IMPACTO DE HERBICIDAS UTILIZADOS EM CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE *Cotesia flavipes*

MAURICIO DA CRUZ CÔRREA*
MARIA BERNADETE SILVA DE CAMPOS**
PATRÍCIA ANDREA MONQUERO***

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos herbicidas diuron + hexazinona, ametrina + clomazona e sulfentrazone sobre a população de *Cotesia flavipes*, parasitoide da broca da cana-de-açúcar. Foram avaliadas cinco doses dos herbicidas ($\frac{1}{2}$ D, $\frac{1}{4}$ D, 1 D, 2 D e 4 D, sendo D = dose comercial de cada produto) e a testemunha sem herbicida. Os produtos foram pulverizados diretamente no inseto, na fase de massas (casulos), ou mediante contato indireto nas folhas de cana-de-açúcar, visando atingir o inseto adulto. A porcentagem de viabilidade de casulos foi observada até 120 horas após o tratamento e a mortalidade causada pelo efeito do contato indireto monitorada após 72, 96 e 120 horas da aplicação. Os resultados mostraram que o contato direto dos herbicidas ametrina + clomazona e sulfentrazone com os casulos apresentaram efeito negativo quando utilizadas doses maiores que a comercial. Já para diuron + hexazinona não houve impacto negativo significativo. O contato indireto sobre os insetos adultos causou aumento inicial da mortalidade em todos os tratamentos. Os resultados indicaram baixa influência dos herbicidas para a população de *C. flavipes*, mas o contato das vespas com folhas pulverizadas pode reduzir o tempo de vida do parasitoide.

PALAVRAS-CHAVE: HERBICIDAS; CANA-DE-AÇÚCAR; BROCA DA CANA.

* Graduando em Engenharia Agrônoma, Bolsista CNPq, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Araras, SP (e-mail: mauricioccorrea@hotmail.com).

** Engenheira Agrônoma, Doutora em Ecologia e Recursos Naturais, Professora, UFSCar, Araras, SP (e-mail: mbcampos@cca.ufscar.br).

*** Engenheira Agrônoma, Doutora em Produção Vegetal, Professora, UFSCar, Araras, SP (e-mail: pamonque@cca.ufscar.br).

1 INTRODUÇÃO

A infestação de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar pode ocasionar reduções diretas na produção, decorrentes da competição pelos fatores de crescimento, além da ação alelopática. As plantas daninhas podem reduzir indiretamente a produção de cana-de-açúcar por atuarem como hospedeiras intermediárias de pragas, doenças, vírus e nematóides (LORENZI, 1983).

O controle de plantas daninhas constitui prática de manejo obrigatória na cultura canavieira em todo o território nacional. A alta eficiência, praticidade e baixo custo do uso de herbicidas em relação a outros métodos de controle tornam o manejo químico de plantas daninhas o mais utilizado (CHRISTOFFOLETI *et al.*, 2006; KUVA *et al.*, 2008).

A *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Crambidae), popularmente conhecida como broca da cana-de-açúcar, representa fator biótico importante na produção da cultura. *D. saccharalis* invade os colmos da cana-de-açúcar, o que promove redução do tempo de vida da planta e também da qualidade da sacarose (OLIVEIRA e ANDRADE, 2009).

De acordo com Guagliumi (1972; 1973) e Gallo *et al.* (2002), as lagartas se alimentam dos tecidos foliares no início do ciclo e, em seguida, penetram no interior dos colmos. Os prejuízos diretos dessa praga originam-se das galerias que constroem nos colmos, o que promove a perda de peso e tombamento da planta pelo vento. Tais galerias auxiliam indiretamente a penetração de fungos nas plantas, o que favorece a podridão vermelha do colmo. Essa doença causa a inversão da sacarose e conseqüentemente reduz a produção de álcool. A localização das larvas no interior dos colmos das plantas dificulta o controle desse inseto. O controle químico (com o uso de inseticidas nessa fase) torna-se inviável devido ao alto custo e baixa eficiência dos produtos que são incapazes de atingir as lagartas no interior dos colmos, local dos maiores prejuízos. O mais eficiente nesse caso é o controle biológico por meio de inimigos naturais que são liberados no campo em glebas, previamente amostradas para determinar a intensidade de infestação (BOTELHO, 2010). Os parasitoides larvais são os mais utilizados no Brasil e no mundo, especialmente a vespa *Cotesia flavipes*, com liberações em grandes quantidades visando interromper o crescimento populacional da praga (BOTELHO e MACEDO, 2002).

