaminadas por

microorganismos e dessa forma, exige medidas preventivas através do uso de anticontaminantes (Parra, 2015).

Dentre os agentes químicos mais utilizados como anticontaminantes em dietas artificiais para a criação de insetos destaca-se o uso de formaldeído. Todavia, essa substância apresenta alta toxicidade para o ser humano, quando manipulado inadequadamente, podendo causar irritação das vias respiratórias, sensibilidade imunológica imediata, mutagênese e até mesmo carcinogênese (Nicon, 2017), sendo o risco do uso do formol maior, quanto utilizado em maiores concentrações (Anvisa, 2017).

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a eficácia de anticontaminantes ácido acetilsalicílico, ácido sórbico e ácido benzoico em substituição ao uso do formaldeído na dieta artificial para a criação de *H.armigera* verificando os efeitos nas suas características biológicas.

## **Material e Métodos**

Os trabalhos foram realizados nos Laboratórios de Entomologia e de Controle Biológico da Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados, MS.

### **Criação de *H. armigera***

Adultos de *H. armigera* (ANEXO III, fig. A) (20 machos e 30 fêmeas) foram mantidos em gaiolas de PVC (10 cm x 22 cm) (ANEXO III, fig. B) em sala climatizada na temperatura de  $25 \pm 1$  °C, umidade relativa (UR) de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas, tendo na sua parte superior um tecido do tipo “voil” onde foram realizadas as posturas. Os ovos oriundos dessas posturas foram retirados diariamente do substrato de oviposição e colocados em bandejas contendo pedaços de dieta, onde permaneceram até eclosão das lagartas (ANEXO III, fig. C). A dieta artificial de Greene et al., (1976) constituída basicamente de feijão branco, proteínas, vitaminas e anticontaminantes foi previamente preparada (ANEXO III, fig. D), recortada e colocada em copos descartáveis transparentes (ANEXO III, fig. E), onde as lagartas após sua completa eclosão foram individualizadas. As lagartas foram mantidas nos recipientes contendo dieta artificial até atingirem a fase de pupa. As pupas foram separadas por sexo, e

transferidas para outro recipiente contendo vermiculita (ANEXO III, fig. F), onde ocorre a emergência dos adultos, os quais foram transferidos para as gaiolas de criação, reiniciando-se assim um novo ciclo.

### **Preparo das dietas para criação de *H. armigera***

As dietas artificiais utilizadas para a criação de lagartas de *H. armigera* foram preparadas com base na metodologia proposta por Greene et al., (1976) como segue: Inicialmente pesou-se o germe de trigo, a proteína de soja, a caseína e a levedura, sendo esses ingredientes acondicionados em um primeiro recipiente. Em um segundo recipiente pesou-se o ágar e um terceiro colocou-se o ácido ascórbico, a tetraciclina e o nipagin. Em um quarto recipiente adicionou-se a solução vitamínica e o formaldeído. O feijão branco foi pesado e cozido por 20 a 25 minutos. A água destilada foi medida e levada ao fogo até que começasse a ferver, sendo esta dividida posteriormente em duas partes. Com uma das partes de água, procedeu-se a homogeneização dos componentes do primeiro recipiente em liquidificador juntamente com o feijão branco cozido. Na outra parte de água, o ágar foi aquecido, sendo este homogeneizado mantido no fogo até ferver. Nesse momento, o conteúdo do liquidificador foi adicionado ao ágar no fogo, esta mistura foi homogeneizada constantemente até que o conteúdo do recipiente começasse a ferver novamente e se engrossasse. O conteúdo do terceiro e do quarto recipiente foi adicionado somente depois que o fogo foi desligado e quando essa mistura resfriada atingiu a temperatura próxima dos 60°C. A dieta pronta foi colocada em bandejas, que após resfriada foi recortada e transferida para os copos plásticos para alimentação das lagartas (O esquema do preparo da dieta de *H. armigera* pode ser observado no Anexo IV).

A quantidade dos componentes das dietas (g ou mL/dieta) com os diferentes anticontaminantes foram detalhados na Tabela 1.



**Tabela 1**

Componentes (g ou mL/dieta) da dieta utilizadas na avaliação do desenvolvimento de *H. armigera* contendo diferentes anticontaminantes.

Componentes	Diets							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Feijão branco (g)	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5
Germe de trigo (g)	90	90	90	90	90	90	90	90
Proteína de soja (g)	45	45	45	45	45	45	45	45
Caseína	45	45	45	45	45	45	45	45
Levedura	56,3	56,3	56,3	56,3	56,3	56,3	56,3	56,3
Ácido Ascórbico (g)	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4
Solução Vitamínica <sup>2</sup> (mL)	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5
Metil-p-hidroxibenzoato (Nipagin) (g)	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Tetraciclina 500mg (g)	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Ágar (g)	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5
Água destilada (mL)	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800
Formaldeído (37%) (mL)	-	4,5	-	-	-	-	-	-
Ácido acetilsalicílico 500mg (g)	-	5,4	1,00	2,00	-	-	-	-
Ácido sórbico (g)	-	-	-	-	1,85	3,70	-	-
Ácido benzoico (g)	-	-	-	-	-	-	1,85	3,70

<sup>1</sup>Carbonato de cálcio: 21,000; Fosfato de cálcio: 14,900; Sulfato de cobre X 5H<sub>2</sub>O: 0,039; Fosfato férrico: 1,470; Sulfato de magnésio: 9,000; Sulfato manganoso: 0,020; Sulfato de potássio e alumínio: 0,009; Cloreto de potássio: 12,000; Iodeto de potássio: 0,005; Monofosfato de potássio: 31,000; Cloreto de sódio: 10,500; Fluoreto de sódio: 0,057. Quantidade em porcentagem.

<sup>22</sup> Niacinamida: 0,5g; Pantotenato de cálcio: 0,5g; Riboflavina: 0,25g; Tiamina: 0,125g; Piridoxina: 0,125g; Ácido fólico: 0,5g; Biotina: 0,02 mg; Vitamina B12 - Cianocobalina 1mg, Água destilada QSP 500ml. Quantidade para 500mL de solução

1-Testemunha; 2-Formaldeído; 3-AAS 1,85g; 4- AAS 3,7g; 5-Ácido sórbico 1,85g; 6-Ácido sórbico 3,7g, 7-Ácido Benzoico 1,85; 8-Ácido benzoico 3,7g.

## **Avaliação de anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído em dieta artificial para criação de *H. armigera***

Foram testados duas doses/concentrações de três diferentes anticontaminantes disponíveis no mercado na dieta de *H. armigera*, sendo o formaldeído avaliado na concentração de 5,4 ml/dieta e considerado o tratamento padrão. Os três anticontaminantes e suas respectivas doses avaliadas foram: ácido acetilsalicílico (1g e 2g/dieta), ácido sórbico (1,85g e 3,7g/dieta) e ácido benzóico (1,85g e 3,7g/dieta), além do padrão formaldeído (5,4 mL/dieta) e uma testemunha onde nenhum desses anticontaminante foi adicionado.

Os produtos anticontaminantes testados: ácido benzoico (DL50 para ratos de >2000 mg/kg) ácido sórbico (DL50 para ratos de 3800 a 4300mg/kg) apresentam toxicidade aguda pelo menos dez vezes menor que a do formaldeído (DL50 para ratos de 800 mg/kg) e as doses foram estabelecidas considerando-se a literatura (Eduardo 2015). Para o AAS (DL para ratos 200mg/kg) (Oswaldo Cruz 2003), procedeu-se alguns testes em laboratório que foram considerados satisfatórios para incluir este ácido no ensaio.

Todas as fases de desenvolvimento de *H. armigera* foram mantidas em sala climatizada, reguladas na temperatura de  $25 \pm 1$  °C, umidade relativa (UR) de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12horas. O desenvolvimento das lagartas foi acompanhado diariamente, registrando-se a ocorrência de contaminações nos tubos de ensaio, a duração em dias e viabilidade em percentagem da fase larval. A contaminação foi avaliada visualmente, anotando-se quando ocorria no interior dos tubos de dieta, o crescimento de fungos e a formação de colônias de bactérias.

Quando as lagartas transformaram-se em pupas, estas foram retiradas da dieta artificial cerca de após 24 horas após a pupação, sendo o seu peso registrado com uma balança analítica de precisão. É importante que todas as pupas sejam pesadas com mesma idade, pois com o passar do tempo há perda de água pela pupa o que pode levar a erros grosseiros (Parra, 2015). Em seguida, as pupas foram separadas por sexo sob estereomicroscópio e individualizadas em copos transparentes descartáveis de polietileno com capacidade de 50 mL, sendo avaliada a duração em dias e viabilidade em percentagem dessa fase.

Após a emergência dos adultos de *H. armigera*, 20 casais com a mesma idade foram individualizados para copularem gaiolas de tubo PVC medindo 10 cm de diâmetro por 22 cm de altura as quais tinha na base uma placa gerbox forrada com papel filtro na base e um recipiente com mel diluído a 10% em água, que era fornecido às mariposas através de rolo dental de algodão imerso na solução de mel, esse alimento foi renovado diariamente, pois segundo Parra, (2009) as soluções açucaradas podem fermentar e prejudicar o desenvolvimento do inseto. A extremidade superior da gaiola era forrada com tecido tipo “tule” que servia com substrato de oviposição de *H. armigera*. Diariamente o tule era retirado para a contagem dos ovos, registrando-se o número de ovos colocados e eventualmente a morte das mariposas para estudos da fase reprodutiva e longevidade.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), constituído dos oito tratamentos do ensaio em 10 repetições, sendo cada repetição representada por 10 lagartas de *H. armigera* mantidas na dieta.

Quando as fêmeas de *H. armigera* fizeram a segunda postura, cerca de 50 ovos de cada casal foram separados e acondicionando-os em gerbox, sendo registrado o período de incubação dos ovos e o número de lagartas que eclodiram das posturas para determinar a duração em dias e a viabilidade em percentagem dessa fase de desenvolvimento. Esta padronização de postura é recomendada por Parra, (2015) para estudo de biologia comparando dietas. Durante a fase reprodutiva foi também determinado os períodos de pré-oviposição, oviposição, pós-oviposição, e número diário e total de ovos colocados pelas fêmeas. Os dados foram submetidos à análise de variância, e quando constatado efeito significativo de tratamento, as médias foram comparadas pelo teste de Skott-knott a 5% de probabilidade.

