

HIPÓLITO ALBERTO EDUARDO MALIA

**TERRA DIATOMÁCEA, INDIVIDUALIDADE E BALANÇO DE ÁGUA NO
CARUNCHO DO MILHO *Sitophilus zeamais***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

HIPÓLITO ALBERTO EDUARDO MALIA

**TERRA DIATOMÁCEA, INDIVIDUALIDADE E BALANÇO DE ÁGUA NO
CARUNCHO DO MILHO *Sitophilus zeamais***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 02 de fevereiro de 2012

Nelsa Maria Pinho Guedes

Carvalho Carlos Ecolé

Eliseu José Guedes Perreira

Raul Narciso Carvalho Guedes

(Orientador)

Aos meus pais Lourenço e Ana Tércia, minha inspiração;

Aos meus irmãos Isália, Kicas e Bia, meus companheiros;

A meus amigos e familiares;

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradecer a Deus por ter iluminado meu caminho durante todos estes anos de formação acadêmica.

À Universidade Federal de Viçosa e o Programa de Pós Graduação em Entomologia pela oportunidade oferecida de freqüentar o curso de mestrado.

Agradecer profundamente ao meu supervisor Prof. Raul Guedes, pelo continuo acompanhamento e encorajamento; pela disponibilização de materiais e meios para realização deste trabalho; sem me esquecer do apoio prestado na revisão bibliográfica, análise e organização do texto.

Aos amigos do laboratório de Ecotoxicologia: Alberto, Hudson, Ronnie, Katherine, Sharrine, Wagner, Conrado, Danubia, Lucas, Eric e Eduardo pela convivência maravilhosa e enriquecedora.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia, cuja orientação nas disciplinas me possibilitou a abertura de novos conhecimentos e horizontes científicos.

Aos meus pais pelo apoio que me deram desde os primeiros anos de vida e pelo contributo na minha educação.

Aos meus irmãos que sempre estiveram do meu lado nas decisões mais importantes que tomei e sempre me aconselharam.

A minha namorada, Mirza, que me deu forças para partir nesta jornada e ficou sempre do meu lado durante estes dois anos de curso.

Ao Dr. Carvalho Ecole por ter me orientado na graduação, encaminhado para o mestrado e todo seu apoio moral.

Aos amigos feitos aqui em Viçosa, principalmente a comunidade africana que me recebeu e esteve sempre do meu lado nos bons e maus momentos.

Aos amigos que deixem em Moçambique que sempre estiveram do meu lado mesmo a distancia possibilitando mais força para continuar.

Por fim ao Governo e ao povo brasileiro que são os responsáveis pela minha vinda e estadia aqui.

Khanimambo

BIOGRAFIA

Hipólito Alberto Eduardo Malia, filho de Lourenço Eduardo Alberto Malia e de Ana Tércia Roque Fumo, nasceu em 15 de Setembro de 1984, na Cidade da Matola, província de Maputo, Moçambique.

Freqüentou o ensino primário entre 1990 e 1996 nas escolas primárias 1º e 2º grau da Maxaquene e o ensino secundário na escola secundária Josina Machel entre 1997 e 2001.

Em 2004 ingressou no ensino superior na Universidade Eduardo Mondlane, onde freqüentou o curso de Engenharia Agrônômica sendo concluído em Setembro de 2008 sob supervisão do Dr. Carvalho Carlos Ecole. Durante este período realizou estágio na Estação Agrária do Umbeluzi, unidade experimental avançada do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM), onde fez o seu trabalho de fim de curso. Entre 2006 e 2008 foi monitor das disciplinas de Climatologia e Controle de Pragas Agrícolas.

No ano de 2010 ingressou como bolsista do Programa Estudantes do Convênio para a Pós-Graduação (PEC-PG) no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes defendendo o seu trabalho em 02 de fevereiro de 2012.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO I	9
INDIVIDUALIDADE IMPORTA NA EFICÁCIA DE TERRA DIATOMÁCEA AO CARUNCHO DO MILHO (<i>Sitophilus zeamais</i>)?	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Populações de <i>Sitophilus zeamais</i>	13
2.2. Bioensaio respirométrico	16
2.3. Bioensaios comportamentais	16
2.4. Bioensaios de sobrevivência	21
2.5. Análises estatísticas	22
3. RESULTADOS	23
3.1. Bioensaios de sobrevivência	23
3.2. Bioensaios comportamentais	24
3.3. Relação entre os parâmetros comportamentais e a sobrevivência individual	27
4. DISCUSSÃO	29
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO II	36
BALANÇO DE ÁGUA MEDIADO POR TERRA DIATOMÁCEA EM CARUNCHO DO MILHO (<i>Sitophilus zeamais</i>)	36
1. INTRODUÇÃO	38

2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1. Insetos	41
2.2. Condições de teste e experimentação	41
2.3. Determinação do conteúdo e perda de água	42
2.4. Determinação da taxa de perda de água	43
2.5. Ganho de água	43
2.6. Bioensaio de sobrevivência	44
2.7. Análises estatísticas	44
3. RESULTADOS.....	46
3.1. Conteúdo e perda de água.....	46
3.2. Taxa de perda de água	51
3.3. Sobrevivência	53
4. DISCUSSÃO	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60

RESUMO

MALIA, Hipólito Alberto Eduardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Terra Diatomácea, individualidade e balanço de água no caruncho do milho *Sitophilus zeamais***. Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.

A busca de métodos alternativos de controle de pragas tem sido um dos grandes desafios dos últimos tempos. Em grãos armazenados uma das alternativas ao controle químico das pragas é o tratamento com terra diatomácea que é um pó inerte que age nos insetos praga removendo a camada de cera da cutícula levando a morte por dessecação. No controle de pragas os conhecimentos do comportamento e da fisiologia são de extrema importância para obter sucesso. A proposta deste trabalho foi verificar a relação de parâmetros comportamentais e fisiológicos do caruncho do milho (*Sitophiluszeamais*) com a sobrevivência quando tratados com a terra diatomácea. O primeiro capítulo objetivou verificar se existe relação entre comportamento individual no caruncho do milho e o tempo de sobrevivência quando exposto a terra diatomácea. Para tal foram avaliados vários comportamentos individuais de caminhamento (número de paradas, velocidade de caminhamento e distancia caminhada), tanatose, desvira, interação inter e intraespecífica e queda livre em seis populações. Estes comportamentos foram posteriormente correlacionados ao tempo de sobrevivência do caruncho em terra diatomácea. Encontrou-se existência de comportamento individual nas populações do caruncho, mas este não está ligado ao tempo de sobrevivência e discutiu-se as possíveis causas. Para o segundo capítulo a abordagem foi o balanço de água onde se comparou duas formulações de terra diatomácea (Keepdry[®] e Insecto[®]). Indivíduos de *Sitophiluszeamais* foram colocados em seis umidades relativas diferentes e pesados diariamente para determinação da variação do conteúdo de água no corpo. A partir dos dados de balanço de água, o conteúdo e a perda de água foram determinados e se encontrou os melhores modelos para explicar a variação destes parâmetros em relação ao tempo e a umidade relativa. A taxa de perda de água foi também determinada uma vez que é o parâmetro que melhor explica o efeito da dessecação. Conteúdo e perda de água correlacionam-se negativamente e são afetados pela umidade, pelo tempo de exposição e pela formulação de terra diatomácea. O mesmo acontece com a taxa de perda de água que

é maior a baixas umidades. O tempo de sobrevivência foi afetado pela exposição à terra diatomácea, sendo menor na formulação Keepdry®.

ABSTRACT

MALIA, Hipólito Alberto Eduardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2012. **Diatomaceous earth, animal personality and water balance in maize weevil *Sitophilus zeamais***. Advisor: Raul Narciso Carvalho Guedes.

The continuous search for alternative control methods for pest control has been one of the challenges lately. In stored products one alternative for chemical control of pests is the use of diatomaceous earth, an inert dust that act in the insect pests removing the wax layer of their epicuticle causing death by desiccation. In pest control the knowledge of behavior and physiology are extremely important for success. The approach of this work was to verify the relation between behavioral and physiological parameters of maize weevil (*Sitophilus zeamais*) with survival time when exposed to diatomaceous earth. In the first chapter we evaluate the existence of relationship between individual behavior in maize weevil and the survival time when treated with diatomaceous earth. For this purpose individual walking (number of stops, walking speed and walking distance), thanatosis, flipping back into position, inter and hetero-specific interactions and free fall behaviors were evaluate in six different populations. These behaviors were subsequently correlated with survival time. We found existence of individual behavior in *Sitophilus zeamais* populations, but not related with the survival time. For the second chapter the focus was the water balance where we compare two different formulations of diatomaceous earth (Keepdry[®] e Insecto[®]). Maize weevil individuals were placed in six different relative humidity and weighed daily determining their variation in water body content. Water content and the water loss data from water balance were used to find the best models that explain the variation of these parameters in relation to time and relative humidity. The water loss rate was also calculated once is the best parameter to explain desiccation. The water content and the water loss were negatively correlated and affected by relative humidity, time of exposure and diatomaceous earth formulation. The survivor time was affected by diatomaceous earth exposure and even more so by the Keepdry[®] formulation.

INTRODUÇÃO GERAL

Com base nas estimativas atuais, a população mundial pode atingir mais de 12 bilhões de pessoas até 2050 (Pimentel *et al.*, 1994). Este aumento inevitável irá causar uma maior demanda na produção de cereais e outros grãos básicos na dieta humana (Hertleinet *al.*, 2011).O milho está entre os cereais mais importantes para pequenos produtores na América Latina e África, sendo que grande proporção da população desses continentes depende destecereal para subsistência (Jones & Thornton, 2003).

Perdas de grãos de cereais armazenados atualmente rondam entre 10 e 20% da produção, sendo que um dos principais fatores dessas perdas é o ataque de pragas (Hertleinet *al.*, 2011).Insetos de grãos armazenados são pragas sérias de produtos alimentares secos e derivados a nível mundial. Além das perdas que esses insetos provocam contribuem para a contaminação dos produtos pela sua presença, vivos ou mortos, suas excreções e fragmentos de corpos (Phillips & Throne, 2009).Dentre as pragas que atacam o milho armazenado destacam-se principalmente asordens Coleoptera e Lepidoptera, as quais causam danos quantitativos e qualitativos na massa de grãos. Em regiões tropicais o problema é agravado pelas condições propícias ao desenvolvimento e manutenção das pragas durante todo o ano.

O caruncho do milho, *Sitophiluszeamais*Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae), é uma praga cosmopolita e especialmente abundante em regiões tropicais como o Brasil, onde é a principal praga de grãos armazenados (Danhoet *al.*, 2002; Pimentel *et al.*, 2009). Essa praga infesta o milho amadurecido antes da colheita e durante o armazenamento, e posteriormente se multiplicam ainda mais (Caswell, 1962; Kim&Kossou, 2003).O controle desta praga tem sido basicamente realizado com fumigantes e inseticidas de efeito residual (piretroides e fosforados), ampliando a abordagem de limpeza e higiene (Adaneet *al.*, 1996),principalmente devido a falta de outras medidas de controle adequadas (Pereira *et al.*, 2009). O uso destes inseticidas químicos no programa de controle de pragas resulta em ressurgência de pragas, resistência à inseticidas, efeitos letais em organismos não-alvo (Adaneet *al.*, 1996),possíveis perigos a saúde principalmente de mamíferos, e risco de contaminação ambiental (Cox, 2004; Yang, 2010).A seleção intensa e a evolução rápida da resistência a inseticidas em populações naturais têm sido os

principais obstáculos a serem superados no manejo satisfatório de insetos-praga (Berticat *et al.*, 2008), principalmente nesses ambientes onde o controle químico é o método mais utilizado, como o caso de pragas de grãos armazenados (Guedes *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005).