Os agrotóxicos podem afetar organismos não alvos. Com relação aos herbicidas, existem exemplos de efeitos diretos e indiretos desses produtos sobre insetos e ácaros. Observa-se o efeito direto em função da toxicidade das moléculas aos organismos ou a influência que esses exercem sobre os parâmetros de desenvolvimento dos insetos. Indiretamente, herbicidas podem promover alterações fisiológicas nas plantas que em alguns casos influenciam a bioecologia e o comportamento dos artrópodes (BEGON *et al.*, 2007).

Sintomas cloróticos e necróticos em culturas próximas a áreas de cana-de-açúcar são observados, provavelmente pelo efeito da deriva de clomazona e de sulfentrazone aplicados em cana-de-açúcar. Esse fato é agravado pelas aplicações intensivas, durante o pré e pós-plantio da cana-de-açúcar, realizadas com o uso de tratores que aumentam as possibilidades de deriva (TAKAHASHI *et al.*, 2009). Trabalhos realizados em lavouras comerciais evidenciam deriva de até 36,2 % durante as aplicações de herbicidas direcionados ao solo em cana-de-açúcar (VELINI *et al.*, 2010). Os produtores estão fazendo o plantio de cana-de-açúcar em diversas épocas do ano, visando o escalonamento da colheita da cultura e também para melhorar o aproveitamento do parque de máquinas, do aparato industrial e dos recursos humanos (FERREIRA *et al.*, 2008). Desse modo, é possível que na época da liberação da *Cotesia flavipes* em alguns talhões ocorra contato com herbicidas aplicados em outras áreas da lavoura.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses dos herbicidas diuron + hexazinona, ametrina + clomazona e de sulfentrazone na viabilidade de casulos e na mortalidade de adultos do parasitoide *C. flavipes*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) foi criada em dieta artificial, conforme metodologia descrita por Macedo e Campos (1998), visando à multiplicação do parasitoide *C. flavipes* utilizado na condução dos bioensaios. A vespa *C. flavipes* iniciou seu parasitismo depositando ovos no interior da lagarta/broca, os quais deram origem a larvas dos parasitoides que se desenvolveram pela utilização dos tecidos de reserva da *D. saccharalis* para sua alimentação. Após o período de alimentação, as larvas da *C. flavipes* migraram do interior da lagarta e formaram os casulos (pupas) que posteriormente originaram os adultos.

Avaliou-se o efeito de herbicidas sobre os casulos e adultos de *C. flavipes* utilizando os herbicidas registrados para cana-de-açúcar. Os produtos testados foram: diuron + hexazinona (inibidor do fotossistema II - FSII), ametrina + clomazona (inibidor do FSII + inibidor da enzima protoporfirógeno oxidase - PROTOX) e sulfentrazone (inibidor da PROTOX) (Tabela 1). Foram avaliadas cinco doses dos herbicidas ($\frac{1}{2}$ D, $\frac{1}{4}$ D, 1 D, 2 D e 4 D, sendo D = dose comercial de cada produto) e a testemunha sem aplicação de herbicida, em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Para a aplicação dos produtos utilizou-se pulverizador costal pressurizado com gás carbônico (CO₂), composto de barra com duas pontas de pulverização tipo leque XR 110.03, espaçadas de 0,50 m, com volume de aplicação de 200L ha⁻¹ (RODRIGUES e ALMEIDA, 2011).

TABELA 1 - HERBICIDAS E DOSES UTILIZADAS EM *C. flavipes*

Herbicidas	Nome comercial	Doses do produto comercial (Kg ou L/ha)				
		$\frac{1}{4}$ D	$\frac{1}{2}$ D	D	2 D	4 D
diuron+hexazinona	Velpar K	0,62	1,25	2,5	5,0	10,0
ametrina+clomazona	Sinerge	1,25	2,5	5,0	10,0	20,0
sulfentrazone	Boral	0,3	0,6	1,2	2,4	4,8

Avaliaram-se os efeitos diretos e indiretos dos herbicidas em *C. flavipes*. Analisou-se o efeito dos herbicidas por meio da aplicação direta dos produtos sobre as “massas” de *C. flavipes* (conjunto de casulos, 50-70, contendo pupas agrupadas em meio a fios de seda), dispostas em placas de Petri. Monitorou-se a porcentagem de viabilidade dos casulos até 120 horas após a aplicação dos produtos. Para a avaliação do efeito indireto, os herbicidas foram aplicados sobre plantas de cana-de-açúcar cultivadas em casa-de-vegetação. Logo após a aplicação, as plantas foram levadas para o laboratório e colocadas em contato com os insetos adultos (cerca de 80 insetos/repetição). A porcentagem de mortalidade dos adultos foi avaliada após 72, 96 e 120 horas do tratamento. Os bioensaios com a *C. flavipes* foram conduzidos em ambiente com temperatura de $25 \pm 1^\circ$ C, umidade relativa de 60 ± 10 % e luz de 14 horas (MACEDO e CAMPOS, 1998).

