

ADALBERTO HIPÓLITO DE SOUSA

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS DE
Sitophilus zeamais AO OZÔNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S725r
2010

Sousa, Adalberto Hipólito de, 1980-
Respostas fisiológicas e comportamentais de
Sitophilus zeamais ao ozônio / Adalberto Hipólito de
Sousa. – Viçosa, MG, 2010.
vii, 98f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Lêda Rita D'Antonio Faroni.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Sitophilus zeamais* - Comportamento.
2. *Sitophilus zeamais* - Populações. 3. *Sitophilus zeamais* -
Seleção. 4. Ozônio - Toxicologia. 5. Insetos - Fisiologia.
6. Insetos - Resistência a inseticidas. 7. Milho - Armazena-
mento - Doenças e danos. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 595.768

ADALBERTO HIPÓLITO DE SOUSA

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS DE
Sitophilus zeamais AO OZÔNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de abril de 2010.

**Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes
(Co-orientador)**

**Prof. Marcos Rogério Tótola
(Co-orientador)**

Prof. Elton Lúcio de Araújo

Prof. Eliseu José Guedes Pereira

**Prof^ª. Lêda Rita D'Antonino Faroni
(Orientadora)**

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos
“Incentivo e ternura”

Dedico

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me trazer saúde, perseverança e sabedoria.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof^a. Lêda Rita D'Antonino Faroni, pela orientação durante o mestrado e doutorado, pela confiança, ensinamentos e oportunidades concedidas.

Ao Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes, pelo exemplo de Educador, um verdadeiro mestre que sempre me incentivou; ao Dr. Wilfredo Irrazabal Urruchi, pelas sugestões, disponibilidade e calibragem dos equipamentos; e aos componentes da banca, pela cordialidade ao convite e forma como participaram da mesma.

Aos meus pais Adalberto Sousa de Oliveira e Cleonice Hipólito de Sousa; aos meus irmãos Alessandra, Alessandro, Alenilda, Alessiane e Patrícia; e aos meus sobrinhos Mateus e Ingrid, por me proporcionarem momentos maravilhosos e me incentivarem nesta conquista.

Aos amigos do laboratório Marco Aurélio e Ernandes, pela amizade e ajuda em várias etapas da minha Pós-Graduação; aos amigos Gutierres e Romenique, pela amizade e ajuda na condução dos experimentos e redação da tese.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos; aos amigos e funcionários dos Programas de Pós-Graduação em Entomologia e em Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio durante a Pós-Graduação.

Aos amigos Adriano, Alberto, Alexandre, Alisson, Augusto, Ana Carolina, Juliana Cristina, Juliana Lobo, Joseane, Marcela, Marta, Nelsa, Hany, Rodrigo, Ricardo, Rita, Tales e Yenes, pelo apoio, convivência e incentivo;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho e para minha formação acadêmica, Muito Obrigado!!!

BIOGRAFIA

Adalberto Hipólito de Sousa, filho de Adalberto Sousa de Oliveira e Cleonice Hipólito de Sousa, nasceu em Picos, PI em 28 de abril de 1980.

Em fevereiro de 2000 iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, antiga Escola Superior de Agricultura de Mossoró, graduando-se Engenheiro Agrônomo em janeiro de 2005. Em fevereiro do mesmo ano ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação da Prof^a. Lêda Rita D'Antonino Faroni, submetendo-se à defesa de tese em 28 de fevereiro de 2007. Em março do mesmo ano iniciou o Doutorado, também no Programa de Pós-Graduação em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação da Prof^a. Lêda Rita D'Antonino Faroni, submetendo-se à defesa de tese em 27 de abril de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
Introdução geral	01
Referências Bibliográficas	05
Artigo 1. Toxicidade e respostas comportamentais ao ozônio de populações de <i>Sitophilus zeamais</i> (Coleoptera: Curculionidae)	11
Resumo	12
Abstract	13
Introdução	14
Material e Métodos	16
Resultados	24
Discussão	37
Referências Bibliográficas	40
Artigo 2. Comportamento de caminamento e de decolagem de populações <i>Sitophilus zeamais</i> (Coleoptera: Curculionidae) sob exposição sub-letal ao ozônio	48
Resumo	49
Abstract	50
Introdução	51
Material e Métodos	53
Resultados	58
Discussão	70
Referências Bibliográficas	72
Artigo 3. Seleção de <i>Sitophilus zeamais</i> (Coleoptera: Curculionidae) ao ozônio.	80
Resumo	81
Abstract	82
Introdução	83
Material e Métodos	84
Resultados	87
Discussão	93
Referências Bibliográficas	94
Considerações finais	98

RESUMO

SOUSA, Adalberto Hipólito de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2010. **Respostas fisiológicas e comportamentais de *Sitophilus zeamais* ao ozônio.** Orientadora: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Co-orientadores: Raul Narciso Carvalho Guedes e Marcos Rogério Tótola.

A utilização da atmosfera enriquecida com o ozônio (O₃) tem sido apontada como uma das principais alternativas para o controle de insetos-praga de produtos armazenados. Embora os efeitos tóxicos do ozônio para os insetos já sejam conhecidos, são escassas as informações sobre os seus efeitos no comportamento das pragas. Este trabalho tem por objetivo avaliar as respostas comportamentais de locomoção de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) sob concentrações sub-letais do ozônio, estabelecer relações entre o comportamento e os padrões fisiológicos das populações e verificar os riscos de evolução de resistência ao fumigante. Os resultados indicaram que nenhuma população de *S. zeamais* apresentou resistência ao ozônio. O comportamento locomotor dos insetos na presença do ozônio variou entre as populações, proporcionalmente ao comportamento locomotor na ausência do gás. Algumas populações apresentaram redução da atividade locomotora na presença do ozônio, indicando resposta comportamental do tipo estímulo-dependente nestas populações. Observou-se que a atividade locomotora dos insetos em função do incremento da concentração é dependente da população e do sexo. Em geral, a redução da atividade locomotora dos insetos foi mais expressiva nas fêmeas, embora o comportamento locomotor seja específico para cada população. Por fim, não foi constatado ganho resistência ao ozônio nas populações de *S. zeamais* submetidas a ciclos sucessivos de seleção.

ABSTRACT

SOUSA, Adalberto Hipólito de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April of 2010. **Physiological and behavioral responses of *Sitophilus zeamais* to ozone.** Adviser: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Co-Advisers: Raul Narciso Carvalho Guedes and Marcos Rogério Tótola.

Use of ozone enriched air (O₃) has been considered as one of the major alternatives for controlling insect pests of stored products. Although the toxic effects of ozone on insects are already known, there is little information about its effects on insect pest behavior. This study aimed to evaluate the locomotor behavior of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in response to sub-lethal ozone concentrations, establish relationships between behavioral and physiological patterns of populations and evaluate the risk of development of resistance to the fumigant. The results indicated that none of the *S. zeamais* populations in study were resistant to ozone. Locomotor behavior of insects in response to ozone varied among the populations proportionally to locomotor behavior in the lack of the gas. Some populations had reduced locomotor activity when exposed to ozone, indicating a stimulus-dependent response. Locomotor activity of insects in response to increasing ozone concentrations was found to be dependent on the population and the sex. In general, reduction in locomotor activity was more pronounced in female insects, although locomotor behavior is specific to each population. In conclusion, selection for ozone resistance was not possible in populations of *S. zeamais* subjected to successive selection cycles.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Durante o armazenamento, a massa de grãos comporta-se como um ecossistema dinâmico, em que a deterioração dos grãos deve-se, principalmente, à interação entre agentes bióticos e abióticos (Loeck, 2002). Os insetos da ordem Coleoptera se destacam entre os insetos-praga de produtos armazenados porque apresentam a habilidade de penetrar e se desenvolver nas camadas mais profundas da massa de grãos armazenados em silos e graneleiros (Rees, 1996). O *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) é uma praga destruidora de grãos de cereais, com importância econômica reconhecida em regiões tropicais. Suas mandíbulas fortes são capazes de romper o tegumento dos grãos. A fêmea faz um orifício, geralmente na região do embrião, para depositar os seus ovos, os quais são posteriormente cobertos com um tampão gelatinoso produzido pela própria fêmea (Rees, 1996; Athié & Paula, 2002; Faroni & Sousa, 2006).

O controle químico é o método mais empregado no controle das pragas de produtos armazenados (Guedes, 1990/1991). Porém, o uso contínuo e indiscriminado de inseticidas tem favorecido o desenvolvimento de populações resistentes, conforme reportado para a fosfina (Champ & Dyte, 1976; Pacheco et al., 1990; Pimentel et al., 2007; 2009) e para os inseticidas organofosforados e piretróides (Santos, 1988; Pacheco et al., 1991; Guedes et al., 1994; Guedes et al., 1995; Ribeiro et al., 2003). A resistência é resultante de mudanças genéticas que possibilitam aos indivíduos resistentes suportar doses de inseticida que seriam letais para os indivíduos de uma população normal da mesma espécie (Guedes, 1990/1991; Subramanyam & Hagstrum, 1996). Os insetos de uma população podem apresentar resistência a mais de um inseticida, sendo reconhecida como resistência cruzada quando um único mecanismo confere resistência a dois ou mais inseticidas, ou resistência múltipla,

quando dois ou mais mecanismos diferentes coexistem no indivíduo e conferem resistência a dois ou mais inseticidas distintos (Georghiou, 1972; Mckenzie, 1996).

Diante da preocupação com a evolução de resistência a inseticidas e da preocupação com os riscos oferecidos pelos inseticidas à saúde humana e ao meio ambiente, algumas pesquisas têm indicado a utilização da atmosfera modificada com o gás ozônio como um importante método alternativo de controle (Kells et al., 2001; Mendez et al., 2003; Sousa et al., 2008; Isikber & Öztekin, 2009; Lu et al., 2009). Os primeiros relatos sobre o ozônio datam de 1785, quando Van Marum, um físico holandês, observou que descargas elétricas no ar resultavam em um odor irritante característico (Rideal, 1920; Hill & Rice, 1982). Todavia, a descoberta do ozônio só foi anunciada oficialmente na Academia de Munique em 1940. Por ser um poderoso agente oxidante, o ozônio é altamente tóxico para fungos, bactérias, vírus, protozoários e insetos (Kells et al., 2001; Mendez et al., 2003; Sousa et al., 2008). As primeiras investigações utilizando ozônio como inseticida foram realizadas com insetos domésticos (formigas, baratas, moscas e traças), visando manter as condições de higiene do ambiente (Beard, 1965; Levy et al., 1972, 1973, 1974).

Em insetos-praga de produtos armazenados, a primeira pesquisa foi publicada no início dos anos oitenta, sobre a toxicidade do ozônio para larvas, pupas e adultos de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Erdman, 1980). A eficácia do ozônio também foi estudada em nível de campo, onde se observou que a ozonização de uma massa de grãos de milho de 8,9 ton foi eficaz no controle de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae), *S. zeamais* e *T. castaneum* (Kells et al., 2001). Estudos mostraram que o ozônio não modifica a qualidade dos grãos e é economicamente viável para milho (Pereira et al., 2007; 2008). Adicionalmente, o ozônio não apresenta resistência cruzada com a fosfina (Sousa et al., 2008).

A susceptibilidade dos insetos aos inseticidas tem sido frequentemente documentada nas últimas décadas, onde são prioritários os esforços para se entenderem os mecanismos bioquímico-fisiológicos associados a este fenômeno (Araújo et al., 2008; Silva et al., 2010). Porém, são escassas as informações sobre as respostas comportamentais dos insetos aos inseticidas. Não há informações na literatura consultada a respeito da influência dos fumigantes sobre o comportamento locomotor dos insetos-praga de produtos armazenados. As pesquisas mais expressivas neste campo de investigação científica estão relacionadas com inseticidas protetores (Watson & Barson, 1996; Pereira et al., 2009; Guedes et al., 2009a,b). Embora as respostas comportamentais dos insetos possam ser influenciadas pelos compostos tóxicos, nem sempre esta relação é estabelecida (Pereira et al., 2009).

A resistência comportamental a inseticidas é uma característica hereditária e envolve o conjunto de todos os atos que os insetos de uma população realizam ou deixam de realizar para escapar dos efeitos deletérios dos inseticidas, ao contrário do que seria observado para indivíduos susceptíveis da mesma espécie; tal fenômeno também tem sido associado à capacidade de aprendizagem dos insetos (Lockwood et al., 1984; French-Constant, 1994; Hoy et al., 1998). Neste caso, a população pode conservar a sua susceptibilidade intrínseca ao inseticida. Os mecanismos comportamentais podem ser estímulo-independente ou estímulo-dependentes (Georghiou, 1972). Resistência comportamental estímulo-independente inclui um comportamento padrão que previne a exposição à substância tóxica e independe da sua presença. Resistência comportamental estímulo-dependente refere-se a um aumento na habilidade do inseto de detectar a substância tóxica e a sua expressão depende da presença do composto (Georghiou, 1972; Lockwood et al., 1984).

Estudos que determinam o risco de evolução de resistência a inseticidas candidatos a uso podem prover informações importantes para a elaboração de estratégias de manejo de pragas, tais a determinação do número de gerações e de aplicações necessárias para o desenvolvimento de resistência (Tabashnik, 1992). A seleção de uma determinada característica pode estar associada à pleiotropia, que é a habilidade de um único gene afetar mais de uma característica no indivíduo (Raymond et al., 2005; Guedes et al., 2009a). A resistência a inseticida possibilita mudanças nos padrões normais da fisiologia, comportamento e reprodução dos insetos (Coustau et al., 2000; Berticat et al., 2002; Guedes et al., 2006). Estas características são importantes tanto para se estabelecerem associações com os mecanismos de ação dos inseticidas, como para se determinar a presença de custos adaptativos associados à resistência (McKenzie, 1996; Sousa et al., 2009).

Para verificar a exposição de populações de *S. zeamais* a concentrações sub-letais do ozônio e verificar se os indivíduos adquirem resistência adicional ao gás, foram conduzidos três conjuntos de ensaios. O primeiro teve por meta determinar a toxicidade do ozônio para as populações de *S. zeamais* e verificar os padrões comportamentais de caminhamento destas populações, quando expostas ao ozônio. O segundo teve por objetivo caracterizar o comportamento de caminhamento e de decolagem de indivíduos de populações de *S. zeamais* com diferentes padrões de caminhamento, sob concentrações sub-letais do ozônio. O terceiro grupo de bioensaios teve por meta avaliar a susceptibilidade ao ozônio de populações de *S. zeamais* submetidas à pressão de seleção com o gás e acompanhar os seus padrões de comportamento de caminhamento. Nos três grupos de bioensaios, foram avaliadas as taxas respiratórias e massa corporal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, R.A.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, M.G.A.; Ferreira, G.H. Enhanced activity of carbohydrate- and lipid-metabolizing enzymes in insecticide-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Bulletin of Entomological Research**, v.98, n.4, p.417-424, 2008.
- Athié, I.; Paula, D.C. **Insetos de grãos armazenados – aspectos biológicos e identificação**. 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 2002. 244p.
- Beard, R.L. Observation on house flies on high-ozone environments. **Annals of the Entomological Society of America**, v.58, n.3, pp.404-405, 1965.
- Berticat, C.; Boquien, G.; Raymond, M.; Chevillon, C. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. **Genetical Research**, v.79, n.1, p.41-47, 2002.
- Champ, B.R.; Dyte, C.E. **Global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests**. Rome: FAO/UN, 1976. p.356.
- Coustau, C.; Chevillon, C.; French-Constant, R.H. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? **Trends in Ecology and Evolution**, v.15, n.9, p.378-383, 2000.
- Erdman, H.E. Ozone toxicity during ontogeny of two species of flour beetles, *Tribolium confusum* and *T. castaneum*. **Environmental Entomology**, v.9, n.1, p.16-17, 1980.
- Faroni, L.R.D'A.; Sousa, A.H. Aspectos biológicos e taxonômicos dos principais insetos-praga de produtos armazenados. In: Almeida, F.A.C.; Duarte, M.E.M.; Mata, M.E.R.M.C. **Tecnologia de Armazenagem em sementes**. Campina Grande: UFCG, 2006. p.371-402.

- French-Constant, R.H. The molecular and population genetics of cyclodiene resistance. **Insect Biochemical Molecular Biology**, v.4, p.275-288, 1994.
- Georghiou, G.P. The evolution of resistance to pesticides. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.3, p.133-168, 1972.
- Guedes, N.M.P.; Guedes, R.N.C.; Ferreira, G.H.; Silva, L.B. Flight take-off and walking behavior of insecticide-susceptible and – resistant strains of *Sitophilus zeamais* exposed to deltamethrin. **Bulletin of Entomological Research**, v.99, n.4, p.393-400, 2009a.
- Guedes, N.M.P.; Guedes, R.N.C.; Silva, L.B.; Cordeiro, E.M.G. Deltamethrin-induced feeding plasticity in pyrethroid-susceptible and -resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Applied Entomology**, v.133, n.7, p.524-532, 2009b.
- Guedes, R.N.C. Manejo integrado para a proteção de grãos armazenados contra insetos. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.15/16, n.1/2, p.3-48, 1990/1991.
- Guedes, R.N.C.; Lima, J.O.G.; Santos, J.P.; Cruz, C.D. Inheritance of deltamethrin resistance in a Brazilian strain of maize weevil *Sitophilus zeamais* Mots. **International Journal of Pest Management**, v.40, n.1, p.103-106, 1994.
- Guedes, R.N.C.; Lima, J.O.G.; Santos, J.P.; Cruz, C.D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Product Research**, v.31, n.2, p.145-150, 1995.
- Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Guedes, N.M.P.; Ribeiro, B.; Serrão, J.E. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Physiological Entomology**, v.31, n.1, p.30-38, 2006.

- Hill, A.G.; Rice, R.G. **Handbook of Ozone Technology and Applications**. Michigan: Ann Arbor Science, 1982. p.1.
- Hoy, C.W.; Head, G.P.; Hall, F.R. Spatial heterogeneity and insect adaptation to toxins. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.571-594, 1998.
- Isikber, A.A.; Öztekin, S. Comparison of susceptibility of two stored-product insects, *Ephesia kuehniella* Zeller and *Tribolium confusum* du Val to gaseous ozone. **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.3, p.159-164, 2009.
- Kells, S.A.; Mason, L.J.; Maier, D.E.; Wolososhuk, C.P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v.37, n.4, p.371-383, 2001.
- Levy, R.; Chiu, Y.J.; Banks, W.A. Laboratory evaluation of candidate bait toxicants against the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. **Florida Entomological Society**, v.56, p.141-146, 1973.
- Levy, R.; Chiu, Y.J.; Cromroy, H.L. Effects of ozone on three species of Diptera. **Environmental Entomology**, v.1, n.5, p.608-611, 1972.
- Levy, R.; Jouvenaz, D. P.; Cromroy, H.L. Tolerance of three species to prolonged exposure ozone. **Environmental Entomology**, v.3, n.1, p.184-185, 1974.
- Lockwood, J.A.; Sparks, T.C.; Story, R.N. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. **Bulletin of the Entomological of America**, v.30, n.4, p.41-51, 1984.
- Loeck, A.E. Principais pragas que atacam produtos armazenados. In: Loeck, A.E. **Pragas de produtos armazenados**. Pelotas: EGUFPEL, 2002. p.35-59.
- Lu, B.; Ren, Y.; Du, Y.; Fu, Y.; Gu, Jie. Effect of ozone on respiration of adult *Sitophilus oryzae* (L.), *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Rhyzopertha dominica* (F.). **Journal of Insect Physiology**, v.55, n.10, p.885-889, 2009.

- McKenzie, J.A. Selection Against Resistant Phenotypes. In: McKenzie, J.A. **Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance**. Austin: Academic Press, 1996. 185p.
- Mendez, F.; Maier, D.E.; Mason, L.J.; Woloshuck, C.P. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. **Journal of Stored Products Research**, v.39, n.1, p.33-44, 2003.
- Pacheco, I.A.; Sartori, M.R.; Bolonhezi, S. Resistance to malathion, pirimiphos-methyl and fenitrothion in Coleoptera from stored grains. In: Fleurat-Lessard, F.; Ducom, P. **Proceedings of the 5 th International Working Conference on Stored-Product Protection**. Bordeaux: Imprimerie du Médoc, 1991. p.1029-1037.
- Pacheco, I.A.; Sartori, M.R.; Taylor, R.W.D. Levantamento de resistência de insetos-praga de grãos armazenados à fosfina no estado de São Paulo. **Coletânea do ITAL**, v.20, n.2, p.144-154, 1990.
- Pereira, A.M.; Faroni, L.R.D'A.; Silva Júnior, A.G.; Sousa, A.H.; Paes, J.L. Viabilidade econômica do gás ozônio como fumigante em grãos de milho armazenados. **Engenharia na Agricultura**, v.16, n.2, p.144-154, 2008.
- Pereira, A.M.; Faroni, L.R.D'A.; Sousa, A.H.; Urruchi, W.I.; Roma, R.C.C. Efeito imediato e latente da fumigação com ozônio na qualidade dos grãos de milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.32, n.2, p.100-110, 2007.
- Pereira, C.J.; Pereira, E.J.G.; Cordeiro, E.M.G.; Della Lucia, T.M.C.; Tótola, M.R.; Guedes, R.N.C. Organophosphate resistance in the maize weevil *Sitophilus zeamais*: Magnitude and behavior. **Crop Protection**, v.28, n.2, p.168-173, 2009.
- Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.D'A.; Guedes, R.N.C.; Sousa, A.H.; Tótola, M.R. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschusky

- (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.1, p.71-74, 2009.
- Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.D'A.; Tótola, M.R.; Guedes, R.N.C. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. **Pest Management Science**, v.63, n.9, p.876-881, 2007.
- Raymond, B.; Sayyed, A.H.; Wright, D.J. Genes and environment interact to determine the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the Royal Society**, v.272, p.1519-1524, 2005.
- Rees, D.P. Coleoptera. In: Subramanyam, B.; Hagstrum, D.W. **Integrated Management of Insects in Stored Products**, New York: Marcel Dekker, 1996. p.1-39.
- Ribeiro, B.M.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Santos, J.P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.39, n.1, p.21-31, 2003.
- Rideal, E.K. **Ozone**. London: Constable and Company, 1920.
- Santos, J. P. Comparação entre populações de *Sitophilus zeamais* quanto à resistência a inseticidas piretróides e fosforados. In: Congresso Nacional do Milho e Sorgo, 15, 1988, Piracicaba, **CD de Resumos**. Piracicaba, 1988. pp. 71.
- Silva, L.B.; Reis, A.P.; Pereira, E.J.G.; Oliveira, M.G.A.; Guedes, R.N.C. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases from insecticide-resistant and -susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v.155, n.1, p.12-19, 2010.
- Sousa, A.H.; Faroni, L.R.D'A.; Pimentel, M.A.G.; Guedes, R.N.C. Developmental and population growth rates of phosphine-resistant and -susceptible populations

of stored product insect-pests. **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.4, p.241-246, 2009.

Sousa, A.H.; Faroni, L.R.D'A.; Guedes, R.N.C.; Tótola, M.R.; Urruchi, W.I. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect-pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, v.44, n.4, p.379-385, 2008.