Ultimamente tem havido uma restrição no uso de pesticidas e compostos químicos oficialmente registrados para o controle de pragas de produtos alimentares (Riudavetset *al.* 2010). Esforços têm sido constantemente empregados na elaboração de métodos alternativos ao controle químico (Gudrupset *al.*, 2001; Collins & Cook, 2006; Oliveira *et al.*, 2005; Veltenet *al.*, 2008). Esses métodos alternativos devem satisfazer a demanda dos consumidores para redução ou eliminação de pesticidas mantendo ao mesmo tempo o elevado grau de eficácia no controle (Riudavetset *al.* 2010).

A Terra Diatomácea (TD) têm sido utilizada como alternativa a inseticidas sintéticos há muitos anos e, como não degrada rapidamente, uma única aplicação pode ser usada por muito tempo para afetar o desenvolvimento do inseto enquanto o local permanecer seco (Timlick&Fields, 2010). Terra Diatomácea é composta de paredes de células fossilizadas de Fitoplâncton (diatomáceas) contendo sílica extraída pelas células vivas do fluido do seu ambiente. Quando as diatomáceas morrem, as paredes de suas células acumulam-se no fundo dos oceanos, lagos e rios (Vardemanet *al.*, 2007a). São constituídas majoritariamente por dióxido de silício (~90% de SiO₂) e outros minerais (Stathers, 2008). A diatomácea fossilizada torna-se diatomite, que pode ser extraída, secada e triturada para produzir um pó fino do tipo talco conhecida como Terra Diatomácea (Stathers, 2008).

O uso de Terra Diatomacea para o controle de pragas em produtos armazenados tem aumentado durante os últimos anos. Ela tem sido reportada como alternativa efetiva ao controle químico de insetos pragas em produtos armazenados, quando aplicada nos grãos ou nas paredes das instalações por exemplo (Golob, 1997; Mewis&Ulrichs, 2001). Pós de sílica fornecem diferentes resultados quando usados em diferentes organismos alvo (Korunic, 1998; Mewis&Ulrichs, 2001). Várias teorias foram propostas para explicar essas diferenças: alargamento da superfície do tegumento seguido de desidratação, diminuição do trato digestivo, bloqueamento dos espiráculos e traqueia, adsorção ou absorção dos lípidios da cutícula e dano à camada

de cera da epicutícula (Mewis&Ulrichs, 2001).Atualmente sabe-se que a TD protege os produtos de duas maneiras. Primeiro, as partículas de TD são tomadas pelos insetos ao se movimentarem pelos produtos. O corpo dos insetos é composto de um exoesqueleto coberto por ceras e lipídios hidrofóbicos (Klowden, 2007). O produto final provoca abrasão à cutícula absorvendolipídios da epicutículae causando morte por dessecação (Vardeman *et al.*, 2007b). Por outro lado, outro modo de ação da TD é a sua habilidade de repelir insetos (Timlick&Fields, 2010).A eficácia da TD é afetada pela formulação, tamanho da partícula, tipo de grão, temperatura do grão e humidade relativa (Arthur, 2004).Ela é aplicada diretamente ao grão. As vantagens da terra diatomácea são: não é tóxica para mamíferos (DL₅₀de Insecto[®] para ratos >5000mg/Kg) (Korunic, 1998; Stathers *et al.*, 2008), pode ser facilmente removida durante o processamento (Korunic, 1998; Yanget *al.*, 2010), é muito efetiva para uma larga variedade de espécies e, como se trata de um método físico, é pouco provável que possa ocorrer resistência fisiológica (Golob, 1997; Korunic, 1998; Islam *et al.*, 2010).Por outro lado aspetos como regulamento em vários países, a capacidade que alguns insetos têm de recuperar a camada de lipídios, a necessidade de altas doses, problemas nas maquinarias das industrias e atmosfera poeirenta criada pela TD podem ser limitações (Korunic, 1998;Subramanyam&Roesli, 2000). Várias formulações de terra diatomácea estão comercialmente disponíveis pelo mundo, provenientes de diferentes fontes e variando na sua eficácia a insetos comprometendo generalizações sobre sua eficácia (Stathers *et al.*, 2008). A variação nas formulações de TD é majoritariamente devido a diferenças fisiológicas e morfológicas da diatomácea e não necessariamente quanto à sua origem (Korunic, 1998).

Estudos feitos com TD geralmente abordam apenas a componente sobrevivência relacionada ao controle. Existe pouca informação sobre aspectos comportamentais e fisiológicos no controle de pragas de grãos armazenados com terra diatomácea. Neste trabalho aborda-se essas duas vertentes, comportamental e fisiológica, da terra diatomácea no controle do caruncho do milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adane, K., Moore, D., Archer, S.A., 1996. Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. *Journal of Stored Products Research* 32(2): 105-113.
- Arthur, F.H., 2004. Evaluation of a new insecticide formulation (F2) as a protectant of stored wheat, maize, and rice. *Journal of Stored Products Research* 40(3): 317-330.
- Berticat, C., Bonnet, J., Duchon, S., Agnew, P. Weill, M., Corbel, V., 2008. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Bmc Evolutionary Biology*
- Caswell, G.H., 1962. *Agricultural Entomology in the Tropics*. Edward Arnold, London, pp. 40–76.
- Collins, D.A., Cook, D.A., 2006. Laboratory studies evaluating the efficacy of diatomaceous earths, on treated surfaces, against stored-product insect and mite pests. *Journal of Stored Products Research* 42(1): 51-60.
- Cox, P. D., 2004. Potential for using semiochemicals to protect stored products from insect infestation. *Journal of Stored Products Research* 40(1): 1-25.
- Danho, M., Gaspar, C., Haubruge, E., 2002. The impact of grain quantity on the biology of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): oviposition, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. *Journal of Stored Products Research* 38(3): 259-266.
- Golob, P., 1997. Current status and future perspectives for inert dusts for control of stored product insects. *Journal of Stored Products Research* 33(1): 69-79.
- Gudrups, I., Floyd, S., Kling, J.G., Bosque-Perez, N.A., Orchard, J.E., 2001. A comparison of two methods of assessment of maize varietal resistance to the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, and the influence of kernel hardness and size on susceptibility. *Journal of Stored Products Research* 37(3): 287-302.
- Guedes, R.N.C., Lima, J.G., Santos, J.P., Cruz, C.D., 1995. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 31(2): 145-150.

- Hertlein, M.B., Thomson, G.D., Subramanyam, B., Athanassiou, C.G., 2011. Spinosad: A new natural product for stored grain protection. *Journal of Stored Products Research*, doi:10.1016/j.jspr.2011.01.004.
- Islam, M.S., Hasan, M. M., Lei, S., Mucha-Pelzer, T., Mewis, I., Ulrichs, C., 2010. Direct and admixture toxicity of diatomaceous earth and monoterpenoids against the storage pests *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Pest Science* 83(2): 105-112.
- Jones, P.G., Thornton, P.K., 2003. The potential impacts of climate change on maize production in Africa and Latin America in 2055. *Global Environmental Change* 13(1): 51-59.
- Kim, S.K., Kossou, D.K., 2003. Responses and genetics of maize germplasm resistant to the maize weevil *Sitophilus zeamais* Motschulsky in West Africa. *Journal of Stored Products Research* 39(5): 489-505.
- Klowden, M.J., 2007. *Physiological System in Insects*. Second Edition. Academic Press. Moscow, pp. 87.
- Korunic, Z., 1998. Diatomaceous earths, a group of natural insecticides. *Journal of Stored Products Research* 34(2-3): 87-97.
- Mewis, I., Ulrichs, C., 2001. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum*, *Tenebrio molitor*, *Sitophilus granarius* and *Plodia interpunctella*. *Journal of Stored Products Research* 37(2): 153-164.
- Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C., Corrêa, A.S., Damasceno, B.L., Santos, C.T., 2005. Resistência vs suscetibilidade a piretróides em *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): há vencedor? *Neotropical Entomology*, v. 34, p. 981-990.
- Pereira, C.J., Pereira, E.J.G., Cordeiro, E.M.G., Della Lúcia, T.M.C., Tótola, M.R., Guedes, R.N.C., 2009. Organophosphate resistance in the maize weevil *Sitophilus zeamais*: Magnitude and behavior. *Crop Protection* 28(2): 168-173.
- Phillips, T.W., Throne, J.E., 2009. *Biorational Approaches to Managing Stored-product Insect*.

- Pimentel, D., Harman, R., Pacenza, M., Pecarsky, J., Pimentel, M., 1994. Natural resources and an optimum human population. *Population and Environment* 15, 347 e 369.
- Pimentel, M.A.G., Faroni, L.R.D.A., Guedes, R.N.C., Sousa, A.H., Tótola, M.R., 2009. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 45(1): 71-74.
- Ribeiro, B.M., Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Santos, J.P., 2003. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 39(1): 21-31.
- Riudavets, J., Castañé, C., Alomar, O., Pons, M.J., Gabarra, R., 2010. The use of carbon dioxide at high pressure to control nine stored-product pests. *Journal of Stored Products Research* 46(4): 228-233.
- Stathers, T.E., Riwa, W., Mvumi, B.M., Mosha, R., Kitandu, L., Mngara, K., Kaeoneka, B., Morris, M., 2008. Do diatomaceous earths have potential as grain protectants for small-holder farmers in sub-Saharan Africa? The case of Tanzania. *Crop Protection* 27(1): 44-70.
- Subramanyam, B.; Roesli, R., 2000. Inert dust. In: SUBRAMANYAM, B.; HAGSTRUM, D.W. (Eds.). *Alternatives to pesticide in stored-product IPM*. New York: Marcell Dekker. p.321-380.
- Timlick, B., Fields, P.G., 2010. A comparison of the effect of two diatomaceous earth formulations on *Plodia interpunctella* (Hübner) and the effect of different commodities on diatomaceous earth efficacy. 10th International Working Conference on Stored Product Protection.
- Vardeman, E.A., Arthur, F.H., Nechols, J.R., Campbell, J.F., 2007a. Efficacy of surface applications with diatomaceous earth to control *Rhyzoperth dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) in stored wheat. *Journal of Stored Products Research* 43(4): 335-341.
- Vardeman, E.A., Campbell, J.F., Arthur, F.H., Nechols, J.R., 2007b. Behavior of female *Rhyzoperth dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) in a mono-layer of

wheat treated with diatomaceous earth. *Journal of Stored Products Research* 43(3): 297-301.

Velten, G., Rott, A.S., Petit, B.J.C., Cardona, C., Dorn, S., 2008. Improved bruchid management through favorable host plant traits and natural enemies. *Biological Control* 47(2): 133-140.

Yang, F.-L., Liang, G.-W., Xu, Y.-J., Lu, Y.-Y., Zeng, L., 2010. Diatomaceous earth enhances the toxicity of garlic, *Allium sativum*, essential oil against stored-product pests. *Journal of Stored Products Research* 46(2): 118-123.

CAPÍTULO I

INDIVIDUALIDADE IMPORTA NA EFICÁCIA DE TERRA DIATOMÁCEA AO CARUNCHO DO MILHO(*Sitophiluszeamais*)?