Os dados obtidos nos ensaios foram submetidos à análise de variância e quando significativos foram ajustadas curvas de regressão com modelos não lineares, função hiperbólica (ZAR 1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 APLICAÇÃO DIRETA DOS HERBICIDAS EM CASULOS DE *C. flavipes*

A emergência dos adultos iniciou 72 horas após os tratamentos, com pico depois de 96 horas e queda progressiva, sendo contabilizada a porcentagem de viabilidade pupal após 120 horas da aplicação dos herbicidas (Figura 1).

FIGURA 1 - PORCENTAGEM DE MASSAS DE CASULOS ECLODIDOS DE *Cotesia flavipes* EM FUNÇÃO DE DOSES DE AMETRINA + CLOMAZONA E DE SULFENTRAZONA

Para a mistura diuron + hexazinona não foram observadas diferenças significativas entre as doses aplicadas. Todavia, verificou-se tendência de menor viabilidade pupal com a utilização de quatro vezes a dose recomendada do produto. O efeito de diuron + hexazinona sobre outros agentes de controle biológico foi estudado para fungos. De acordo com Botelho e Monteiro (2011), os herbicidas diuron, glifosato e hexazinona + diuron afetaram o crescimento micelial, a produção e a viabilidade dos conídios de *Beauveria bassiana* e de *Metarhizium anisopliae*. De acordo com o rótulo, o herbicida diuron + hexazinona pertence à classe toxicológica III, ou seja, mediantemente tóxico.

As doses do herbicida ametrina + clomazona apresentaram diferenças significativas entre si. A maior dose desse herbicida, considerado altamente tóxico, promoveu elevada redução na viabilidade de casulos. De acordo com Pereira (2012), ametrina e clomazona interferem nos parâmetros funcionais da espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus* e pode comprometer a saúde desses animais. Botelho e Monteiro (2011) também verificaram redução da sobrevivência dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* provocada pela mistura de ametrina + clomazona, sendo essa redução mais pronunciada em solo arenoso.

O herbicida sulfentrazone também apresentou impacto negativo na espécie *C. flavipes*, sendo verificada redução na viabilidade de casulos nas maiores doses. O produto sulfentrazone, classificado como herbicida de baixa toxicidade, é relativamente persistente, com meia vida de 24 a 302 dias (FMC CORPORATION, 1999; OHMES *et al.*, 2000) dependendo das condições ambientais. Sua dissipação ocorre principalmente mediante degradação microbiana.

O efeito de herbicidas sobre organismos benéficos foi avaliado por Story e Stougaard (2006), que conduziram estudos em campo durante quatro anos. Tais autores observaram incompatibilidade entre os herbicidas 2,4D e clopiralida e dois insetos, *Cyphocleonus achates* (Fahraeus) e *Agapeta zoegana* L., introduzidos para o controle biológico da planta daninha *Centaurea stoebe* L.

O impacto dos herbicidas na viabilidade de casulos evidencia que altas doses, principalmente de ametrina + clomazona e de sulfentrazone podem afetar substancialmente *C. flavipes*, mesmo com a proteção dos casulos. Dessa forma, devem ser utilizadas as doses estritamente recomendadas para os produtos.

3.2 APLICAÇÃO INDIRETA DE HERBICIDAS NAS FOLHAS DA CANA-DE-AÇÚCAR

A taxa de mortalidade de *C. flavipes*, quando em contato indireto com a mistura diuron + hexazinona por meio da pulverização na folha da cana-de-açúcar, pode ser visualizada na Figura 2. Na avaliação após 72 horas da aplicação não foi verificada diferença significativa entre as doses na mortalidade do parasitoide. Após 96 horas da aplicação, todas as doses promoveram pronunciado aumento na mortalidade de *C. flavipes*. Com o decorrer do tempo (120 horas) ocorreu alta taxa de mortalidade de *C. flavipes* em todos os tratamentos, inclusive na testemunha, devido à própria biologia do organismo. Todavia, os dados evidenciaram que o herbicida promoveu redução no tempo de vida do parasitoide. Toxicidade para os insetos *Trichogramma minutum* (INGRAM *et al.*, 1947), *Drosophila* sp. e *Culex quinquefasciatus* (AHMED e ALI, 1994) também foi provocada por herbicidas do grupo das triazinas (grupo químico inibidor do FSII). A toxicidade de diuron para os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi observada por Botelho e Monteiro (2011).