Subramanyam, B.; Hagstrum, D.W. Resistance Measurement and Management. In: Subramanyam, B.; Hagstrum, D. W. **Integrated Management of Insects in Stored Products**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.331-397.

Tabashnik, B.E. Resistance risk assessment: realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae), tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae), and colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v.85, n.5, p.1551-1559, 1992.

Watson, E.; Barson, G. A laboratory assessment of the behavioural responses of three strains of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) to three insecticides and the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide. **Journal of Stored Products Research**, v.32, n.1, p.59-67, 1996.

**TOXICIDADE E RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS AO OZÔNIO DE
POPULAÇÕES DE *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

Palavras-chave: comportamento locomotor, fumigante alternativo, caruncho do milho, armazenamento.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade do ozônio para populações de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) e verificar a influência do gás sobre o comportamento locomotor das populações. Adicionalmente, foram avaliadas as suas taxas respiratórias e massa corporal para reconhecer eventual associação destas com os níveis de susceptibilidade e padrões comportamentais. A toxicidade do ozônio foi determinada por meio de bioensaios tempo-resposta, utilizando-se a concentração do ozônio de 50 ppm, em fluxo contínuo de 2 L min⁻¹. As populações foram submetidas a bioensaios de caminhada na presença e na ausência do ozônio. Avaliaram-se também a produção de CO₂ e a massa corpórea de cada população. Nenhuma das populações de *S. zeamais* apresentou resistência ao ozônio. Estas populações apresentaram diferentes padrões comportamentais de caminhada (distância percorrida, tempo de repouso e velocidade de caminhada) na presença e na ausência do ozônio e diferentes padrões de taxa respiratória e de massa corpórea. Todavia, não foram observadas correlações significativas entre a toxicidade do ozônio e os padrões comportamentais de caminhada. O comportamento de caminhada natural das populações foi influenciado pela massa corporal dos insetos, mas não foi influenciado pela taxa respiratória. Embora a distância percorrida pelas populações na presença do ozônio esteja associada com os padrões naturais de caminhada dos insetos, foi observada redução na atividade locomotora de algumas populações na presença do ozônio. Isto indica que as respostas comportamentais de caminhada de *S. zeamais* ao ozônio são do tipo estímulo-dependente, ao menos para algumas populações.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the ozone toxicity to populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and the influence of the gas on insect locomotor behavior. Additionally, respiration rates and body mass were evaluated in order to recognize possible associations with levels of susceptibility and behavioral patterns. Ozone toxicity was determined using time-response bioassays, in concentrations of 50 ppm, at continuous flow of 2 L min⁻¹. Insect populations were subjected to walking bioassays in the presence and absence of ozone. CO₂ production and body mass of each population were also evaluated. None of the *S. zeamais* populations showed resistance to ozone. These populations showed different walking patterns (distance walked, resting time and walking velocity) in the presence and absence of ozone and different patterns of respiratory rate and body mass index. However, no significant correlations were found between ozone toxicity and walking patterns. Natural walking of insects was affected by body mass, but not by respiratory rate. Although the distance walked by the populations exposed to ozone is associated with the patterns of natural walking, there was a decrease in locomotor activity of some populations exposed to the gas. This indicates that the walking response of *S. zeamais* to ozone is stimulus-dependent, at least for some populations.

Key words: locomotor behavior, alternative fumigant, maize weevil, storage.

1. INTRODUÇÃO

A utilização do ozônio (O_3) tem sido indicada como um método alternativo potencial para o controle de insetos-praga de produtos armazenados, por ser este um gás oxidante altamente tóxico para diversos organismos, como insetos, fungos, bactérias e vírus (Khadre et al., 2001; An et al., 2007; Isikber & Öztekin, 2009). Basicamente, o ozônio atua promovendo danos às membranas celulares ou desencadeando a morte celular em diversos organismos vivos mediante estresse oxidativo (Hollingsworth & Armstrong, 2005). O ozônio é uma forma triatômica do oxigênio e possui o segundo maior potencial de oxidação dentre os elementos químicos, sendo superado somente pelo flúor (F_2) (Hill & Rice, 1982).

A exposição das populações de insetos a concentrações ineficazes de inseticidas pode favorecer o desenvolvimento de resistência aos compostos químicos (Haynes, 1988; Hoy et al., 1998; Wang et al., 2004). Porém, estudos detalhados a respeito do efeito sub-letal dos fumigantes sobre o comportamento dos insetos são escassos na literatura. Quase todos os inseticidas influenciam o comportamento dos insetos e o conhecimento fenômeno pode contribuir para a elaboração de estratégias de manejo de populações de uma mesma espécie ou de espécies distintas que compõem o mesmo ambiente (Haynes, 1988; Watson et al., 1997).

Estudos toxicológicos geralmente se concentram no efeito fisiológico dos inseticidas em detrimento do efeito causado por este no comportamento do inseto (Kongmee et al., 2004). Alguns insetos são capazes de mudar o seu comportamento por apresentarem percepção sensorial aos compostos tóxicos. Algumas mudanças no comportamento dos insetos podem diminuir a eficácia dos tratamentos com inseticidas, e assim os impactos letais de um inseticida podem ser superestimados em uma população. Tais alterações comportamentais podem, ainda, conduzir à evolução

de resistência comportamental aos inseticidas devido ao uso contínuo e indiscriminado destes produtos (Haynes, 1988; Gould, 1991; Hoy et al., 1998; Guedes et al., 2009a,b). Sabe-se que a expressão do comportamento dos insetos, assim como de outras características, é resultante da interação entre o ambiente onde se encontram e o genótipo dos mesmos (Sibly et al., 1997; Futuyma, 1998; Hoy et al., 1998; Stearns & Hoekstra, 2000). Nesse sentido, a plasticidade fenotípica de populações de insetos-praga de produtos armazenados pode ser modificada quando os mesmos são submetidas a exposições sub-letais do agente de controle.

A taxa respiratória e a massa corporal dos insetos também podem contribuir para elucidar os mecanismos de ação dos inseticidas e para explicar as respostas comportamentais dos insetos a determinados inseticidas (Guedes et al., 2009a; Pereira et al., 2009). A susceptibilidade dos insetos aos fumigantes varia com a taxa respiratória (consumo de O₂ ou produção de CO₂) (Cotton, 1932), pois é determinada pela captação dos gases (Bond et al., 1969; Price, 1981; 1984; Chaudhry, 1997; Sousa et al., 2008). A taxa respiratória e a massa corporal refletem a soma das demandas energéticas dos processos fisiológicos dos insetos necessárias à manutenção do organismo e à expressão de mecanismos de defesa contra os inseticidas (Guedes et al., 2006; Araújo et al., 2008; Sousa et al., 2008).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade do ozônio para populações de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) e verificar a influência de exposições sub-letais do gás sobre o comportamento locomotor das populações. Adicionalmente, foram avaliadas as suas taxas respiratórias e massa corporal para reconhecer a possível associação destas com os níveis de susceptibilidade e padrões comportamentais das populações estudadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Insetos

Foram utilizadas 30 populações de *S. zeamais* coletadas nos estados brasileiros de Amazonas, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Piauí, Santa Catarina e São Paulo e em localidade paraguaias de Pedro Juan Caballero e Arroyo Jambure Amambay (Tabela 1), sendo que algumas dessas populações são resistentes à fosfina (Pimentel et al., 2009). Os insetos foram criados em frascos de vidro de 1,5 L, em câmaras climáticas do tipo B.O.D., sob condições constantes de temperatura (27 ± 2 °C), umidade relativa ($70\pm 5\%$) e escotofase de 24 h. Foram utilizados grãos de milho como substrato alimentar com teor de água de 13% base úmida (b.u.), previamente expurgados e mantidos a -18 °C para evitar reinfestação.

Tabela 1. Origem das populações de *Strophilus zeamais*

Cidade	Estado (abreviação), país	Local de coleta	Mês/ano
Abre Campo	Minas Gerais (MG), Brasil	Silo metálico	Novembro/2005
Água Boa	Mato Grosso (MT), Brasil	Armazém convencional	Agosto/2004
Amambay	Paraguai	Armazém convencional	Dezembro/2007
Anápolis	Goiás (GO), Brasil	Silo metálico	Agosto/2007
Canarana	Mato Grosso (MT), Brasil	Armazém convencional	Janeiro/2005
Coimbra	Minas Gerais (MG), Brasil	Armazém convencional	Abril/2007
Cristalina	Goiás (GO), Brasil	Armazém convencional	Dezembro/2006
Dourados Bororó	Mato Grosso do Sul (MS), Brasil	Silo metálico	Janeiro/2008
Dourados Linha Barreirinha	Mato Grosso do Sul (MS), Brasil	Silo metálico	Dezembro/2007
Dourados Linha Proterito	Mato Grosso do Sul (MS), Brasil	Silo metálico	Janeiro/2008
Espirito Santo do Pinhal	São Paulo (SP), Brasil	Armazém convencional	Dezembro/2007
Guarapuava	Paraná (PR), Brasil	Silo metálico	Agosto/2006
Guaxupé	Minas Gerais (MG), Brasil	Silo metálico	Agosto/2005
Iporá	Goiás (GO), Brasil	Armazém convencional	Dezembro/2006
Jataí	Goiás (GO), Brasil	Silo metálico	Setembro/2006
Machado	Minas Gerais (MG), Brasil	Industria de alimentos	Julho/2005
Nova Era	Minas Gerais (MG), Brasil	Armazém convencional	Maior/2005
Paracatu	Minas Gerais (MG), Brasil	Silo metálico	Dezembro/2006
Pedro Juan Caballero	Paraguai	Armazém convencional	Setembro/2006
Picos	Piauí (PI), Brasil	Armazém convencional	Abril/2007
Piracicaba	São Paulo (SP), Brasil	Laboratório	Agosto/2004
Sacramento	Minas Gerais (MG), Brasil	Armazém convencional	Maior/2005
São João	Pernambuco (PE), Brasil	Armazém convencional	Dezembro/2007
São José do Rio Pardo	São Paulo (SP), Brasil	Armazém convencional	Setembro/2006
Tunápolis	Santa Catarina (SC), Brasil	Armazém convencional	Maior/2005
Uirapuru	Amazonas (AM), Brasil	Armazém convencional	Fevereiro/2008
Unai	Minas Gerais (MG), Brasil	Silo metálico	Agosto/2004
Vicentina	Mato Grosso do Sul (MS), Brasil	Silo metálico	Setembro/2006
Viçosa	Minas Gerais (MG), Brasil	Silo metálico	Agosto/2008
Votuporanga	São Paulo (SP), Brasil	Armazém convencional	Janeiro/2008

2.2. Toxicidade do ozônio

A toxicidade do ozônio para as populações de *S. zeamais* foi determinada por meio de estimativas dos tempos de exposição letais para 50 e 95% dos insetos (TL₅₀ e TL₉₅). Para isso, foram estabelecidas curvas tempo-resposta mediante bioensaios com períodos crescentes de exposição ao ozônio. A concentração do gás foi fixada em 50 ppm ($\approx 0,11 \text{ g m}^{-3}$), em fluxo contínuo de 2 L min^{-1} . Foram realizados testes preliminares para se estimar os tempos de exposição máximos e mínimos a serem utilizados nos bioensaios de tempo-resposta, tendo sido utilizado de cinco a seis períodos de exposição.

A aplicação do ozônio foi realizada no interior de câmaras plásticas (13 cm de largura \times 20 cm de altura), a $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 5\%$. A injeção e exaustão do gás foram feitas por intermédio de uma conexão instalada a 6 cm da base de cada câmara e outra na parte superior (tampa), respectivamente. O mesmo sistema foi utilizado para o controle, porém, utilizando-se gás oxigênio (pureza mínima de 99,99%). Os insetos de cada população foram colocados em gaiolas plásticas (4 cm de largura \times 3,5 cm de altura) suspensas a 10 cm da base das câmaras. As gaiolas tiveram a tampa e o fundo confeccionados com tecido do tipo organza, permitindo a passagem livre do ozônio e do oxigênio. Foram utilizadas três repetições, cada uma com 50 adultos não-sexados, com idade variando de uma a quatro semanas. A mortalidade dos insetos foi avaliada após oito dias de cada período de exposição.

2.3. Obtenção do ozônio e funcionamento do sistema

O ozônio foi obtido através do gerador de ozônio O&L3 ORM (Ozone & Life, São José dos Campos, SP, Brasil) (Figura 1), o qual utiliza gás oxigênio

comprimido (pureza mínima de 99,99%) como insumo. Na saída do cilindro de oxigênio foi instalado um dispositivo com duas saídas de ar com vazão de 6 L min⁻¹, uma passando pelo gerador de ozônio e a outra indo para o sistema que utilizou apenas o oxigênio (controle). O ozônio e o oxigênio foram distribuídos uniformemente para as câmaras onde se encontravam os insetos (Figura 2). O ozônio residual e oxigênio da exaustão foram conectados a um dispositivo confeccionado com PVC (4,5 cm de largura × 56 cm de altura), com coluna de 8,0 cm de água, antes de serem lançados na atmosfera, de modo a garantir a distribuição uniforme do gás no interior das câmaras.

Na geração do ozônio, o gás oxigênio passa por um reator refrigerado, onde existe uma descarga por barreira dielétrica. Esse tipo de descarga é produzido ao se aplicar uma alta voltagem entre dois eletrodos paralelos, tendo entre eles um dielétrico (vidro) e um espaço livre por onde flui o oxigênio. Nesse espaço livre é produzida uma descarga em forma de filamentos, onde são gerados elétrons com energia suficiente para produzir a quebra das moléculas de oxigênio, formando o ozônio (O₃).

A concentração do ozônio indicada pelo gerador de ozônio foi confirmada por meio de um monitorador de ozônio contínuo (BMT Messtechnik GMBH - BMT 930), com precisão de 0,001 ppm_v e pelo método iodométrico, utilizando-se titulação indireta (Eaton et al., 2000).



Figura 1. Gerador de ozônio O&L3.ORM

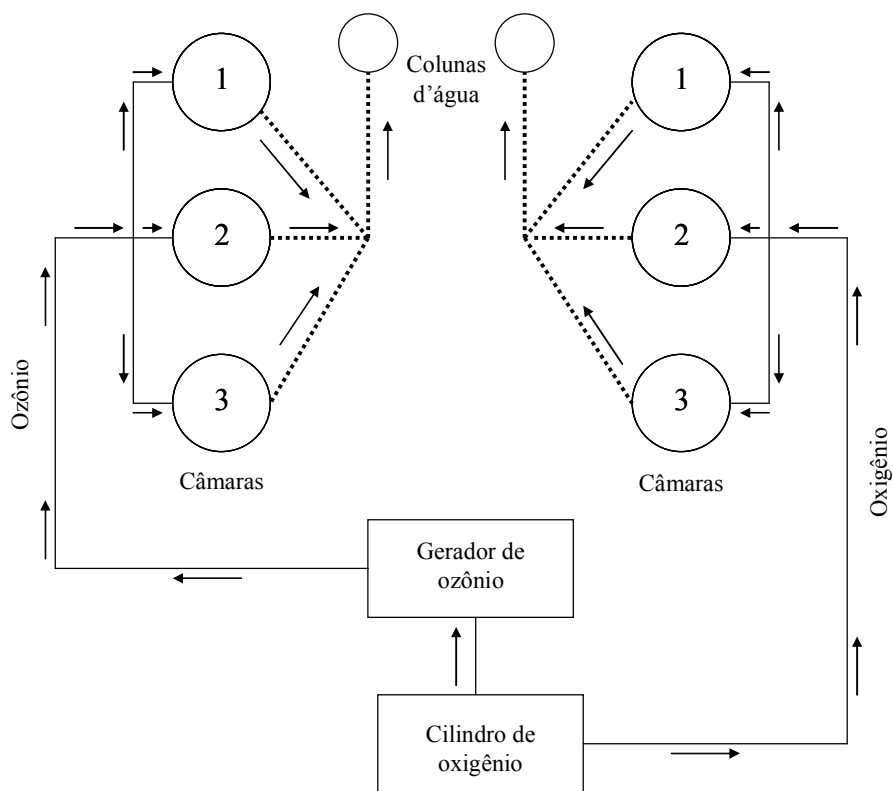


Figura 2. Esquema de aplicação do ozônio.

2.4. Caminhamento

Os métodos utilizados foram adaptados de Watson et al. (1997), Guedes et al. (2009a) e Pereira et al. (2009). O caminhamento dos insetos não-sexados foi observado individualmente durante 10 min em arenas confeccionadas com acrílico (3,5 cm de altura × 15 cm de largura), cujas paredes foram revestidas com Teflon® PTFE (DuPont, São Paulo, Brasil) para evitar o escape dos insetos. A concentração do ozônio foi fixada em 50 ppm ($\approx 0,11 \text{ g m}^{-3}$), em fluxo contínuo de $1,3 \text{ L min}^{-1}$. A injeção e exaustão do gás foram realizadas por intermédio de duas conexões instaladas opostamente em cada arena. O controle foi constituído pelo mesmo sistema, injetando-se apenas oxigênio.

O movimento de cada inseto dentro da arena foi registrado por um sistema de rastreamento que consiste de uma câmera CCD que registra e transfere as imagens digitalmente para um computador acoplado (ViewPoint Life Sciences Inc., Montreal, Canada). Cada inseto foi colocado no centro da arena com 2 min de antecedência do início dos testes para que ocorresse a saturação das câmaras com o ozônio e para que o inseto fizesse o reconhecimento da arena. As características avaliadas foram distância percorrida (cm), tempo de repouso (s) e velocidade de caminhamento (mm s^{-1}). Foram utilizadas 20 repetições para cada população. Os testes foram realizados em sala com iluminação artificial, na temperatura de 27 ± 2 °C, entre 7 e 19 h.

2.5. Taxa respiratória e massa corpórea

A produção de dióxido de carbono (CO_2) ($\mu\text{L de CO}_2 \text{ h}^{-1}/\text{inseto}$) foi mensurada por meio de um respirômetro do tipo CO_2 Analyser TR3C (Sable System International, Las Vegas, EUA), utilizando-se a metodologia adaptada de

trabalhos anteriores (Guedes et al., 2006; Sousa et al., 2008). Foram utilizadas câmaras respirométricas de 25 mL, cada uma contendo 20 insetos adultos não-sexados, conectadas a um sistema completamente fechado. A produção de CO₂ foi mensurada após o período de 15 h de aclimatação dos insetos nas câmaras, na temperatura de 27±2 °C. Para fazer a varredura de todo o CO₂ produzido no interior de cada câmara, procedeu-se à passagem de ar isento de CO₂ em fluxo de 100 mL min⁻¹ por um período de dois min. Essa corrente de ar faz com que todas as moléculas de CO₂ produzidas passem por um leitor de infravermelho acoplado ao sistema, que continuamente faz a mensuração do CO₂ produzido pelos insetos e acumulado no interior de cada câmara. O controle foi constituído por câmaras respirométricas sem insetos e foi utilizado para normalizar os dados da taxa respiratória de cada população. Após a mensuração do CO₂, os insetos foram removidos das câmaras e em seguida foram pesados usando-se uma balança analítica (Sartorius BP 210D, Göttingen, Germany). Os valores da taxa respiratória não foram normalizados pela massa corpórea porque este procedimento mascara o efeito individual das variáveis (Hayes, 2001). Foram utilizadas quatro repetições para cada população.

2.6. Análises estatísticas

Os dados dos bioensaios de tempo-resposta foram submetidos à análise de probit (PROC PROBIT; SAS Institute, 2002) para gerar as curvas de tempo-mortalidade. Os intervalos de confiança para as razões de toxicidade (RTs) foram calculados conforme Robertson & Preisler (1992) e os valores dos tempos letais (TLs) foram considerados significativamente diferentes ($P < 0,05$) se os intervalos de confiança das RTs não englobarem o valor 1.

Os resultados das variáveis de caminhada (distância percorrida, tempo de repouso e velocidade de caminhada) para as populações nos tratamentos com ozônio e sem ozônio (controle) foram submetidos à análise de variância (PROC GLM; SAS Institute, 2002). Posteriormente, foram realizados testes de agrupamento de médias de Scott–Knott entre as populações ($P < 0,05$) (Scott and Knott, 1974; SAEG, 2005) e teste de F entre os tratamentos com e sem ozônio ($P < 0,05$) (PROC GLM; SAS Institute, 2002). Os dados da produção de CO₂ e de massa corpórea também foram submetidos à análise de variância e teste de agrupamento de médias de Scott–Knott ($P < 0,05$) (Scott and Knott, 1974; SAEG, 2005).

Realizou-se uma análise de trilha para identificar e quantificar as interações diretas e indiretas entre distância percorrida na presença do ozônio, distância percorrida no controle, toxicidade do ozônio, massa corpórea, taxa respiratória e resistência à fosfina (Pimentel et al., 2009). A utilização da característica “distância percorrida” na análise de trilha foi baseada nos coeficientes de correlação entre distância percorrida \times tempo de repouso \times velocidade de caminhada (PROC CORR; SAS Institute, 2002). As interações da análise de trilha são representadas por coeficientes de correlação, que quantificam as interações entre as variáveis independentes, e coeficientes de regressão, responsáveis por quantificar o efeito direto na variável resposta (PROC REG e PROC CALIS; SAS Institute, 2002), conforme Mitchell (1993).

3. RESULTADOS

3.1. Toxicidade do ozônio

As curvas de tempo-mortalidade das populações de *S. zeamais* expostas ao ozônio são apresentadas na Tabela 2. As curvas de tempo-resposta foram usadas para se identificar a população padrão de susceptibilidade, bem como para identificar a toxicidade do ozônio para as populações. Embora tenha ocorrido variação na susceptibilidade das populações de *S. zeamais* ao ozônio, esta variação foi demasiado (< 2 vezes) para ser reconhecida como resistência ao ozônio. A razão de toxicidade (RT) dos TL_{50} e TL_{95} variou de 1,0 a 1,97 e de 1,0 a 1,73 vezes, respectivamente. A maioria das inclinações das curvas de tempo-mortalidade foram similares entre as populações, exceto em algumas populações que apresentaram inclinações moderadamente maiores, indicando homogeneidade de resposta ao ozônio.