1. INTRODUÇÃO

Os insetos podem resistir à exposição a inseticidas através de adaptações fisiológicas ou comportamentais, neste ultimo caso evitando ou minimizando o contato com o inseticida. Essas estratégias alternativas de sobrevivência são também referidas como resistência fisiológica e comportamental a inseticidas, e são traços herdáveis diferindo entre populações de insetos (Georghiou, 1972; Hoyet *et al.*, 1998; Braga *et al.*, 2011), tendo sido reportadas no caruncho do milho, *Sitophiluszeamais* (Guedes *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 2009; Braga *et al.*, 2011). A dinâmica do processo de interação de pesticidas e populações de insetos envolve a deposição do inseticida e características comportamentais do organismo que contribuem para a bioavaliabilidade do composto (Longley&Sotherton, 1997).

O comportamento é definido, na forma mais simplificada, em tudo que os organismos vivos fazem. O comportamento representa o resultado final de uma série complexa de impulsos nervosos e contrações musculares que são iniciados em uma ordem específica e que acabará por resultar na expressão do que vemos como um deslocamento espacial do inseto no ambiente externo (Klowden, 2007). Embora estudos a níveis populacionais tenham um papel importante na ecologia, eles tem sérias limitações. Essas limitações dos dados de nível populacional são ainda maiores em estudos evolutivos (Clutton-Brock& Sheldon, 2010).

Em ecologia comportamental os estudos são feitos à nível de individuo. As conclusões desses estudos são extrapoladas para os níveis seguintes de complexidade ecológica: o nível populacional e o de comunidades. “Todos os fenômenos ecológicos e os padrões de organização de comunidades podem ser vistos como conseqüências imediatas de comportamentos e ações individuais” (Real, 1994). Há um aumento de evidências sugerindo que indivíduos diferem no seu nível médio de comportamento mostrado em uma gama de contextos (“personalidade” animal). Essa diferença existe em vários animais, e geralmente explica mais de 30% da variância fenotípica dentro das populações. Indivíduos podem diferir no seu grau de plasticidade comportamental. Variação individual na plasticidade já foi documentada em estudos laboratoriais e ultimamente tem aumentado a sua documentação no campo (Dingemanse *et al.*, 2010). Diferenças comportamentais entre indivíduos serão favorecidas se proporcionarem diferenças entre os mesmos dentro da população

(Biro&Stamps 2008). Em circunstâncias diferentes o mesmo comportamento de um indivíduo pode conferir vantagem ou desvantagem, dependendo da pressão que é exercida nele.

O comportamento de insetos pragas de produtos armazenados é afetado por diferentes fatores classificados como físicos, químicos e bióticos. Entre os fatores químicos a presença de inseticidas pode afetar o comportamento dos insetos associado com a distribuição e movimentação dos besouros na massa do grão (Cox & Collins, 2002). Por outro lado a ação de um inseticida pode depender também do comportamento de um indivíduo exposto a ele.

Vários trabalhos mostram que a Terra Diatomácea é um método alternativo ao controle químico eficaz no controle de insetos pragas de grãos armazenados (Stathers *et al.*, 2008; Vayias *et al.*, 2009; Vardeman *et al.*, 2007a). Contudo, pouco se sabe sobre como a variação comportamental de uma população e variação individual dentro da população podem influenciar na exposição e ação deste agente nos insetos.

Monje (2010) encontrou que os comportamentos individuais do caruncho do milho contribuem para a variação dos tempos de sobrevivência em ambientes tratados com o inseticida piretróide deltametrina. Neste trabalho o objetivo foi verificar se diferenças comportamentais a nível de indivíduo influenciam na eficácia da terra diatomácea no controle do caruncho do milho, *Sitophilus zeamais*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Populações de *Sitophilus zeamais*

Seis populações de *S. zeamais* provenientes de diferentes cidades brasileiras, uma do Paraguai e uma de Moçambique foram utilizadas nos bioensaios experimentais. As populações foram provenientes dos estados brasileiros de Minas Gerais, Pernambuco e Acre, da região de Arroyo Jambure do Amambay no Paraguai e da Cidade de Maputo em Moçambique. A população de Jacarezinho –PR é derivada de uma população coletada no final da década de 80 em armazéns desses municípios (Figura 1).

As populações foram multiplicadas a partir dos insetos contidos nas amostras coletadas em campo e mantidas em recipientes de vidro (1,5 L) dentro de salas de criação sob condições controladas de temperatura ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($70 \pm 10\%$). O substrato utilizado para manutenção das populações foi milho isento de pragas e inseticidas, o qual era renovado periodicamente.

Os insetos adultos usados nos experimentos foram padronizados pela idade para igualar as condições de expressão dos comportamentos; dessa maneira, usou-se insetos de um a dois dias de emergência. Logo após a separação dos insetos jovens, eles foram sexados e pesados. Apenas fêmeas foram utilizadas por constituírem-se no gênero condicionador principal do potencial reprodutivo, apesar de estudo anterior não haver demonstrado diferença entre os sexos (Monje, 2010). A separação por sexos foi realizada pela observação da textura e perfurações do rosto, como proposto por Tolpo e Morrison (1965). Os insetos foram pesados em uma balança analítica (Sartorius BP 210D), onde posteriormente foram individualizados, marcados e mantidos em frascos de plástico de 20 mL com grãos de milho. Usou-se 28 fêmeas de cada uma das seis populações em todos os bioensaios comportamentais e respirométricos, além do bioensaio de sobrevivência. Os bioensaios foram realizados durante uma semana.

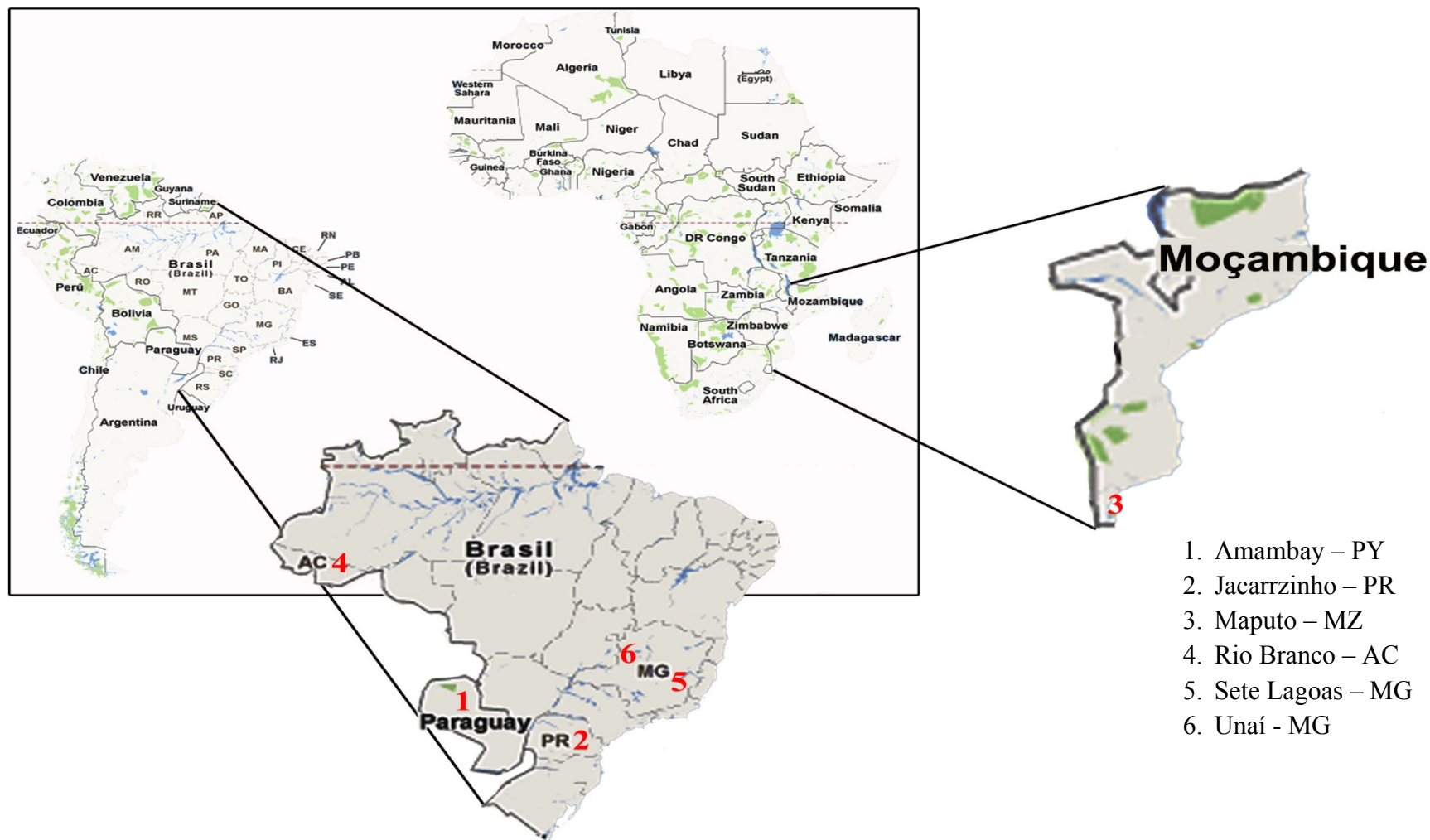


Figura 1. Locais de coleta de *Sitophilus zeamais* nos estados brasileiros, em Moçambique e no Paraguai.

2.2. Bioensaio respirométrico

O ensaio de respirometria foi realizado em condições de laboratório utilizando-se um respirômetro do tipo TR3C equipado com analisador de CO₂ (Sable System International, Las Vegas, EUA) e metodologia adaptada de Guedes *et al.* (2006). Cada um dos insetos foi individualmente acondicionado à câmaras de 25 mL conectadas a um sistema completamente fechado, onde o CO₂ produzido pelos insetos (μL de CO₂ / hora) é varrido por um fluxo de ar isento de CO₂ e mensurado por um leitor infravermelho de CO₂ conectado ao sistema. A metodologia de acondicionamento foi adaptada para determinação em insetos individualizados. Assim, foi preciso deixar o CO₂ produzido se acumular nas câmaras por mais tempo (3 horas) para obtenção de resultados coerentes.

2.3. Bioensaios comportamentais

Os bioensaios comportamentais avaliados para determinar a variação individual e populacional nos indivíduos testados, é descrita a seguir, baseada na classificação comportamental proposta por Reáleet *al.* (2007) (Tabela 1).

Os bioensaios comportamentais foram realizados em laboratório com condições de temperatura, umidade relativa e luminosidade controladas.

Tabela 1. Classificação, principais funções ecológicas, técnicas utilizadas e variáveis testadas para cada um dos bioensaios comportamentais avaliados em populações brasileiras de *S. zeamais*.

Categoria	Bioensaio	Função ecológica	Técnica utilizada	Variáveis avaliadas
Atividade motora	Caminhamento	Dispersão	Arenas de caminhada usando a vídeo-gravação com sistema ViewPoint	Distância Tempo Velocidade Número de paradas
	Vôo	Dispersão	Queda livre	Maior distância
	Desvirar	Desvirar	Inseto sobre eixo dorsal obrigado a desvirar	Tempo médio para desvirar
Explorar-evitar	Interação inter e intraespecífica	Procura de alimento, de parceiro, de refúgio, competição.	Arenas com grãos ocupados por <i>Sitophilus</i> ou <i>Rhyzopertha</i>	Tempo que tardava em chegar ao grão.
“Ousadia-timidez”	Fingimento de morto	Defesa contra predadores	Simulação do predador	Maior tempo de fingimento de morto (tanatose)

2.3.1. Caminhamento

O primeiro da série de bioensaios comportamentais foi a medição de parâmetros da atividade motora por meio do caminhamento. Esse bioensaio realizou-se com cada um dos 28 insetos de cada população. Os indivíduos foram levados a arenas conectadas a um sistema de rastreamento formado por uma câmera de vídeo acoplada a um computador (ViewPoint Life Sciences Inc., Montreal – Canadá) por um período de 10 minutos.