## **Tabela de vida de fertilidade de *H. armigera***

Para comparação da adequação de diferentes dietas na criação de insetos, normalmente tem sido utilizado a tabela de vida e de fertilidade. Para obtenção dos dados da tabela de vida de fertilidade utilizaram-se adultos fêmea de *H. armigera* baseando-se em Silveira Neto et al., (1976) calculando-se os seguintes parâmetros:

$$R_o = \sum m_x \cdot l_x$$

$$T = \sum (m_x \cdot l_x \cdot x) / (\sum m_x \cdot l_x)$$

$$r_m = \ln R_o / T$$

$$TD = \ln (2) / r_m$$

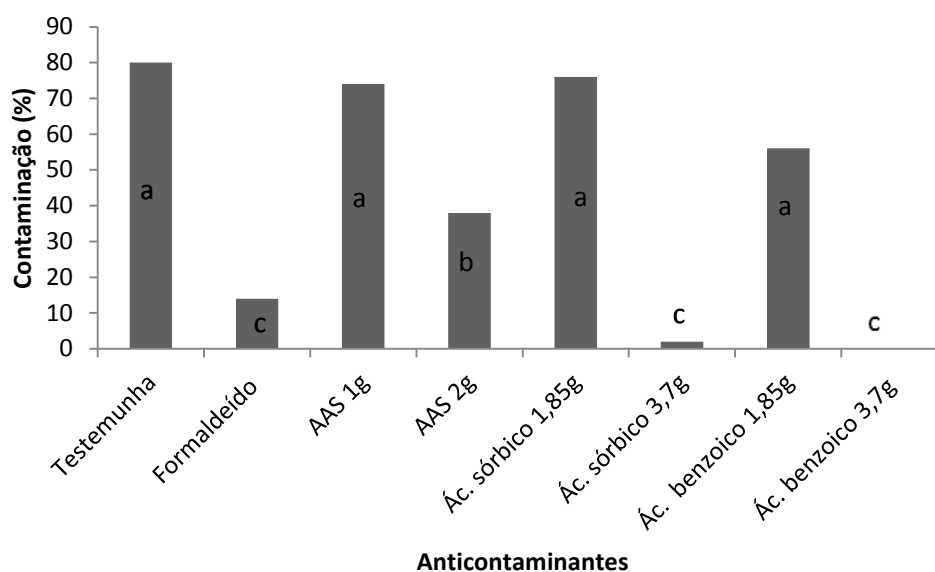
$$\lambda = e^{r_m}$$

onde,  $R_o$  é a taxa líquida de reprodução, que corresponde ao número de vezes que a população cresce durante o ciclo de vida;  $T$  é o intervalo de tempo entre cada geração (dias);  $r_m$  é a capacidade inata de aumentar em número;  $TD$  é o tempo que leva para a população duplicar em número;  $\lambda$  é a razão finita de aumento populacional, que corresponde ao número de indivíduos adicionados á população/fêmea/dia que darão origem a fêmeas;  $m_x$  é o número de descendentes produzidos/fêmea no estágio  $x$  (fertilidade específica) e que produzirão fêmeas;  $l_x$  é a taxa de sobrevivência e  $m_x \cdot l_x$  é o total de fêmeas produzidas/fêmea durante o intervalo de tempo. Para calcular  $m_x$  usou-se a razão sexual, que foi determinada dividindo-se o número de fêmeas pelo somatório do número de fêmeas + machos (Silveira Neto et al., 1976).

## **Resultados e discussão**

### **Avaliação de anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído em dieta artificial para criação de *H. armigera***

A contaminação nos tubos de dieta artificial de criação de lagartas de *H. armigera* foi menor nos tratamentos com formaldeído e com as maiores concentrações de ácido sórbico e de ácido benzoico, seguidos pelo tratamento contendo a maior dose de ASS (Figura 3). Nos demais tratamentos com anticontaminantes, a contaminação no interior dos tubos não diferiram daquele verificado no tratamento testemunha (Figura 3).



**Figura 2.**

Contaminação nos tubos de dieta artificial de *H. armigera* contendo diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas. Barras seguidas de mesma letra, as médias não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Skott-knott ( $p < 0,05$ ).

Os menores índices de contaminação observados nos tratamentos contendo as maiores doses/concentrações dos anticontaminantes utilizados neste estudo atesta a efetividade antimicrobiana destes quando adicionados na dieta artificial para criação de *H. armigera*. No entanto nesse caso, não ocorre lavagem de ovos ou seja a desinfecção com sulfato de cobre como é comumente recomendado pela literatura para metodologia de criação de *Diatraea saccharalis*, o que possivelmente contribuiu para a maior contaminação observada na dieta de criação de *H. armigera* nos tratamentos onde haviam menor doses/concentrações dos produtos testados. Os anticontaminantes avaliados neste estudo têm sido comumente referidos na literatura para uso em dietas artificiais de criação de insetos (Parra & Zucchi, 1997; Alverson & Conhen, 2002; Parra, 2015).

O período embrionário de ovos advindos da reprodução de *H. armigera* após sua criação nas dietas com os diferentes anticontaminantes foi maior nos tratamentos com ácido sórbico em ambas as concentrações estudadas, enquanto nos demais tratamentos o período embrionário foi semelhante aquele observado na testemunha (Tabela 2).

**Tabela 2.**

Duração (dias) das diferentes fases de desenvolvimento e viabilidade (%) de ovo, de lagarta e de pupa de *H. armigera* quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	Duração (dias)			Viabilidade (%)		
	Ovo	Lagarta	Pupa	Ovo	Lagarta	Pupa
Testemunha	5,15±0,2 b <sup>1</sup>	22,09±0,9 a	14,61±0,8 a	38,8 a	38,0 c	72,17 a
Formaldeído	5,30±0,2 b	21,09±0,4 a	16,61±0,8 a	32,0 a	68,0 b	92,55 a
AAS 1g	4,95±0,4 b	22,11±0,8 a	16,19±1,0 a	35,2 a	60,0 b	82,07 a
AAS 2g	5,10±0,0 b	21,82±0,9 a	15,13±0,6 a	38,3 a	61,0 b	65,45 a
Ácido sórbico 1,85	5,75±0,2 a	21,95±0,8 a	15,31±0,4 a	26,9 a	62,0 b	80,07 a
Ácido sórbico 3,7g	5,55±0,2 a	20,23±0,2 a	16,33±0,2 a	52,1 a	82,0 a	81,41 a
Ácido benzoico 1,85g	5,15±0,2 b	22,46±1,5 a	15,29±0,8 a	41,9 a	59,0 b	84,30 a
Ácido benzoico 3,7g	5,00±0,0 b	20,43±0,5 a	16,74±0,4 a	44,1 a	74,0 a	88,04 a

<sup>1</sup>Médias± EP seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Skott-knott ( $p<0,05$ ).

Segundo Dunkel & Read, (1991) algumas famílias da ordem Lepidoptera podem ser afetadas pelo ácido sórbico. Esses autores constataram ainda efeito negativo do ácido sórbico no desenvolvimento dos insetos em especial para o estágio embrionário, semelhante aos resultados deste estudo. Já a viabilidade da fase de ovo não foi influenciada pelos diferentes tratamentos aplicados na dieta artificial (Tabela 2). A viabilidade dessa fase não foi influenciada pelo uso de anticontaminantes, tão pouco foi prejudicada pela presença de microorganismos. Em contrapartida Sikorowski & Thompson, (1984) ao estudar bactérias contaminantes em dieta artificial para criação de *Heliothis virescens* (Fabricius), observaram efeitos prejudiciais dos anticontaminantes testados na eclosão dos ovos.

A duração da fase larval foi também semelhante entre os diferentes tratamentos aplicados na dieta, enquanto que a viabilidade dessa fase de desenvolvimento foi significativamente maior nos tratamentos com as maiores concentrações de ácido sórbico e ácido benzoico (Tabela 2), enquanto nos demais tratamentos a viabilidade da fase larval foi menor, diferindo da testemunha, que foi o tratamento que mais afetou a viabilidade de lagartas (Tabela 2), evidenciando que a contaminação da dieta pode prejudicar o desenvolvimento dos insetos. Segundo Eduardo et al., (2015) a melhor sanidade de uma dieta pode ser um fator de fagoestimulação, que proporciona uma maior qualidade e ingestão de alimento, promovendo a produção de insetos com melhor qualidade. Sikorowski & Thompson, (1984) estudaram o efeito de microorganismos contaminantes em dietas artificial para criação de *H. virescens* e observaram uma diminuição significativa do ácido úrico detectada no sangue desse inseto, indicando aumento da excreção de água nas fezes. Verificou também um aumento significativo inexplicado de colesterol no sangue das larvas quando contaminadas.

A duração e a viabilidade da fase de pupas não foram afetadas pelo uso dos anticontaminantes na dieta bem como não apresentaram diferenças do tratamento testemunha (Tabela 2), evidenciando que os anticontaminantes aplicados na dieta artificial não interferem no desenvolvimento e na sobrevivência deste estágio de desenvolvimento de *H. armigera*.

Os pesos de pupas machos e de fêmeas, não foram influenciados pelos diferentes tratamentos aplicados na dieta artificial (Tabela 3), bem como a longevidade de machos e de fêmeas de adultos de *H. armigera* que foram semelhantes em todos os tratamentos do ensaio (Tabela 4).

**Tabela 3**

Peso (g) de pupas de *H. armigera* (macho e fêmea), quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	Peso de pupas (g)	
	Macho	Fêmea
Testemunha	0,397±0,03 a <sup>1</sup>	0,378±0,02 a
Formaldeído	0,416±0,01 a	0,399±0,01 a
AAS 1g	0,403±0,01 a	0,367±0,03 a
AAS 2g	0,401±0,03 a	0,388±0,02 a
Ácido sórbico 1,85g	0,409±0,03 a	0,414±0,00 a
Ácido sórbico 3,7g	0,420±0,02 a	0,404±0,01 a
Ácido benzoico 1,85g	0,401±0,01 a	0,389±0,05 a
Ácido benzoico 3,7g	0,407±0,02 a	0,402±0,02 a

<sup>1</sup>Médias± EP seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Skott-knott ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4**

Longevidade de adultos, de *H. armigera* (macho e fêmea), quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	Longevidade	
	Macho	Fêmea
Testemunha	6,2±0,5 a	8,5±0,9 a
Formaldeído	9,7±2,4 a	9,7±0,2 a
AAS 1g	9,0±1,3 a	8,8±1,3 a
AAS 2g	9,1±0,8 a	7,1±0,9 a
Ácido sórbico 1,85g	7,2± 2,3 a	9,2±1,4 a
Ácido sórbico 3,7g	6,0±1,9 a	7,9 ±2,5 a
Ácido benzoico 1,85g	9,6±2,0 a	8,4±0,8 a
Ácido benzoico 3,7g	8,1±1,5 a	9,1± 2,4 a

<sup>1</sup>Médias± EP seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Skott-knott ( $p < 0,05$ ).



Com relação aos parâmetros avaliados durante a fase reprodutiva de *H.armigera*, tais como período de pré-oviposição, de oviposição e de pós-oviposição, bem como a fecundidade diária e total de ovos colocados por fêmea não foram influenciados pelo uso dos anticontaminantes na dieta, sendo todos semelhantes quando comparados ao tratamento testemunha (Tabela 5).