Tabela 2. Toxicidade relativa do ozônio para as populações de *Strophilus zeamais*

População	Nº de insetos	Inclinação (\pm EPM)	TL ₅₀ (IF 95%) (h)	RT ₅₀ (IC 95%)	LT ₉₅ (IF 95%) (h)	RT ₉₅ (IC 95%)	χ^2	P
Tunápolis, SC ^a	750	4.60±0.26	4,57 (4,32-4,82)	-	10,40 (9,53-11,54)	-	9,27	0,16
Paracatu, MG ^c	900	3,52±0,21	5,01 (4,67-5,36)	1,10 (1,00-1,20)	14,70 (13,09-16,97)	1,41 (1,20-1,67)	8,81	0,18
Proterito, MG ^d	750	5,74 ±0,46	5,03 (4,70-5,31)	1,10 (1,00-1,21)	9,73 (9,05-10,68)	1,07 (0,92-1,25)	5,57	0,35
Víçosa, MG ^d	750	5,35±0,32	5,04 (4,77-5,32)	1,10 (1,02-1,20)	10,24 (9,43-11,32)	1,02 (0,90-1,15)	5,13	0,40
Nova Era, MG ^b	750	6,70±0,42	5,31 (5,10-5,50)	1,16 (1,09-1,24)	9,34 (8,80-10,06)	1,11 (0,99-1,25)	10,65	0,15
Caballero, PY ^d	750	7,11±0,51	5,54 (5,29-5,78)	1,21 (1,15-1,29)	9,45 (8,89-10,20)	1,10 (1,00-1,21)	6,59	0,25
Uirapuru, AM ^d	750	6,76±0,39	5,57 (5,36-5,78)	1,22 (1,15-1,29)	9,76 (9,22-10,45)	1,07 (0,97-1,17)	11,56	0,12
São José do Rio Preto, SP ^d	750	7,42±0,44	5,65 (5,45-5,85)	1,24 (1,17-1,30)	9,42 (8,89-10,10)	1,11 (1,01-1,21)	10,36	0,11
Amambay, PY ^d	900	5,86±0,38	5,78 (5,53-6,02)	1,26 (1,20-1,34)	11,02 (10,23-12,10)	1,06 (0,95-1,18)	9,51	0,15
Espirito Santo do Pinhal, SP ^d	900	5,51±0,32	5,79 (5,53-6,03)	1,27 (1,19-1,35)	11,50 (10,74-12,50)	1,11 (0,99-1,24)	12,32	0,14
Vicentina, MS ^d	750	8,39±0,56	5,99 (5,77-6,20)	1,31 (1,24-1,39)	9,41 (8,94-10,02)	1,11 (1,01-1,22)	9,00	0,16
Abre Campo, MG ^b	900	5,29±0,30	6,01 (5,69-6,32)	1,31 (1,23-1,40)	12,29 (11,36-13,49)	1,18 (1,06-1,31)	8,18	0,16
Bororó, MS ^d	900	4,67±0,34	6,04 (5,66-6,39)	1,32 (1,22-1,43)	13,60 (12,53-15,10)	1,31 (1,15-1,49)	9,36	0,23
Votuporanga, SP ^d	750	8,24±0,41	6,10 (5,93-6,27)	1,33 (1,25-1,43)	9,65 (9,21-10,21)	1,08 (0,97-1,20)	10,59	0,30
São João, PE ^d	900	5,10±0,32	6,25 (5,88-6,60)	1,37 (1,28-1,46)	13,13 (12,24-14,31)	1,26 (1,15-1,39)	11,32	0,12
Unai, MG ^c	750	7,96±0,43	6,28 (6,07-6,48)	1,37 (1,28-1,47)	10,10 (9,61-10,72)	1,03 (0,94-1,13)	8,56	0,29
Coimbra, MG ^b	900	5,98±0,34	6,76 (6,49-7,02)	1,48 (1,40-1,56)	12,73 (12,00-13,67)	1,22 (1,12-1,33)	10,87	0,28
Barreirinha, MS ^d	900	6,17±0,33	6,80 (6,54-7,05)	1,49 (1,41-1,57)	12,57 (11,91-13,40)	1,21 (1,10-1,32)	13,07	0,22
Guarapuava, PR ^c	750	7,66±0,48	7,02 (6,70-7,33)	1,54 (1,45-1,63)	11,51 (10,83-12,38)	1,11 (1,01-1,21)	6,76	0,24
Iporá, GO ^d	900	4,94±0,34	7,17 (6,63-7,69)	1,57 (1,44-1,71)	15,44 (14,15-17,17)	1,48 (1,32-1,67)	6,08	0,19
Piracicaba, SP ^b	900	4,60±0,21	7,24 (6,90-7,57)	1,58 (1,45-1,73)	16,47 (15,38-17,82)	1,58 (1,40-1,79)	14,97	0,18
Cristalina, GO ^b	750	6,21±0,29	7,28 (6,99-7,56)	1,59 (1,50-1,69)	13,40 (12,68-14,27)	1,29 (1,17-1,42)	13,73	0,13
Canarana, MT ^d	750	6,16±0,32	7,51 (7,17-7,85)	1,64 (1,55-1,75)	13,89 (12,95-15,08)	1,33 (1,21-1,47)	9,65	0,14
Picos, PI ^d	750	6,57±0,35	7,57 (7,24-7,91)	1,66 (1,55-1,77)	13,47 (12,62-14,56)	1,29 (1,16-1,44)	8,92	0,18
Sacramento, MG ^b	750	6,52±0,32	7,61 (7,26-7,96)	1,67 (1,56-1,78)	13,61 (12,87-14,50)	1,31 (1,19-1,44)	9,93	0,19
Água Boa, MT ^d	750	6,42±0,31	7,80 (7,47-8,12)	1,71 (1,60-1,82)	14,07 (13,32-15,00)	1,35 (1,24-1,47)	10,66	0,22
Anápolis, GO ^d	750	6,70±0,38	7,90 (7,56-8,23)	1,73 (1,63-1,84)	13,90 (13,04-14,99)	1,34 (1,22-1,46)	7,09	0,31
Jataí, GO ^b	750	6,94±0,41	8,00 (7,64-8,33)	1,75 (1,65-1,86)	13,80 (13,03-14,79)	1,33 (1,21-1,46)	10,20	0,12
Machado, MG ^c	900	5,76±0,29	8,78 (8,36-9,19)	1,92 (1,80-2,05)	16,95 (15,94-18,20)	1,63 (1,48-1,79)	12,37	0,13
Guaxupé, MG ^b	900	5,46±0,28	9,00 (8,53-9,47)	1,97 (1,83-2,12)	18,02 (16,80-19,53)	1,73 (1,56-1,92)	9,02	0,25

EPM=Erro padrão da média; TL=Tempo letal; IF 95%=Intervalo fiducial a 95% de probabilidade; RT=razão de toxicidade para os TL₅₀ e TL₉₅; IC 95%=Intervalo de confiança a 95% de probabilidade; χ^2 =Qui-quadrado; P=Probabilidade; ^aPopulação padrão de susceptibilidade ao ozônio; ^bpopulação susceptível à fofina; ^cpopulação resistente à fofina; ^dpopulação com padrão de susceptibilidade à fofina desconhecido.

3.2. Caminhamento

Observou-se diferença significativa para as características comportamentais de caminhamento entre as populações de *S. zeamais* (distância percorrida: $F_{29;1140}=11,43$; $P<0,01$; tempo de repouso: $F_{29;1140}=8,88$; $P<0,01$; velocidade de caminhamento: $F_{29;1140}=10,94$; $P<0,01$), tratamento com ozônio e sem ozônio (distância percorrida: $F_{1;1140}=141,26$; $P<0,01$; tempo de repouso: $F_{1;1140}=87,35$; $P<0,01$; velocidade de caminhamento: $F_{1;1140}=70,11$; $P<0,01$) e para a interação entre estas duas variáveis (distância percorrida: $F_{29;1140}=2,67$; $P<0,01$; tempo de repouso: $F_{29;1140}=2,19$; $P<0,01$; velocidade de caminhamento: $F_{29;1140}=2,31$; $P<0,01$).

As características comportamentais de caminhamento apresentaram diferenças substanciais entre as populações (Figuras 3, 4 e 5). As variações observadas para a distância percorrida entre as populações no controle e no tratamento com ozônio foram de 60,68 e 69,85%, respectivamente; para o tempo de repouso, de 52,73% e 63,66%; e de 84,29% e 85,32% para a velocidade de caminhamento. Embora algumas das características de caminhamento das populações tenham sido afetadas significativamente pelo gás ozônio, não foram constatadas variações substanciais entre o controle e o tratamento com ozônio. As variações das respostas comportamentais de caminhamento também estão exemplificadas por cinco populações na Figura 6.

A distância percorrida apresentou correlação significativa e positiva com a velocidade de caminhamento na presença do ozônio ($n=30$; $r=0,65$; $P<0,0001$) e no controle ($n=30$; $r=0,82$; $P<0,0001$), porém apresentou correlação significativa e negativa com o tempo de repouso tanto na ausência ($n=30$; $r=-0,94$; $P<0,0001$) quanto na presença do ozônio ($n=30$; $r=-0,94$; $P<0,0001$). Para as correlações entre

o tempo de repouso e a velocidade de caminhada, verificou-se correlação significativa negativa no controle ($n=30$; $r=-0,57$; $P<0,0001$), mas não foi constatada correlação significativa para o tratamento com ozônio ($n=30$; $r=-0,27$; $P=0,15$).

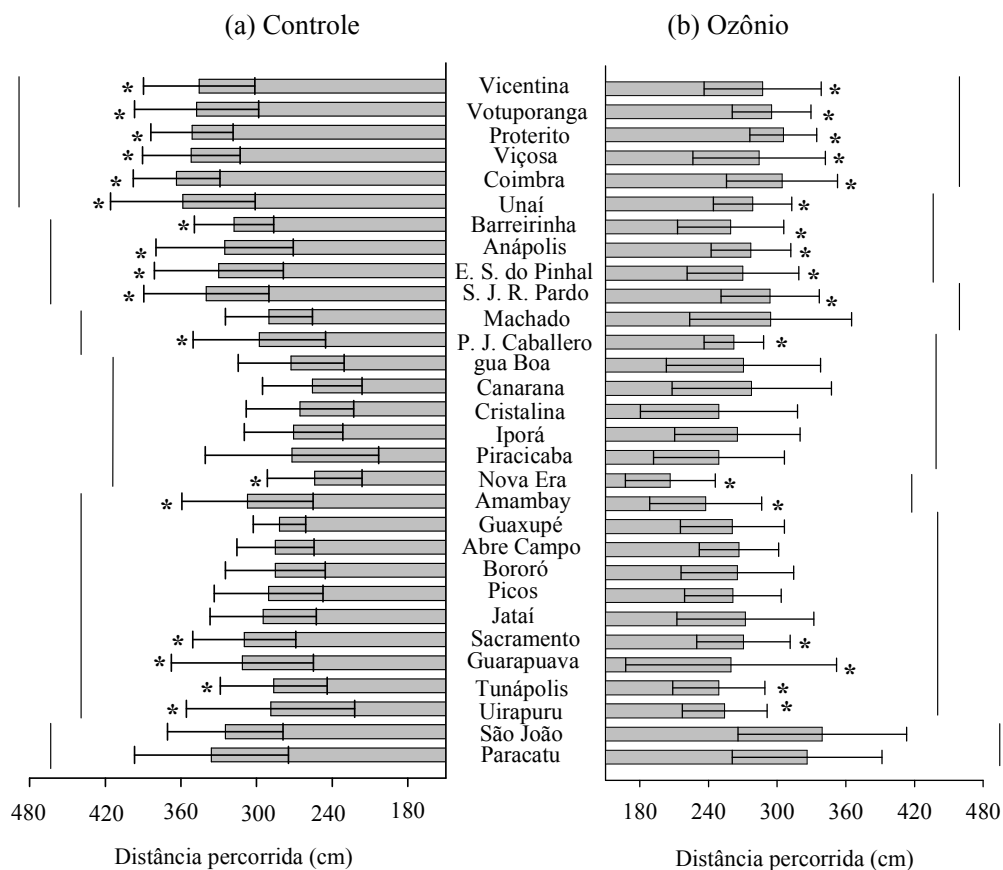


Figura 3. Distância percorrida (cm) (\pm E.P.M.) por indivíduos das populações de *Sitophilus zeamais* submetidas a arenas com ozônio (50 ppm) e sem ozônio (controle) durante 10 min. Médias agrupadas com barras na mesma altura não diferem entre as populações pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) e os asteriscos indicam diferença significativa entre a população exposta e não exposta ao ozônio pelo teste de F ($P < 0,05$).

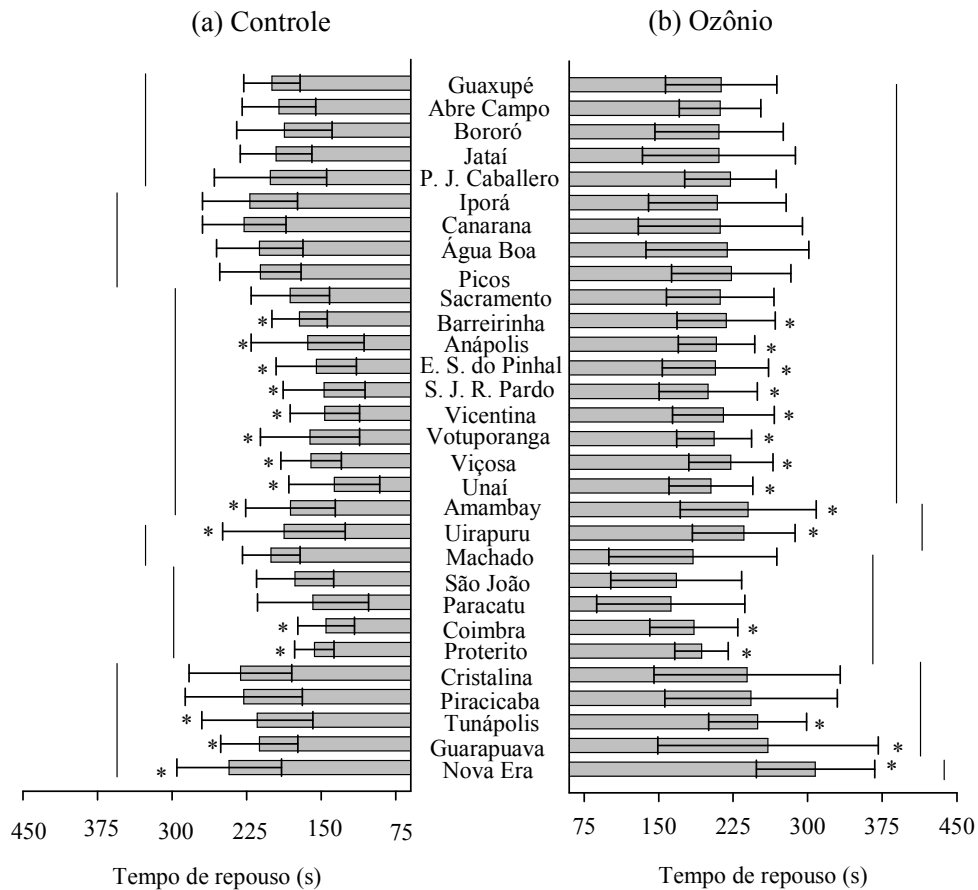


Figura 4. Tempo de repouso (s) (\pm E.P.M.) dos indivíduos das populações de *Sitophilus zeamais* submetidas a arenas com ozônio (50 ppm) e sem ozônio (controle) durante 10 min. Médias agrupadas com barras na mesma altura não diferem entre as populações pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) e os asteriscos indicam diferença significativa entre a população exposta e não exposta ao ozônio pelo teste de F ($P < 0,05$).

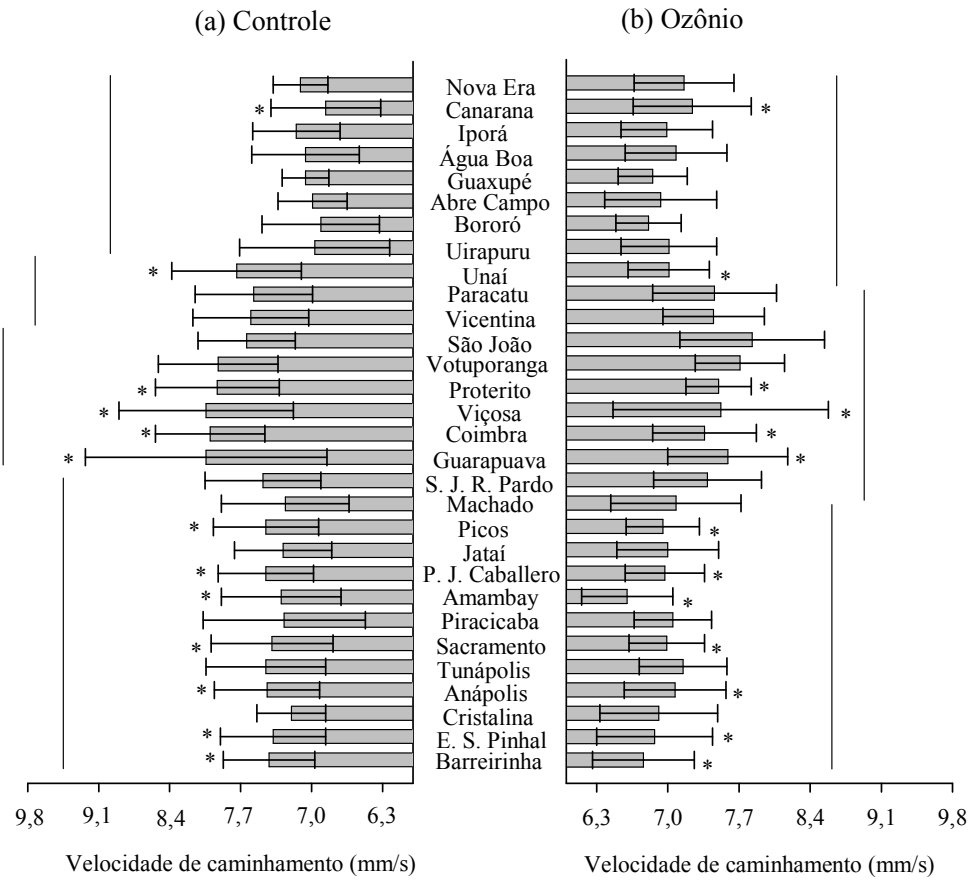


Figura 5. Velocidade de caminhada (\pm E.P.M.) dos indivíduos das populações de *Sitophilus zeamais* submetidas a arenas com ozônio (50 ppm) e sem ozônio (controle) durante 10 min. Médias agrupadas com barras na mesma altura não diferem entre as populações pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) e os asteriscos indicam diferença significativa entre a população exposta e não exposta ao ozônio pelo teste de F ($P < 0,05$).

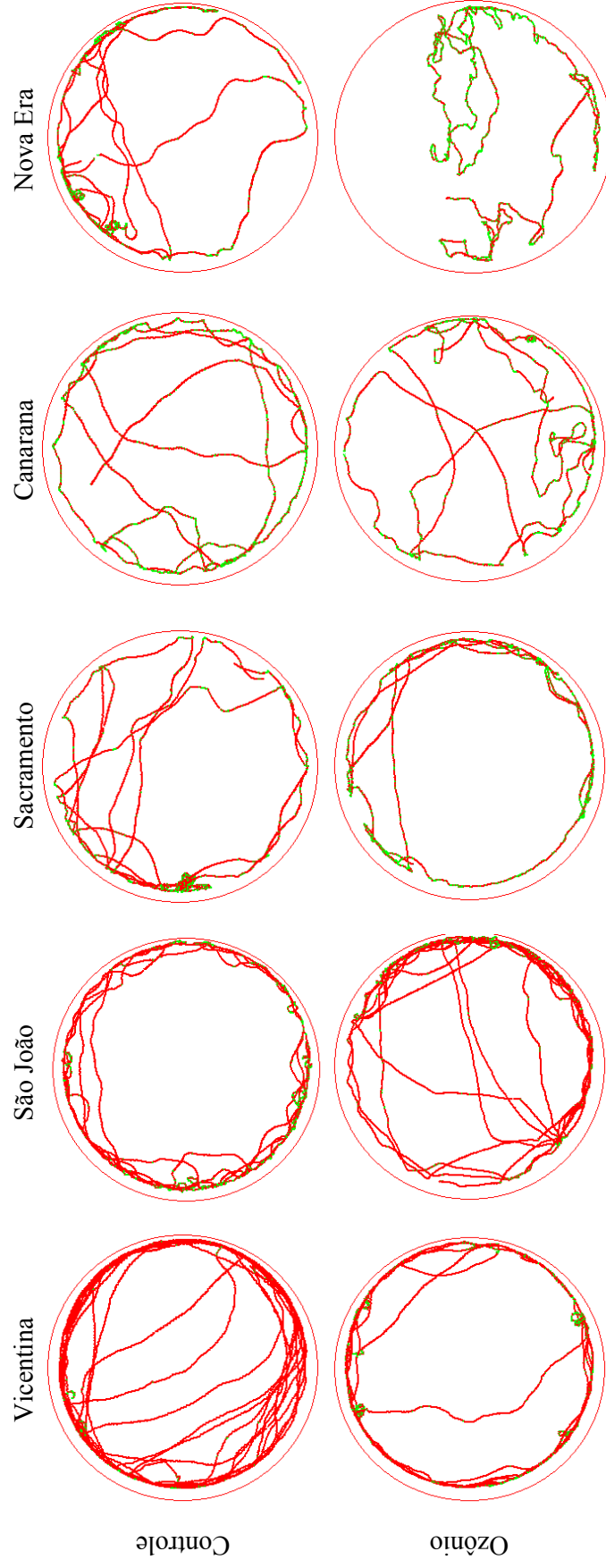


Figura 6. Arena representando o caminhamento de indivíduos de populações *Sitophilus zeamais* submetidas a arenas tratadas com ozônio (50 ppm) e sem tratamento (controle) por um período de 10 min.

3.3. Taxa respiratória, massa corpórea e associações com o caminhamento das populações

A taxa respiratória (μL de CO_2 $\text{h}^{-1}/\text{inseto}$) diferiu significativamente entre as populações de *S. zeamais* ($F_{29,90}=7,01$; $P<0,0001$) (Figura 7A), com uma variação da produção de CO_2 de 41,24%. A massa corpórea individual dos insetos (mg) também diferiu significativamente entre as populações ($F_{29,90}=13,37$; $P<0,0001$) (Figura 7B), com uma variação de 70,77%.

Os fatores potencialmente determinantes do comportamento de caminhamento das populações foram estudados mediante análise de trilha (Figura 8). O parâmetro comportamental utilizado nesta análise foi a distância percorrida, uma vez que todas as correlações realizadas com a distância percorrida foram significativas. O modelo mostrou-se significativo pelo teste de Qui-quadrado a 5% de probabilidade ($\chi^2 = 3,10$; $df = 5$; $P=0,68$). Observou-se correlação significativa e positiva entre a massa corpórea e a taxa respiratória das populações. A massa corpórea das populações influenciou significativamente e negativamente a distância percorrida no controle, afetando assim a distância percorrida sob o ozônio; a massa corpórea também afeta a resistência à fosfina. No entanto, não influenciou a toxicidade do ozônio. A distância percorrida pelas populações na presença do ozônio não foi influenciada pela toxicidade deste fumigante. Já a taxa respiratória das populações apresentou efeito significativo e negativo sobre a resistência à fosfina e efeito significativo e positivo sobre a toxicidade do ozônio; no entanto, não influenciou a distância percorrida pelas populações no controle.