As arenas foram confeccionadas em placas de Petri de nove centímetros de diâmetro e dois centímetros de altura, com o fundo recoberto com discos de papel-filtro. As paredes internas das placas foram revestidas com teflon, e as mesmas eram cobertas conjuntamente com um filme plástico, para evitar a fuga dos insetos. As características avaliadas foram distância percorrida, tempo em repouso, velocidade média de caminhamento e número de paradas na arena.

2.3.2. Desvirar

O comportamento de desvirar quando um inseto está sobre seu eixo dorsal foi observado em todos insetos do ensaio experimental. Com uma pinça os insetos foram virados em posição dorsal em contato com a arena. Com um cronômetro mediu-se o tempo gasto em desvirar. O procedimento foi repetido três vezes tendo servido para análise o tempo médio.

2.3.3. Tanatose ou fingimento de morto

O comportamento de fingimento de morto foi induzido com o toque no dorso do inseto com um pincel fino, simulando o ataque de um predador. Mediu-se o tempo de duração do comportamento com um cronômetro. A medição começou na altura que o inseto apresentou a posição característica da tanatose. Esta posição é reconhecida pelo recolhimento das pernas e a imobilidade. A observação do comportamento terminou com o primeiro movimento visível. Esse procedimento foi repetido três vezes com

cada indivíduo e o maior tempo de duração do comportamento serviu para as análises. O inseto que não apresentou comportamento em nenhuma das três tentativas foi marcado como um indivíduo sem resposta.

2.3.4. Interação inter e intraespecífica

O comportamento apresentado pelos indivíduos de *S. zeamais* quando colocados em arenas com um grão de milho ocupado por um indivíduo da mesma espécie, ou de outra espécie (*Rhyzoperthadominica*(Coleoptera: Bostrichidae)) também foi observado nos 28 insetos de cada população. As arenas para este ensaio foram confeccionadas em placas de Petri de 18 centímetros de diâmetro e dois centímetros de altura. As paredes internas da placa foram recobertas com teflon para evitar o escape dos insetos. No fundo das placas colocou-se um papel com um círculo de um centímetro de diâmetro no centro, e marcados espaços de um centímetro para medir a distância mínima que o inseto chegava ao grão. No círculo foi colocado o grão de milho ocupado por um adulto de *S. zeamais* para a interação intraespecífica ou por um adulto de *R. dominica* para a interação interespecífica.

Cada indivíduo de *S. zeamais* foi colocado em um dos extremos da placa e observado durante 10 minutos à distância ao grão que era atingida. O ensaio foi finalizado quando o indivíduo atingiu o grão de milho ou quando terminou o tempo de observação.

2.3.5. Vôo

A capacidade e a autonomia de vôo dos indivíduos de *S. zeama* também foram estudadas. Para tal usou-se a técnica de “queda livre”.

A técnica de “queda livre” foi adaptada de Ohno e Miyatake (2007). Essa técnica consiste em soltar um indivíduo do centro superior de uma caixa e registrar a distância dessa queda. Foi usada uma caixa com pilares de madeira e as laterais recobertas com organza, com 150 centímetros de altura e base de 45 x 45 centímetros. O topo da caixa foi coberto com uma lâmina

transparente com um furo localizado no centro desta. No fundo da caixa colocou-se um papel contendo círculos concêntricos separados por três centímetros de distância cada. Assim, o círculo central representava a distância zero; o segundo círculo a distância três, o seguinte a seis e, assim, até o último círculo que representava a distância de 18 centímetros desde o centro.

No ensaio o inseto foi segurado com uma pinça e soltou-se do topo da caixa pelo furo feito na transparência. A coleta de dados foi feita da seguinte maneira: se o inseto não batesse as asas e, portanto não voasse se afastando do centro, a distância de vôo desse indivíduo era registrada como zero. Se o inseto batesse as asas e voasse caindo numa distância do centro qualquer, essa distância era registrada. Se o inseto voasse e pousasse nas laterais da caixa, era registrada uma maior distância de vôo determinada como valor 30 centímetros. Esse procedimento foi repetido três vezes e a maior distância de vôo usada nas análises.

2.4. Bioensaios de sobrevivência

Logo após o ensaio de queda livre os indivíduos foram submetidos ao ensaio de sobrevivência. O inseticida utilizado foi a Terra DiatomaceaKeepdry[®]. A dose usada nos experimentos foi de 1kg/ton, que é a recomendada para este produto (ver bula). Para aplicação separou-se 500 gramas de milho que foram colocados em um recipiente fechado, onde adicionou-se a TD (0,5 g) e agitou-se de forma a distribuir o pó pelo grão de forma homogênea. Para cada bioensaio de sobrevivência foram preparados 28 frascos cilíndricos de vidro (25 mL) com 15 gramas aproximadamente de grãos de milho tratados com TD. Logo depois, os insetos individualizados foram colocados dentro destes frascos. As avaliações foram feitas em intervalos de vinte e quatro horas a partir do momento em que o inseto foi colocado no frasco até a mortalidade total. Bioensaios controle, sem TD, foram também conduzidos para cada população sem detecção de mortalidade (natural) durante o período experimental para bioensaios de sobrevivência mediante exposição à TD.

2.5. Análises estatísticas

Para obter as curvas de sobrevivência usou-se estimadores Kaplan-Meier (1958) gerados a partir do número de insetos sobreviventes à exposição inseticida em avaliações de tempo seqüenciais até a conclusão do experimento, utilizando o procedimento LIFETEST do SAS (SAS Institute, 2000). As curvas de sobrevivência de cada população foram comparadas usando modelo de regressão de Cox, que estuda variáveis explanatórias simultaneamente, pelo procedimento PHREG (SAS Institute, 2000).

Na análise das variáveis comportamentais estudadas usou-se a análise de variância multivariada, para verificar a existência de diferenças significativas entre as populações, e à análise de variáveis canônicas (CVA) para reconhecer tais diferenças e quais as variáveis que mais contribuíram com elas. Em tais análises utilizou-se o procedimento CANDISC do SAS (SAS Institute 2000). As variáveis comportamentais foram também submetidas à análise de variância modificada como proposto por Excoffier *et al.* (1992), usando o programa GENES, buscando hierarquização da variância para quantificar a variação individual e populacional na composição da variância total dos comportamentos observados. Em seguida, as variáveis comportamentais foram sujeitas a análise de regressão múltipla tendo o tempo de sobrevivência como variável dependente, de forma a identificar as variáveis que mais contribuíram para a sobrevivência em superfície tratada com Terra Diatomácea. O procedimento REG com as rotinas STEPWISE e BACKWARD do SAS foi usado na modelagem de regressão múltipla (SAS Institute, 2000).

3. RESULTADOS

3.1. Bioensaios de sobrevivência

O modelo de regressão de Cox não indicou efeito significativo de populações nas curvas de sobrevivência ($\chi^2 = 10,44$; $P > 0,05$). As curvas de sobrevivência para cada população foram estimadas usando estimadores de Kaplan-Meier, o que possibilitou a estimativa dos tempos de sobrevivência médios (TL₅₀) para cada população (Tabela 2). As populações mostraram tempos médios de sobrevivência variando de 6 à 9 dias (Figura 2).

Tabela 2: Tempo médio de sobrevivência (TL₅₀) de 6 populações de *Sitophilus zeamais* expostos à TD.

População	N	TL ₅₀ (IC 95%) (dias)
Amambay	28	6 (4 – 7)
Jacarezinho	28	6 (5 – 8)
Maputo	26	9 (6 – 9)
Rio Branco	27	7 (6 – 10)
Sete Lagoas	27	7 (3 – 9)
Unai	27	6 (5 – 7)

N= número total de insetos avaliados; IC 95% = Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

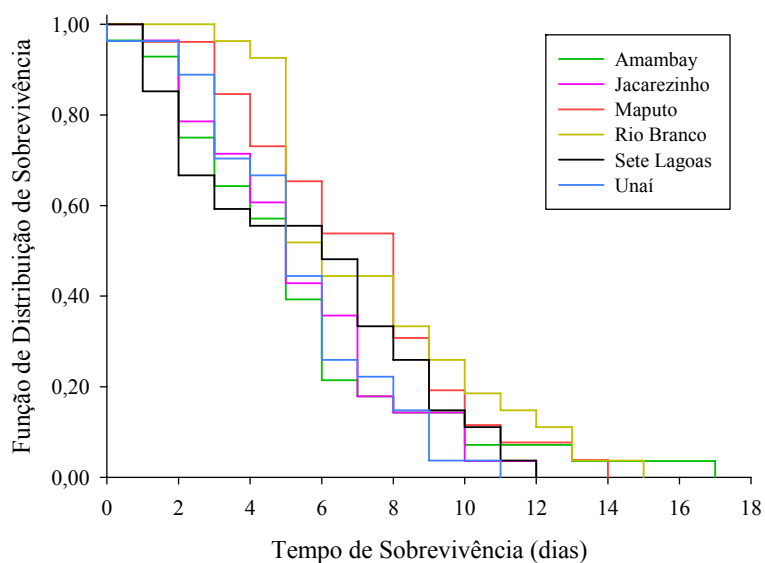


Figura 2. Curvas de sobrevivência estimadas pelo modelo de Kaplan-Meier para as 6 populações de *S. zeamaisexposed to TD*.

3.2. Bioensaios comportamentais

Os resultados da análise de variância multivariada para os comportamentos avaliados mostram diferenças significativas entre as populações (Wilk's $\lambda = 0,096$; $F = 10,31$; $gl_{(num/dem)} = 45/674,09$; $P < 0,0001$). A análise de variáveis canônicas (CVA) gerou três eixos de ordenação significativos ($P < 0,05$; Tabela 2) que explicam 98% da variância total. Os maiores valores absolutos dos coeficientes mostraram quais foram os comportamentos que mais contribuíram para o padrão de divergência entre as populações. Estes comportamentos foram: número de paradas na arena de caminhada, tempo de fingimento de morto e tempo para desvirar (Tabela 3).

A divergência comportamental entre as populações está graficamente representada na Figura 3. Este diagrama mostra a dispersão das populações, onde se formaram três grupos. O primeiro grupo é formado pelas populações de Sete Lagoas, Amambay e Unai, sendo o maior dos três. Em seguida tem o grupo formado pelas populações de Jacarezinho e Rio Branco. Isoladamente aparece a população de Maputo que não apresenta agrupamento com nenhuma outra população.

Apesar da divergência entre as populações obtida na análise de variáveis canônicas, a análise de variância modificada proposta por Excoffier, *et al.* (1992)

permitiu a hierarquização da variância total observada nos dados comportamentais. A variação dentro das populações (i.e. entre indivíduos dentro das populações) foi significativamente maior (63,4%) do que a variação entre as populações (36,6%). Esse resultado realça a importância da variação comportamental individual em relação a variação populacional, ressaltando assim a individualidade nos comportamentos avaliados neste experimento.

Tabela 3. Eixos canônicos e coeficientes (agrupados na estrutura canônica) dos parâmetros comportamentais avaliados em 6 populações de *S. zeamais*.