**Tabela 5.**

Duração (dias) do período de pré-oviposição, oviposição, pós-oviposição, fecundidade diária e total de *H. armigera* quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	Pré-oviposição(dias)	Oviposição (dias)	Pós-oviposição(dias)	Fecundidade	
				Diária	Total
Testemunha	2,4±0,2 a	4,9±0,4 a	2±1,0 a	78,28±28,3 a	456,60±217,0 a
Formaldeído	2,1±0,3 a	5,7±0,8 a	1,7±0,3 a	113,51±9,8 a	603,80±85,9 a
AAS 1g	2,3±0,5 a	4,4±0,6 a	2,4±0,5 a	60,67±19,6 a	220,10±87,8 a
AAS 2g	3,4±0,4 a	3,9±0,3 a	1,3±0,6 a	122,10±64,2 a	456,70±137,0 a
Ácido sórbico 1,85g	2,6±0,3 a	5,8±1,4 a	1,1±0,3 a	80,15±31,9 a	486,80±210,9a
Ácido sórbico 3,7g	3,1±0,2 a	4,1±0,5a	1,9±0,3 a	78,18±29,0 a	349,30±131,6 a
Ácido benzoico 1,85g	2,6±0,7a	4,8±0,5a	1,2±0,4 a	122,57±54,9 a	540,17±22,8 a
Ácido benzoico 3,7g	3,8±0,8 a	4,4± 0,9a	2,6±0,4 a	93,84±26,5 a	380,70±188,7 a

<sup>1</sup>Médias± EP seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Skott-knott ( $p < 0,05$ )

### **Tabela de vida de fertilidade de *H. armigera* criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes**

A taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ) de fêmeas de *H. armigera* foi significativamente maior para os insetos alimentados com dietas contendo formaldeído, seguido pelos tratamentos com ambas as concentrações de ácido benzoico e com a maior concentração de ácido sórbico, os quais superaram todos os demais tratamentos, em especial a testemunha que apresentou a menor taxa líquida de reprodução (Tabela 6). Já a taxa intrínseca de crescimento ( $R_m$ ) e a razão finita de aumento ( $\lambda$ ) foram maiores no tratamento com formaldeído e naquele com a maior concentração de ácido benzoico, enquanto o menor valor desses dois parâmetros foi verificado na testemunha, que apresentou novamente o menor valor, sendo significativamente inferior a todos os demais tratamentos do ensaio (Tabela 6). O intervalo de tempo entre as gerações ( $T$ ) de *H. armigera* foi inferior com ácido benzoico em ambas as concentrações testadas, não diferindo daquele observado com a menor concentração de ácido sórbico e com a testemunha, enquanto os demais tratamentos apresentaram valores de  $T$  significativamente superiores (Tabela 6). Quanto o tempo gasto para a população de *H. armigera* duplicar em número (TD), verificou-se que os menores valores foram observados nos tratamentos com formaldeído, com ácido benzoico, nas duas concentrações testadas e com a menor de ácido sórbico ao passo que o maior TD foi observado no tratamento testemunha (Tabela 6).

### **Tabela 6.**

Taxa líquida de reprodução (Ro), capacidade inata de aumentar em número (rm), razão finita de aumento ( $\lambda$ ), tempo entre cada geração (T) e tempo de duplicação da população (TD), de *H. armigera* quando criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	Ro	Rm	$\lambda$	T	TD
Testemunha	27,31	0,087	1,090	34,51	7,56
Formaldeído	183,22	0,140	1,150	36,08	4,79
AAS 1g	78,05	0,118	1,280	35,80	5,70
AAS 2g	86,82	0,120	1,290	35,82	5,52
Ácido sórbico 1,85	126,26	0,135	1,440	34,30	4,93
Ácido sórbico 3,7g	137,77	0,131	1,410	35,90	5,05
Ácido benzoico 1,85g	145,62	0,136	1,450	35,19	4,89
Ácido benzoico 3,7g	145,06	0,139	1,490	34,86	4,85

O tratamento testemunha, talvez devido a baixa sobrevivência observada durante a fase larval em decorrência da contaminação, foi aquele mais prejudicado nas características da tabela de vida, seguido por aqueles tratamentos com ácido acetilsalicílico. Os tratamentos contendo ácido benzoico e sórbico destacaram-se por apresentarem maior crescimento dentro desses respectivos grupos.

As maiores doses dos produtos testados podem substituir o formaldeído na dieta por assegurarem maior eficácia no controle de microorganismos. Todavia, dentre os diferentes anticontaminantes estudados considera-se o ácido benzoico na maior concentração testada (3,7g) como o mais adequado para criação de *H. armigera*.

### **Agradecimentos**

À Universidade Federal da grande Dourados, Embrapa agropecuária Oeste e a CAPES pelo apoio financeiro.

## Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. 2017. Cosmético: Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/cosmeticos>, Acessado em 10 de janeiro 2017.

Alverson. J. & Conhen . A. C. 2002. Effect of Antifungal Agents on Biological Fitness of *Lygus Hesperus* (Heteroptera: Miridae) Journal of economic entomology, v. 95, n. 2, p. 256- 260.

Ávila, C. J., Vivan L. M. & Tomquelski G. V. 2013. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. Dourados: Embrapa. (Circular Técnica, 23).

Czepak, C., Albernaz K. C., Vivan L. M., Guimarães H. O. & Carvalhais T. 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 110-113.

Dunkel, F. V. & Read N. R. 1991. Review of the Effect of Sorbic Acid on Insect Survival in Rearing Diets with Reference to Other Antimicrobials. American Entomologisty, v. 37, n. 3, p. 172-178.

Eduardo, W. L., Almeida L. F. V., Moraes R. F. de O., Santos J. A. dos, Martin C. C. & Bortoli S. A. de. 2015. Alternativa ao uso de formaldeído em dieta artificial para *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). Congresso Brasileiro de Fitossanidade. Águas de Lindóia-SP.

Greene, G. L., Leppla N. C. & Dickerson W. A., 1976. Velvet bean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. Journal of Economic Entomology, v. 69, n. 4, p. 487-488.

Nicrom Química Ltda. 2017. Ficha de Informação e Segurança do Produto Químico – Formaldeído. Disponível em:

<http://nicromquimica.com.br/produtos/cosmeticos/#wpcf7-f156-p597>-Acessado em 10 janeiro.

Oswaldo Cruz. 2017. Ácido acetilsalicílico. Disponível em: [https://www.oswaldocruz.br/download/fichas/%C3%81cido%20acetilsalic%C3%ADlico2003 .pdf](https://www.oswaldocruz.br/download/fichas/%C3%81cido%20acetilsalic%C3%ADlico2003.pdf), Acesso em 24 de janeiro de 2017.

Parra, J. R. P. & Zucchi R. A. 1997. *Trichogramma* e o controle biológico aplicado. Piracicaba: ESALQ/FEALQ SP p.324.

Parra, J. R. P. 2009. A evolução das dietas artificiais e suas interações em ciência e tecnologia. In: Panizzi, A. R. & Parra, J. R. P. (Ed.). Bioecologia e nutrição de insetos: Base para o manejo integrado de pragas. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica, p. 91-174.

Parra, J. R. P. 2015. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba: ESALQ/FEALQ.

Razmjou, J. & Naseri B. 2014. Comparative performance of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants. Journal Pest Science, Netherlands v.,87, p. 29–37.

Sikorowski, P. P. & Thompson A. C. 1984. Effects of bacterial contamination on development and blood chemistry of *Heliothis virescens*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, v. 77, n. 2, p. 283-285.

Silveira neto, S., Nakano O., Barbin D. & Villa Nova N. A. 1979. Manual de ecologia dos insetos. Piracicaba: Ceres, p. 419.

Smith, C. N. 1996. Insect colonization and mass production. New York; Academic, p. 618.

### CAPÍTULO 3

Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) visando a multiplicação dos parasitoides *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae)

Suélen Cristina da Silva Moreira<sup>a</sup>, Crébio José Ávila<sup>b</sup>, Harley Nonato de Oliveira<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados

<sup>b</sup>Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Caixa Postal 322, 79804-980 Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. E-mail: [suelenbiotec@hotmail.com](mailto:suelenbiotec@hotmail.com)

\*O trabalho segue as normas da revista Brasileira de Entomologia com adaptações as normas de redação da dissertações e teses do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade.

Alternative anticontaminants as substitutes of formaldehyde in the artificial diet for rearing *Diatraea saccharalis* for multiplication *Trichogramma galloi* and *Cotesia flavipes*.

ABSTRACT – The Formaldehyde has been widely used as an anticontaminant in artificial diets for breeding insects. However, the substance is highly toxic to humans. The objective of this work was to verify the effect of acetylsalicylic acid, sorbic acid and benzoic acid replacing formaldehyde in artificial diets for the creation of *Diatraea saccharalis* by analyzing the biological characteristics of its parasitoids *Trichogramma galloi* and *Cotesia flavipes*. The experimental design was the completely randomized with the following treatments (dose/diet): acetylsalicylic acid (3,7g), sorbic acid (3,7g) benzoic acid (3,7g) formaldehyde (1,7ml) and control. The studies of the biological characteristics of *T. galloi* and *C. flavipes* consisted of 25 replicates, and for *T. galloi* each replicate consisted of a mass of 30 eggs that were exposed for 24h to a *T. galloi* female with less than 24 hours old. For *C. flavipes*, each replicate consisted of a third instar *D. saccharalis* caterpillar inoculated by a *C. flavipes* female less than 24 hours old. The biological characteristics evaluated were: parasitism, emergence, progeny, sexual ratio, longevity and cycle length (egg-adult). The use of alternative anticontaminants tested in the artificial diets of *D. saccharalis* is feasible for the production of *T. galloi* and *C. flavipes* parasols.

KEYWORDS: Biological control, mass rearing, sugarcane borer



RESUMO - O formaldeído tem sido amplamente utilizado como anticontaminante em dietas artificiais para criação de insetos. Todavia, essa substância apresenta alta toxicidade para o ser humano. Objetivou-se com esse trabalho verificar o efeito do ácido acetilsalicílico, ácido sórbico e ácido benzoico em substituição ao formaldeído em dietas artificiais para a criação de *Diatraea saccharalis* analisando-se as características biológicas de seus parasitoides *Trichogramma galloi* e *Cotesia flavipes*. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com os seguintes tratamentos (dose/dieta): ácido acetilsalicílico (3,7g), ácido sórbico (3,7g) ácido benzoico (3,7g), formaldeído (2,7ml) e testemunha. Os estudos das características biológicas de *T. galloi* e *C. flavipes* foram constituídos por 25 repetições, sendo que para *T. galloi* cada repetição foi constituída por uma massa de 30 ovos que foram expostas por 24h a uma fêmea de *T. galloi* com menos de 24h de idade. Para *C. flavipes* cada repetição foi constituída por uma lagarta de *D. saccharalis* de terceiro ínstar, inoculada por uma fêmea de *C. flavipes* com menos de 24h de idade. As características biológicas avaliadas foram: parasitismo, emergência, progênie, razão sexual, longevidade e duração do ciclo (ovo-adulto). O uso dos anticontaminantes alternativos testados na dietas artificial de criação de *D. saccharalis* é viável para produção dos parasotoides *T. galloi* e *C. flavipes*.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, criação massal, broca-da-cana-de-açúcar

## Introdução

O Controle Biológico Aplicado é um importante componente do Manejo Integrado de Pragas, pois se trata de liberações inundativas de inimigos naturais após a sua criação massal em laboratório, visando controlar rapidamente a população da praga e a retomada do seu nível de equilíbrio (Parra et al., 2002).