Os efeitos direto, indireto e total de cada característica utilizada na análise de trilha (distância percorrida no controle, toxicidade do ozônio, massa

corpórea, taxa respiratória e resistência à fosfina) também foram determinados sobre a distância percorrida pelos insetos na presença do ozônio (Tabela 3). Observa-se que modelo utilizado para correlacionar a distância percorrida pelas populações na presença do ozônio com as variáveis potencialmente determinantes deste parâmetro (massa corpórea, taxa respiratória, distância percorrida na ausência do O₃ e toxicidade do ozônio) não foi significativo ($R^2=0,51$; $P=0,07$). Tal resultado se deve principalmente ao fato de que a distância percorrida pelas populações na presença do ozônio não foi influenciada significativamente pela toxicidade do ozônio.

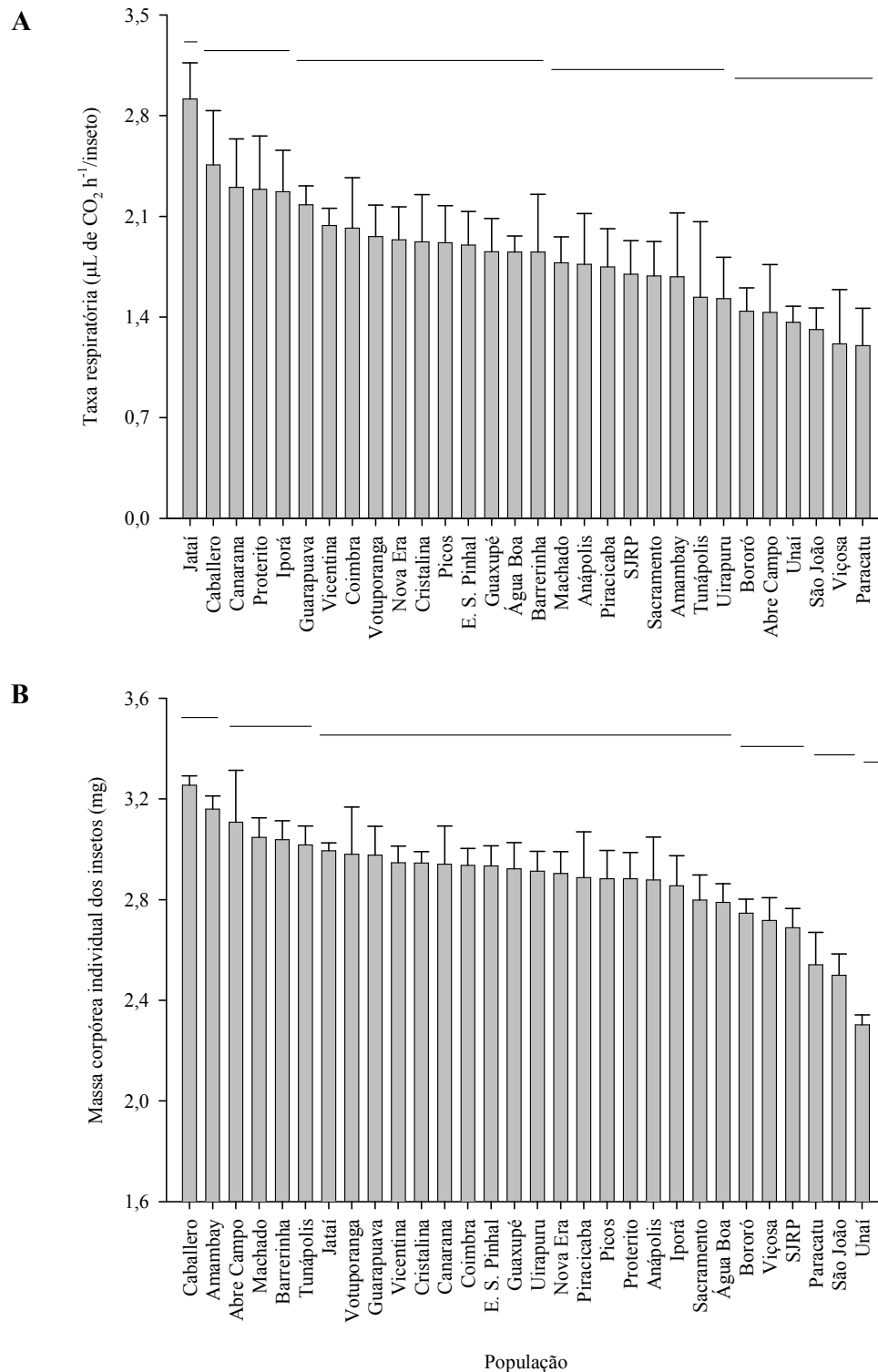


Figura 7. Taxa respiratória (A) e massa corpórea (B) (\pm E.P.M.) das populações de *Sitophilus zeamais*. Médias seguidas pelas mesmas barras não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

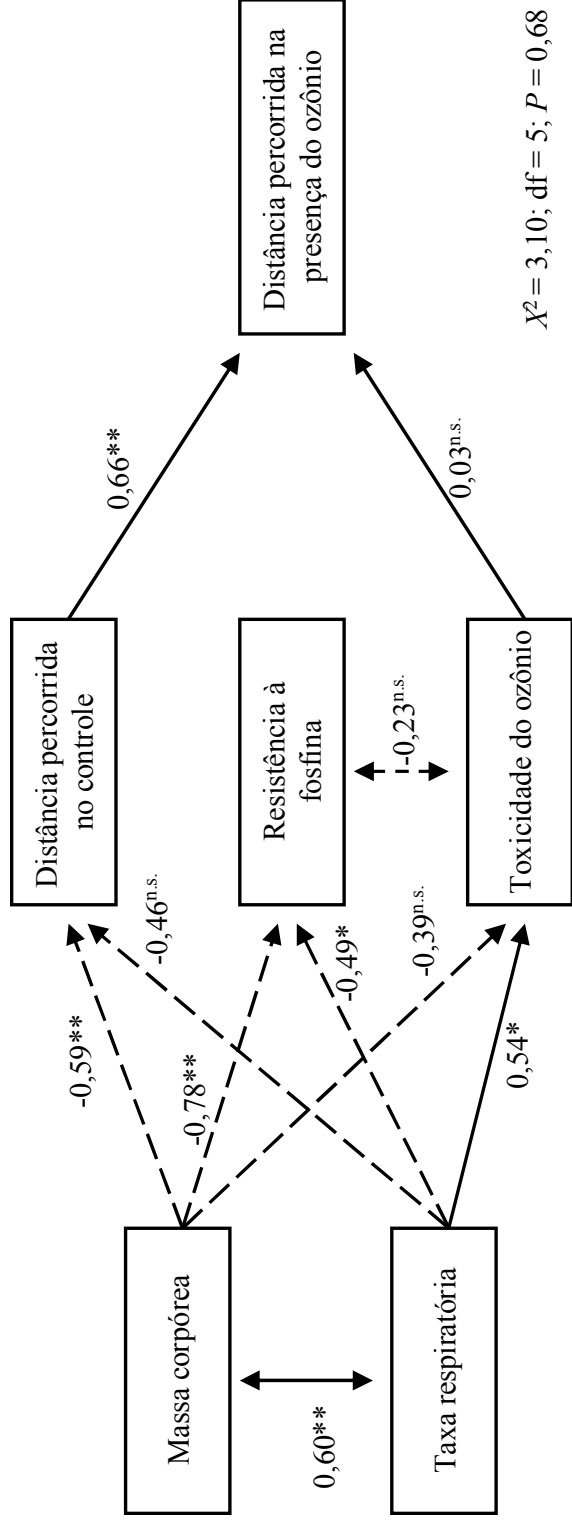


Figura 8. Diagrama de trilha mostrando a influência da distância percorrida nas arenas sem ozônio (controle), toxicidade do ozônio, massa corpórea, taxa respiratória e resistência à fosfina sobre a distância percorrida das populações de *Sitophilus zeamais* sob atmosfera enriquecida com ozônio. Setas unidirecionais indicam interação causal (regressão) enquanto que setas bidirecionais indicam correlação entre as variáveis. Linhas tracejadas representam relação negativa e as linhas contínuas representam relação positiva. O nível de significância é representado por asteriscos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Tabela 3. Efeitos direto (ED), indireto (EI) e total (ET) para o diagrama de trilha apresentado na Figura 8 para o modelo de efeitos sobre a distância percorrida das populações de *Sitophilus zeamais* na presença do ozônio

Variável	Distância percorrida no controle (cm)			Razão de resistência à fosfina			Razão de toxicidade do ozônio			Distância percorrida na presença do ozônio (cm)		
	ED	EI	ET	ED	EI	ET	ED	EI	ET	ED	EI	ET
Massa corpórea (mg/inseto)	-0,49	-	-0,49	-0,76	-	-0,76	0,10	-	0,10	-	-0,34	-0,34
Taxa respiratória	-0,17	-	-0,17	-0,03	-	-0,03	0,48	-	0,48	-	-0,0006	-0,0006
Distância percorrida no controle (cm)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,75	-	0,75
Razão de toxicidade do ozônio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,27	-	0,27
R ²	0,37			0,61			0,29			0,51		
P	0,05*			0,002**			0,10 ^{n.s.}			0,07 ^{n.s.}		

4. DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato sobre a toxicidade do ozônio para populações de *S. zeamais* e sobre as modificações comportamentais dos insetos na presença do ozônio e suas interações com os padrões fisiológicos dos mesmos. As curvas de tempo-mortalidade indicaram que as populações de *S. zeamais* não apresentaram resistência ao ozônio. Por outro lado, foram observados diferentes padrões comportamentais de caminhamento (distância percorrida, tempo de repouso e velocidade de caminhamento) entre as populações, tanto na presença como na ausência do ozônio. Também foi verificado que algumas populações reduziram a atividade locomotora na presença do gás, indicando a ocorrência de plasticidade fenotípica desta característica comportamental em algumas populações. Tais respostas comportamentais geralmente estão associadas aos processos sensoriais dos insetos e podem desencadear a evolução de resistência comportamental aos inseticidas convencionais e candidatos a uso (Haynes, 1988; Hoy et al., 1998; Desneux, 2007), caso tais variações de respostas sejam herdadas.

Como algumas populações de *S. zeamais* reduziram sua atividade locomotora num curto período de exposição ao ozônio (10 min), pode-se afirmar que esta resposta comportamental é do tipo estímulo-dependente, ou seja, é desencadeada por um estímulo sensorial (Lockwood et al., 1985; Wang et al., 2004; Muenworn et al., 2006). As alterações comportamentais dos insetos na presença de inseticidas podem lhes proporcionar menor exposição dos compostos tóxicos (Cox et al., 1997; Guedes et al., 2009b) e, com isso, favorecer o desenvolvimento de resistência comportamental aos inseticidas (Cox et al., 1997; Guedes et al., 2009b). A resposta comportamental apresentada pelos insetos na presença do ozônio pode estar associada ainda a mecanismos fisiológicos que possibilitam a redução dos efeitos

deletérios dos compostos tóxicos. Neste sentido, a redução da atividade de caminamento dos insetos na presença do ozônio pode desencadear, por exemplo, a redução da atividade respiratória dos insetos ao perceberem a presença do ozônio, conforme reportado para adultos de *S. oryzae*, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) (Lu et al., 2009). Tais respostas fisiológicas, aliadas às respostas comportamentais, são importantes para minimizar os efeitos deletérios do ozônio sobre os organismos.

Os padrões comportamentais de caminamento das populações não foram correlacionados com a toxicidade do ozônio. Tal fato refuta a hipótese de Georghiou (1972), a qual afirma que sempre ocorre correlação negativa entre as respostas comportamentais e a susceptibilidade aos inseticidas. Esta hipótese foi sustentada durante anos devido ao fato de que a resistência comportamental poderia levar à redução da exposição aos inseticidas e, desta forma, minimizar os efeitos deletérios dos compostos químicos (Gould, 1984; Jallow & Hoy, 2005). Uma alternativa para a hipótese de Georghiou é a possibilidade de uma evolução conjunta de respostas comportamentais e fisiológicas (Lockwood et al. 1984). Com relação ao ozônio, foi constatada independência entre as bases fisiológicas associadas à toxicidade do ozônio e as respostas comportamentais de locomoção, da mesma forma que foram observados para outros inseticidas (Lockwood et al., 1984; Suiter & Gould, 1994; Chareonviriyaphap et al., 1997; Renou et al., 1997; Kongmee et al., 2004; Wang et al., 2004; Guedes et al., 2009a; Pereira et al., 2009).

Respostas comportamentais têm base fisiológica, de forma que uma manifestação física pode ocorrer em detrimento às características fisiológicas do organismo (Lockwood, 1984; Watson & Barson, 1996; Watson et al., 1997; Guedes et al., 2009a; Pereira et al., 2009). No presente estudo, todavia, a distância percorrida

pelas populações na presença do ozônio não foi influenciada pela taxa respiratória e pela massa corpórea dos insetos, embora tenha sido constatado que a distância percorrida pelos insetos no controle diminuiu com o aumento da massa corporal.

Como a resistência à fosfina está associada à menor taxa respiratória e massa corporal dos insetos (Pimentel et al., 2007, 2009), pode-se afirmar que as características envolvidas com os mecanismos de resistência à fosfina influenciaram diretamente a distância percorrida pelas populações nas arenas não tratadas com o ozônio e, conseqüentemente, isto desencadeou o menor caminhar na presença do ozônio. A taxa respiratória (captação de O₂ ou produção de CO₂) é uma medida indireta da transferência de energia (formação de ATP) (Clarke, 1993; Steven & Gastón, 1999). Então, a correlação observada entre a taxa respiratória e a massa corporal das populações de *S. zeamais* é esperada, considerando-se que populações com maior massa corpórea necessitam de maior mobilização de energia para a manutenção do organismo (Packard & Boardman, 1999; Hayes, 2001; Araújo et al., 2008; Silva et al., 2010).

Considerando que as populações utilizadas neste trabalho não apresentaram resistência ao ozônio e que algumas destas apresentaram elevados níveis de resistência à fosfina (Pimentel et al., 2009), pode-se afirmar que não existe resistência cruzada entre os dois fumigantes em populações de *S. zeamais*, conforme já reportado para outros insetos-praga de produtos armazenados (Zhanggui et al., 2003; Sousa et al., 2008). Por outro lado, constatou-se redução da atividade locomotora de algumas populações na presença do ozônio. Tal comportamento pode favorecer a seleção adicional para resistência ao ozônio em tais populações devido a menor submissão aos efeitos deletérios do fumigante. Como uma das prerrogativas para o desenvolvimento de estratégias de uso de novos inseticidas visa manter a

susceptibilidade dos insetos, são válidos os esforços para que se utilizem concentrações do ozônio de fato eficazes no controle das pragas. Outras alternativas são o uso intercalado ou alternado do ozônio com outros inseticidas, conforme indicado em programas de manejo de pragas (Metcalf, 1980; McKenzie & Batterham, 1998; Sousa et al., 2008, 2009; Hagstrum & Subramanyam, 2009).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- An, J.; Zhang, M.; Lu, Q. Changes in some quality indexes in fresh-cut green asparagus treated with aqueous ozone and subsequent modified atmosphere packaging. **Journal of Food Engineering**, v.78, n.1, p.340-344, 2007.
- Araújo, R.A.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, M.G.A.; Ferreira, G.H. Enhanced activity of carbohydrate- and lipid-metabolizing enzymes in insecticide-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Bulletin of Entomological Research**, v.98, n.4, p.417-424, 2008.
- Bond, E.J.; Robinson, J.R.; Buckland, C.T. The toxic action of phosphine: absorption and symptoms of poisoning in insects. **Journal of Stored Products Research**, v.5, n.4, p.289–298, 1969.
- Chareonviriyaphap, T.; Roberts, D.R.; Andre, R.G.; Harlan, H.; Bangs, M.J. Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus*, a malaria vector in the americas. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.13, n.2, p.171-183, 1997.
- Chaudhry, M.Q. A review of the mechanisms involved in the action of phosphine as an insecticide and phosphine resistance in stored-product insects. **Pesticide Science**, v.49, n.3, p.213–228, 1997.

- Clarke, A. Seasonal acclimatization and latitudinal compensation in metabolism: do they exist? **Functional Ecology**, v.7, p.139–149, 1993.
- Cotton, R.T. The relation of respiratory metabolism of insects to their susceptibility to fumigants. **Journal of Economic Entomology**, v.25, n.5, p.1088-1103, 1932.
- Cox, P.D.; Fleming, D.A.; Atkinson, J.E.; Bannon, K.L.; Whitefield, J.M. The effect of behaviour on the survival of *Cryptolestes ferrugineus* in an insecticide-treated laboratory environment. **Journal of Stored Products Research**, v.33, n.3, p.257-269, 1997.
- Desneux, N.; Decourtye, A.; Delpuech, J.-M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.52, p.81-106, 2007.
- Eaton, A.D.; Clesceri, L.S.; Greenberg, A.E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20^a ed. Washington: APHA/AWWA/WEF, 2000.
- Futuyma, D.G. **Evolutionary Biology**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1998. 759p.
- Georghiou, G.P. The evolution of resistance to pesticides. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.3, p.133-168, 1972.
- Gould, F. Arthropod behavior and the efficacy plant protectants. **Annual Review of Entomology**, v.36, p.305-330, 1991.
- Gould, F. Role of behavior in the evolution of insect adaptation to insecticides and resistant host plants. **Bulletin of the Entomological Society America**, v.30, p.34-51, 1984.
- Guedes, N.M.P.; Guedes, R.N.C.; Ferreira, G.H.; Silva, L.B. Flight take-off and walking behavior of insecticide-susceptible and -resistant strains of *Sitophilus*

- zeamais* exposed to deltamethrin. **Bulletin of Entomological Research**, v.99, n.4, p.393-400, 2009a.
- Guedes, N.M.P.; Guedes, R.N.C.; Silva, L.B.; Cordeiro, E.M.G. Deltamethrin-induced feeding plasticity in pyrethroid-susceptible and -resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Applied Entomology**, v.133, n.7, p.524-532, 2009b.
- Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Guedes, N.M.P.; Ribeiro, B.; Serrão, J.E. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Physiological Entomology**, v.31, n.1, p.30-38, 2006.
- Hagstrum, D.W.; Subramanyam, B. A review of stored-product entomology information sources. **American Entomologist**, v.55, n.3, p.174-183, 2009.
- Hayes, J.P. Mass-specific and whole-animal metabolism are not the same concept. **Physiological and Biochemical Zoology**, v.74, n.1, p.147-150, 2001.
- Haynes, K.F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Annual Review of Entomology**, v.33, p.149-168, 1988.
- Hill, A.G.; Rice, R.G. **Handbook of Ozone Technology and Applications**. Michigan: Ann Arbor Science, 1982. p.1.
- Hollingsworth, R.G.; Armstrong, J.W. Potential of temperature, controlled atmospheres and ozone fumigation to control thrips and mealybugs on ornamental plants for export. **Journal of Economic Entomology**, v.98, n.2, p.289-298, 2005.
- Hoy, C.W.; Head, G.P.; Hall, F.R. Spatial heterogeneity and insect adaptation to toxins. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.571-594, 1998.

- Isikber, A.A.; Öztekin, S. Comparison of susceptibility of two stored-product insects, *Ephestia kuehniella* Zeller and *Tribolium confusum* du Val to gaseous ozone. **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.3, p.159-164, 2009.
- Jallow, M.F.A.; Hoy, C.W. Phenotypic variation in adult behavioral response and offspring fitness in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in response to permethrin. **Journal of Economic Entomology**, v.98, n.6, p.2195-2202, 2005.
- Khadre, M.A.; Yousef, A.E.; Kim, J.G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001.
- Kongmee, M.; Prabaripai, A.; Akratanakul, P.; Bangs, M.J.; Chareonviriyaphap, T. Behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposed to deltamethrin and possible implications for disease control. **Journal of Medical Entomology**, v.41, n.6, p.1055-1063, 2004.
- Lockwood, J.A.; Byford, R.L.; Story, R.N.; Sparks, T.C.; Quisenberry, S.S. Behavioral resistance to the pyrethroids in the horn fly, *Hematiobia irritans* (Diptera: Muscidae). **Environmental Entomology**, v.14, n.6, p.873-880, 1985.
- Lockwood, J.A.; Sparks, T.C.; Story, R.N. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. **Bulletin of the Entomological of America**, v.30, n.4, p.41-51, 1984.
- Lu, B.; Ren, Y.; Du, Y.; Fu, Y.; Gu, Jie. Effect of ozone on respiration of adult *Sitophilus oryzae* (L.), *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Rhyzopertha dominica* (F.). **Journal of Insect Physiology**, v.55, n.10, p.885-889, 2009.
- McKenzie, J.A.; Batterham, P. Predicting insecticide resistance: mutagenesis, selection and response. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.353, n.1376, p.1729-1734, 1998.

- Metcalf, R.L. Changing role of insecticides in crop protection. **Annual Review of Entomology**, v. 25, p.219-256, 1980.
- Mitchell, R.J. Path analysis: pollination. In: Scheiner, S.M.; Gurevitch, J. (Eds.). **Design and analysis of ecological experiments**. New York: Chapman & Hall, 1993. p.211-231.
- Muenworn, V.; Akaratanakul, P.; Bangs, M.J.; Parbaripai, A.; Chareonviriyaphap, T. Insecticide-induced behavioral responses in two populations of *Anopheles maculates* and *Anopheles sawadwongporni*, malaria vectors in Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.22, n.4, p.689-698, 2006.
- Packard, G.C.; Boardman, T.J. The use of percentages and size-specific indices to normalize physiological data for variation in body size: wasted time, wasted effort? **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.122, n.1, p.37-44, 1999.
- Pereira, C.J.; Pereira, E.J.G.; Cordeiro, E.M.G.; Della Lucia, T.M.C.; Tótola, M.R.; Guedes, R.N.C. Organophosphate resistance in the maize weevil *Sitophilus zeamais*: Magnitude and behavior. **Crop Protection**, v.28, n.2, p.168-173, 2009.
- Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.D'A.; Guedes, R.N.C.; Sousa, A.H.; Tótola, M.R. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschusky (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.1, p.71-74, 2009.
- Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.D'A.; Tótola, M.R.; Guedes, R.N.C. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. **Pest Management Science**, v.63, n.9, p.876-881, 2007.
- Price, N.R. A comparison of the uptake and metabolism of ³²P-radiolabelled phosphine in susceptible and resistant strains of the lesser grain borer

- (*Rhyzopertha dominica*). **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v.69, n.1, p.129–131, 1981.
- Price, N.R. Active exclusion of phosphine as a mechanism of resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). **Journal of Stored Products Research**, v.20, n.3, p.163–168, 1984.
- Renou, M.; Henninot-Rodes, E.; Delorme, R.; Augé, D.; Touton, P. Oviposition of resistance and susceptible strains of *Drosophila melanogaster* in the presence of deltamethrin. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.84, n.2, p.173-181, 1997.
- Robertson, J.L.; Preisler, H.K. **Pesticide bioassays with Arthropods**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1992. 127p.
- SAEG. **Sistema para Análises Estatísticas**, versão 9.0. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 2005.
- SAS Institute. **SAS/STAT User's Guide**, version 6.0. Cary: SAS Institute Inc., 1989.
- Scott, A.J.; Knott, M.A.A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v.30, n.3, p.507-512, 1974.
- Sibly, R.M.; Winokur, L.; Smith, R.H. Interpopulation variation in phenotypic plasticity in the speckled wood butterfly, *Pararge aegeria*. **Oikos**, v.78, n.2, p.323-330, 1997.
- Silva, L.B.; Reis, A.P.; Pereira, E.J.G.; Oliveira, M.G.A.; Guedes, R.N.C. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases from insecticide-resistant and -susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v.155, n.1, p.12-19, 2010.