FIGURA 2 - PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DE ADULTOS DE *C. flavipes* EXPOSTOS INDIRETAMENTE A DIFERENTES DOSES DE DIURON + HEXAZINONA APLICADO EM FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Para ametrina + clomazona (Figura 3) não houve diferença significativa na mortalidade de adultos após 72 horas da aplicação, sendo que praticamente não houve mortalidade. Depois de 96 horas do contato dos adultos com a mistura de herbicidas verificou-se efeito pronunciado na sua mortalidade a partir da dose comercial recomendada, sendo maiores nas doses mais altas. Após 120 horas houve mortalidade natural do parasitoide, sem diferença significativa entre os tratamentos. Os resultados mostram que a mistura desses herbicidas reduz o ciclo de vida do parasitoide, o que deve comprometer sua ação no controle da *D. saccharalis*.

Autores, citados por Norris e Kogan (2000), acreditam que poucos herbicidas apresentam efeitos diretos sobre insetos, devido à forma como os produtos são selecionados nas indústrias de agrotóxicos. Segundo Norris e Kogan (2000) proposições gerais a respeito da toxicidade dos herbicidas aos insetos são difíceis de serem formuladas. O comportamento dos produtos varia para cada espécie de inseto e diversas pesquisas mostram efeitos tóxicos e não tóxicos dos herbicidas.

FIGURA 3 - PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DE ADULTOS DE *C. flavipes* EXPOSTOS INDIETAMENTE A DIFERENTES DOSES DE AMETRINA + CLOMAZONA APLICADO EM FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Na Figura 4 são apresentados os resultados da avaliação do herbicida sulfentrazone na mortalidade de adultos de *C. flavipes*. Esse herbicida mostrou a mesma tendência dos anteriores, ou seja, nenhum efeito na mortalidade dos insetos após 72 horas da sua aplicação. Seu efeito na mortalidade de adultos de *C. flavipes* foi verificado apenas depois de 96 horas da aplicação do produto. Após 120 horas, os tratamentos foram igualados devido à própria biologia do parasitoide. Ensaio realizado por Vacari *et. al.* (2012) constatou longevidade de *C. flavipes* de 2,7 dias.

FIGURA 4 - PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DE ADULTOS DE *C. flavipes* EXPOSTOS INDIETAMENTE A DIFERENTES DOSES DE SULFENTRAZONA APLICADA EM FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

4 CONCLUSÃO

Altas doses, principalmente de ametrina + clomazona e de sulfentrazone podem afetar substancialmente a viabilidade de casulos de *C. flavipes*.

Os herbicidas avaliados anteciparam a mortalidade de adultos de *C. flavipes* mesmo na dose recomendada, sendo a mortalidade mais pronunciada nas maiores doses.

ABSTRACT

IMPACT OF HERBICIDES USED IN SUGAR CANE ON *Cotesia flavipes*

The objective of this study was to evaluate the effect of diuron + hexazinone, ametrine + clomazone and sulfentrazone on the population of *Cotesia flavipes*, parasitoid of the sugarcane borer. Were evaluated five herbicides doses (D ½, ¼ D, 1 D, 2 D and 4 D, where D = dose of each commercial product) and control (no herbicide). Herbicides were sprayed directly over insects on cocoon stage, or indirectly through contact with sugar cane leaves in order to reach adult insects. The percentage of unhatched cocoons was observed up to 120 hours post treatment and mortality caused by the effect of indirect contact was monitored at 72, 96 and 120 hours after application. Results showed that the direct contact of herbicide ametrine + clomazone and sulfentrazone with the cocoons had negative effect when doses higher than the commercial one were used. However, for diuron + hexazinone no significant negative impact was detected. In indirect contact with adult insects caused an initial increase on the mortality in all treatments. The results showed that the influence of herbicides for the population of *C. flavipes* is low, however the contact of the wasps with the pesticide may reduce their lifetime.

KEY-WORDS: SUGAR CANE; SUGARCANE BORER; HERBICIDES; *Cotesia flavipes*.