Dentre os casos de sucesso do controle biológico aplicado para *Diatraea saccharalis* no Brasil e no mundo destaca-se a utilização de *Trichogramma* spp (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e de *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) os quais são utilizados, respectivamente para o controle de ovos e lagartas da broca-da-cana (Pinto et al., 2006).

Com o objetivo de reduzir as perdas causadas pela broca-da-cana-de-açúcar, foram realizados estudos sobre a possibilidade de associar no campo *Trichogramma galloi* com o parasitoide larval *C. flavipes* (Botelho & Macedo, 2002) após sua criação massal em laboratório (Parra, 2002) sendo *C. flavipes* considerada o principal inimigo natural desse inseto praga (Silva et al., 2012).

A importância de *T. galloi* é dada devido ao fato de atacar a praga no estágio de ovo, considerado o fator chave do crescimento populacional da broca-da-cana-de-açúcar (Botelho, 1992), prevenindo a ocorrência de injúrias (Pinto et al., 2006) principalmente em áreas de baixa predação de ovos (Botelho et al., 1999). Além disso, podem ser facilmente multiplicados em laboratório (Valente et al., 2016).

Para a produção de *C. flavipes*, cerca de 30 pessoas produzem em laboratórios de 10 a 20 milhões de *C. flavipes*/mês para liberações inundativas. Diante disso, criação massal é definida como uma atividade sistemática, automatizada, em instalações integradas, com o objetivo de produzir um suprimento relativamente grande de insetos para distribuição em uma aceitável relação custo/benefício (Silva & Brito, 2015).

Para os programas de Controle Biológico envolvendo parasitoides e predadores há a necessidade de criação de duas espécies de insetos, a praga ou hospedeiro alternativo e o agente de controle biológico (Parra, 2015). Contudo, são poucos os estudos que verificam a toxicidade dos anticontaminantes no desenvolvimento de parasitoides multiplicados nestes hospedeiros (Parra & Zucchi, 1997).

O formaldeído tem sido amplamente utilizado como anticontaminante em dietas artificiais para criação de insetos (Hensley & Hammond, 1968). Todavia, essa substância apresenta alta toxicidade, quando manipulado inadequadamente, podendo causar problemas a saúde humana (Nicon, 2017). O risco do formol em sua aplicação

indevida é tanto maior quanto maior a concentração e a frequência do uso (Anvisa, 2017).

A produção de agentes de controle biológico de seus hospedeiros está diretamente relacionada com a qualidade da dieta (Bueno, 2009). Existem várias maneiras de se avaliar a qualidade dos parasitoides produzidos em laboratório como por exemplo, a adequação à dieta de preferência hospedeira (Vacari et al., 2012). Assim o conteúdo da dieta pode afetar, por exemplo, a qualidade dos parasitoides, a porcentagem de parasitismo, razão sexual e a progênie (Dias et al., 2010).

Objetivou-se com esse trabalho verificar o efeito do acetilsalicílico, ácido sórbico e ácido benzóico como anticontaminantes em substituição ao uso do formaldeído em dietas artificiais para criação de *D. saccharalis* sobre as características biológicas dos parasitoides *T. galloi* e *C. flavipes*.

## **Material e Métodos**

Os trabalhos foram realizados nos Laboratórios de Entomologia e de Controle Biológico da Embrapa Agropecuária Oeste em Dourados, MS.

### **Criação de *D. saccharalis***

Adultos de *D. saccharalis* (20 machos e 30 fêmeas) foram colocados em gaiolas de PVC (10 cm x 22 cm) fechadas com tecido do tipo “voil” e mantidos na sala climatizada com a temperatura de  $25 \pm 1$  °C, umidade relativa (UR) de  $70 \pm 10$  % e fotofase de 12 horas. Essas gaiolas foram revestidas internamente com folhas de papel pardo umedecido, onde as fêmeas, após o acasalamento realizaram as suas posturas. Os ovos oriundos dessas posturas foram retirados diariamente das gaiolas de PVC e colocados em placas de Petri (9 cm de diâmetro x 2 cm altura) onde permaneceram até a eclosão das lagartas. As lagartas obtidas foram colocadas em tubos de vidro (8,5 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro), contendo a dieta artificial recomendada por Parra, (2015) que foi constituída basicamente de farelo de soja, germe de trigo, vitaminas, sais minerais e anticontaminantes, onde permaneceram até se transformarem em pupas.

As pupas foram retiradas dos tubos de vidro, sexadas de acordo com a metodologia de Butt e Cantu, (1962) e mantidas em gerbox até a emergência de adultos, reiniciando-se assim um novo ciclo (Parra, 2015).

### **Criação de *T. galloi***

A criação de *T. galloi* foi realizada em ovos do seu hospedeiro natural que é *D. saccharalis* e de hospedeiro alternativo como é o caso de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879), baseada na metodologia descrita por Parra & Zucchi, (1997). Os ovos de *A. kuehniella* foram aderidos em cartelas de coloração azul celeste com dimensões de 8,0 cm x 4,5 cm com auxílio de goma arábica diluída a 10% e, posteriormente, foram expostos ao parasitoide por 24 horas. Da mesma forma, ovos de *D. saccharalis*, colocados nas folhas de papel pardo recortado e expostas às fêmeas do parasitoide por 24 horas. Os ovos supostamente parasitados foram retirados do ambiente de parasitismo e mantidos em câmara climatizada (BOD) com a temperatura de  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa (UR) de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas, até a emergência dos parasitoides. Após a emergência, os parasitoides receberam novos ovos para parasitar, reiniciando-se assim um novo ciclo.

### **Criação de *C. flavipes***

Lagartas de terceiro instar de *D. saccharalis* foram individualizadas em placas de Petri para realização do parasitismo, sobre as quais foram permitidas duas picadas por uma fêmea de *C. flavipes* com menos de 24 horas de idade, previamente alimentada com mel. As lagartas supostamente parasitadas foram mantidas em placas de Petri contendo dieta artificial até a formação da pupa do parasitoide, que são facilmente identificadas pela formação de casulos de coloração branca. Essas massas de pupas do parasitoide foram retiradas e acondicionadas em câmara climatizada (BOD) na temperatura de  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa (UR) de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas, até a emergência dos parasitoides. Os parasitoides emergidos das pupas foram alimentados com mel e colocados em contato novamente com novas lagartas de *D. saccharalis* para reiniciar um novo ciclo.

### **Preparo das dietas para criação de *D. saccharalis***

O preparo de dietas para criação de lagartas de *D. saccharalis* teve como base a metodologia proposta por Parra, (2015), como segue: Inicialmente, pesou-se o germe de

trigo, o farelo de soja, o açúcar e os sais de Wesson, sendo esses ingredientes acondicionou-se em um primeiro recipiente. Em um segundo recipiente, pesou-se o ágar e em outro terceiro recipiente o ácido ascórbico, cloreto de colina, tetraciclina e o nipagin. No quarto recipiente adicionou-se a solução vitamínica e o formaldeído.

A água destilada foi medida e levada ao fogo até que começasse a ferver e depois foi dividida em duas partes. Com uma das partes de água, procedeu-se à homogeneização dos componentes do primeiro recipiente em liquidificador e com outra parte de água adicionou-se o ágar que foi homogeneizado e mantido no fogo até ferver. Nesse momento, o conteúdo do liquidificador foi adicionado ao ágar no fogo, esta mistura foi homogeneizada constantemente até que o conteúdo do recipiente fervesse novamente e engrossasse. O conteúdo do terceiro e do quarto recipiente foi adicionado somente depois que o fogo foi desligado, e quando a mistura resfriada atingiu a temperatura aproximada de 60°C.

A dieta pronta foi transferida para um bécker e colocada em tubos de vidro com fundo chato de 8,5 cm x 2,5 cm, em quantidade suficiente para o desenvolvimento de uma lagarta de *D. saccharalis* (10mL). Em seguida, os tubos foram tampados com algodão que foram previamente esterilizados em estufa a 200°C durante quatro horas. Quando não se observou mais condensação no interior dos tubos, procedeu-se a transferência de lagartas recém-eclodidas, colocou-se uma lagarta em cada tubo com um pincel de cerdas macias. Os tubos foram deixados em suportes na posição vertical, onde as lagartas permaneceram até a fase de pupa. A quantidade dos componentes das dietas (g ou mL/dieta) com os diferentes anticontaminantes foram detalhados na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes (g ou mL/dieta) da dieta utilizadas para criação de *D. saccharalis* contendo diferentes anticontaminantes.

Componentes	Diets				
	1	2	3	4	5
Germe de trigo (g)	70	70	70	70	70
Farelo de soja (g)	120	120	120	120	120
Açúcar (g)	120	120	120	120	120
Sais de wesson <sup>1</sup> (g)	17	17	17	17	17
Ácido Ascórbico (g)	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
Cloreto de colina (g)	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
Solução Vitamínica <sup>2</sup> (mL)	25	25	25	25	25
Metil-p-hidroxibenzoato (Nipagin) (g)	7	7	7	7	7
Tetraciclina 500mg (g)	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Ágar (g)	24	24	24	24	24
Água destilada (mL)	2000	2000	2000	2000	2000
Formaldeído (37%) (mL)	-	1,7	-	-	-
Ácido acetilsalicílico500mg (g)	-	-	2,00	-	-
Ácido sórbico (g)	-	-	-	3,70	-
Ácido benzoico (g)	-	-	-	-	3,70

<sup>1</sup>Carbonato de cálcio: 21,000; Fosfato de cálcio: 14,900; Sulfato de cobre X 5H<sub>2</sub>O: 0,039; Fosfato férrico: 1,470; Sulfato de magnésio: 9,000; Sulfato manganoso: 0,020; Sulfato de potássio e alumínio: 0,009; Cloreto de potássio: 12,000; Iodeto de potássio: 0,005; Monofosfato de potássio: 31,000; Cloreto de sódio: 10,500; Fluoreto de sódio: 0,057. Quantidade em porcentagem.

<sup>22</sup> Niacinamida: 0,5g; Pantotenato de cálcio: 0,5g; Riboflavina: 0,25g; Tiamina: 0,125g; Piridoxina: 0,125g; Ácido fólico: 0,5g; Biotina: 0,02 mg; Vitamina B12 - Cianocobalina 1mg, Água destilada QSP 500ml. Quantidade para 500mL de solução.