- Sousa, A.H.; Faroni, L.R.D'A.; Guedes, R.N.C.; Tótola, M.R.; Urruchi, W.I. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect-pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, v.44, n.4, p.379-385, 2008.
- Sousa, A.H.; Faroni, L.R.D'A.; Pimentel, M.A.G.; Guedes, R.N.C. Developmental and population growth rates of phosphine-resistant and -susceptible populations of stored product insect-pests. **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.4, p.241-246, 2009.
- Stearns, S.C.; Hoekstra, R.F. **Evolution: an introduction**. Oxford: Oxford University Press, 2000, 381p.
- Steven, L. C.; Gaston, K. J. Exploring links between physiology and ecology at macro-scales: the role of respiratory metabolism in insects. **Biological Reviews**, v. 74, p. 87–120, 1999.
- Suiter, K.A.; Gould, F. Physiological and behavioral avoidance responses to residues of four pesticides by six spider mite populations. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.71, n.1, p.1-14, 1994.
- Wang, C.; Scharf, M.E.; Bennett, G.W. Behavioral and physiological resistance of the German cockroach to gel baits (Blattodea: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology**, v.97, n.6, p.2067-2072, 2004.
- Watson, E.; Barson, G. A laboratory assessment of the behavioural responses of three strains of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) to three insecticides and the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide. **Journal of Stored Products Research**, v.32, n.1, p.59-67, 1996.
- Watson, E.; Barson, G.; Pinniger, D.B.; Roberts, G.; Ludlow, A.R. Evaluation of the behavioral responses of *Anthrenus verbasi* adults and larvae to permethrin (ec)

using a computerized tracking system. **Journal of Stored Products Research**, v.33, n.4, p.335-346, 1997.

Zhanggui, Q., Xia, W., Gang, D., Xiaoping, Y., Xuechao, H., Deke, X., Xingwen, L. Investigation of the use of ozone fumigation to control several species of stored grain insects. In: Credland, P.F., Armitage, D.M., Bell, C.H., Cogan, P.M., Highley, E. **Advances in Stored Product Protection, Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Products Protection**, Wallingford: CABI International Publishing, 2003. p.617-621.

**COMPORTAMENTO DE CAMINHAMENTO E DE DECOLAGEM DE
POPULAÇÕES DE *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)
SOB EXPOSIÇÃO SUB-LETAL AO OZÔNIO**

Palavras-chave: concentrações sub-letais, fumigante alternativo, comportamento locomotor, plasticidade fenotípica, armazenamento.

RESUMO

É consenso que os insetos apresentam diversas respostas comportamentais na presença dos inseticidas. Todavia, tais respostas têm sido negligenciadas em estudos toxicológicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de concentrações sub-letais do ozônio sobre o comportamento locomotor de populações de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Adicionalmente, avaliou-se a taxa respiratória e massa corpórea das populações. As características comportamentais avaliadas foram distância percorrida, tempo de repouso e velocidade de caminhada de machos e fêmeas, além de iniciação de vôo para insetos não-sexados. Foram estabelecidas as concentrações de ozônio de 0, 30, 40, 50 e 60 ppm para a população com menor atividade locomotora natural (Amambay) e as concentrações de 0, 50, 75, 100, 125 e 150 ppm de ozônio para a população com maior atividade locomotora natural (São João). Observou-se que a atividade locomotora variou entre as populações e sexos com o incremento das concentrações sub-letais do ozônio. A atividade de caminhada dos insetos da população Amambay reduziu com o incremento da concentração do ozônio, sendo que esta redução foi mais expressiva nas fêmeas. Por outro lado, a atividade de caminhada da população de São João não variou com o aumento da concentração de ozônio. A taxa respiratória e a massa corpórea variaram significativamente entre as populações, mas não variaram entre os sexos. O tempo de repouso das populações de *S. zeamais* se correlacionou positivamente com a taxa respiratória dos insetos, indicando que indivíduos que apresentam maiores taxas respiratórias permanecem parados por maior tempo na presença do ozônio.

ABSTRACT

It is agreed that insects have different behavioral responses to insecticides. However, such responses have been overlooked in toxicological studies. The aim of this study was to evaluate the effect of sub-lethal ozone concentrations on locomotor behavior of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Additionally, respiration rates and body mass were evaluated. The studied behavioral characteristics included distance walked, resting time and walking velocity of males and females, as well as flight initiation of non-sexed insects. Ozone concentrations of 0, 30, 40, 50 and 60 ppm were used for the population of lower natural locomotor activity (Amambay) and the concentrations of 0, 50, 75, 100, 125 and 150 ppm for the population of higher natural locomotor activity (São João). Locomotor activity varied between populations and sexes with increasing sub-lethal ozone concentrations. The walking activity of the Amambay insect population was reduced with increasing ozone concentration and this response was more pronounced in females. Conversely, the walking activity of the São João insect population showed no variation with increasing ozone concentration. Respiratory rate and body mass varied significantly between populations, but not between sexes. Resting time of *S. zeamais* populations was positively correlated with respiration rate, indicating that individuals with higher respiration rates remain still for a longer time under Ozone exposure.

Key words: sub-lethal concentrations, alternative fumigant, locomotor behavior, phenotypic plasticity, storage.

1. INTRODUÇÃO

A resistência a inseticidas e as preocupações com os riscos oferecidos pelos inseticidas à saúde humana e ao meio ambiente têm impulsionado a busca por métodos alternativos de controle de insetos-praga de produtos armazenados. Pesquisas recentes indicam que o enriquecimento do ambiente de armazenamento com o ozônio é uma importante alternativa a ser utilizada na proteção de produtos armazenados (Kells et al., 2001; Mendez et al., 2003; Sousa et al., 2008; Isikber & Öztekin, 2009; Lu et al., 2009). Além de apresentar efeito tóxico para os insetos, o ozônio não apresenta resistência cruzada com a fosfina, o único fumigante utilizado em vários países (Sousa et al., 2008), e não altera a qualidade do produto tratado (Pereira et al., 2008).

Outro aspecto que merece atenção é a influência de exposições sub-letais de inseticidas sobre o comportamento locomotor dos insetos e suas correlações com os aspectos fisiológicos dos indivíduos. Os insetos podem apresentar uma série de respostas fisiológicas e comportamentais para vários compostos tóxicos em ambientes naturais ou de manejo (Wang et al., 2004; Kljajić & Perić, 2007; Verheggen et al., 2007). O comportamento dos insetos é pouco abordado em estudos toxicológicos, embora se saiba que os insetos são capazes de modificar o seu comportamento em resposta à sua percepção sensorial aos inseticidas, de forma a comprometer a eficácia destes produtos (Hoy et al., 1998; Pereira et al., 2009).

Certos inseticidas estimulam ou inibem o comportamento locomotor dos insetos, como o caminhar e a habilidade de vôo (Watson & Barson, 1996; Watson et al., 1997; Guedes et al., 2009a; Pereira et al., 2009). Os inseticidas podem interferir na coordenação motora dos insetos, deixá-los convulsivos e interferir nos padrões normais de reprodução, localização de hospedeiros, dispersão, migração e

alimentação (Haynes, 1988). Os mecanismos comportamentais podem ser estímulo-independente ou estímulo-dependente. A resposta comportamental é estímulo-dependente quando se refere ao aumento da habilidade dos insetos para detectar um composto tóxico e, em consequência, desencadeia uma propriedade irritante ou repelente que aumenta a resposta após a detecção do inseticida, mesmo sem contato com o mesmo (Georghiou, 1972; Lockwood et al., 1984). Com relação a resposta comportamental estímulo-independente, a menor exposição dos insetos para o composto tóxico se deve a uma característica comportamental inata à população (Anonymous, 1958; Georghiou, 1972; Lockwood et al., 1984). Ambos os tipos de respostas são reconhecidas como resistência comportamental para um composto tóxico quando as características são herdadas (Georghiou, 1972; Lockwood et al., 1984). Tais conceitos foram considerados na realização deste trabalho.

As principais pesquisas sobre a influência de doses sub-letais de compostos tóxicos sobre o comportamento locomotor dos insetos-praga de produtos armazenados se referem basicamente aos inseticidas organofosforados e piretróides (Watson & Barson, 1996; Lorini & Galley, 1998; Beckel et al., 2004; Beckel et al., 2005; Pereira et al., 2009; Guedes et al., 2009a). Apesar da resistência aos fumigantes ter recebido destaque nos últimos anos (Benhalima et al., 2004; Collins et al., 2005; Lorini et al., 2007; Pimentel et al., 2007; 2009), em particular a fosfina, não existem informações no que se refere aos efeitos de gases sobre o comportamento dos insetos-praga de produtos armazenados. A associação de exposições sub-letais de inseticidas candidatos a uso com as características fisiológicas dos insetos pode ajudar a entender os mecanismos de ação destes gases e contribuir para a elaboração de estratégias de manejo de pragas (Dethier et al., 1960; Gammon, 1978; Lockwood et al., 1984; Pekár & Haddad, 2005).

Como os fumigantes são absorvidos, principalmente, através do sistema de trocas gasosas dos insetos, fatores que influenciam este processo podem afetar a captação dos fumigantes (Cotton, 1932; Bond et al., 1969; Sousa et al., 2008; Lu et al., 2009). A taxa respiratória e, ainda, a massa corporal também podem representar a soma das demandas energéticas dos processos fisiológicos dos insetos necessárias para produzir mecanismos de defesa contra os inseticidas (Guedes et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Araújo et al., 2008). Considerando que estas características, influenciam a toxicidade dos fumigantes, são válidos os esforços para entender os seus efeitos sobre o comportamento locomotor de populações sob exposições sub-letais do ozônio.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo caracterizar o comportamento de caminamento e de decolagem de indivíduos de populações de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), com diferentes padrões de caminamento, sob concentrações sub-letais do ozônio. Adicionalmente foram avaliadas a taxa respiratória e massa corpórea dos indivíduos e associadas com os padrões comportamentais de caminamento e de decolagem para vôo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Insetos

Foram utilizadas duas populações de *S. zeamais* com performances de caminamento distintos, as quais foram selecionadas a partir de estudos prévios (Capítulo 1), sob atmosfera enriquecida com 50 ppm de ozônio, em fluxo contínuo de 1,3 L min⁻¹. A população com maior atividade de caminamento foi coletada em São João, Pernambuco, Brasil e a população com menor atividade de caminamento foi coletada em Amambay, Paraguay. Os insetos foram criados em frascos de vidro

de 1,5 L, em câmaras climáticas tipo B.O.D., sob condições constantes de temperatura (27 ± 2 °C), umidade relativa ($70\pm 5\%$) e escotofase de 24 h. Foram utilizados grãos de milho como substrato alimentar com teor de água de 13% base úmida (b.u.), previamente expurgados e mantidos a -18 °C para evitar reinfestação.

2.2. Obtenção do ozônio

O ozônio foi obtido através do gerador de ozônio O&L3 ORM (Ozone & Life, São José dos Campos, SP, Brasil). O gás foi gerado utilizando-se gás oxigênio comprimido (pureza mínima de 99,99%) como insumo, em fluxo contínuo de $1,3$ L min^{-1} . Na geração do ozônio, o gás oxigênio passa por um reator refrigerado, onde existe uma descarga por barreira dielétrica. Esse tipo de descarga é produzido ao aplicar uma alta voltagem entre dois eletrodos paralelos, tendo entre eles um dielétrico (vidro) e um espaço livre por onde flui o oxigênio. Nesse espaço livre é produzida uma descarga em forma de filamentos, onde são gerados elétrons com energia suficiente para produzir a quebra das moléculas de oxigênio, formando o ozônio (O_3). As concentrações indicadas pelo gerador de ozônio foram confirmadas através de um monitorador de ozônio contínuo (BMT Messtechnik GMBH - BMT 930), com precisão de $0,001$ ppm_v e pelo método iodométrico, utilizando titulação indireta (Eaton et al., 2000).

2.3. Caminhamento

Os métodos utilizados foram adaptados em conformidade com Watson et al. (1997), Guedes et al. (2009a) e Pereira et al. (2009). O caminhamento dos insetos machos e fêmeas foi observado individualmente durante 10 min em arenas confeccionados com acrílico ($3,5$ cm de altura \times 15 cm de largura), cujas paredes

foram revestidas com Teflon® PTFE (DuPont, São Paulo, Brasil) para evitar a fuga dos insetos. Foram utilizadas as concentrações de ozônio de 0, 30, 40, 50, 60 e 70 ppm para a população de Amambay e as concentrações de 0, 50, 75, 100, 125 e 150 ppm para a população de São João, em fluxo contínuo de 1,3 L min⁻¹. Estas concentrações estão na faixa sub-letal para as duas populações. Foram maiores para a população de São João devido a esta população não apresentar variação de resposta comportamental nas concentrações utilizadas para a população de Amambay. A injeção e exaustão do gás foram realizadas por intermédio de duas conexões instaladas opostamente em cada arena.

O movimento dos insetos dentro da arena foi registrado por um sistema de rastreamento que consiste de uma câmera CCD que registra e transfere as imagens digitalmente para um computador acoplado (ViewPoint Life Sciences Inc., Montreal, Canada). Cada inseto foi sexado e colocado individualmente no centro da arena, 2 min antes do início dos testes para que ocorresse a saturação das câmaras com o ozônio e para que o inseto fizesse o reconhecimento da arena. As características avaliadas foram distância percorrida (cm), tempo de repouso (s) e velocidade de caminhada (mm/s). Foram utilizadas 15 repetições para cada população. Os testes foram realizados em sala climatizada (27±2 °C), entre 7 e 19 h.

2.4. Decolagem

A metodologia utilizada foi adaptada dos procedimentos descritos por Perez-Mendoza et al. (1999) e Guedes et al. (2009a). A aplicação do ozônio foi feita no interior de câmaras de ozonização (13 cm de largura × 20 cm de altura) contendo uma conexão a 4 cm da base para a injeção do gás e outra na parte superior da câmara para a exaustão. O ozônio residual da exaustão foi direcionado para um

dispositivo confeccionado de PVC (4,5 cm de largura × 56 cm de altura), com coluna de 8,0 cm de água, antes de serem lançados na atmosfera, de modo a garantir a neutralidade do “efeito parede”. Foram utilizadas as concentrações de 0, 30, 40, 50, 60 e 70 ppm para a população de Amambay e as concentrações de 0, 50, 75, 100, 125 e 150 ppm para a população de São João, em fluxo contínuo de 1,3 L min⁻¹ para todas as concentrações.

A iniciação de vôo foi realizada em câmaras transparentes (17 cm de altura × 15 cm de diâmetro interno) colocadas a 6 cm da base da câmara de ozonização. Os insetos foram liberados na parte inferior das câmaras, as quais tiveram as paredes internas revestidas com Teflon® PTFE (DuPont, São Paulo, Brasil) até 2 cm de altura para evitar que os insetos subissem nestas, e o restante impregnadas com cola entomológica (Bio Controle, São Paulo, Brasil). As câmaras de vôo tiveram a tampa e o fundo confeccionados com tecido do tipo organza para permitir a passagem livre do ozônio. Foram utilizadas três repetições, cada uma com 200 adultos não-sexados, com idade variando de uma a quatro semanas. Os bioensaios foram conduzidos sob condições constantes de temperatura (30±2 °C) e umidade relativa (70±5%). O tempo de observação foi de 30 min e os parâmetros avaliados foram o número de insetos que iniciaram o vôo (decolagem) e a altura de vôo. Foram utilizadas três repetições para cada combinação de população e concentração.

2.5. Taxa respiratória e massa corpórea

A produção de dióxido de carbono (CO₂) (μL de CO₂ h⁻¹/inseto) foi mensurada em um respirômetro do tipo CO₂ Analyser TR3C (Sable System International, Las Vegas, EUA), utilizando a metodologia adaptada de trabalhos anteriores (Guedes et al., 2006; Sousa et al., 2008). Foram utilizadas câmaras

respirométricas de 25 mL, cada uma contendo 20 insetos adultos não-sexados, conectadas a um sistema completamente fechado. A produção de CO₂ foi mensurada após o período de 15 h de aclimação dos insetos nas câmaras, na temperatura de 27±2 °C. Para fazer a varredura de todo o CO₂ produzido no interior de cada câmara, procedeu-se à passagem de ar isento de CO₂ em fluxo de 100 mL min⁻¹ por um período de dois min. Essa corrente de ar faz com que todas as moléculas de CO₂ produzidas passem por um leitor de infravermelho acoplado ao sistema, que continuamente faz a mensuração do CO₂ produzido pelos insetos e contido no interior de cada câmara. O controle foi constituído por câmaras respirométricas sem insetos e foi utilizado para normalizar os dados da taxa respiratória de cada população. Após a mensuração do CO₂, os insetos foram removidos das câmaras e em seguida foram pesados usando uma balança analítica (Sartorius BP 210D, Göttingen, Germany). Os valores da taxa respiratória não foram normalizados pela massa corpórea porque este procedimento mascara o efeito individual das variáveis (Hayes, 2001). Foram utilizadas quatro repetições para cada população.

2.6. Análises estatísticas

Os resultados gerais dos bioensaios de caminhada foram submetidos a análise multivariada de covariância (sexo × população), tendo a concentração como covariável (PROC GLM com procedimento MANOVA; SAS Institute, 2002). Para o levantamento de vôo, também foram realizadas análises de covariância, porém, entre as concentrações e populações. Os dados de caminhada e levantamento de vôo foram submetidos a análises de regressões em função da concentração do ozônio sempre que observado variação significativa entre estas, utilizando-se o software SigmaPlot (SPSS, 2001).

Os dados de produção de CO₂ e massa corpórea foram submetidos à análise de variância ($P < 0,05$), sendo representados em histograma de barra elaborados no software SigmaPlot (SPSS, 2001). Adicionalmente, foram feitas análises de correlação entre as características comportamentais de caminhamento (distância percorrida, tempo de repouso e velocidade de caminhamento) \times produção de CO₂ \times massa corpórea (PROC CORR; SAS Institute, 2002).

3. RESULTADOS

3.1. Caminhamento e decolagem

A distância percorrida foi influenciada significativamente pela concentração do ozônio ($F_{8,266}=6,56$; $P < 0,0001$), pela população ($F_{1,266}=203,72$; $P < 0,0001$) e pelo sexo ($F_{1,2664}=10,91$; $P=0,0011$). Observou-se interação significativa entre concentração \times população ($F_{1,266}=4,60$; $P=0,03$), no entanto, não ocorreu interação significativa para concentração \times sexo ($F_{5,266}=1,17$; $P=0,32$) e população \times sexo ($F_{1,266}=0,04$; $P=0,85$) e nem interação tripla da análise de covariância multivariada ($F_{1,266}=1,61$; $P=0,20$).

Os padrões de caminhamento das duas populações são representados através das trilhas de caminhamento formadas pelas populações (Figuras 1 e 2). Os insetos da população de São João percorreram maiores distâncias que os da população de Amambay, embora tenha sido constada redução significativa apenas na população de Amambay (Figura 3 e Tabela 1). A distância percorrida pelos insetos machos foi maior que a distância percorrida pelas fêmeas em ambas as populações.

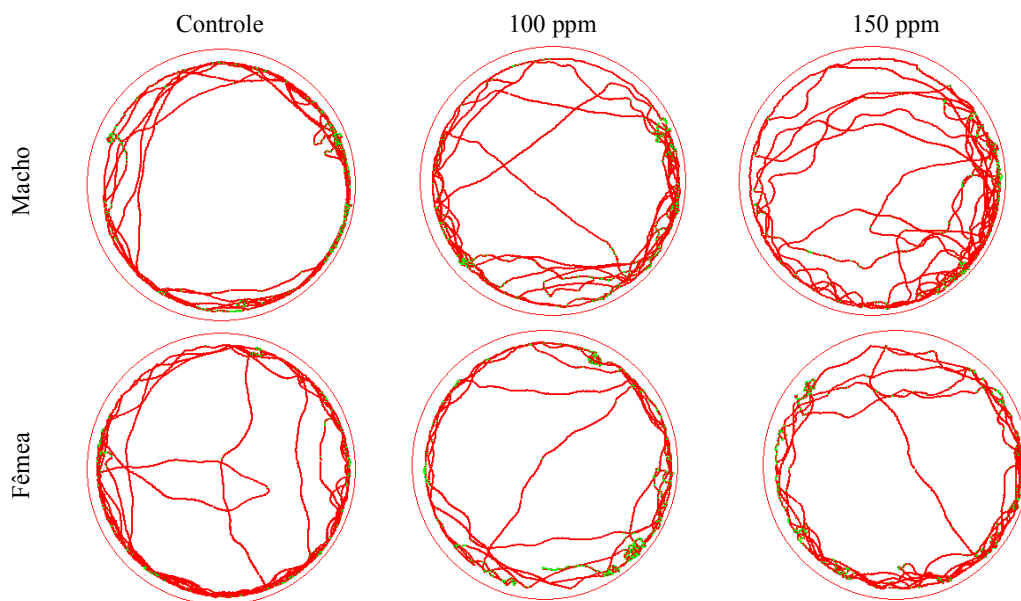


Figura 1. Arena representando o caminhamento de insetos machos e fêmeas da população de São João de *Sitophilus zeamais* submetidos a arenas sem ozônio (controle) e com ozônio nas concentrações de 100 e 150 ppm durante 10 min.

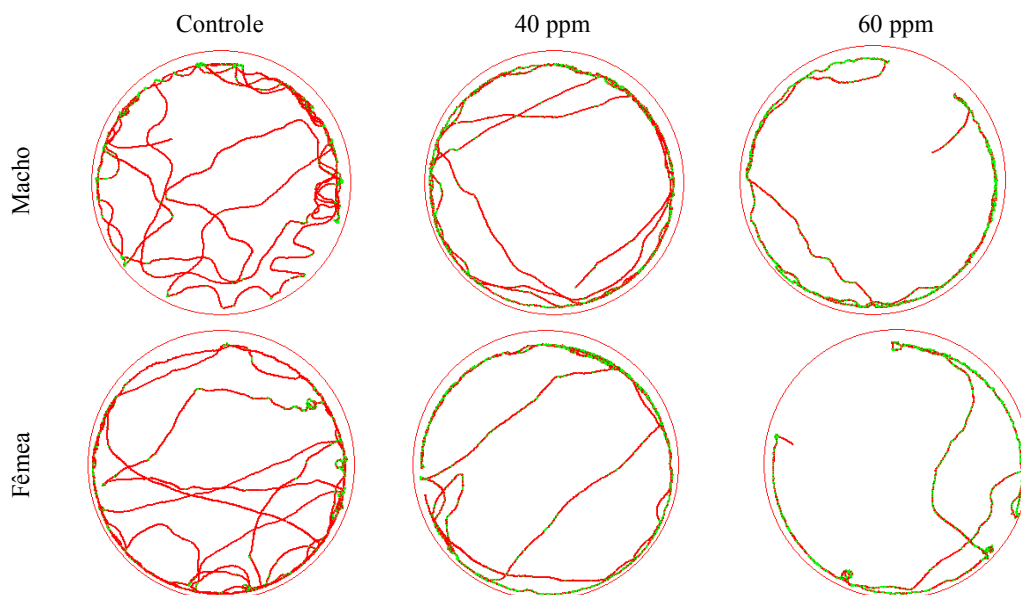


Figura 2. Arena representando o caminhamento de insetos machos e fêmeas da população de Amambay de *Sitophilus zeamais* submetidos a arenas sem ozônio (controle) e com ozônio nas concentrações de 40 e 60 ppm durante 10 min.