Comportamento	Variáveis	Eixos canônicos				
		1	2	3	4	5
Caminhamento	Distancia	-0,03	0,25	-0,06	0,37	0,33
	Tempo	-0,01	0,07	-0,02	0,35	0,49
	Velocidade	-0,04	0,51	-0,10	0,21	-0,25
	Número de paradas	0,70	-0,40	0,07	-0,12	0,11
Queda livre	Distância do centro	-0,03	-0,06	-0,67	-0,13	0,02
Tanatose	Maior tempo	0,04	0,72	0,29	-0,43	-0,21
Desvira	Maior tempo	-0,03	-0,10	0,69	0,05	0,03
Interação	Intraespecífica	0,01	0,16	-0,20	0,48	-0,57
	Interespecífica	-0,08	-0,18	-0,01	0,38	-0,54
	F	10,31	2,39	1,61	1,30	1,50
	Graus de liberdade (num; den)	45; 674,09	32; 558,46	21; 437,01	12; 306	5; 155
	<i>P</i>	< 0,0001	< 0,0001	0,0434	0,2198	0,1923
	Correlação Canônica ao quadrado	0,85	0,23	0,11	0,05	0,05

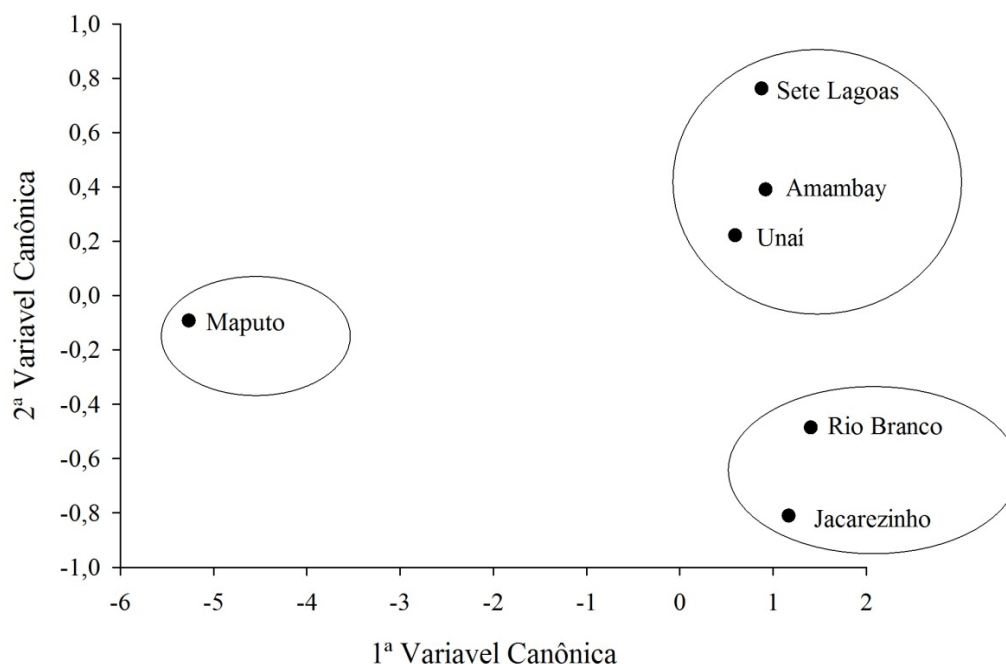


Figura 3. Diagrama de ordenação mostrando a discriminação entre populações de *S. zeamais* quanto a parâmetros comportamentais. Os dois eixos representam 96% da variância total dos dados. Os símbolos ● são centróides de tratamentos e representam a média das classes de variáveis canônicas. As elipses representam grupos sem diferenças significativas entre eles ($p > 0,05$), com base na distância de Mahalanobis entre as médias.

3.3. Relação entre os parâmetros comportamentais e a sobrevivência individual

A análise de regressão múltipla para o tempo de sobrevivência de cada indivíduo em função dos comportamentos individualizados e com interação com objetivo de identificar os comportamentos que mais contribuíram para explicar a variação da sobrevivência dos indivíduos avaliados não mostrou efeito significativo ($P < 0,05$). No procedimento usado não foi encontrada nenhuma relação entre o comportamento individual na sobrevivência dos carunchos.

Nesta análise incluiu-se mais dois parâmetros para relacionar com a sobrevivência. Foram eles a taxa respirométrica e o peso, que são parâmetros fisiológico e biométrico respectivamente. A taxa respirométrica não mostrou nenhum

efeito significativo. Por outro lado o peso mostrou ter efeito significativo na sobrevivência na regressão com inclusão paulatina de variáveis ($R^2 = 0,0235$; $F = 3,90$ e $P=0,050$).

4. DISCUSSÃO

Os resultados dos bioensaios de sobrevivência mostraram não haver diferença significativa entre as populações avaliadas, isto suporta a teoria de baixa probabilidade de resistência por parte de indivíduos expostos a terra diatomácea (Subramanyam&Roesli, 2000). Atualmente sabe-se que a terra diatomácea age sobre a cutícula removendo a camada de lipídios e conseqüentemente levando a morte do inseto por dessecação (Korunic, 1998). Assim por possuir um modo de ação diferenciado, muito provavelmente a probabilidade de resistência é realmente baixa.

Foi possível identificar a existência de variação comportamental a nível populacional e individual a partir dos resultados da análise de variáveis canônicas e da análise de variância modificada de Excoffier. Aqui, a variação de comportamentos a nível individual foi muito superior que a variância a nível populacional, ficando mais evidente a necessidade de estudos a nível individual. Os comportamentos de desvirar, número de paradas na arena de caminamento e tempo de fingimento de morto foram os que mais responderam pela variação populacional. O tempo que o inseto leva para desvirar e o número de paradas na arena são dois parâmetros da atividade locomotora, que é considerada um fator chave na exposição dos insetos aos inseticidas. No caso da terra diatomácea que age por contato durante movimentação do indivíduo, o tempo que o inseto vai levar para desvirar pode ser de crucial importância, pois quanto mais tempo ele fica sobre o seu eixo dorsal, mais partículas do inseticida serão aderidas ao seu corpo. O número de paradas na arena se correlacionou negativamente com a velocidade e a distância caminhada, o que implica em menor exposição às partículas de terra diatomácea. A tanatose é um comportamento de defesa contra ataque de predadores (Miyatake, 2001; Kuriwad, *et al.*, 2011; Acheampong& Mitchell, 1997). Não é um comportamento diretamente ligado a exposição ao inseticida, mas neste caso mostrou-se de importância significativa para a variação comportamental entre as diferentes populações e indivíduos. Ao contrário do que parecia ser, estas variações comportamentais não mostraram nenhuma influência direta no tempo de mortalidade dos indivíduos, isto muito provavelmente devido ao modo de ação diferenciado da terra diatomácea, uma vez que apenas um pequeno movimento do inseto em ambiente tratado com este

inseticida é suficiente para adesão das partículas ao seu corpo e conseqüentemente o início da sua atividade de controle.

Os parâmetros comportamentais aqui estudados são adaptativos e apresentam implicações ecológicas. A tanatose ou fingimento de morto já foi reportada como comportamento de defesa em diferentes animais, onde o animal se coloca num estado de imobilidade em resposta a um estímulo externo (Miyatake *et al.*, 2004; Hozumi & Miyatake, 2005). Este comportamento varia muito dependendo de diferentes fatores como tamanho do corpo (Hozumi & Miyatake, 2005), periodicidade diurna (Miyatake, 2001), idade e sexo (Kuriwada, *et al.*, 2011), saciedade (Acheampong & Mitchell, 1997) entre outros, explicando a contribuição deste comportamento para a variação comportamental encontrada. Bell (1990) realça a importância do número de paradas no comportamento de procura dos insetos, sendo essencial para aquisição de comida, reprodução, oviposição e refúgio. Essas paradas são também importantes para explorar um território novo. Um indivíduo que leva muito tempo para desvirar quando colocado sobre o seu dorso está mais propenso a predação, teria mais dificuldades na locomoção e aquisição de recursos. Vários comportamentos são modificados tanto pelo ambiente como pela própria fisiologia do inseto, mas mesmo assim o estudo do comportamento natural é mais relevante para entender o papel do sucesso evolutivo dos insetos (plasticidade comportamental), incluindo a habilidade de modificar o comportamento pelo aprendizado (Gullan, 2000).

A existência de variação individual foi mais uma vez confirmada neste estudo. Na área de toxicologia as determinações individuais são revertidas à população, sem consideração própria. Este é um aspecto limitante quando se faz este tipo de estudos. Estudos a nível individual devem ser mais usados uma vez que já muitos estudos relatam a existência de “personalidade animal” em vários grupos de organismos incluindo insetos (Dingemanse *et al.*, 2010). Existem poucos estudos que relacionam a individualidade e a sobrevivência à inseticidas em grãos armazenados. Monje (2010) encontrou existência de individualidade nas populações de caruncho do milho, e este contribui para sobrevivência à deltametrina. No nosso estudo a variação individual não contribuiu para sobrevivência muito provavelmente pelo modo de ação da terra diatomácea. As partículas de terra diatomácea agem no inseto

de forma independente, bastando apenas que o indivíduo esteja em ambiente tratado. Assim, seja qual for o comportamento apresentado pelo inseto, se ele entra em contato com essas partículas vai ser afetado.

Por outro lado, encontrou-se correlação entre a massa corporal e o tempo de sobrevivência de *S. zeamais*. Sabe-se que a massa está diretamente ligado a quantidade de água disponível nos insetos, assim, insetos mais pesados tem maior quantidade de água no organismo. Conseqüentemente, estes insetos vão levar mais tempo para perder a quantidade de água necessária para causar a sua morte, uma vez que um indivíduo precisa perder 20 à 30% do seu peso para morrer (Hadley, 1994; Benoit, *et al.*, 2005). Existe uma necessidade de aprofundar esse estudo para poder fazer alguma inferência sobre esta relação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acheampong, S., Mitchell, B.K., 1997. Quiescence in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 82(1): 83-89.
- Bell, W.J., 1990. Searching Behavior Patterns in Insects. *Annual Review of Entomology* 35(1): 447-467.
- Benoit, J.B., Yoder, J.A., Rellinger, E.J., Ark, J.T., Keeney, G.D., 2005. Prolonged maintenance of water balance by adult females of the American spider beetle, *Mezium affine* Boieldieu, in the absence of food and water resources. *Journal of Insect Physiology* 51(5): 565-573.
- Biro, P.A., Stamps, J.A., 2008. Are animal personality traits linked to life-history productivity? *Trends in Ecology & Evolution* 23(7): 361-368.
- Braga, L.S., Corrêa, A.S., Perreira, E.J.G., Guedes, R.N.C., 2011. Face or flee? Fenitrothion resistance and behavioral response in populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research* 47(3): 161-167.
- Clutton-Brock, T., Sheldon, B.C., 2010. Individuals and populations: the role of long-term, individual-based studies of animals in ecology and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution* 25(10): 562-573.
- Cox, P.D., Collins, L.E., 2002. Factors affecting the behaviour of beetle pests in stored grain, with particular reference to the development of lures. *Journal of Stored Products Research* 38(2): 95-115.
- Dingemanse, N.J., Kazem, A.J.N., Réale, D., Wright, J., 2010. Behavioural reaction norms: animal personality meets individual plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* 25(2): 81-89.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131(2): 479-491.
- Georghiou, G.P., 1972. "The Evolution of Resistance to Pesticides. *Annual Review of Ecology and Systematics* 3(1): 133-168.

- Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Guedes, N.M.P., Ribeiro, B.M., Serrão, J.E., 2006. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophiluszeamais*. *Physiological Entomology* 31(1): 30-38.
- Guedes, R.N.C., Lima, J.G., Santos, J.P., Cruz, C.D., 1995. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophiluszeamais*Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 31(2): 145-150.
- Gullan, P.J., 2000. *The insects: an Outline of Entomology*. Malden, MA ; Oxford :, Blackwell Science.
- Hadley, N.F., 1994. *Water relations of terrestrial arthropods*. Academic Press, New York, NY.
- Hoy, C.W., Head, G. P., Hall, F. R., 1998. Spatial Heterogeneity And Insect Adaptation To Toxins. *Annual Review of Entomology* 43(1): 571-594.
- Hozumi, N., Miyatake, T., 2005. Body-Size Dependent Difference in Death-Feigning Behavior of Adult *Callosobruchuschinensis*. *Journal of Insect Behavior* 18(4): 557-566.
- Kaplan, E.L., Meier P., 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 53: 457-481.
- Klowden, M.J., 2007. "Physiological System in Insects." Second Edition. Academic Press. Moscow.
- Korunic, Z., 1998. Diatomaceous earths, a group of natural insecticides. *Journal of Stored Products Research* 34(2-3): 87-97.
- Kuriwada, T., Kumano, N., Shiromoto, K., Haraguchi, D., 2011. Age-dependent investment in death-feigning behaviour in the sweetpotato weevil *Cylasformicarius*. *Physiological Entomology* 36(2): 149-154.
- Longley, M., Sotherton, N.W., 1997. Factors determining the effects of pesticides upon butterflies inhabiting arable farmland. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 61(1): 1-12.
- Miyatake, T., 2001. Diurnal Periodicity of Death-Feigning in *Cylasformicarius* (Coleoptera: Brentidae). *Journal of Insect Behavior* 14(4): 421-432.
- Miyatake, T., Katayama, K., Takeda, Y., Nakashima, A., Sugita, A., Mizumoto, M., 2004. Is death-feigning adaptive? Heritable variation in fitness difference of

- death-feigning behaviour. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 271(1554): 2293-2296.
- Monje, J.A., 2010. Carunchos Vs Inseticidas: Individualidade Importa? Dissertação de mestrado. UFV. Viçosa.
- Ohno, T., Miyatake, T., 2007. Droporfly? Negative genetic correlation between death-feigning intensity and flying ability as alternative anti-predator strategies. Proc. R. Soc. B. 274; 555-560.
- Pereira, C.J., Pereira, E.J.G., Cordeiro, E.M.G., Della Lúcia, T.M.C., Tótola, M.R., Guedes, R.N.C., 2009. Organophosphate resistance in the maize weevil *Sitophiluszeamais*: Magnitude and behavior. Crop Protection 28(2): 168-173.
- Real, L.A., 1994. How to think about behavior: an introduction. In Behavioral Mechanisms in Evolutionary Ecology. Real, L.A. (ed.), University of Chicago Press, Chicago, IL. 460 pp.
- Reále, D., Reader, S.M., Sol, D., McDougall, P.T., Dingemanse, N.J., 2007. Integrating animal temperament within ecology and evolution. Biol. Rev. 82: 291-318.
- SAS Institute, 2000. SAS/STAT User's Guide. SAS, Cary, NC, USA.
- Stathers, T.E., Riwa, W., Mvumi, B.M., Mosha, R., Kitandu, L., Mngara, K., Kaeoneka, B., Morris, M., 2008). Do diatomaceous earths have potential as grain protectants for small-holder farmers in sub-Saharan Africa? The case of Tanzania. Crop Protection 27(1): 44-70.
- Subramanyam, B.; Roesli, R., 2000. Inert dust. In: SUBRAMANYAM, B.; HAGSTRUM, D.W. (Eds.). Alternatives to pesticide in stored-product IPM. New York: Marcell Dekker. p.321-380.
- Tolpo, N.C., Morrison, E.O., 1965. Sex determination by snout characteristics of *Sitophiluszeamais* Motschulsky. The Texas Journal Science, v.7, p. 122-124.
- Vardeman, E.A., Arthur, F.H., Nechols, J.R., Campbell, J. F., 2007a. Efficacy of surface applications with diatomaceous earth to control *Rhyzoperthadominica* (F.) (Coleoptera:Bostrichidae) in stored wheat. Journal of Stored Products Research 43(4): 335-341.
- Vayias, B.J., Athanassiou, C.G., Buchelos, C.T., 2009. Effectiveness of spinosad combined with diatomaceous earth against different European strains of

Triboliumconfusum du Val (Coleoptera: Tenebrionidae): Influence of commodity and temperature. *JournalofStoredProductsResearch* 45(3): 165-176.

CAPÍTULO II

BALANÇO DE ÁGUA MEDIADO POR TERRA DIATOMÁCEA EM CARUNCHO DO MILHO (*Sitophilus zeamais*)

1. INTRODUÇÃO

A regulação da temperatura e do balanço de água são as principais componentes de homeostase em qualquer organismo. As atividades e processos associados a tal homeostase podem ser dispendiosos e podem conseqüentemente desviar recursos de outros processos fisiológicos (Addo-Bediako, *et al.* 2001; Chown, *et al.* 2011). Apesar da sua importância estes dois fatores são constantemente modificados por dois outros fatores climáticos importantes, a radiação solar e o vento. Os efeitos fisiológicos causados pelo clima são geralmente relacionados ao balanço de água e a temperatura. A elevada proporção área por volume apresenta desvantagem para o inseto em ambientes terrestres devido à sua pequena capacidade de armazenamento de água e a possibilidade de perda de água. Contudo isto possibilita estes indivíduos escaparem para micro-habitat e terem vantagens em microclimas favoráveis (Willmer, 1982).

O conteúdo de água nos insetos varia muito, sendo de 40 a 90% da massa líquida (Hadley, 1994; Chown & Nicolson, 2004). Ela é menor em insetos com altas reservas de gorduras ou cutículas pesadas, e varia entre espécies, instares e indivíduos, variando também ao longo do tempo (Wharton, 1985). Perdas de água em insetos ocorrem muito quando estes estão expostos a um ambiente dessecante onde a atividade de vapor é inferior a atividade de água. Existem dois tipos de perdas de água, a funcional e a casual. A primeira é caracterizada pela perda devido a processos vitais como respiração, excreção, secreção, crescimento e reprodução. A casual é aquela perda de água que não pode ser quantificada por funções identificáveis. Esta é descrita majoritariamente como perda de água cuticular ou perda por difusão (Wharton, 1985).

Dependendo da disponibilidade de água no ambiente circundante do inseto, estes podem também captar água, ou seja, absorver água do ambiente externo. Um exemplo extremo é visto em pragas de grãos armazenados que vivem em atmosferas de baixa atividade de vapor (a_v), não tem acesso a água livre e consomem alimentos com conteúdo de água mínimo (variando com a a_v do ambiente). Períodos de jejum podem ser necessários para sobreviver a tais condições, mas níveis altos de umidade fazem com que o inseto continue se alimentando (Chown & Nicolson, 2004). Por outro lado estes mesmos insetos, quando tem acesso a água livre, podem beber

livremente, como foi encontrado em *Gibbiuamaequinoctiacle*(Coleoptera: Ptininae), *Meziuamaffine*(Coleoptera: Anobiidae)e *Prostephanustruncatus*(Coleoptera: Bostrichidae)(Benoit, *et al.*2005).

Artrópodes terrestres desenvolveram a camada epicuticular de lipídios principalmente para evitar a perda de água por evaporação. Dependendo da localização geográfica do inseto são encontradas diferenças na cutícula entre espécies e indivíduos dentro da mesma espécie. Existe uma forte correlação entre a presença de lipídios na epicutícula do inseto e a taxa de perda de água (Wigglesworth, 1970; Gibbs, 1998).Inseticidas que agem sobre a cutícula de insetos geralmente atuam diretamente na camada de lipídios e tem como função removê-la, destruindo a barreira com o ambiente externo e interno do inseto podendo aumentar a perda de água e a incidência de patógenos (Subramanyam&Roesli, 2000).Pós inertes, como terra diatomácea, tem sido usados para controlar pragas de grãos armazenados há alguns anos, uma vez que provocam a remoção da camada de lipídios do inseto resultando em dessecação rápida e morte rápida (Appelet *al.*, 1999).

O caruncho do milho habita ambientes quentes e secos como os de sistemas de armazenamento de grãos. Esses ambientes são análogos a varias regiões desérticas. Assim, varias adaptações de pragas de grãos armazenados são semelhantes aquelas de espécies de desertos. Uma das mais importantes dessas adaptações é a redução da perda de água através da cutícula (Hadley, 1994). Exposição à terra diatomácea resulta num aumento da permeabilidade cuticular conseqüentemente causando maior perda de água e mortalidade mais rápida (Appelet *al.*, 1999).Alguns organismos podem resistir àdessecação. Resistência a dessecação em insetos é geralmente conseguida de três maneiras: aumentando o conteúdo de água do corpo, reduzindo as taxas de perda de água, ou tolerando a perda de grande proporção de conteúdo de água do corpo (tolerância àdessecação ou desidratação) (Gibbs, 1999; Chown&Nicolson, 2004).

Com o conhecimento atual do modo de ação da terra diatomácea e o seu potencial uso como método de controle de pragas de grãos armazenados, é importante quantificar o seu efeito naquela que é uma das mais importantes pragas do milho armazenado. Uma melhor compreensão sobre o dano causado no inseto poderá ampliar os possíveis usos deste método de controle.

Pouco se sabe sobre o balanço de água em *S.zeamais*. No capítulo anterior encontrou-se que a terra diatomácea tem efeito no tempo de vida do caruncho do milho. Encontrou-se também uma correlação entre o peso dos indivíduos tratados com terra diatomácea e a sobrevivência. Uma vez que a terra diatomácea age sobre a camada de lipídios do inseto que evita a perda excessiva de água, neste trabalho objetivou-se comparar o efeito de duas formulações diferentes de terra diatomácea em seis diferentes umidades relativas em parâmetros específicos do balanço de água do caruncho do milho. Assim, será possível relacionar os parâmetros que influenciam o balanço de água no caruncho e quantificar as flutuações que ocorrem no conteúdo de água do mesmo face a exposição à TD.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Insetos

Foi usada uma população de caruncho do milho (*Sitophilus zeamais*) de Sete Lagoas (MG) neste bioensaio. Usou-se esta população por não ter havido diferença significativa no tempo de sobrevivência de populações de caruncho tratadas com terra diatomácea no bioensaio de sobrevivência do capitulo anterior. Esta população foi mantida em sala de criação com ambiente controlado (temperatura de 27°C ±2 e umidade relativa 60%± 5) e alimentada com milho. Usou-se 21 indivíduos adultos não sexados para cada tratamento, com idade padronizada.

2.2. Condições de teste e experimentação

Após cinco dias de emergência, os insetos foram pesados e colocados, individualmente durante 24 horas, em vidros de 25mL contendo milho. Usou-se três tratamentos com o primeiro sendo o controle em que usou-se milho não tratado e os outros dois usou-se milho tratado com duas formulações diferentes de terra diatomácea (Keepdry[®] e Insecto[®]) na dose recomendada pelo fabricante de 1g/kg. Após a exposição os insetos foram isolados em vidros de 20 mL por 24 horas, sem chances para beber ou alimentar minimizando o efeito da digestão, reprodução ou excreção na massa corporal a ser analisada (Benoit, *et al.*, 2005). A temperatura utilizada foi de 25°C, o que permitiu a comparação com a maioria da literatura sobre balanço de água. Posteriormente, os indivíduos foram submetidos a diferentes umidades relativas. A temperatura e a umidade relativa foram controladas respectivamente por BOD (±1°C) e por dessecadores de vidro lacrados (3000cc) (±5% UR). As umidades relativas testadas foram obtidas através de soluções salinas saturadas e misturas de água destilada e glicerol (Winston e Bates, 1960). Usou-se umidade relativa de 100%, obtida colocando uma placa de petri, de 9cm de diâmetro e 2 cm de altura, com água destilada no fundo do dessecador; 80% UR com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl); 60% e 25% com solução de glicerol e água; 40% com cloreto de magnésio hidratado (MgCl₂+6H₂O); 0% com “Drierite” (um dessecante feito de sulfato de cálcio anídrico). A umidade relativa e a temperatura

foram medidas através de termohigrômetros ($\pm 0.5\%$ UR, Thomas Scientific, Philadelphia PA), onde era feito controle diário da umidade nos dessecadores.