1-Testemunha; 2-Formaldeído; 3-AAS 3,7g; -Ácido sorbico 3,7g, 7-Ácido benzoico 3,7g

## **Avaliação de anticontaminantes na dieta artificial para criação de *D. saccharalis* sobre o parasitoide *T. galloi***

Ovos de *D. saccharalis* provenientes dos insetos criados nas respectivas dietas artificiais contendo formaldeído, ácido acetilsalicílico, ácido benzóico, ácido sórbico e da testemunha, foram coletados para realização dos ensaios visando determinar o efeito destes anticontaminantes sobre o desenvolvimento do parasitoide *T. galloi*.

Os produtos anticontaminantes testados: ácido benzoico (DL50 para ratos de >2000 mg/kg) ácido sórbico (DL50 para ratos de 3800 a 4300mg/kg) apresentam toxicidade aguda pelo menos dez vezes menor que a do formaldeído (DL50 para ratos de 800 mg/kg) e as doses foram estabelecidas considerando-se a literatura (Eduardo et al., 2015). Para o AAS (DL para ratos 200mg/kg) (Oswaldo Cruz, 2003), procedeu-se alguns testes com 1g/2mL de dieta em laboratório que foram considerados satisfatórios. Cada repetição foi constituída por uma massa de 30 ovos de *D. saccharalis* com até 24 horas de idade. As massas de ovos foram individualizadas em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de comprimento) e vedadas com filme de PVC que foi perfurado com alfinete entomológico para permitir aeração no interior do tubo. Os ovos de *D. saccharalis* foram expostos a uma fêmea de *T. galloi* com menos de 24 horas de idade, previamente alimentada com mel. Após 24 horas de exposição as fêmeas parasitoides, as massas de ovos foram retiradas do parasitismo e mantidas em câmara climatizada (BOD) com a temperatura de  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa (UR) de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas até a emergência dos parasitoides. Foram avaliadas as seguintes características biológicas biológicas: número de fêmeas que parasitaram, número total de ovos parasitados, percentagem de emergência, progênie, razão sexual e longevidade de fêmeas do parasitoide e duração do ciclo (ovo-adulto). A razão sexual foi calculada com a divisão do número de fêmeas pelo total de indivíduos (machos + fêmeas) (Silveira-Neto et al., 1976), sendo o dimorfismo sexual determinado pelas antenas, as quais nas fêmeas são clavadas e nos machos são plumosas (Valente, 2016), Enquanto a progênie e dada pelo número de indivíduos por ovo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 25 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, e quando constatado efeito significativo de tratamento, as médias foram comparadas pelo teste de Skott-knott a 5% de probabilidade. Realizou-se uma estimativa para o número de ovos parasitados,

emergência, progênie e número de parasitoites fêmeas para cada 100 ovos de *D. saccharalis* criadas em dieta artificial com diferentes anticontaminantes.

### **Avaliação de anticontaminantes na dieta artificial para criação de *D. saccharalis* sobre o parasitoide *C. flavipes***

Lagartas de *D. saccharalis* de terceiro ínstar provenientes dos insetos criados nas respectivas dietas artificiais contendo formaldeído, ácido acetilsalicílico, ácido benzóico, ácido sórbico e testemunha, foram coletados para realização dos ensaios visando o efeito destes anticontaminantes sobre o desenvolvimento do parasitoide *C. flavipes*. Cada repetição foi constituída por uma lagarta de *D. saccharalis* de terceiro ínstar, individualizada em placas de Petri. Foram permitidas apenas duas picadas da fêmea de *C. flavipes* em cada lagarta de *D. saccharalis*. As fêmeas do parasitoide tinham cerca de 24 horas de idade e foram previamente alimentada com mel. As lagartas supostamente parasitadas foram individualizadas em placas de Petri e mantidas em câmara climatizada (BOD) com a temperatura de  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa (UR) de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas até a fase de formação de massa de pupação do parasitoide. Após a formação das massas de pupas, estas foram mantidas nas mesmas condições até a emergência dos parasitoides. Para a avaliação da porcentagem de parasitismo, determinou-se o número médio de lagartas que foram parasitadas por *C. flavipes*, ou seja, que apresentaram casulos do parasitoide. O conjunto de casulos obtidos de cada lagarta foi individualizado acondicionado em copos de plástico, até a emergência e morte dos adultos. Apartir da emergência, contou-se o número total de adultos de *C. flavipes* emergidos, bem como o número de machos e fêmeas. A partir dessas observações, foram registrados as seguintes características biológicas: porcentagem de parasitismo, porcentagem de emergência, progênie, razão sexual, longevidade de fêmeas e duração do ciclo (ovo-adulto). A razão sexual foi calculada com a divisão do número de fêmeas pelo total de indivíduos (machos + fêmeas) (Silveira-Neto et al., 1976). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 25 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, e quando constatado efeito significativo de tratamento, as médias foram comparadas pelo teste de Skott-knott a 5% de probabilidade. Realizou-se uma estimativa para o número de lagartas parasitadas, emergência, progênie e número de parasitoites fêmeas para cada

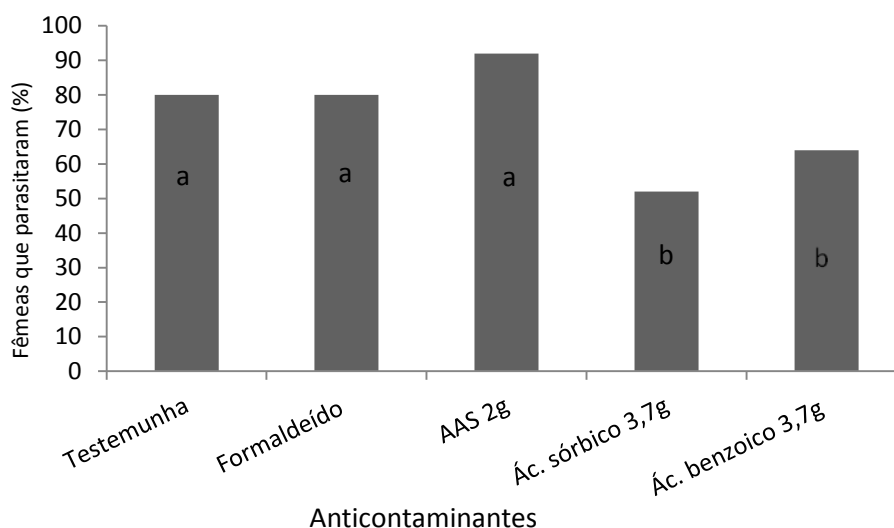


100 lagartas de *D. saccharalis* criadas em dieta artificial com diferentes anticontaminantes.

## Resultados e discussão

### Efeito de anticontaminantes na dieta artificial para criação de *D. saccharalis* sobre o parasitoide *T. galloi*

A porcentagem de fêmeas que parasitaram ovos de *D. saccharalis* foi maior nos tratamentos com acetilsalicílico (AAS), formaldeído e na testemunha, superando os tratamentos cujas dietas foram tratadas com ácido sórbico e benzoico (Figura 1).



**Figura 1**

Fêmeas que parasitaram ovos de *D. saccharailis* criadas em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Colunas seguidas de mesma letra, os valores não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

A preferência das fêmeas pode estar relacionada com a qualidade nutricional do hospedeiro escolhido para o parasitismo e com as características físico-químicas do hospedeiro, podendo afetar a aceitação e a adaptação da linhagem do parasitoide, interferindo, por exemplo, na capacidade de parasitismo (Valente et al., 2016). Além disso, as fêmeas parasitoides podem rejeitar o hospedeiro devido a estímulos

inapropriados ou ação repelente (Salt, 1937). Todavia, os efeitos indiretos do ácido sórbico e benzoico sobre ovos de *D. saccharalis* ainda não são conhecidos e necessitam ser estudados.

Os anticontamiantes utilizados no preparo das dietas de criação de *D. saccharalis* não influenciaram as diferentes características biológicas do parasitoide *T. galloi* criados em lagartas de *D. saccharalis*, uma vez que os valores para a percentagem de ovos parasitados, emergência, progênie, razão sexual e longevidade foram semelhantes àqueles observados no tratamento testemunha (Tabela 2).

**Tabela 2**

Parasitismo de ovos, emergência, progênie, razão sexual e longevidade de *T. galloi* quando criados em ovos de *D. saccharalis* provenientes de dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	Ovos parasitados (%)	Emergência (%)	Progênie	Razão sexual	Longevidade
Testemunha	48,78±8,3 a	61,91±6,0 a	17,81±3,6 a	0,74±0,0 a	2,08±0,5 a
Formaldeído	32,32±8,2 a	77,57±11,1 a	16,74±3,1 a	0,73±0,1 a	3,30±0,4 a
AAS 2g	49,42 ±6,6 a	72,49±4,2 a	23,59±4,3 a	0,79±0,0 a	2,36±0,4 a
Ácido sórbico 3,7g	56,44±5,4 a	59,45±14,6 a	21,12±4,9 a	0,81±0,0 a	2,68±0,6 a
Ácido benzoico 3,7g	47,55±4,9 a	47,23±10,5 a	25,92±10,5 a	0,71±0,1 a	1,84±0,2 a

<sup>1</sup>Médias± EP seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ )

A media da duração do ciclo (ovo-adulto) foi de  $11,84 \pm 0,05$  ( $F = 1.3032$ ,  $p = 0,3288$ ) dias, não havendo diferença entre os tratamentos. Em alguns casos a presença e a intensidade dos efeitos de anticontaminantes sobre os parasitoides tem se manifestado principalmente pelo prolongamento desse estágio (Parra & Zucchi, 1997).

Com base nos resultados obtidos, estima-se uma maior proporção de fêmeas na população quando os anticontaminantes são acrescentados na dieta do que nos tratamentos com formaldeído e testemunha (Tabela 3).

### **Tabela 3**

Estimativa de número de ovos parasitados, emergência de parasitoides, progênie e número de *T. galloi* fêmeas de cada 100 ovos de *D. saccharalis* criadas em dieta artificial com diferentes anticontaminantes.

Anticontaminantes	Parasitismo	Emergência	Progênie	Nº de fêmeas
Testemunha	48,78	30,19	337,68	397,88
Formaldeído	32,32	25,07	419,67	306,36
AAS 2g	49,42	35,82	844,99	667,54
Ácido sórbico 3,7g	56,44	33,55	708,57	573,94
Ácido benzoico 3,7g	47,55	22,45	581,90	413,15

Embora os parasitoides de ovos possam ser mais sensíveis aos anticontaminantes utilizados em dietas artificiais do que os insetos fitófagos (Parra & Zucchi, 1997), os resultados observados no presente estudo mostra que é possível viabilizar a substituição do formadeído visando a multiplicação de *T. galloi* sem interferir negativamente nas suas características biológicas, o que ficou evidente principalmente observando o número de fêmeas estimado no tratamento com AAS, ácido sorbico e benzoico, que foi maior nesses tratamentos quando comparados ao tratamento testemunha.