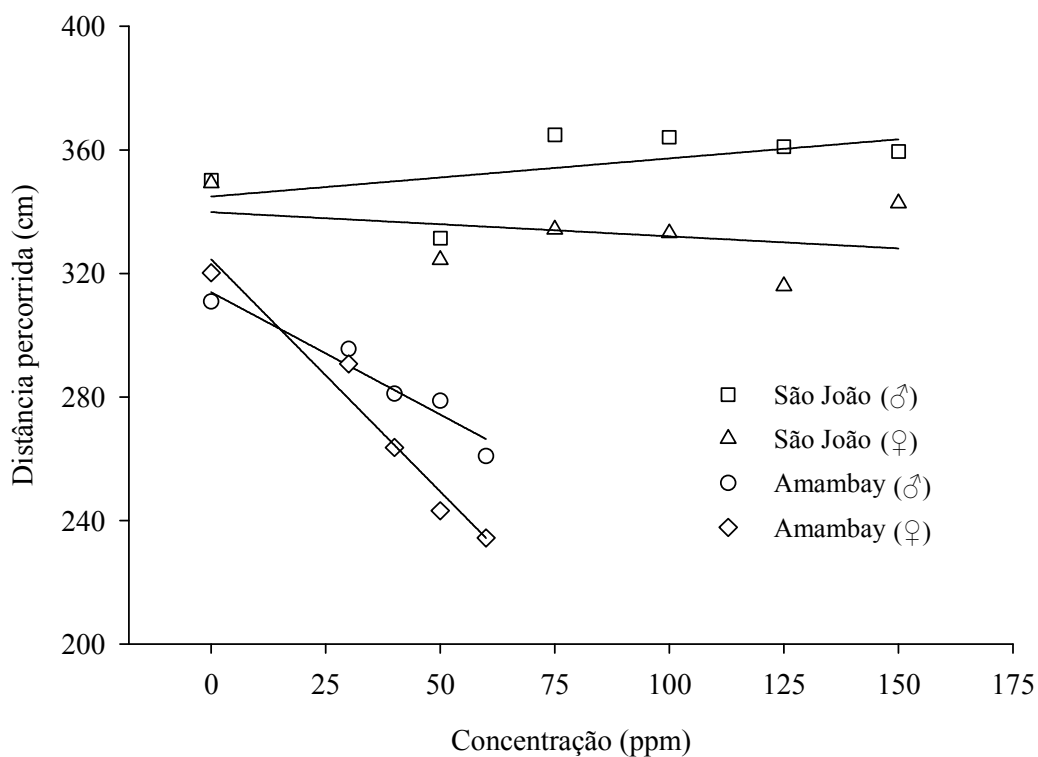


Figura 3. Distância percorrida (cm) por indivíduos machos e fêmeas das populações de São João e Amambay de *Sitophilus zeamais* submetidas a arenas tratadas com ozônio em diferentes concentrações durante 10 min. Cada símbolo representa a média das repetições. As equações estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Sumário das análises de regressão das curvas de distância percorrida (cm), tempo de repouso (s), velocidade de caminhamento (mm/s) e proporção de insetos que levantaram vôo de *Sitophilus zeamais*

Variável	População (Sexo)	Modelo	Parâmetros estimados (\pm EPM)			g.l.erro	F	P	R ²
			A	B	C				
Distância percorrida (cm)	Amambay (♂)	y = a + bx	313,89 \pm 4,92	-0,79 \pm 0,12	-	3	44,54	0,007	0,94
	Amambay (♀)	y = a + bx	324,56 \pm 7,07	-1,50 \pm 0,17	-	3	77,77	0,003	0,96
	São João (♂)	y = 365,48	-	-	-	4	-	> 0,05	-
	São João (♀)	y = 328,66	-	-	-	4	-	> 0,05	-
Tempo de repouso (s)	Amambay (♂)	y = a + b exp(cx)	191,45 \pm 4,84	0,49 \pm 0,88	0,07 \pm 0,03	2	20,70	0,05	0,95
	Amambay (♀)	y = a + bx	176,69 \pm 4,50	1,44 \pm 0,11	-	3	177,53	0,001	0,98
	São João (♂ e ♀)	y = 157,03	-	-	-	4	-	> 0,05	0,04
Velocidade de caminhamento (mm/s)	Amambay (♂)	y = a + bx	7,66 \pm 0,06	-0,01 \pm 0,0014	-	3	21,78	0,01	0,88
	Amambay (♀)	y = a + bx	7,54 \pm 0,12	-0,01 \pm 0,0030	-	3	14,52	0,03	0,83
	São João (♂ e ♀)	y = 7,94	-	-	-	4	-	> 0,05	-
Proporção de insetos que levantaram vôo	Amambay (♂ e ♀)	y = a + bx	0,06 \pm 0,01	-0,0008 \pm 0,0002	-	3	23,21	0,02	0,89
	São João (♂ e ♀)	y = a + bx	0,22 \pm 0,02	-0,0014 \pm 0,0002	-	4	36,24	0,004	0,90

Observou-se variação significativa no tempo de repouso em resposta a concentração do ozônio ($F_{8;266}=4,48$; $P<0,0001$), população ($F_{1;266}=175,09$; $P<0,0001$) e ao sexo ($F_{1;266}=12,93$; $P=0,0004$). Verificou-se interação significativa para concentração \times população ($F_{1;266}=9,61$; $P<0,002$), mas não foi constatada interação significativa entre concentração \times sexo ($F_{5;266}=1,73$; $P=0,13$) e população \times sexo ($F_{1;266}=1,17$; $P=0,28$), e não ocorreu interação tripla da análise de variância multivariada ($F_{1;266}=1,65$; $P=0,20$).

O tempo de repouso dos indivíduos da população de Amambay foi maior que o da população de São João, tendo ocorrido aumento significativo com o incremento da concentração do ozônio apenas na população de Amambay (Figura 4 e Tabela 1). Este aumento do tempo de repouso foi mais expressivo nas fêmeas do que nos machos na população de Amambay, porém, não houve variação para o sexo na população de São João.

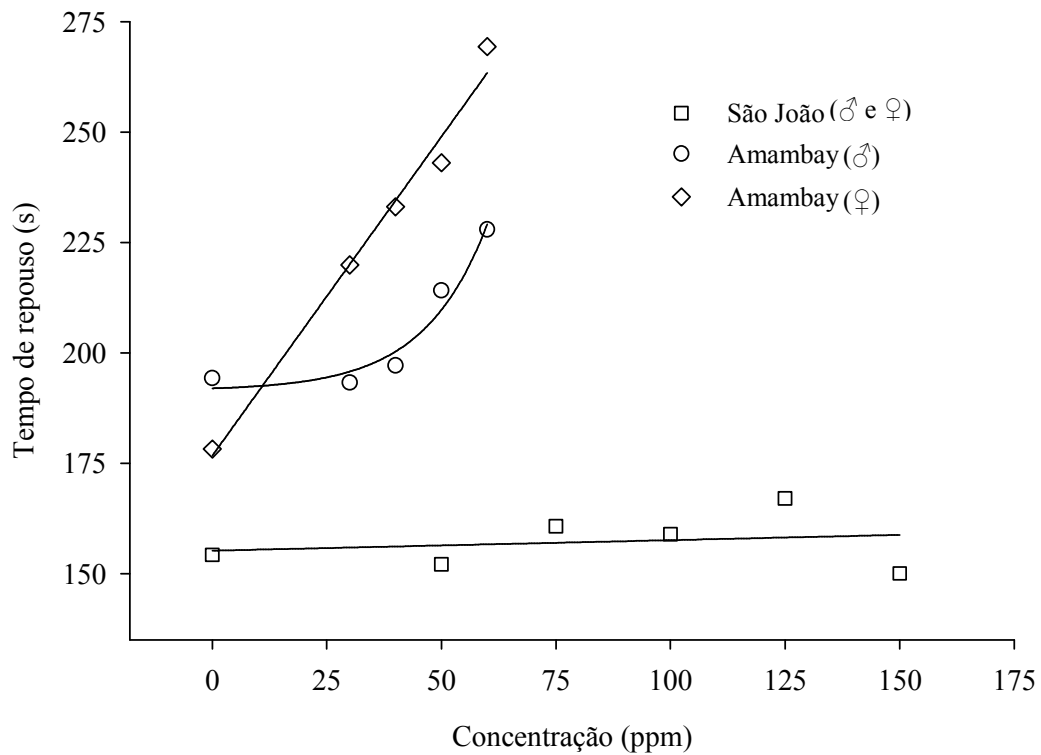


Figura 4. Tempo de repouso (s) de indivíduos machos e fêmeas das populações de São João e Amambay de *Sitophilus zeamais* submetidas a arenas tratadas com ozônio em diferentes concentrações durante 10 min. Cada símbolo representa a média das repetições. As equações estão apresentadas na Tabela 1.

A velocidade de caminhada variou significativamente entre as concentrações ($F_{8;266}=3,30$; $P=0,0013$), entre as populações ($F_{1;224}=85,30$; $P<0,000$) e entre os sexos ($F_{1;266}=9,24$; $P=0,003$). Verificou-se interação significativa entre população \times sexo ($F_{1;266}=4,99$; $P=0,026$), porém, não ocorreu interação significativa entre concentração \times população ($F_{1;266}=2,26$; $P=0,13$) e concentração \times sexo ($F_{5;266}=1,65$; $P=0,15$) e nem interação tripla da análise de variância multivariada ($F_{1;266}=0,23$; $P=0,63$).

Embora a população de São João tenha apresentado velocidade de caminhada substancialmente maior do que a população de Amambay (Figura 5), a velocidade de caminhada da população de São João não diferiu significativamente entre as concentrações. A velocidade de caminhada da população de Amambay diminuiu significativamente com o incremento da concentração do ozônio, tanto para os machos como para as fêmeas (Tabela 1). Todavia, a redução na velocidade foi mais expressiva nas fêmeas.

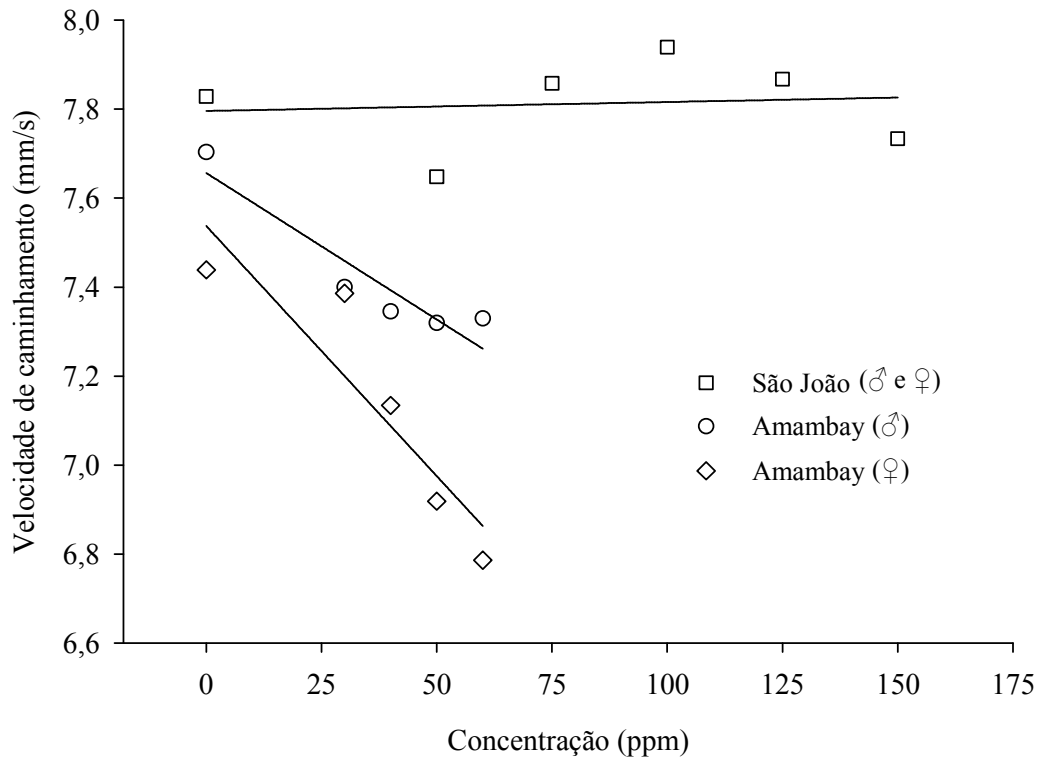


Figura 5. Velocidade de caminhada (mm/s) de indivíduos machos e fêmeas das populações de São João e Amambay de *Sitophilus zeamais* submetidas a arenas tratadas com ozônio em diferentes concentrações durante 10 min. Cada símbolo representa a média das repetições. As equações estão apresentadas na Tabela 1.

Observou-se variação significativa na proporção de insetos que iniciaram vôo em resposta à concentração de ozônio ($F_{5;16}=1,63$; $P=0,007$) e entre as populações ($F_{1;16}=87,45$; $P<0,0001$); no entanto, não ocorreu interação significativa entre estes fatores ($F_{1;16}=1,17$; $P=0,30$). A proporção de insetos que decolaram diminuiu significativamente com o incremento da concentração nas duas populações, sendo que a população de São João, em geral, apresentou maiores valores (Figura 6 e Tabela 1). Com relação à altura de vôo, não foi verificada variação significativa entre as populações ($F_{1;16}=0,26$; $P=0,61$), entre as concentrações ($F_{5;16}=0,49$; $P=0,78$) e nem entre as suas interações ($F_{1;16}=0,38$; $P=0,55$). As médias da altura de vôo das populações de São João e Amambay foram $6,46\pm 0,95$ e $6,57\pm 2,23$ cm, respectivamente.

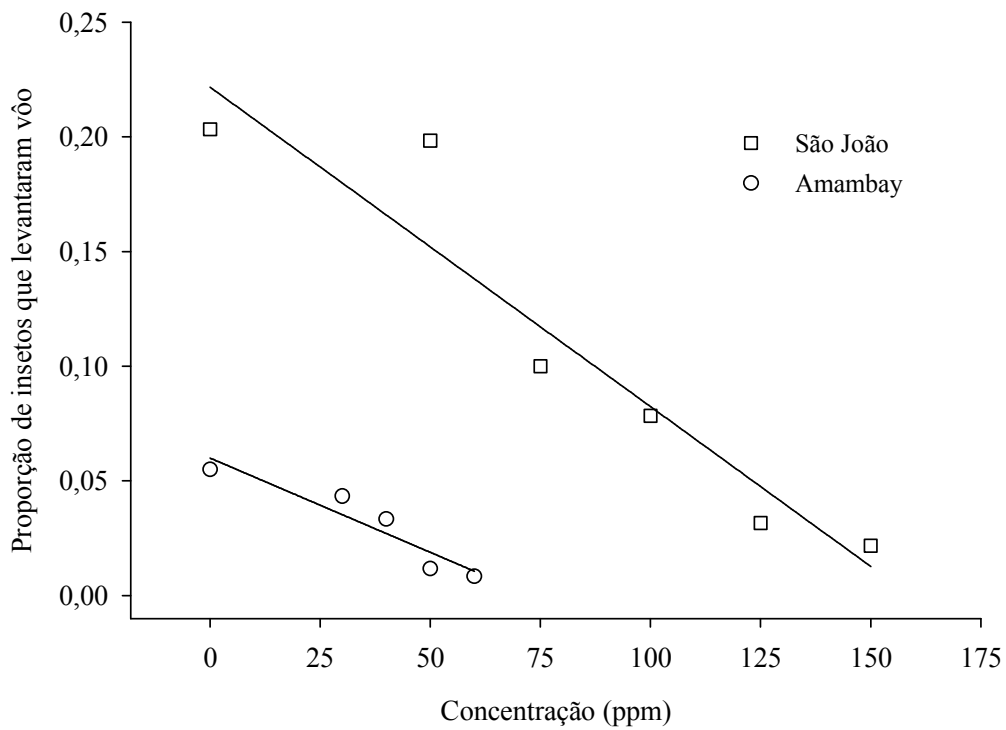


Figura 6. Proporção de adultos não-sexados das populações de São João e Amambay de *Sitophilus zeamais* que levantaram vôo no interior de câmaras tratadas com ozônio em diferentes concentrações durante 30 min. Cada símbolo representa a média e repetições. As equações estão apresentadas na Tabela 1.

3.1. Taxa respiratória e massa corpórea

A taxa respiratória ($\mu\text{L de CO}_2 \text{ h}^{-1}/\text{inseto}$) variou significativamente entre as populações ($F_{1;12}=67,34$; $P<0,0001$), mas não apresentou variação significativa quanto ao sexo ($F_{1;12}=0,04$; $P=0,84$) e não foi verificada interação significativa entre população \times sexo ($F_{1;12}=0,00$; $P=0,95$). Para a massa corpórea também observou-se variação significativa entre as populações ($F_{1;12}=43,87$; $P<0,0001$), mas não foi constada variação significativa para o sexo ($F_{1;12}=0,03$; $P=0,87$) e não ocorreu interação significativa entre estas variáveis ($F_{1;12}=2,51$; $P=0,14$). A taxa respiratória e a massa corpórea da população de Amambay foram significativamente maiores do que da população de São João, com uma variação de 23,84 e 15,51%, respectivamente (Figura 7). A taxa respiratória se correlacionou positivamente e significativamente com o tempo de repouso dos insetos das populações sob a atmosfera enriquecida com o ozônio ($n=4$, $r=0,96$, $P=0,04$). No entanto, não se correlacionou com a distância percorrida ($n=4$; $r=-0,94$; $P=0,06$) e nem com a velocidade de caminhada ($n=4$, $r=-0,87$, $P=0,13$). A massa corpórea se correlacionou significativamente com a distância percorrida ($n=4$, $r=-0,98$, $P=0,02$) e com o tempo de repouso ($n=4$, $r=0,98$, $P=0,02$), mas não com a velocidade de caminhada ($n=4$, $r=-0,94$, $P=0,06$).

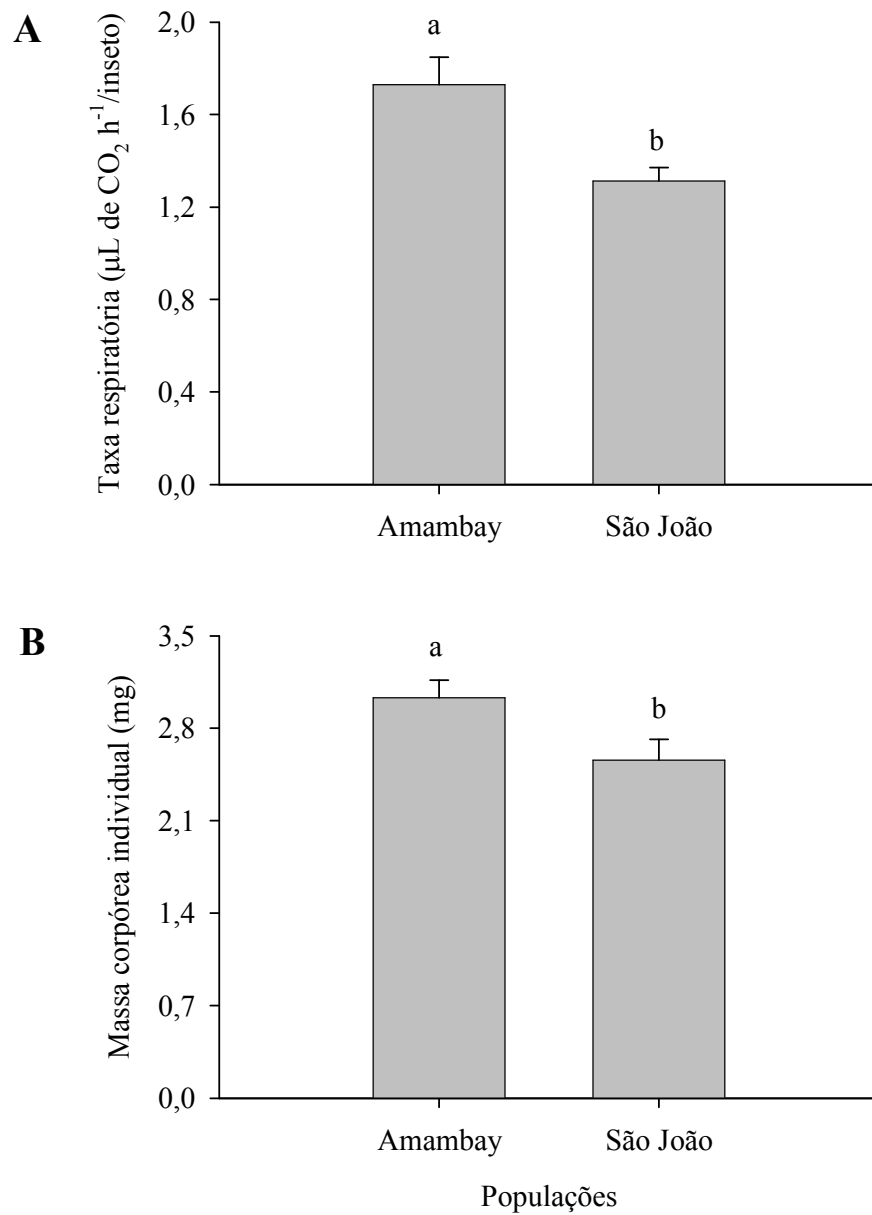


Figura 7. Taxa respiratória (A) e massa corpórea (B) (\pm E.P.M.) das populações de *Sitophilus zeamais*. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo teste F ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

As variações comportamentais causadas pelo incremento da concentração do ozônio foram dependentes da população de *S. zeamais*. A população de Amambay apresentou respostas comportamentais de locomoção e iniciação de vôo distintas sob concentrações sub-letais do ozônio, tanto para os machos como para as fêmeas, embora as fêmeas tenham apresentado respostas mais expressivas. Por outro lado, o comportamento da população de São João normalmente não sofreu influência do ozônio. As alterações comportamentais que os insetos apresentam na presença dos inseticidas podem lhes proporcionar habilidades adicionais para se adaptarem aos ambientes tratados com os compostos tóxicos (Watson e Barson, 1996; Cox et al., 1997; Guedes et al.; 2009a). A detecção da presença dos inseticidas no ambiente pode estar associada à habilidade de aprendizagem dos insetos ou a variações genéticas nos receptores periféricos ou sistemas de processamento central (Georghiou, 1972; Haynes, 1988; Gould, 1991; Hoy et al., 1998). Isso pode ocasionar a evolução de resistência comportamental aos inseticidas em algumas espécies (Gould, 1984; Jallow & Hoy, 2005).