REFERÊNCIAS

- 1 AHMED, S.A.; ALI, M.N. Cytotoxic assay of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by mitotic index profiles in *Culex pipiens fatigans*. **Entomologischen Gesellschaft Basel**, Basel, v.14, n.2, p.169-715, 1994.
- 2 BEGON, M.; TOWNSEND, C.R.; HARPER, J.L. **Ecologia**: de indivíduos a ecossistemas. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 740 p.
- 3 BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P. *et al.* (Eds.) **Controle biológico no Brasil**: parasitoides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. p. 409-425.
- 4 BOTELHO, A.A.A.; MONTEIRO, A.C. Sensibilidade de fungos entomopatogênicos a agroquímicos usados no manejo da cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 70, n. 2, p.361-369, 2011.
- 5 BOTELHO, A.A.A.; MONTEIRO, A.C. Toxicidade de agrotóxicos usados no cultivo da cana-de-açúcar para fungos entomopatogênicos no solo. **Pesticidas**: revista de ecotoxicologia e meio ambiente, v.21, p.73-84, 2011.
- 6 CHRISTOFFOLETI, P.J.; BORGES, A.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; MONQUERO, P.A. Carfentrazone-ethyl aplicado em pós-emergência para o controle de *Ipomoea* spp. e *Commelina benghalensis* na cultura da cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v.24, n.1, p.83-90, 2006.
- 7 FMC CORPORATION. **Sulfentrazone**: product profile. Philadelphia: Agricultural Product Group, 1999.
- 8 FERREIRA, M.C.; WERNECK, C.F.; FURUHASHI, S.; LEITE, G.J. Tratamento de toletes de cana-de-açúcar para o controle da podridão-abacaxi em pulverização conjugada ao plantio mecanizado. **Engenharia Agrícola**, v.28, n.2, p.263-273, 2008.
- 9 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. **Entomologia agrícola**. São Paulo: FEALQ, 2002. 920 p.
- 10 GUAGLIUMI, P. **Pragas da cana-de-açúcar no nordeste do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e do Alcool, 1972/73. 622 p.
- 11 INGRAM, J.W.; BYNUM, E.K.; CHARPENTIER, L.J. Effect of 2,4-D on sugarcane borer. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.40, n.3, p.745-746, 1947.
- 12 KUVA, M.A.; FERRAUDO, A.S.; PITELLI, R.A.; ALVES, P.L.C.A.; SALGADO, T.P. Padrões de infestação de comunidades de plantas daninhas no agroecossistema de cana-crua. **Planta Daninha**, v.26, n.4, p.549-557, 2008.

- 13 LORENZI, H. Plantas daninhas e seu controle na cultura da cana-de-açúcar. In: REUNIÃO TÉCNICA AGRONÔMICA COOPERSUCAR: PRAGAS DA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR, 1983, Piracicaba. **Anais...** São Paulo: COOPERSUCAR, 1983. p.59-73.
- 14 MACEDO, N.; CAMPOS, M.B.S. Inovações tecnológicas na criação massal de *Diatraea saccharalis* para o controle biológico. **STAB: Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil**, v.17, n.2, p.46-49, 1998.
- 15 NORRIS, R.F.; KOGAN, M. Interactions between weeds, arthropods pests, and their natural enemies in managed ecosystems. **Weed Science**, v.48, n.1, p.94-158, 2000.
- 16 OHMES, G.A.; HAYES, R.M.; MUELLER, T.C. Sulfentrazona dissipation in a Tennessee soil. **Weed Technology**, v.14, n.1, p.100-105, 2000.
- 17 OLIVEIRA, F.G.L.; ANDRADE, C.F.S. Ocorrência de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Pyralidae). **Ciência et Praxis**, v.2, n.4, p.7-10, 2009.
- 18 PEREIRA, L. **Efeito dos herbicidas clomazona e ametrina em parâmetros funcionais da espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus***. 2012. 85 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- 19 RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. Londrina: IAPAR, 2011. 697 p.
- 20 STORY, J.M.; STOUGAARD, R.N. Compatibility of two herbicides with *Cyphocleonus achates* (Coleoptera: Curculionidae) and *Agapeta zoegana* (Lepidoptera: Tortricidae), two root insects introduced for biological control of spotted knapweed. **Environmental Entomology**, v.35, n.2, p.373-378, 2006.
- 21 TAKAHASHI, E.N.; ALVES, P.L.C.A.; SALGADO, T.P.; FARIAS, M.A.; SILVA, A.C.; BIAGGIONI, B.T. Consequências da deriva de clomazona e sulfentrazona em clones de *E. grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**, v.33, n.4, p.675-683, 2009.
- 22 VELINI, E.D.; CARBONARI, C.A.; SILVA, J.R.M.; BOSCHIERU, M.; VALÉRIO, W.; AMSTALDEM, F. Monitoramento da deriva em aplicações de herbicidas em cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto. **Anais...** Londrina: SBCPD, 2010. p.3528-3532. CD-ROM.
- 23 VACARI, A.M.; GENOVEZ, G.S.; LAURENTIS, V.L.; BORTOLI, S.A. 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, 2012.
- 24 ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1999.