### **Efeito de anticontaminantes na dieta artificial para criação de *D. saccharalis* sobre o parasitoide *C. flavipes***

Semelhantemente ao observado para o parasitoide *T. galloi*, os anticontaminantes utilizados para o preparo das dietas de criação de *D. saccharalis* não apresentaram diferenças nas características biológicas do parasitoide de lagartas *C.*

*flavipes*, uma vez que os valores de percentagem de parasitismo de lagartas, emergência de parasitoides, progênie razão sexual e longevidade foram semelhantes aqueles observado no tratamento testemunha (Tabela 4).

**Tabela 4**

Parasitismo, emergência, progênie, razão sexual, e longevidade de *C. flavipes* sobre lagartas de *D.saccharalis* criada em dieta artificial com diferentes anticontaminantes. Temperatura  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotoperíodo de 12 horas.

Anticontaminantes	Parasitismo (%)	Emergência (%)	Progênie	Razão sexual	Longevidade
Testemunha	60,00±9,7 a	63,36±13,6 a	72,36±13,9 a	0,74±0,0 a	1,95±0,2 a
Formaldeído	64,00±6,6 a	78,34±8,6 a	54,73±12,9 a	0,74±0,0 a	2,05±0,0 a
AAS 2g	40,00±0,0 a	80,00±17,8 a	39,77±14,0 a	0,82±0,0 a	1,60±0,0 a
Ácido sórbico 3,7g	60,00±5,6 a	43,36±3,6 a	38,90±3,14 a	0,68±0,0 a	1,55±0,0 a
Ácido benzoico 3,7g	56,00±6,6 a	63,36±13,6 a	90,40 ±8,4 a	0,65±0,0 a	2,00±0,6 a

<sup>1</sup>Médias± EP seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A razão sexual apresentados neste estudo é satisfatória (acima de 0,65), uma vez que Vacari et al., (2012) argumentaram que o número de fêmeas em relação ao número de machos devem estar numa proporção acima de 1:1, já que as fêmeas são as verdadeiras responsáveis pelo parasitismo. No entanto, é de conhecimento de que qualidade do hospedeiro é o principal fator que influencia razão sexual do inseto (Green et al., 1982).

A longevidade do parasitoide não foi influenciada pelos anticontaminantes neste estudo, sendo estes resultados semelhantes aos observados na literatura (Silva 2012, Moraes et al., 2015). A longevidade do parasitoide esta diretamente relacionada com aptidão do inseto no campo, estando este parâmetro biológico associado a qualidade e capacidade de busca pela presa (Moraes et al., 2015).

A média da duração do ciclo (ovo-adulto) foi de 17 dias para todos os tratamentos.

Os resultados apresentados por Silva, (2012) evidenciaram que o formaldeído pode ser substituído pela associação de tiocianato-bis-metileno e 2-tiocianometil-tiobenzotiazol a 10%, uma vez que estes produtos não interferiram nas características biológicas de *C. flavipes*. Da mesma forma Moraes et al., (2015) mostram que o formaldeído poderia ser substituído por 2 phenylphenol em dieta artificial de criação da *D. saccharalis* uma vez que este produto não ocasionou efeitos deletérios a este mesmo parasitoide.

Com base nos resultados obtidos, estima-se uma menor proporção de fêmeas de *C. flavipes* na população quando utilizado na dieta artificial de *D. saccharalis* o ácido sórbico e ácido benzoico em relação aos demais tratamentos (Tabela 5).

**Tabela 5**

Estimativa de número de ovos parasitados, emergência, progênie e número de *C. flavipes* fêmeas provenientes de cada 100 lagartas de *D. saccharalis* criadas em dieta artificial com diferentes anticontaminantes.

Anticontaminantes	Parasitismo	Emergência	Progênie	Nº de fêmeas
Testemunha	60,00	38,01	2.750,40	2.035,29
Formaldeído	64,00	50,13	2.743,61	2.030,22
AAS 2g	40,00	32,00	1.272,64	1.043,56
Ácido sórbico 3,7g	60,00	26,01	1.011,78	688,01
Ácido benzoico 3,7g	56,00	35,48	3.207,39	2.084,80

Embora estimou-se uma menor razão sexual nos tratamentos com os anticontaminantes alternativos em relação a testemunha e formaldeído, a razão sexual para todos os tratamentos pode ser considerada adequada já que atende as recomendações de proporção do número de fêmeas com relação ao número de machos acima de 1:1, recomendada por Vacari et al., 2012. No entanto, essa estimativa permite inferir que a presença desses anticontaminantes pode ter afetado as características biológicas de *C. flavipes*, quando comparados a testemunha e formaldeído, o que ficou evidente principalmente se observarmos a estimativa de emergência, e o número de fêmeas de *C. flavipes* no tratamento com ácido sórbico.

As espécies podem ser mais ou menos sensíveis, porém a maioria dos antimicrobianos utilizados em dieta artificial para criação de insetos fitófagos como benzoato de sódio (derivado do ácido benzoico) e sorbato de potássio (derivado do ácido sórbico), podem ser prejudiciais aos parasitoides, quando utilizados em níveis efetivos para controlar fungos (Grenier & Liu, 1990). O efeito negativo do ácido sórbico sobre os parasitoides foi demonstrado por Xie et al., (1986) quando testou dez substâncias químicas utilizadas para controlar fungos, e constatou efeito negativo na eclosão de ovos de *Trichogramma* sp. quando se adicionou na dieta ácido sórbico.

O uso dos anticontaminantes alternativos testados: ácido ascetilsalicílico, ácido sórbico e ácido benzoico na dietas artificial de criação de *D. saccharalis* é viável para produção dos parasitoides *T. galloi* e *C. flavipes*.



## Considerações finais

Embora o formaldeído venha sendo amplamente utilizado como aditivo antimicrobiano em dietas artificiais para a criação de insetos a mudança no hábito da sua utilização deve ser preconizada, já que este produto apresenta riscos a saúde humana. Os anticontaminantes alternativos estudados tem um grande potencial para substituir o formaldeído em dietas artificiais uma vez que os resultados obtidos evidenciaram que não houve interferência destes no desenvolvimento dos insetos estudados, no entanto são necessários mais estudos para conhecer melhor a influência destes anticontaminantes da produção de insetos, bem como de seus inimigos naturais, pois poucos são os trabalhos relacionados a essa área de estudo. Além disso estudos devem ser conduzidos visando ajustar as doses/concentrações considerando o custo e o acesso a esses produtos.

## Conclusão Geral

Os produtos anticontaminantes testados: ácido ascetilsalicílico, ácido sórbico e ácido benzoico, podem ser utilizados em substituição ao uso do formaldeído em dieta artificial para criação de *D. saccharalis* e de *H. armigera*.

Para a criação de *D. saccharalis* considera-se o ácido acetilsalicílico na menor dose testada (1g/dieta) como o mais adequado por ser esse produto de fácil acesso e baixo custo, quando comparado a outros anticontaminantes.

Para a criação de *H. armigera* as maiores doses dos produtos testados podem substituir o formaldeído na dieta por assegurarem maior eficácia no controle de microorganismos. Todavia, considera-se o ácido benzoico na maior concentração testada (3,7g) como o mais adequado.

O uso dos anticontaminantes alternativos testados na dietas artificial de criação de *D. saccharalis* é viável para produção dos parasitoides *T. galloi* e *C. flavipes*.

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal da grande Dourados, Embrapa agropecuária Oeste e a CAPES pelo apoio financeiro.

## Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. 2017. Cosmético: Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/cosmeticos>, Acessado em 10 janeiro 2017.

Botelho, P. S. M., Parra J. R. P., Chagas Neto J. F., Oliveira C. P. B. 1999. Associação do parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v.28, p.491-496.

Botelho, P. S. M & Macedo N. 2002. Descrição e bioecologia de *D. saccharalis*. In: Parra, J. R. P., Botelho, P. S. M., Ferreira B. S. C, Bento, J. M. S. Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores. São Paulo: Manole, cap. 25, p. 409-426.

Bueno, V. H. P. 2009. Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. Lavras: Editora UFLA. 2 ed. p. 430.

Butt, B. A & E. Cantu. 1962. Sex determination of lepidopterous pupae. Washington: United States Department of Agriculture, p.7.

Dias, N. da S., Parra, J. R. P., Dias, C. T. dos S. 2010. Tabela de vida de fertilidade de três espécies neotropicais de Trichogrammatidae em ovos de hospedeiros alternativos como critério de seleção hospedeira. Revista Brasileira de Entomologia, v. 54, n. 1, p.120-124.

Eduardo, W. L., Almeida L. F. V., Moraes R. F. de O., Santos J. A. dos, Martin C. C. & Bortoli S. A. de. 2015. Alternativa ao uso de formaldeído em dieta artificial para *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera:Crambidae). Congresso Brasileiro de Fitossanidade. Águas de Lindóia-SP.

Green, R. F., Gordh G. & Hawkins A. B., 1982. Precise sex ratios in highly inbred parasitic wasps. *The American Naturalist*, v. 120, n. 5, p. 653-665.

Grenier, S. & W. H. Liu. 1990. Antifungals: mold control and safe levels in artificial media for *Trichogramma* ( Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Entomophaga*, v. 35, n. 2, p. 283-291

Hensley, S. D.& Hammond A. H. 1968. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. *Journal of Economic Entomology*, Lanham, v. 61, n. 6, p. 1742-1743.

Moraes. R. F. O. de., Almeida L. F. V., Eduardo W. I., Ramalho D. G., Santos R. F. dos & Bortoli S. A. de. 2015. Anticontaminantes alternativos ao formadeído e seus efeitos em *Cotesia flavipes* (Cameron:1891) (Hymenoptera: Braconidae) Congresso Brasileiro de Fitossanidade. Águas de Lindóia-SP.

Nicron Química Ltda. 2017. Ficha de Informação e Segurança do Produto Químico – Formaldeído. Disponível em: <http://nicromquimica.com.br/produtos/cosmeticos/#wpcf7-f156-p597>-Acessado em 10 janeiro.

Oswaldo Cruz. 2017. Ácido acetilsalicílico. Disponível em: <https://www.oswaldocruz.br/download/fichas/%C3%81cido%20acetilsalic%C3%ADlico2003.pdf>, Acesso em 24 de janeiro de 2017.

Parra, J. R. P. & R. A. Zucchi. 1997. *Trichogramma* e o controle biológico aplicado. Piracicaba: ESALQ/FEALQ SP p.324.

Parra, J. R. P., Botelho P. S. M., Corrêa-Ferreira B. S. & Bento J. M. S.. 2002. Controle biológico uma visão inter e multidisciplinar, p.125-142. *In*: Parra, J. R. P.; P. S. M. Botelho, B. S. Corrêa-Ferreira & J. M. S. Bento (eds.). Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo, Manole, v. 3 p. 635, 2002.