Como as populações e os sexos apresentaram respostas comportamentais diferenciadas com o incremento da concentração do ozônio, há indícios de que existe plasticidade fenotípica diferenciada para os parâmetros de locomoção em resposta ao ambiente enriquecido com o ozônio. O fenômeno da plasticidade fenotípica é reconhecido quando a expressão de uma determinada característica do organismo varia com o ambiente em que ele vive e com o genótipo através da interação genótipo-ambiente (Sibly et al., 1997; Futuyama, 1998; Stearns & Hoekstra, 2000; Guedes et al., 2009a, 2009b). O reconhecimento da plasticidade comportamental das populações e sexos com o incremento das concentrações do ozônio indica, ainda, que

tais respostas são do tipo estímulo-dependente, conforme observado no presente estudo para a população de Amambay. As respostas comportamentais estímulo-dependente são desencadeadas via percepção sensorial dos insetos, tendo sido reportada frequentemente para diferentes espécies de insetos (Lockwood et al., 1985; Wang et al., 2004; Muenworn et al., 2006).

O conhecimento dos padrões do metabolismo intermediário dos insetos também é importante para se entender o comportamento locomotor dos insetos em ambientes tratados com inseticidas (Oliveira et al., 2007; Pereira et al., 2009; Silva et al., 2010). A taxa respiratória e a massa corporal dos insetos podem representar a soma das demandas energéticas dos processos fisiológicos dos insetos necessários para produzir mecanismos de defesa contra inseticidas (Guedes et al., 2006; Sousa et al., 2008). O tempo de repouso das populações de *S. zeamais* se correlacionou positivamente com a taxa respiratória dos insetos, indicando que indivíduos que apresentam maiores taxas respiratórias permanecem parados por maior tempo na presença do ozônio. Tais resultados indicam que indivíduos que naturalmente apresentam maiores taxas respiratórias têm maior capacidade de perceber a presença do ozônio. Conseqüentemente, isso pode desencadear respostas comportamentais e/ou fisiológicas imediatas como mecanismos de defesa contra os efeitos deletérios dos compostos tóxicos (Emekci et al., 2002, 2004; Guedes et al., 2006; Bouwer et al., 2009; Guedes et al. 2009a). Esta hipótese pode ser sustentada considerando-se que adultos de *S. zeamais*, *T. castaneum* e *R. dominica* perceberam a presença do ozônio imediatamente após a exposição e reduziram substancialmente a taxa respiratória com o incremento das concentrações sub-letais do ozônio para reduzir o efeito tóxico do gás (Lu et al., 2009).

Os resultados do presente estudo indicaram que os insetos podem reduzir a sua atividade locomotora na presença do ozônio. Embora os insetos-praga de produtos armazenados não apresentem resistência ao fumigante, esta redução na atividade locomotora na presença do gás pode se tornar um mecanismo de defesa dos insetos. Todavia, a utilização desta tecnologia dificultará a evolução de resistência devido a facilidade de manutenção da concentração eficaz do gás. A utilização da concentração desejada do ozônio durante o período de tratamento dos grãos é possível porque o gás é insuflado em fluxo contínuo e isto possibilita a manutenção e distribuição uniforme do gás na massa de grãos (Kells et al., 2001; Mendez et al., 2003; Isikber & Öztekin, 2009).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anonymous. Exophily in anophelines and malaria control. **WHO Chronicle**, v.12, p.81-82, 1958.
- Araújo, R.A.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, M.G.A.; Ferreira, G.H. Enhanced activity of carbohydrate- and lipid-metabolizing enzymes in insecticide-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Bulletin of Entomological Research**, v.98, n.4, p.417-424, 2008.
- Beckel, H.; Lorini, I.; Lazzari, S.M.N. Comportamento de adultos de diferentes raças de *Rhyzopertha dominica* (F.) em superfície tratada com deltamethrin. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.48, n.1, p.115-118, 2004.
- Beckel, H.; Lorini, I.; Lazzari, S.M.N. Efeito de repelência do inseticida deltamethrin sobre insetos de raças resistentes e suscetíveis de *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera, Bostrichidae) em grãos de trigo armazenado. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.49, n.4, p.572-574, 2005.

- Benhalima, H.; Chaudhry, M.Q.; Mills, K.A.; Price, N.R. Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. **Journal of Stored Products Research**, v.40, n.3, p.241-249, 2004.
- Bond, E.J.; Robinson, J.R.; Buckland, C.T. The toxic action of phosphine: absorption and symptoms of poisoning in insects. **Journal of Stored Products Research**, v.5, n.4, p.289-298, 1969.
- Bouwer, G.; Nardini, L.; Duncan, F.D. *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae that survive sublethal doses of nucleopolyhedrovirus exhibit high metabolic rates. **Journal of Insect Physiology**, v.55, n.4, p. 369-374, 2009.
- Collins, P.J.; Darglish, G.J.; Pavic, H.; Kopittke, R.A. Response of mixed-age cultures of phosphine-resistant and susceptible strains of lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, to phosphine at a range of concentrations and exposure periods. **Journal of Stored Products Research**, v.41, n.4, p.373-385, 2005.
- Cotton, R.T. The relation of respiratory metabolism of insects to their susceptibility to fumigants. **Journal of Economic Entomology**, v.25, n.5, p.1088-1103, 1932.
- Cox, P.D.; Fleming, D.A.; Atkinson, J.E.; Bannon, K.L.; Whitefield, J.M. The effect of behaviour on the survival of *Cryptolestes ferrugineus* in an insecticide-treated laboratory environment. **Journal of Stored Products Research**, v.33, n.3, p.257-269, 1997.
- Dethier, V.G.; Barton-Brown, L.; Smith, C.N. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. **Journal of Economic Entomology**, v.53, n.1, p.134-136, 1960.
- Eaton, A.D.; Clesceri, L.S.; Greenberg, A.E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20^a ed. Washington: APHA/AWWA/WEF, 2000.

- Emekci, M.; Navarro, S.; Donahaye, E.; Rindner, M.; Azrielei, A. Respiration of *Tribolium castaneum* (Herbst) at reduced oxygen concentrations. **Journal of Stored Products Research**, v.38, n.5, p.413-425, 2002.
- Emekci, M.; Navarro, S.; Donahaye, E.; Rindner, M.; Azrielei, A., Respiration of *Rhyzopertha dominica* (F.) at reduced oxygen concentrations. **Journal of Stored Products Research**, v.40, n.1, p.27-38, 2004.
- Futuyma, D.G. **Evolutionary Biology**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1998. 759p.
- Gammon, D.W. Neural effects of alethrin on the free walking cockroach *Periplaneta americana*: an investigation using defined doses at 15 and 32 °C. **Pesticide Science**, v.9, n.1, p.79-91, 1978.
- Georghiou, G.P. The evolution of resistance to pesticides. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.3, p.133-168, 1972.
- Gould, F. Arthropod behavior and the efficacy plant protectants. **Annual Review of Entomology**, v.36, p.305-330, 1991.
- Gould, F. Role of behavior in the evolution of insect adaptation to insecticides and resistant host plants. **Bulletin of the Entomological Society America**, v.30, p.34-51, 1984.
- Guedes, N.M.P.; Guedes, R.N.C.; Ferreira, G.H.; Silva, L.B. Flight take-off and walking behavior of insecticide-susceptible and -resistant strains of *Sitophilus zeamais* exposed to deltamethrin. **Bulletin of Entomological Research**, v.99, n.4, p.393-400, 2009a.
- Guedes, N.M.P.; Guedes, R.N.C.; Silva, L.B.; Cordeiro, E.M.G. Deltamethrin-induced feeding plasticity in pyrethroid-susceptible and -resistant strains of the

- maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Applied Entomology**, v.133, n.7, p.524-532, 2009b.
- Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Guedes, N.M.P.; Ribeiro, B.; Serrão, J.E. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Physiological Entomology**, v.31, n.1, p.30-38, 2006.
- Hayes, J.P. Mass-specific and whole-animal metabolism are not the same concept. **Physiological and Biochemical Zoology**, v.74, n.1, p.147-150, 2001.
- Haynes, K.F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Annual Review of Entomology**, v.33, p.149-168, 1988.
- Hoy, C.W.; Head, G.P.; Hall, F.R. Spatial heterogeneity and insect adaptation to toxins. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.571-594, 1998.
- Isikber, A.A.; Öztekin, S. Comparison of susceptibility of two stored-product insects, *Ephestia kuehniella* Zeller and *Tribolium confusum* du Val to gaseous ozone. **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.3, p.159-164, 2009.
- Jallow, M.F.A.; Hoy, C.W. Phenotypic variation in adult behavioral response and offspring fitness in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in response to permethrin. **Journal of Economic Entomology**, v.98, n.6, p.2195-2202, 2005.
- Kells, S.A.; Mason, L.J.; Maier, D.E.; Wolososhuk, C.P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v.37, n.4, p.371-383, 2001.
- Kljajić, P.; Perić, I. Altered susceptibility of granary weevil *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) populations to insecticides after selection with pirimiphos-methyl and deltamethrin. **Journal of Stored Products Research**, v.43, n.2, p.134-141, 2007.

- Lockwood, J.A.; Byford, R.L.; Story, R.N.; Sparks, T.C.; Quisenberry, S.S. Behavioral resistance to the pyrethroids in the horn fly, *Hematiobia irritans* (Diptera: Muscidae). **Environmental Entomology**, v.14, n.6, p.873-880, 1985.
- Lockwood, J.A.; Sparks, T.C.; Story, R.N. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. **Bulletin of the Entomological of America**, v.30, n.4, p.41-51, 1984.
- Lorini, I.; Collins, P.J.; Daglish, G.J.; Nayak, M.K.; Pavic, H. Detection and characterisation of strong resistance to phosphine in Brazilian *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). **Pest Management Science**, v.63, n.4, p.358-364, 2007.
- Lorini, I.; Galley, D.J. Relative effectiveness of topical, filter paper and grain applications of deltamethrin, and associated behavior of *Rhyzopertha dominica* (F.) strains. **Journal of Stored Products Research**, v.34, n.4, p.377-383, 1998.
- Lu, B.; Ren, Y.; Du, Y.; Fu, Y.; Gu, Jie. Effect of ozone on respiration of adult *Sitophilus oryzae* (L.), *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Rhyzopertha dominica* (F.). **Journal of Insect Physiology**, v.55, n.10, p.885-889, 2009.
- Mendez, F.; Maier, D.E.; Mason, L.J.; Woloshuck, C.P. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. **Journal of Stored Products Research**, v.39, n.1, p.33-44, 2003.
- Muenworn, V.; Akaratanakul, P.; Bangs, M.J.; Parbaripai, A.; Chareonviriyaphap, T. Insecticide-induced behavioral responses in two populations of *Anopheles maculates* and *Anopheles sawadwongporni*, malaria vectors in Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.22, n.4, p.689-698, 2006.

- Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C., Tótola, M.R., De Marco Jr., P. Competition between insecticide-susceptible and -resistant populations of the maize weevil. *Sitophilus zeamais*. **Chemosphere**, v.69, n.1, p.17-24, 2007.
- Pekár, S.; Haddad, C.R. Can agrobiont spiders (Araneae) avoid a surface with pesticide residues? **Pest Management Science**, v.61, n.12, p.1179-1185, 2005.
- Pereira, A.M.; Faroni, L.R.D'A.; Silva Júnior, A.G.; Sousa, A.H.; Paes, J.L. Viabilidade econômica do gás ozônio como fumigante em grãos de milho armazenados. **Engenharia na Agricultura**, v.16, n.2, p.144-154, 2008.
- Pereira, C.J.; Pereira, E.J.G.; Cordeiro, E.M.G.; Della Lucia, T.M.C.; Tótola, M.R.; Guedes, R.N.C. Organophosphate resistance in the maize weevil *Sitophilus zeamais*: Magnitude and behavior. **Crop Protection**, v.28, n.2, p.168-173, 2009.
- Perez-Mendoza, J.; Dover, B.A.; Hagstrum, D.W.; Hopkins, T.L. Effect of crowding, food deprivation, and diet on flight initiation and lipid reserves of the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.91, n.2, p.317-326, 1999.
- Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.D'A.; Guedes, R.N.C.; Sousa, A.H.; Tótola, M.R. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschusky (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.1, p.71-74, 2009.
- Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.D'A.; Tótola, M.R.; Guedes, R.N.C. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. **Pest Management Science**, v.63, n.9, p.876-881, 2007.
- SAS Institute. **SAS/STAT User's Guide**, version 8.0. Cary: SAS Institute Inc., 2002.

- Sibly, R.M.; Winokur, L.; Smith, R.H. Interpopulation variation in phenotypic plasticity in the speckled wood butterfly, *Pararge aegeria*. **Oikos**, v.78, n.2, p.323-330, 1997.
- Silva, L.B.; Reis, A.P.; Pereira, E.J.G.; Oliveira, M.G.A.; Guedes, R.N.C. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases from insecticide-resistant and -susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v.155, n.1, p.12–19, 2010.
- Sousa, A.H.; Faroni, L.R.D'A.; Guedes, R.N.C.; Tótola, M.R.; Urruchi, W.I. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect-pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, v.44, n.4, p.379-385, 2008.
- SPSS. **Sigma Plot user's guide**, version 7.0 (revised edition). Chicago: SPSS Inc., 2001.
- Stearns, S.C.; Hoekstra, R.F. **Evolution: an introduction**. Oxford: Oxford University Press, 2000, 381p.
- Verheggen, F.; Ryne, C.; Olsson, P.-O.C.; Arnaud, L.; Lognay, G.; Högberg, H.-E.; Persson, D.; Haubruge, E.; Löfstedt, C. Electrophysiological and behavioral activity of secondary metabolites in the confused flour beetle, *Tribolium confusum*. **Journal of Chemical Ecology**, v.33, n.3, p. 525-539, 2007.
- Wang, C.; Scharf, M.E.; Bennett, G.W. Behavioral and physiological resistance of the German cockroach to gel baits (Blattodea: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology**, v.97, n.6, p.2067-2072, 2004.
- Watson, E.; Barson, G. A laboratory assessment of the behavioural responses of three strains of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) to three insecticides and the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide. **Journal of Stored Products Research**, v.32, n.1, p.59-67, 1996.

Watson, E.; Barson, G.; Pinniger, D.B.; Roberts, G.; Ludlow, A.R. Evaluation of the behavioral responses of *Anthrenus verbasi* adults and larvae to permethrin (ec) using a computerized tracking system. **Journal of Stored Products Research**, v.33, n.4, p.335-346, 1997.

**SELEÇÃO DE *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) AO
OZÔNIO**

Palavras-chave: seleção em laboratório, gorgulho do milho, fumigante alternativo, susceptibilidade.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo investigar a possibilidade de ganho de resistência ao ozônio em duas populações de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) submetidas à pressão de seleção com o gás. Também foram avaliados os padrões de caminhamento e taxa respiratória em cada ciclo de seleção. Foram utilizadas duas populações-fonte, uma proveniente de um coquetel de 30 populações (PCOQ) e outra a menos susceptível ao ozônio entre estas 30 populações (PMSO). Os insetos de cada população-fonte foram submetidos a ciclos de seleção com o ozônio, utilizando-se o tempo letal para 80% (TL₈₀) dos insetos correspondente a cada geração. Determinou-se a toxicidade do ozônio (50 ppm, em fluxo contínuo de 2 L min⁻¹) para cada geração através de estimativas dos tempos de exposição letais para 50 e 95% dos insetos (TL₅₀ e TL₉₅). Adicionalmente, foram determinados os padrões caminhamento (distância percorrida, tempo de repouso e velocidade de caminhamento) e a taxa respiratória dos insetos (produção de CO₂). Não foi conseguido ganho por seleção para resistência ao ozônio nas populações de *S. zeamais* submetidas a ciclos sucessivos de seleção com o gás. As características comportamentais de caminhamento e a taxa respiratória não variaram entre os ciclos de seleção.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the possibility of development of resistance to ozone in two populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) under selection pressure by the gas. Walking patterns and respiration rate in each cycle of selection were also evaluated. Two source populations were studied; one from a pool of 30 populations (PCOQ); and another, the least susceptible to ozone among these 30 populations (PMSO). Insects from each source population were subjected to cycles of selection to ozone, using the lethal time for 80% (TL₈₀) of insects for each generation. Ozone toxicity (50 ppm at continuous flow of 2 L min⁻¹) was determined for each generation through estimates of lethal exposure times for 50% and 95% of insects (TL₅₀ and TL₉₅). Walking patterns (distance walked, resting time and walking velocity) and respiration rate (CO₂ production) of insects were also determined. No gain from selection for resistance to ozone was achieved in *S. zeamais* populations exposed to successive cycles of selection by the gas. The behavioral characteristics walking and respiration rate showed no variation between cycles of selection.

Key words: selection in laboratory, maize weevil, alternative fumigant, susceptibility.

1. INTRODUÇÃO

A evolução da resistência de pragas a inseticidas tem se tornado um dos grandes entraves em programas de controle de pragas que envolvem o uso de produtos químicos (Groeters & Tabashnik, 2000). No setor de armazenamento, o aumento dos níveis de resistência deve-se principalmente a disponibilidade limitada de inseticidas, ao uso indiscriminado de inseticidas durante muito tempo e a falta de estruturas adequadas para a aplicação de fumigantes (Collins et al., 2005; Sousa et al., 2009). Estudos recentes indicaram que populações brasileiras de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) e *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) atingiram elevados níveis de resistência à fosfina, com razões de resistência variando de 32,2 até 186,20 vezes em relação às populações padrões de susceptibilidade (Pimentel et al., 2007, 2009).

O enriquecimento da atmosfera com o ozônio (O_3) tem sido indicado como uma importante alternativa para o controle das pragas de produtos armazenados (Kells et al., 2001; Sousa et al., 2008; Isikber & Öztekin, 2009; Lu et al., 2009). Isto se deve ao fato dos insetos não apresentarem resistência cruzada entre a fosfina e o ozônio. Adicionalmente, o ozônio não deixar resíduos nos grãos, uma vez que o seu produto de degradação é o oxigênio (O_2) (Zhanggui et al., 2003; Sousa et al., 2008). O ozônio é um gás resultante do rearranjo de átomos de oxigênio e pode ser gerado por descargas elétricas ou pela incidência de radiação eletromagnética de alta energia (luz ultravioleta) no ar (Khadre et al., 2001; Liu et al., 2007). É uma molécula instável, com tempo de meia-vida relativamente curto, variando de 20 a 50 min (Isikber & Öztekin, 2009). Pode ser gerado no próprio local de uso, o que descarta a necessidade de manipulação, armazenamento e transporte de ozônio.

Embora o efeito tóxico do ozônio seja bem documentado para insetos-praga de produtos armazenados, ainda são necessários estudos para avaliar os riscos de evolução de resistência em populações expostas à pressão de seleção com este gás. A teoria evolutiva provê suporte para estudos biológicos de resistência a inseticidas e prediz que populações mantidas sob pressão de seleção podem adquirir habilidades diferenciadas de sobrevivência em ambientes adversos (Foster et al., 2000; Coustau et al., 2000; Arnaud & Haubruge, 2002; Guedes et al., 2010). A seleção de uma determinada característica pode estar associada ao fenômeno da pleiotropia, que é a habilidade de um único gene afetar mais de uma característica no indivíduo (Boivin et al., 2001; Raymond et al., 2005; Guedes et al., 2009). Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar a susceptibilidade de populações de *S. zeamais* ao serem submetidas a pressão de seleção com ozônio. Adicionalmente foram avaliados os padrões de caminhamento e metabólicos em cada ciclo de seleção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Insetos

Foram utilizadas duas populações-fonte, uma proveniente de um coquetel de 30 populações coletadas em dez estados brasileiros e duas localidades paraguaias (PCOQ), e outra a menos susceptível ao ozônio entre estas 30 populações, a qual foi coletada em Guaxupé, MG (PMSO). Estas populações foram criadas em frascos de vidro de 1,5 L sob condições constantes de temperatura (27 ± 2 °C) e umidade relativa. Foram utilizados grãos de milho como substrato alimentar com teor de água de 13% base úmida (b.u.), previamente expurgados e mantidos a -18 °C para evitar reinfestação.

2.2. Bioensaios de seleção e toxicidade do ozônio

Os adultos das populações-fonte (PCOQ e PMSO) foram submetidos a ciclos de seleção com o ozônio utilizando-se, inicialmente, o tempo letal para 80% (TL₈₀) da geração parental de cada população. Posteriormente, foi utilizado o TL₈₀ correspondente a cada geração. Os insetos sobreviventes no final da exposição foram selecionados para a obtenção da progênie. Foram utilizados aproximadamente 2000 insetos com idade conhecida (1 a 2 semanas de emergidos) em cada ciclo de seleção.

A toxicidade do ozônio para cada geração foi determinada através de estimativas dos tempos de exposição letais para 50 e 95% dos insetos (TL₅₀ e TL₉₅), utilizando-se a metodologia adaptada de Sousa et al. (2008). A concentração do gás foi fixada em 50 ppm ($\approx 0,11 \text{ g m}^{-3}$), em fluxo contínuo de 2 L min^{-1} . A aplicação do ozônio foi realizada no interior de câmaras plásticas (13 cm de largura \times 20 cm de altura), à $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 5\%$. Os insetos de cada população foram colocados em gaiolas plásticas (4 cm de largura \times 3,5 cm de altura) suspensas a 10 cm da base das câmaras de fumigação. As gaiolas tiveram a tampa e o fundo confeccionados com tecido do tipo organza. No controle foi utilizado gás oxigênio com pureza mínima de 99,99%. Foram utilizadas três repetições, cada uma com 50 adultos não-sexados, com idade variando de uma a quatro semanas. A mortalidade dos insetos foi avaliada após oito dias para cada período de exposição.

O ozônio foi obtido através do gerador de ozônio O&L3 ORM (Ozone & Life, São José dos Campos, SP, Brasil), que por sua vez utiliza gás comprimido oxigênio (pureza mínima de 99,99%) como insumo. A concentração do ozônio indicada pelo gerador de ozônio foi confirmada através de um monitorador de ozônio contínuo (BMT Messtechnik GMBH - BMT 930), com precisão de $0,001 \text{ ppm}_v$ e pelo método iodométrico, utilizando titulação indireta (Eaton et al., 2000).

2.4. Caminhamento

O caminhamento dos insetos foi observado individualmente durante 10 min em arenas confeccionadas com acrílico (3,5 cm de altura × 15 cm de largura). A concentração do ozônio foi fixada em 50 ppm ($\approx 0,11 \text{ g m}^{-3}$), em fluxo contínuo de $1,3 \text{ L min}^{-1}$. A injeção e exaustão do gás foram realizadas por intermédio de duas conexões instaladas opostamente em cada arena. No controle foi utilizado gás oxigênio com pureza mínima de 99,99%. O movimento de cada inseto foi registrado por um sistema de rastreamento que consiste de uma câmera CCD que registra e transfere as imagens digitalmente para um computador acoplado (ViewPoint Life Sciences Inc., Montreal, Canada). As características avaliadas foram distância percorrida (cm), tempo de repouso (s) e velocidade de caminhamento (mm/s). Foram utilizadas 20 repetições para cada população.