Os carunchos foram individualmente colocados em “eppendorfs” furados de 2 ml sem alimento, em uma base de isopor por cima da placa perfurada do dessecador, evitando qualquer contato com os fluidos no fundo do recipiente.

O peso dos indivíduos foi obtido usando uma microbalança eletrônica (Mettler Toledo, XS3DU; Max 0,8g/3,1g; d = 1 μ g/10 μ g). Os indivíduos foram pesados diariamente até a mortalidade. Eles eram pesados abrindo ligeiramente o dessecador e retirando com uma pinça comprida os “eppendorfs” individualmente e colocados rapidamente na balança. Em seguida eram colocados de volta nas condições experimentais (nos dessecadores), sendo que ficavam menos de três minutos fora. Não foi usado nenhum tipo de anestesia, os insetos eram colocados em um recipiente menor, devidamente tarado, que não permitia o seu movimento durante a pesagem.

2.3. Determinação do conteúdo e perda de água

Por convenção (Wharton, 1985), f é a massa fresca inicial, d é a massa seca e a diferença é a quantidade de água disponível para troca, conhecida como massa de água, m . Variações na massa de água do corpo do inseto são influenciadas tanto pela saída (transpiração, m_T) como pela entrada (absorção, m_S) de água, como é definido por Wharton (1985) na sua equação global de balanço de água:

$$m = m_S - m_T \quad (1)$$

Em todos os casos, a massa seca foi subtraída das mensurações de massa para converter estas mensurações a valores de massa de água (m). O conteúdo de água do corpo (%) foi calculado pela expressão da massa de água como uma porcentagem da massa fresca inicial:

$$m = \left(\frac{f - d}{f} \right) \times 100 \quad (2)$$

Para determinação da massa seca os insetos após a morte foram colocados em um forno de secar a 55°C por pelo menos 2 dias de acordo com Appelet *al.* (1983; 1999), e pesados pelo menos três vezes consecutivas para confirmar que o peso se mantém constante (secura completa) que foi determinada no final de cada experimento conforme descrição feita por Wharton (1985) e Hadley (1994).

2.4. Determinação da taxa de perda de água

A taxa de perda de água real(perda de água transcuticular mais perda de água respiratória) foi determinada a 0%UR e a 25°C. A esta umidade não existe água disponível para absorção, tal que mudanças na massa são somente por perdas, sem interferência da água aderida a superfície do corpo (Benoit,*et al.*, 2005). Assim os carunchos foram mantidos a 0%UR e a 25°C, onde foram feitas mensurações da massa diariamente e no final determinada a massa seca para calcular a massa de água. Essa taxa de perda de água foi derivada do declive da reta de regressão num gráfico de $\ln(m_t/m_0)$ contra o tempo segundo o modelo exponencial de Wharton (1985):

$$m_t = m_0 e^{-k_t t} \quad (3)$$

onde m_t é a massa de água em um dado tempo t , m_0 é a massa de água inicial e a k_t a taxa de perda de água, tirada do declive. A taxa de perda de água foi feita individualmente. A taxa de perda de água foi também determinada à diferentes umidades relativas, onde pode ocorrer absorção, para comparação. Essas umidades foram de 25%, 40%, 60%, 80% e 100%.

2.5. Ganho de água

Avaliou-se o vapor de água atmosférico como uma possível fonte de água monitorando mudanças na massa de água (m) do caruncho a diferentes atividades de vapor de água (av), 0.25, 0.40, 0.60, 0.80 e 1.00 av_s , que são correspondentes as umidades relativas usadas. Caso não ocorra absorção de água suficiente pelo vapor de ar resultado são perdas de água por simples difusão em todas as umidades relativas

testadas, isso porque a atividade da água do corpo é maior que a atividade do ar circundante. Assim se espera $0,25a_v$, $0,40a_v$, $0,60a_v$ e $0,80a_v$ que são menores que $0,99a_w$, que é tida como atividade de água do corpo dos insetos. Atividade de vapor esperada na saturação, onde $1,00a_v$ é maior que $0,99a_w$ favorece o ganho de água em relação a perda. Como tal, manutenção dos níveis de água no corpo (m) a atividades de vapor abaixo da saturação indicam que a perda de água é balanceada pelo ganho pelo ar, contra o gradiente atmosférico, e é evidencia para operação de um mecanismo de captação.

2.6. Bioensaio de sobrevivência

Com base nos bioensaios descritos anteriormente a data de morte foi registrada para cada indivíduo para estimativa do tempo de sobrevivência. O tempo necessário para atingir 50% de mortalidade à 0% de umidade relativa e 25°C foi também usado como estimativa da mortalidade para determinar quanto tempo os carunchos podem tolerar falta de comida e água.

2.7. Análises estatísticas

A partir da massa de água obtida diariamente calculou-se a perda de água diária usando a Equação 1. Com os dados da perda de água diária foi possível determinar a taxa de perda de água.

Análises de covariância foram utilizadas para comparar conteúdo e perda de água devido a TD ao longo do tempo e sob diferentes umidades relativas (PROC GLM; SAS Institute, 2008). Nestas análises a variável dependente foi a formulação de TD (controle, Keepdry[®], Insecto[®]) e as covariáveis foram a umidade relativa e o tempo de exposição. Regressões lineares foram complementarmente feitas para obtenção das superfícies de resposta usando-se os modelos do programa TableCurve 3D. Parcimônia, menor erro e maior F, além do incremento de R^2 foram os parâmetros usados na seleção dos modelos. Taxa de perda de água também foi submetida a análise de covariância complementada por regressões lineares (PROC GLM e PROC REG; SAS Institute 2000).

Os dados da curva de sobrevivência foram obtidos usando os estimadores Kaplan-Meier (1958) gerados a partir do número de insetos sobreviventes à exposição terra diatomácea em avaliações de tempo seqüenciais até a conclusão do experimento, utilizando o procedimento LIFETEST do SAS (SAS Institute, 2000). As curvas de sobrevivência de cada umidade e tratamento foram comparadas usando modelo de regressão de Cox para testar o efeito dessas variáveis (procedimento PHREG; SAS Institute 2000). Os dados do TL_{50} foram então submetidos e análise de regressão não linear usando o procedimento ajuste de curvas do SigmaPlot (Systat software, Inc, 2011), de onde foram também tiradas as equações.

3. RESULTADOS

3.1. Conteúdo e perda de água

A análise dos dados de balanço de água em diferentes umidades relativas ao longo do tempo permitiu gerar curvas de superfície que mostram o padrão de conteúdo de água no caruncho do milho nos diferentes tratamentos. A partir da análise de covariância das três curvas geradas, encontraram-se diferenças significativas entre elas ($P < 0,0001$; $F = 24,76$) para o tratamento ($P < 0,0001$; $F = 30,05$), a umidade ($P < 0,0001$; $F = 194,58$), o tempo ($P < 0,0001$; $F = 58,42$), as interações entre tratamento e umidade ($P < 0,0001$; $F = 4,45$), e umidade e tempo ($P < 0,0001$; $F = 9,24$). Os modelos de regressão mostram que o conteúdo de água foi menor nos insetos tratados com a formulação Keepdry[®] ($P < 0,0005$; $R^2 = 0,54$), tendo a formulação Insecto[®] como intermediária ($P < 0,0005$; $R^2 = 0,49$) e o controle com maior conteúdo ($P < 0,0005$; $R^2 = 0,47$) (Tabela 4). As três curvas de conteúdo de água são mostradas na Figura 4. As três curvas mostram um padrão comum, onde o conteúdo de água no corpo do inseto reduz com o aumento do tempo e a redução da umidade relativa. No tratamento com Keepdry[®] esta redução no conteúdo de água é mais intensa que nos outros tratamentos nos primeiros dias.

Foi possível também gerar curvas de superfície para a perda de água. Usando análise de covariância das três curvas encontrou-se diferenças significativas ($P < 0,0001$; $F = 65,71$) para os parâmetros tratamento ($P < 0,0001$; $F = 100,36$), umidade relativa ($P < 0,0001$; $F = 574,60$) e tempo ($P < 0,0001$; $F = 259,37$), para as interações entre tratamento e umidade relativa ($P < 0,0001$; $F = 16,21$), tratamento e tempo ($P < 0,0001$; $F = 11,78$), umidade relativa e tempo ($P < 0,0001$; $F = 60,55$), bem como para a interação tripla ($P < 0,0001$; $F = 8,92$). O modelo de regressão de perda de água mostra que o tratamento com Keepdry[®] ($P < 0,0005$; $R^2 = 0,64$) foi o que apresentou mais perda, seguido do tratamento com Insecto[®] ($P < 0,0005$; $R^2 = 0,46$) e por fim o controle ($P < 0,0005$; $R^2 = 0,57$) (Tabela 4; Figura 5). Aqui também existe um padrão comum de perda de água. A perda é maior a umidades relativas mais baixas e com o aumento do tempo. No tratamento controle e com o Insecto[®] a perda

é mais gradual, mas no tratamento com Keepdry[®] esta perda é muito mais acentuada nos primeiros dias.

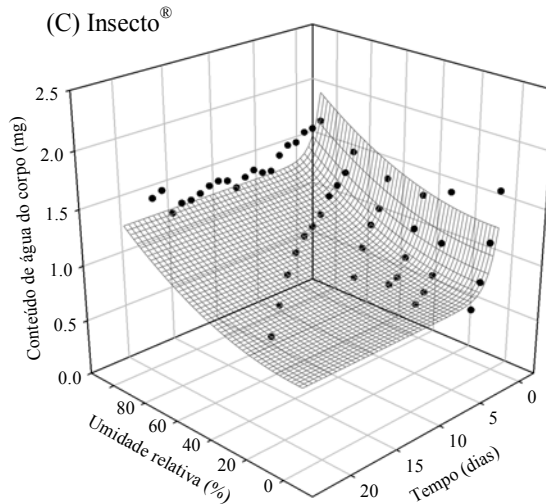
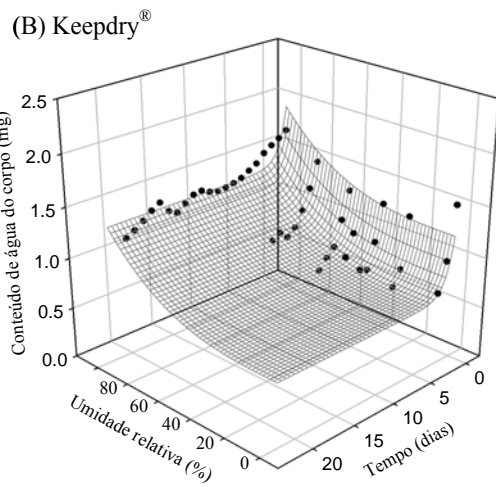
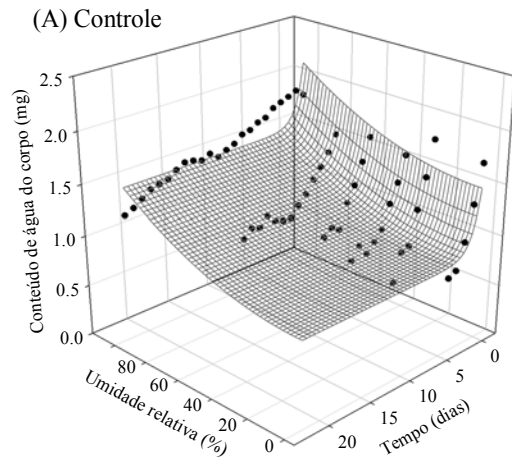


Figura 4 – Curvas de superfície mostrando a variação do conteúdo de água (mg) nos três tratamentos em relação à umidade relativa e o tempo. Os símbolos (●) representam a média de 21 indivíduos e as equações são dadas na **Tabela 4**.