Parra, J. R. P. 2015. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba: ESALQ/FEALQ.

Pinto, A. S., Cano M. A. V. & Santos E. M. 2006. A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* In: PINTO, A. S. (ed.). Controle de pragas da cana-de-açúcar. Sertãozinho: Biocontrol, (Boletim técnico Biocontrol, n.1) p. 64.

Salt. G. 1937. Experimental studie in insect parasitismo. V the sesne used by Ttichogramma to distinguish between parazitized and unparasitized host. Proc. R. Soc. Lond. Biol. 122, 57-74.

Silva C. C. M. da., Marques E. J., Oliveira V. J. & Valente E. C. N. 2012. Preference of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) for *Diatraea* (Lepidoptera: Crambidae). Acta Scientiarum. Agronomy. Maringá, v. 34, n. 1, p. 23-27.

SILVA, M. G. M. F. 2012. Substituição Do Formaldeído Na Dieta Artificial Para Criação De *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae): Efeito Na Biologia Do Hospedeiro e De Seu Parasitoide *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). São Paulo. 2012. Dissertação (Mestrado em Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e o Ambiente) – Instituto Biológico.

Silva, A. B. da. & Brito J. M. de. 2015. Controle biológico de insetos pragas e suas perspectivas para o futuro. Revista Agropecuária Técnica. v 36, n 1, p. 248-258.

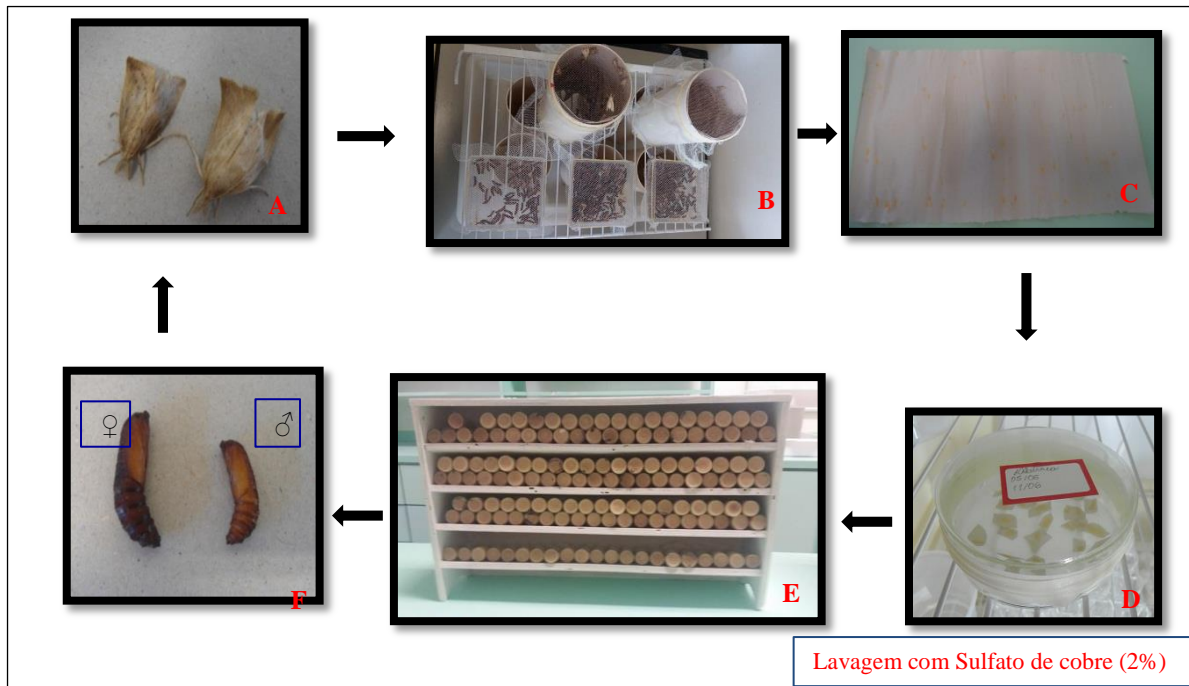
Silveira-neto, S. Nakano O., Barbin D., Villanova N. A. 1976. Manual de ecologia dos insetos. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 519.

Vacari, A. M., Genovez G. S., Laurentis V. L. & Bortoli S. A. de. 2012. Fonte proteica na criação de *Diatraea saccharalis* e seu reflexo na produção e no controle de qualidade de *Cotesia flavipes*. Bragantia, v.71, n.3, p.355-361.

Valente E. C. N., Broglio S. M. F., Passos E. M. dos, Lima A. S. T. 2016. Desempenho de *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) sobre ovos de *Diatraea* spp. (Lepidoptera. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 51, n. 4, p.293-300.

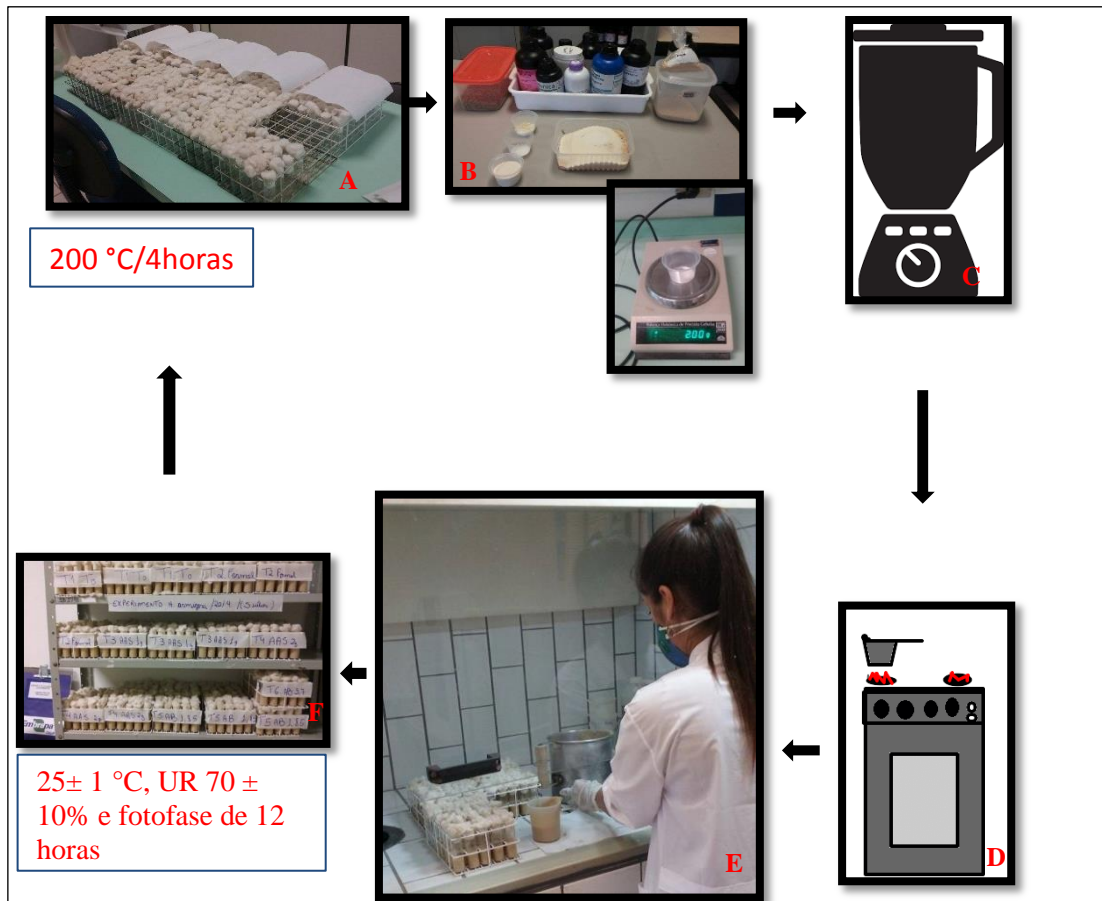
Xie, Z. N., Nettle W. C., Morrisson R. K. & Vinson S. B. 1986. Three methods for the in vitro culture of *Trichogramma pretiosum* Riley. Journal of Entomological Science, v. 21, n. 2, p. 133-138.

## **ANEXOS**

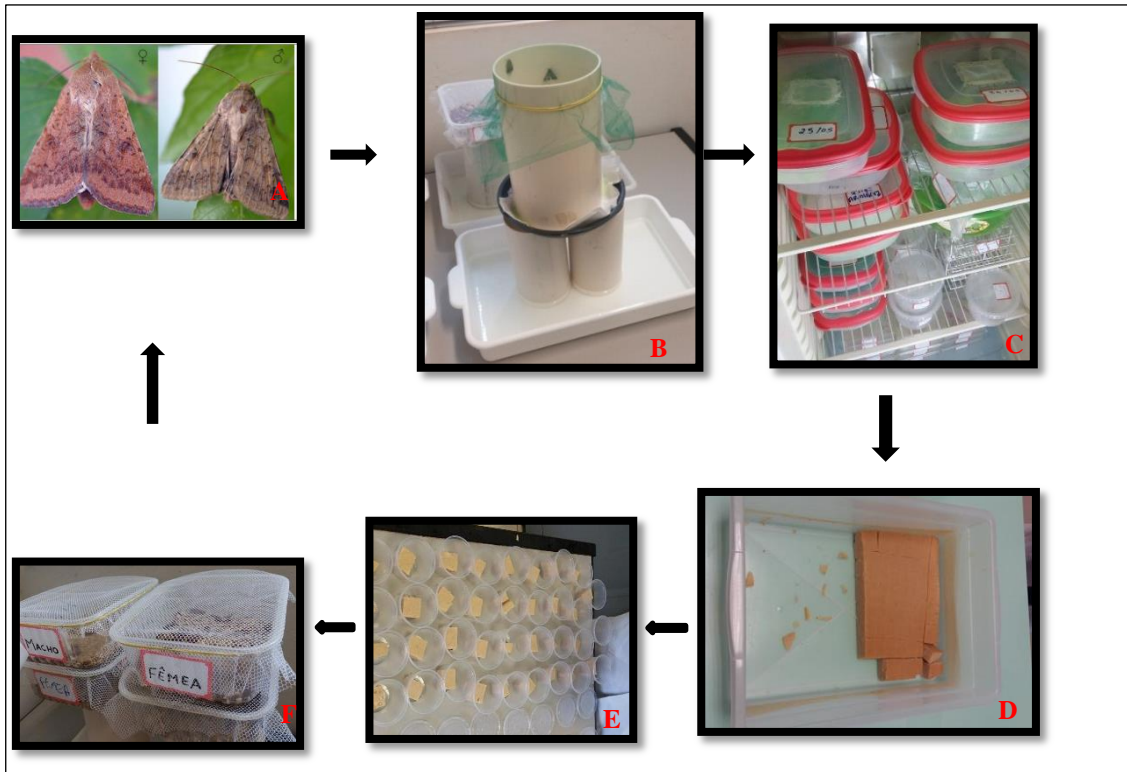


ANEXO I. Criação de *D. saccharalis*. Adultos de *D. saccharalis* (A); Gaiolas de tubo PVC (B); Folhas de papel pardo contendo posturas (C); Ovos de *D. saccharalis* recortados, lavados e acondicionados em placas de petri (D); Tubos de criação de lagartas, contendo dieta artificial recomendada por Parra, (2015) (E); Pupas sexadas de acordo com a metodologia de Butt e Cantu (F).