2.5. Taxa respiratória

A produção de dióxido de carbono (CO_2) foi mensurada através de um respirômetro do tipo CO_2 Analyser TR3C (Sable System International, Las Vegas, EUA). Foram utilizadas câmaras respirométricas de 25 mL, cada uma contendo 20 insetos adultos de cada população, conectadas a um sistema completamente fechado. Foram utilizadas quatro repetições para cada população e a produção de CO_2 foi mensurada em cada câmara sob temperatura controlada ($27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) após um período de 15 h de aclimação. Ar isento de CO_2 foi injetado no interior das câmaras por dois min. em fluxo de 100 mL min^{-1} . Um leitor sensor infravermelho foi conectado na saída do sistema para quantificar o CO_2 ($\mu\text{L de CO}_2 \text{ h}^{-1}/\text{inseto}$). O controle foi constituído por câmaras respirométricas sem insetos e foi utilizado para normalizar os dados da taxa respiratória de cada população.

2.6. Análises estatísticas

Os dados dos bioensaios de tempo-resposta foram submetidos à análise de probit (PROC PROBIT; SAS Institute, 2002). Os intervalos de confiança para as razões de toxicidade (RTs) foram calculados conforme Robertson & Preisler (1992) e os valores dos tempos letais (TLs) foram considerados significativamente diferentes ($P < 0,05$) se os intervalos de confiança dos RTs não englobarem o valor 1. Para os parâmetros de caminhamento, foram realizadas análises multivariada de covariância (população × geração × tratamentos com e sem ozônio) (PROC GLM com procedimento MANOVA; SAS Institute, 2002). Os dados de CO₂ foram submetidos a análise de covariância (população × geração) (PROC GLM; SAS Institute, 2002).

3. RESULTADOS

3.1. Toxicidade do ozônio

A variação da toxicidade entre as gerações foi substancialmente baixa (< 2 vezes) para as duas populações (Tabela 1), indicando que não houve variação na susceptibilidade. Como não foi verificado qualquer indício de ganho adicional para a resistência ao ozônio, os testes foram encerrados na geração F₂. A razão de toxicidade (RT) dos TL₅₀ variou de 1,0 a 1,09 vezes para a população coquetel (PCOQ) e de 1,0 a 1,03 para a população menos susceptível ao ozônio (PMSO). As inclinações das curvas de tempo-mortalidade foram similares entre as populações, indicando homogeneidade de resposta para o ozônio nos ciclos de seleção.

3.2. Caminhamento e taxa respiratória

A distância percorrida e o tempo de repouso variaram significativa entre os tratamentos com ozônio e sem ozônio e entre as populações ($P < 0,01$). Todavia, não

variaram significativamente entre as gerações submetidas à pressão de seleção com o ozônio ($P>0,05$). A única interação significativa entre estas variáveis, tanto para a distância percorrida como para o tempo de repouso, ocorreu entre população \times tratamentos com e sem ozônio ($P<0,01$). Para a velocidade de caminhada, não houve variação significativa entre as variáveis estudadas ($P>0,05$). A distância percorrida e o tempo de repouso da população PMSO no controle foi significativamente maior que da população PCOQ (Figura 1). Porém, na presença do ozônio não ocorreram variações significativas entre as populações. Os padrões de caminhada são representados por meio da trilha de caminhada na Figura 2.

A taxa respiratória ($\mu\text{L de CO}_2 \text{ h}^{-1}/\text{inseto}$) não variou significativamente entre os ciclos de seleção com o ozônio ($P>0,05$). Porém, a produção de CO_2 da população PCOQ foi significativamente maior que da população PMSO ($P<0,05$) (Figura 3), com uma variação de 21,81%. Não houve interação significativa para população \times geração ($P>0,05$).

Tabela 1. Toxicidade relativa do ozônio para adultos da população menos susceptível ao ozônio (PMSO) e da população coquetel (PCOQ) de *Sitophilus zeamais* após dois ciclos de seleção às TL₈₀ na concentração de 50 ppm de ozônio

População	Geração	Inclinação (EPM)	TL ₅₀ (IF 95%) (h)	RT ₅₀ (IC 95%)	TL ₉₅ (IF 95%) (h)	RT ₉₅ (IC 95%)	χ^2	P
PMSO	Parental	5.46±0.28	9,00 (8,53-9,47)	-	18,02 (16,80-19,53)	-	9,02	0.25
	F1	5.81± 0.27	9,77 (9,41-10,13)	1,09 (1,02-1,16)	18,75 (17,72-20,02)	1,04 (0,94-1,15)	14,80	0.25
	F2	6.98±0.35	9,07 (8,72-9,40)	1,01 (0,95-1,06)	15,60 (14,89-16,45)	1,16 (1,07-1,25)	13,69	0.25
PCOQ	Parental	4.71±0.25	6,58 (6,25-6,91)	-	14,71 (13,57-16,20)	-	11,69	0.11
	F1	5.27±0.28	6,69 (6,30-7,06)	1,02 (0,94 -1,10)	13,72 (12,78-14,89)	1,07 (0,95-1,21)	10,17	0.12
	F2	5.20±0.34	6,80 (6,30-7,26)	1,03 (0,94-1,13)	14,09 (13,20-15,24)	1,04 (0,94-1,16)	9,30	0.16

EPM.=Erro padrão da média; TL=Tempo letal; IF 95%=Intervalo fiducial a 95% de probabilidade; IC 95%=Intervalo de confiança a 95% de probabilidade; RT=Razão de toxicidade para TL₅₀ e TL₉₅; χ^2 =Qui-quadrado; P=Probabilidade.

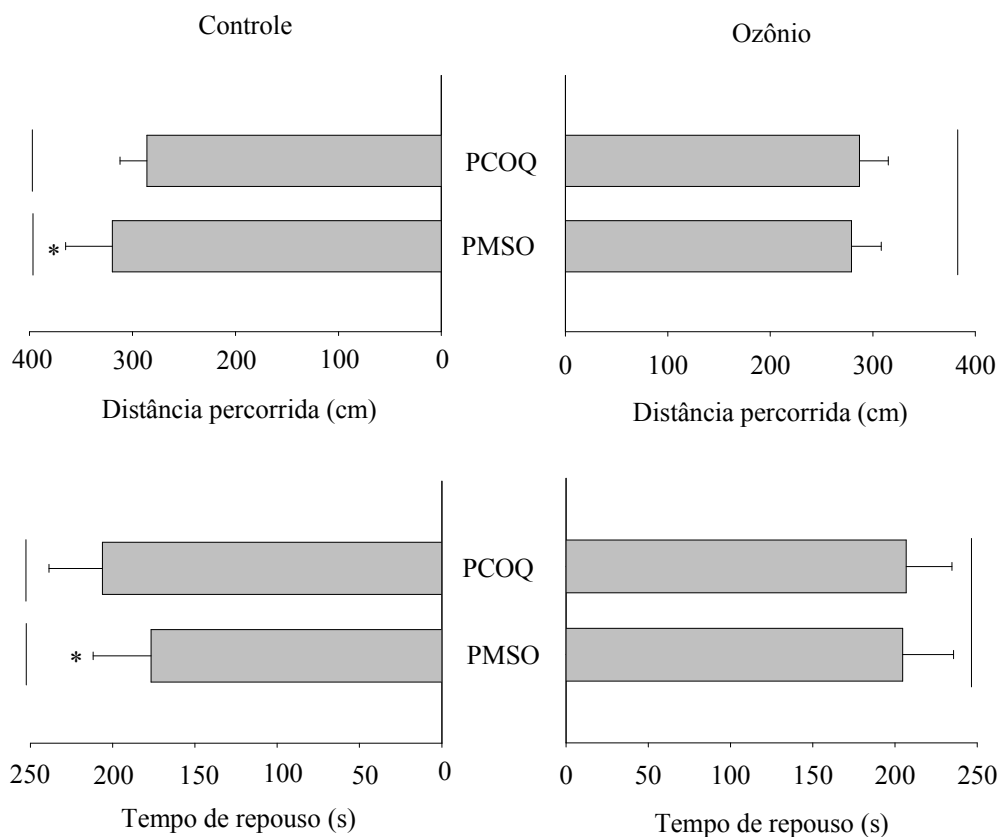


Figura 1. Distância percorrida (cm) e tempo de repouso (\pm E.P.M.) de indivíduos da população coquetel (PCOQ) e da população menos susceptível ao ozônio (PMSO) de *Sitophilus zeamais* submetidas a arenas tratadas com ozônio (50 ppm) e sem ozônio (controle) durante 10 min. Histograma com barras contínuas não diferem entre as populações pelo teste F ($P < 0,05$) e as médias que apresentam asteriscos indicam diferença significativa entre população exposta ou não ao ozônio pelo teste de F ($P < 0,05$).

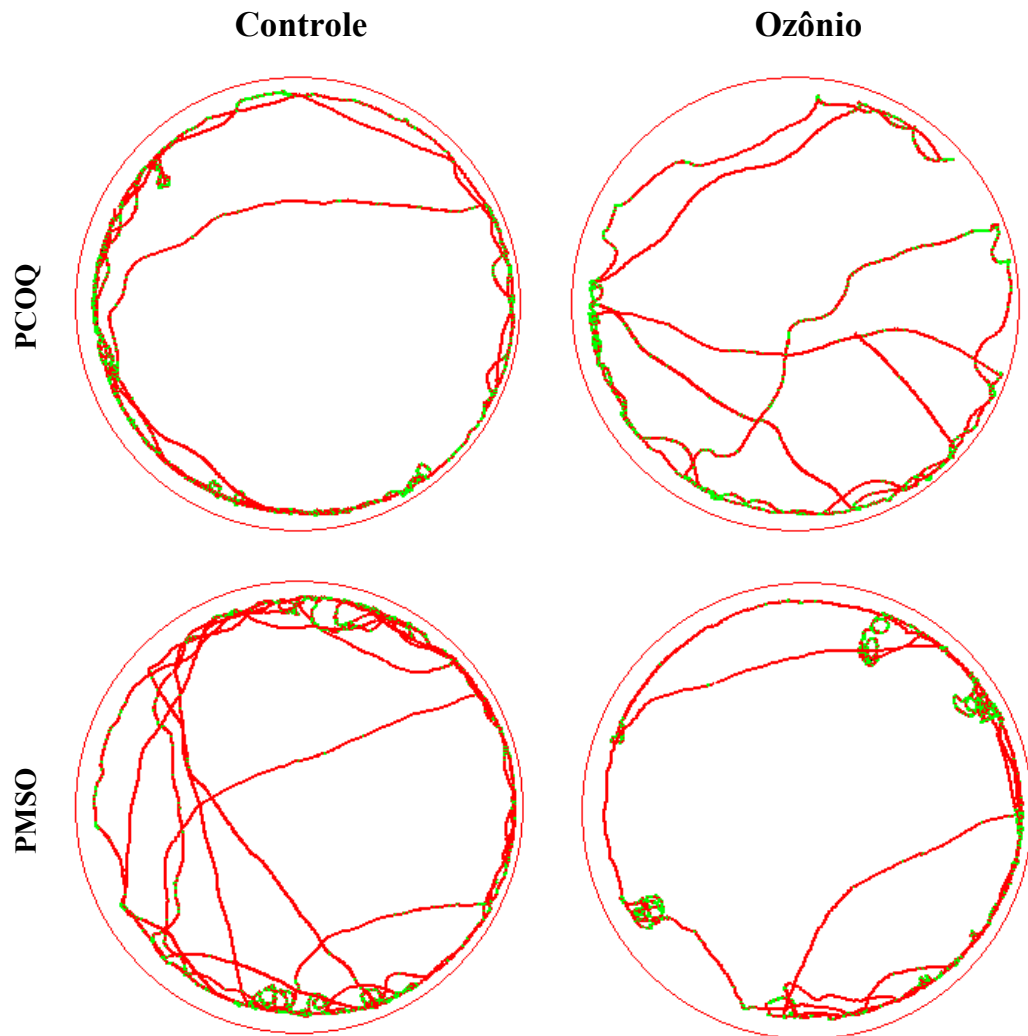


Figura 2. Arena representando o caminhamento de indivíduos da população coquetel (PCOQ) e da população menos susceptível ao ozônio (PMSO) de *Sitophilus zeamais* submetidas a arenas tratadas com ozônio (50 ppm) e sem ozônio (controle) durante 10 min.

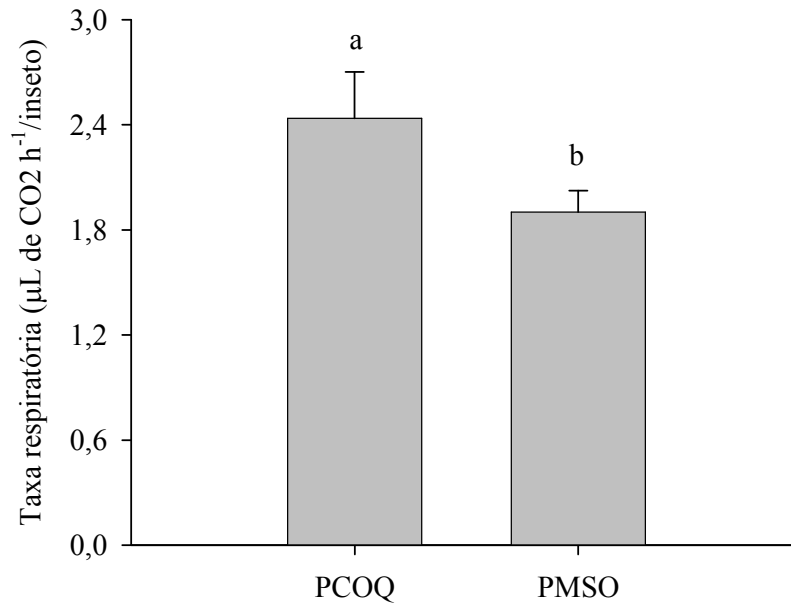


Figura 3. Taxa respiratória (\pm E.P.M.) da população coquetel (PCOQ) e da população menos susceptível ao ozônio (PMSO) de *Sitophilus zeamais*. Histograma de barra com a mesma letra não difere significativamente pelo teste de F ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

A avaliação de risco de resistência constitui uma tentativa para prever a probabilidade de uma praga desenvolver resistência a um inseticida em uso ou com potencial de uso (Tabashnik, 1992; McKenzie & Batterham, 1998). Para o ozônio não foram constatadas alterações nos padrões de susceptibilidade nas populações submetidas à pressão de seleção com o gás. Estes resultados indicam a ausência de variabilidade genética para a toxicidade do ozônio nas populações estudadas. Adicionalmente, reforçam os relatos de baixa variabilidade de susceptibilidade ao ozônio em populações de insetos-praga de produtos armazenados, como constatado no Brasil, China e Austrália (Zhangui et al., 2003; Sousa et al., 2008).

Embora não tenha ocorrido variação na atividade locomotora das populações submetidas a pressão de seleção com o ozônio, constatou-se que a menor atividade locomotora nata da população ou sua redução na presença do ozônio não proporcionaram ganho de resistência ao gás para os insetos. Tal afirmação é válida considerando-se que a redução da atividade locomotora dos insetos na presença de inseticidas possibilita-lhes menor exposição aos efeitos deletérios dos compostos. A redução da taxa respiratória também pode reduzir a exposição dos insetos aos fumigantes, uma vez que o sistema respiratório dos insetos é a principal rota de entrada dos gases no organismo dos mesmos (Chaudhry, 1997; Pimentel et al., 2009). No presente estudo a variação inata da produção de CO₂ das duas populações-fonte não ocasionaram redução da toxicidade do ozônio durante os ciclos de seleção.

A baixa variabilidade genética das populações de *S. zeamais* quanto à susceptibilidade ao ozônio indica baixo risco de evolução de resistência ao fumigante em curto prazo. Todavia, a ausência de ganho de resistência em estudos sob condições de laboratório não garante os mesmos resultados em nível de campo,

particularmente quando as populações de laboratório têm limitada variabilidade genética em relação as populações de campo (McKenzie & Batterham, 1998). A extrapolação dos resultados deste estudo para as condições de campo pode ser dificultada pela falta de estrutura nas unidades armazenadoras adequada à aplicação de fumigantes, o que tem permitido a exposição dos insetos a doses sub-letais dos fumigantes (Pimentel et al., 2007, 2009).

Em resumo, não foi constatado qualquer indício de evolução de resistência ao ozônio nas duas populações de *S. zeamais* submetidas a pressão de seleção com o gás e não ocorreram quaisquer alterações no comportamento de caminamento e na taxa respiratória das populações. Ressalva-se que esta susceptibilidade ao ozônio poderá ser mantida em situações práticas de uso desde que sejam elaboradas estratégias racionais de uso, incluído o monitoramento das pragas e associação com outros métodos de controle.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnaud, L.; Haubruge, E. Insecticide resistance enhances male reproductive success in a beetle. **Evolution**, v.56, n.12, p.2435-2444, 2002.
- Boivin, T.; D'Hières, C.C.; Bouvier, J.C.; Beslay, D., Sauphanor, B. Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth *Cydia pomonella*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.99, n.3, p.381-386, 2001.
- Chaudhry, M.Q. A review of the mechanisms involved in the action of phosphine as an insecticide and phosphine resistance in stored-product insects. **Pesticide Science**, v.49, n.3, p.213–228, 1997.
- Collins, P.J.; Darglish, G.J.; Pavic, H.; Kopittke, R.A. Response of mixed-age cultures of phosphine-resistant and susceptible strains of lesser grain borer,

- Ryzopertha dominica*, to phosphine at a range of concentrations and exposure periods. **Journal of Stored Products Research**, v.41, n.4, p.373-385, 2005.
- Coustau, C.; Chevillon, C.; ffrench-Constant, R.H. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? **Trends in Ecology and Evolution**, v.15, n.9, p.378-383, 2000.
- Eaton, A.D.; Clesceri, L.S.; Greenberg, A.E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20^a ed. Washington: APHA/AWWA/WEF, 2000.
- Foster, S.P.; Denholm, I.; Devonshire, A.L. The ups and downs of insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*) in the U.K. **Crop Protection**, v.19, n.8, p.873-879, 2000.
- Groeters, F.R.; Tabashnik, B.E. Roles of selection intensity, major genes, and minor genes in evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v.93, n.6, p.1580-1587, 2000.
- Guedes, N.M.P.; Guedes, R.N.C.; Silva, L.B.; Cordeiro, E.M.G. Deltamethrin-induced feeding plasticity in pyrethroid-susceptible and -resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Applied Entomology**, v.133, n.7, p.524-532, 2009.
- Guedes, N.M.P.; Tolledo, J.; Corrêa, A.S.; Guedes, R.N.C. Insecticide-induced hormesis in na insecticide-resistant strain of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Applied Entomology**, v.134, n.2, p.142-148, 2010.
- Isikber, A.A.; Öztekin, S. Comparison of susceptibility of two stored-product insects, *Ephestia kuehniella* Zeller and *Tribolium confusum* du Val to gaseous ozone. **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.3, p.159-164, 2009.

- Kells, S.A.; Mason, L.J.; Maier, D.E.; Wolososhuk, C.P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v.37, n.4, p.371-383, 2001.
- Khadre, M.A.; Yousef, A.E.; Kim, J.G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001.
- Liu, H.H.; Wu, Y.C.; Chen, H.L. Production of ozone and reactive oxygen species after welding. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.53, n.4, p.513-518, 2007.
- Lu, B.; Ren, Y.; Du, Y.; Fu, Y.; Gu, Jie. Effect of ozone on respiration of adult *Sitophilus oryzae* (L.), *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Rhyzopertha dominica* (F.). **Journal of Insect Physiology**, v.55, n.10, p.885-889, 2009.
- McKenzie, J.A.; Batterham, P. Predicting insecticide resistance: mutagenesis, selection and response. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.353, n.1376, p.1729-1734, 1998.
- Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.D'A.; Guedes, R.N.C.; Sousa, A.H.; Tótola, M.R. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschusky (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.1, p.71-74, 2009.
- Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.D'A.; Tótola, M.R.; Guedes, R.N.C. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. **Pest Management Science**, v.63, n.9, p.876-881, 2007.
- Raymond, B.; Sayyed, A.H.; Wright, D.J. Genes and environment interact to determine the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the Royal Society**, v.272, p.1519-1524, 2005.

- Robertson, J.L.; Preisler, H.K. **Pesticide bioassays with Arthropods**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1992. 127p.
- SAS Institute. **SAS/STAT User's Guide**, version 8.0. Cary: SAS Institute Inc., 2002.
- Sousa, A.H.; Faroni, L.R.D'A.; Guedes, R.N.C.; Tótola, M.R.; Urruchi, W.I. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect-pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, v.44, n.4, p.379-385, 2008.
- Sousa, A.H.; Faroni, L.R.D'A.; Pimentel, M.A.G.; Guedes, R.N.C. Developmental and population growth rates of phosphine-resistant and -susceptible populations of stored product insect-pests. **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.4, p.241-246, 2009.
- Tabashnik, B.E. Resistance risk assessment: realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae), tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae), and colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v.85, n.5, p.1551-1559, 1992.
- Zhanggui, Q., Xia, W., Gang, D., Xiaoping, Y., Xuechao, H., Deke, X., Xingwen, L. Investigation of the use of ozone fumigation to control several species of stored grain insects. In: Credland, P.F., Armitage, D.M., Bell, C.H., Cogan, P.M., Highley, E. **Advances in Stored Product Protection, Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Products Protection**, Wallingford: CABI International Publishing, 2003. p.617-621.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As populações de *S. zeamais* mostraram uniformidade de resposta ao ozônio e nenhuma exibiu resistência ao gás. Por outro lado, foi constatado que algumas populações reduziram a atividade locomotora e atividade de vôo na presença do gás, indicando a ocorrência de plasticidade locomotora desencadeada pelo ozônio. Dessa forma, a resposta comportamental apresentada pelas populações pode ser considerada do tipo estímulo-dependente.

A locomoção dos insetos na presença do ozônio não apresentou relação com a taxa respiratória e nem com a massa corpórea dos insetos, embora tenha sido constatado que a locomoção dos insetos na ausência do ozônio foi inversamente proporcional ao aumento da massa corporal. Isso pode estar associado à resistência à fosfina, uma vez que a massa corpórea e a taxa respiratória estão correlacionadas e influenciaram negativamente a resistência a este fumigante.

Os adultos de *S. zeamais* podem reduzir a sua atividade locomotora com o incremento da concentração do ozônio. Esta redução da atividade locomotora na presença do gás pode ser um mecanismo de defesa dos insetos. Todavia, as variações comportamentais causadas pelo fumigante são dependentes da população.

Não foi constatado qualquer indício de evolução de resistência ao ozônio e não foram verificadas quaisquer alterações nas demais características avaliadas em relação às populações-fonte.