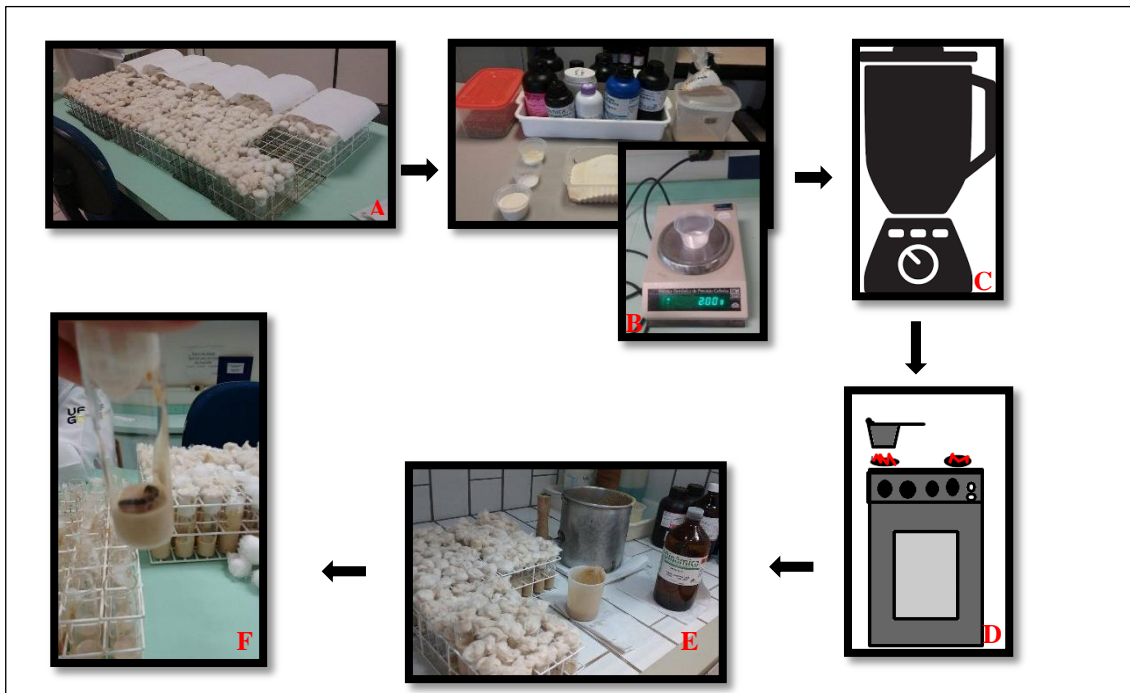




**ANEXO II.** Preparo da dieta artificial de *D. saccharalis*. Tubos de vidro, vedados com algodão esterilizados em estufa (A); Pesagem dos ingredientes (B); Homogeneização dos ingredientes em liquidificador com uma parte de água (C); Em outra parte de água, previamente levada ao fogo, adicionou-se o ágar que foi homogeneizado e mantido no fogo até ferver. Nesse momento, ocorre a adição do conteúdo do liquidificador ao ágar no fogo (D); A dieta pronta foi colocada em tubos de vidro que receberam uma lagarta recém-eclodida (E); Tubos foram deixados em suportes na posição vertical, onde as lagartas permaneceram até a transformação em pupa (F).



**ANEXO III.** Criação de *H. armigera*. Adultos de *H. armigera* (A); Gaiolas de tubos PVC (B); Ovos retirados do substrato de oviposição e acondicionados em bandejas contendo pedaços de dieta (C); Dieta artificial de Greene et al. (1976), que foi previamente preparada (D); Dieta recortada e colocada em copos descartáveis transparentes que receberam uma lagarta, onde permaneceram até a fase de pupa (E); Pupas separadas por sexo em recipiente contendo vermiculita onde permaneceram até a emergência dos adultos (F).



**ANEXO IV.** Preparo da Dieta artificial de *H. armigera*. Tubos de vidro, vedados com algodão esterilizados em estufa (A); Pesagem dos ingredientes (B); Homogeneização dos ingredientes em liquidificador com uma parte de água (C); Em outra parte de água, previamente levada ao fogo, adicionou-se o ágar que foi homogeneizado e mantido no fogo até ferver. Nesse momento, ocorre a adição do conteúdo do liquidificador ao ágar no fogo (D); A dieta pronta foi colocada em tubos de vidro que receberam uma lagarta recém-eclodida (E); Tubos foram deixados em suportes na posição vertical, onde as lagartas permaneceram até a transformação em pupa (F).

## ANEXO V

Normas para envio do manuscrito



### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and policy](#)
- [Form and preparation of manuscripts](#)
- [Sends manuscript to](#)

**ISSN 0085-5626 print**

*version*

**ISSN 1806-9665 online**

*version*

### Scope and policy

The **Revista Brasileira de Entomologia** (RBE) edited on behalf of the Sociedade Brasileira de Entomologia (SBE), publishes original peer-reviewed papers in Entomology, focusing on systematics, diversity, and evolution of insects. The RBE also maintains sections for short communications, book reviews, and announcements of general interest. Points of view or reviews may be published by invitation of the Editorial Board. Current editorial policies give priority to papers with innovative approach and represents a more solid contribution to knowledge of focused groups, including a more detailed discussion of thematic field, under a comparative approach.

Publication fees for manuscripts received after January 1, 2017 will be charged according the nationality of corresponding authors and based on their affiliation to Sociedade Brasileira de Entomologia (SBE). For Brazilian

authors, there is publication fee of R\$ 100 per published page, when the corresponding authors is a member of the SBE. Foreign authors pay a fee of US\$ 70 per published page if the corresponding author is a member of the SBE. If the corresponding author is not a member of the SBE, the fee is R\$ 200 per published page for Brazilian authors and if foreign, then US\$ 140 per page. The online edition ([www.scielo.br/rbent](http://www.scielo.br/rbent) or [www.rbentomologia.com](http://www.rbentomologia.com)) is open access.

### **Form and preparation of manuscripts**

Manuscripts should be in English, preferably proofread by a native English speaker. Manuscript length should not exceed 80 pages, including figures. In the case of longer manuscripts, authors should consult the Editorial Board previous to submission.

Manuscripts should be edited in Microsoft Word®, on A4 size paper, double spaced, and using Times New Roman font size 12; the right margin should not justified and the pages should be numbered consecutively. The font Times New Roman should also be used for labeling figures and graphs. Only graphs and tables should be incorporated to the text file, at the end.

The main document should have a title page containing the title and name(s) of author(s) followed by number(s) for remission to the footnote. The footnote should contain the complete address(es) of the author(s), including e-mail, and other pertinent information, if necessary. Words entirely in upper case should not be employed, except as indicated

below. Author affiliations should be presented in decreasing hierarchical order (e.g. Harvard University, Harvard Business School, Boston, USA) and should be written as established in its own language (e.g. Université Paris-Sorbonne; Harvard University, Universidade de São Paulo). The ABSTRACT should have a maximum of 250 words, presented as one paragraph; KEYWORDS must be organized alphabetically and at most five keywords. Words already included in the title should not be used as keywords.

Scientific names should be followed by author and date of publication at the first mention of these taxa in the manuscript. Genus- and species-group names must be written using *italics*. Any other markings or signs as to emphasize or call attention should not be used. The Editorial Board will decide on how to proceed for particular cases in manuscripts of subject areas other than Systematics, Morphology and Biogeography.

**Text:** All citations in the text should refer to: 1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication; 2. Two authors: both authors' names and the year of publication; 3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....". The ACKNOWLEDGMENTS should be placed at the end of the text, immediately preceding the REFERENCES. Authors are encouraged to be succinct.

– **Illustrations:** photographs, drawings, graphs and maps are

called figures and should be numbered consecutively (using Arabic numerals) and, preferably, in the same sequence in which they are referred to in the text. Scale-bars should be positioned either vertically or horizontally. Tables (numbered with Roman numerals) should be presented in separate pages at the end of the manuscript. If necessary, graphs may also be included in the main document at the end. Illustrations files must be uploaded separately from the main document, with at least 300 dpi for color images and 600 dpi for bitmap and black and white images, in tiff or low compression jpeg format. Figure numbers should be in Times New Roman font size 11 and positioned at the lower right corner. Labeling applied to figures (numbers, letters and words) should also be in Times New Roman and in an appropriate size in order that, after reduction, they remain clearly visible without becoming more prominent than the illustrations themselves. The Editorial Board can make small modifications or ask the author(s) for a new plate. Figure legends should be included in the main document.

**Data references:** This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. This identifier will not appear in your published article. [dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>

Use the following examples when preparing the REFERENCES section. They should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters “a”, “b”, “c”, etc., placed after the year of publication. Examples:

1. Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton,R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

2. Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

3. Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E- Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

4. Internet sites. Gilligan, T.M., Baixeras, J., Brown J.W., Tuck, K.R., 2012. T@RTS: Online World Catalogue of the Tortricidae (Ver. 2.0). Available at: <http://www.tortricid.net/catalogue.asp>. (accessed 25 Nov 2014). Citations of meeting abstracts and unpublished theses and dissertations should be avoided.

**Short Communications:** Short notes must report elaborated work that incorporates the same aspects required for full articles (biology, ecology, behavior, systematics, pest management, etc.). Manuscripts of anecdotal nature will not be accepted. Papers that merely report new geographic occurrences, records of species or host associations to new localities in geographical regions that they are already known will not be considered. Short Communications should



be prepared as a single text and references, including also an Abstract and Keywords. Do not include subtitles (Introduction, Material and Methods, and Results and Discussion). Figures and tables will be limited to a maximum of 3 objects per manuscript. **Important:** RBE will consider the limited number of two Short Communications per issue.

**Voucher policy:** RBE encourages authors to deposit voucher and type specimens in public museums or permanent University collections. It is advisable that authors, at time of submission, clearly state in the manuscript where their material is expected to be deposited. Labeling and proper indication of voucher specimens are the author's responsibility.

**Author's responsibility:** Page proofs are sent to the corresponding author and should be returned, with the necessary corrections, at the indicated deadline. Authors are entirely responsible for the scientific content of the paper, as well as for proper use of grammar. Authors are encouraged to look at the latest issues of the RBE to check current format and layout. When submitting the manuscript, the author may suggest potential reviewers. Please, include the complete name, mailing and electronic addresses of suggested reviewers. The choice of reviewers, however, remains with the Editors.