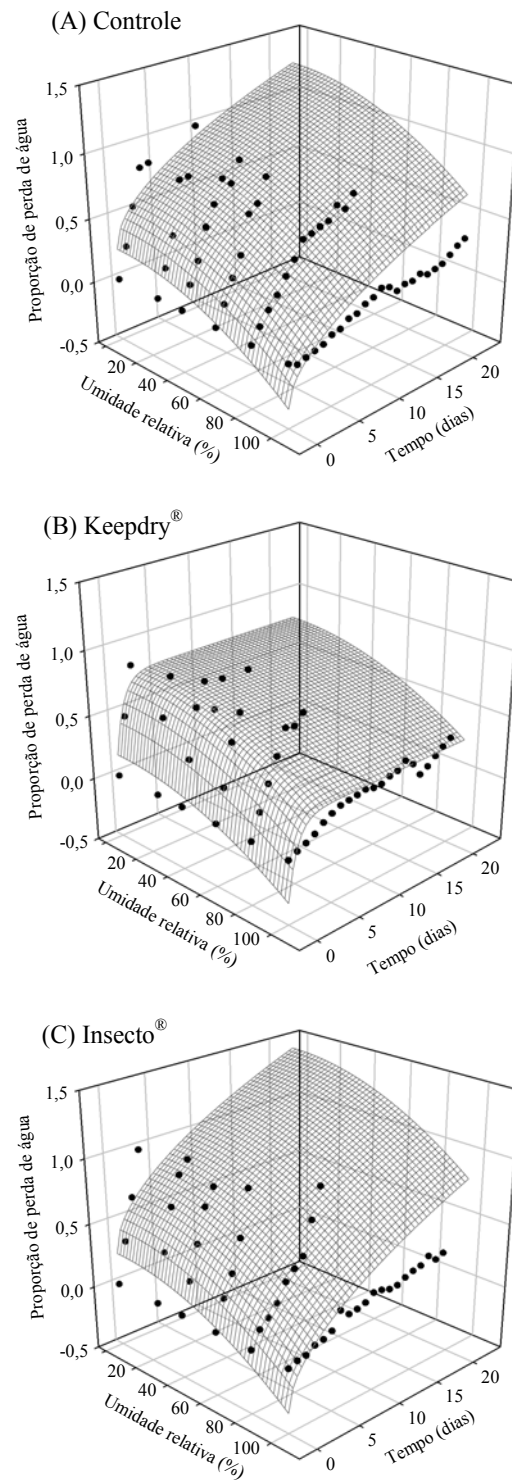


Figura 5- Curvas de superfície mostrando a variação da proporção de perda de água nos três tratamentos em relação à umidade relativa e o tempo. Os símbolos (●) representam as médias e as equações são dadas na **Tabela 4**.

Tabela 4–Sumário da análise das curvas de regressão não linear mostradas nas figuras 4 e 5.

Parâmetro	Modelo	Tratamento	Estimativa do parâmetro (\pm EPM)			gl _{erro}	F	R ²
			<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>			
Conteúdo de água	$z=a+bx^2+ce^{-y}$	Controle	0,85 \pm 0,02	6,57x10 ⁻⁰⁵ \pm 2,88x10 ⁻⁰⁶	0,64 \pm 0,03	834	366,29	0,47
	$z=a+bx^3+ce^{-y}$	Keepdry [®]	0,63 \pm 0,02	7,14x10 ⁻⁰⁷ \pm 2,94x10 ⁻⁰⁸	0,59 \pm 0,03	559	330,45	0,54
	$z=a+bx^2+ce^{-y}$	Insecto [®]	0,71 \pm 0,03	6,78x10 ⁻⁰⁵ \pm 3,35x10 ⁻⁰⁶	0,59 \pm 0,04	642	261,21	0,49
Perda de água	$z=a+bx^2+cy^{0,5}$	Controle	0,24 \pm 0,01	-5,90x10 ⁻⁰⁵ \pm 1,98x10 ⁻⁰⁶	0,21 \pm 0,01	834	556,62	0,57
	$z=a+bx^2+ce^{-y}$	Keepdry [®]	0,78 \pm 0,02	-4,98x10 ⁻⁰⁵ \pm 2,04x10 ⁻⁰⁶	-0,61 \pm 0,02	559	502,53	0,64
	$z=a+bx^2+cy^{0,5}$	Insecto [®]	0,25 \pm 0,02	-5,88x10 ⁻⁰⁵ \pm 2,99x10 ⁻⁰⁶	0,25 \pm 0,02	642	271,90	0,46

Todos os parâmetros estimados são significativos à $P < 0,0001$ pelo teste T e todos modelos são significativos a $P < 0,0001$ pelo teste F de Fisher. EPM – erro padrão da média; gl_{erro} – graus de liberdade de erro

O conteúdo de água e a perda de água apresentaram correlação negativa em todas as umidades relativas e tratamentos testados ($R > 0,70$; $P < 0,0001$), ou seja um decréscimo no conteúdo de água é resultado de uma maior perda de água.

3.2. Taxa de perda de água

Existem diferenças significativas na taxa de perda de água tanto no tratamento ($P < 0,0001$; $F = 42,01$) quanto na umidade relativa ($P < 0,0001$; $F = 128,99$) como mostra a análise de covariância e retas de regressão linear das taxas de perda de água ($P < 0,0001$; $F = 42,30$) (Figura 6; Tabela 5). A taxa de perda de água foi superior no tratamento com Keepdry[®], seguido pelo tratamento com Insecto[®] e o controle com menor taxa de perda de água (ANOVA; teste de Tukey; $P < 0,05$). Quanto maior a umidade relativa menor é a taxa de perda de água (ANOVA; teste de Tukey; $P < 0,05$).

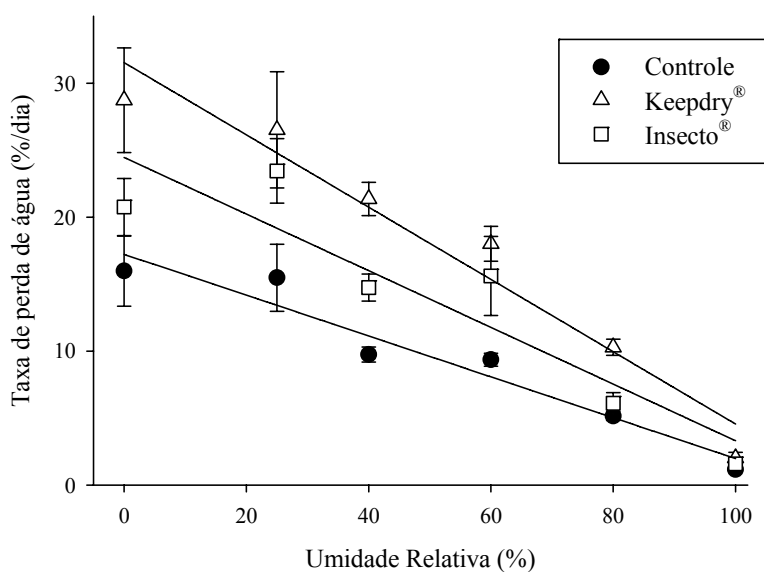


Figura 6—Médias das taxas de perda de água (%/dia) do caruncho do milho em diferentes tratamentos. Comparação entre as taxas de perda de água a diferentes umidades relativas e entre os três tratamentos. As retas representam as curvas de regressão linear da taxa de perda de água e umidade relativa nos três tratamentos. Barras verticais indicam o erro padrão da média.

A taxa de perda de água real (perda transcuticular), derivada do declive da curva de regressão foi de $12 \pm 1,29$ %/dia para o controle, $23 \pm 0,70$ %/dia para o tratamento com Keepdry[®] e $18 \pm 0,90$ %/dia para o tratamento com Insecto[®] (Figura 7; Tabela 5). Os carunchos perdem mais de 50% do seu peso até a morte, sendo que no tratamento com o Keepdry[®] esta perda é mais acentuada e difere das outras significativamente (ANOVA; teste de Tukey; $P < 0,05$). Em seguida o tratamento que mais proporciona perda de água é o com Insecto[®].

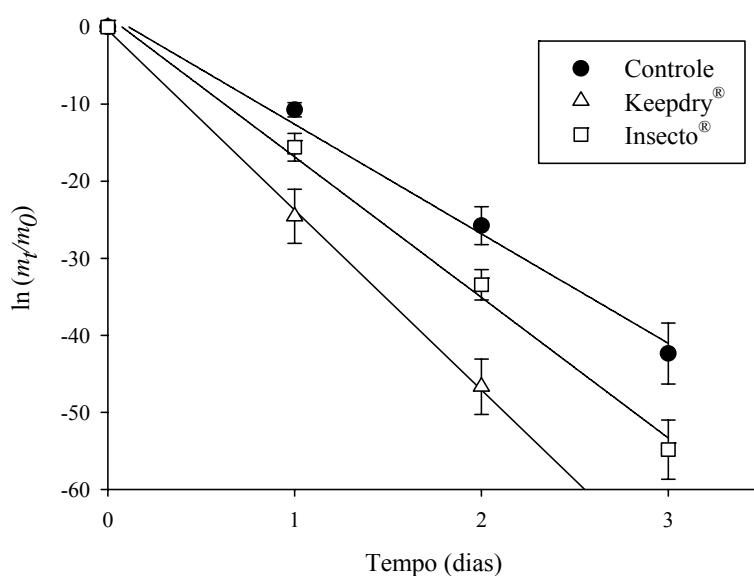


Figura 7–Taxa de perda de água real pelo caruncho do milho à 0% umidade relativa e 25°C, onde não existe vapor de água para absorção então o inseto só perde água. Comparação entre a proporção de perda de água dos três tratamentos. A taxa de perda de água é derivada do declive da reta de regressão.

Tabela 5– Sumário da análise de curvas de regressão mostradas na figura 6 e 7.

Parâmetro	Modelo	Tratamento	Estimativa do parâmetro (\pm EPM)		gl _{erro}	F	R ²
			<i>a</i>	<i>b</i>			
Taxa de perda de água	$y = ax + b$	Controle	-0,15 \pm 0,02	17,23 \pm 1,18	4	62,02	0,94
	$y = ax + b$	Keepdry [®]	-0,27 \pm 0,03	31,54 \pm 1,85	4	78,44	0,98
	$y = ax + b$	Insecto [®]	-0,21 \pm 0,05	24,47 \pm 2,71	4	22,53	0,85
Taxa de perda real	$y = ax + b$	Controle	-12,19 \pm 1,29	-0,42 \pm 3,16	3	89,01	0,96
	$y = ax + b$	Keepdry [®]	-23,33 \pm 0,70	-0,41 \pm 0,91	3	103,47	0,99
	$y = ax + b$	Insecto [®]	-18,23 \pm 0,92	1,39 \pm 1,73	3	389,67	0,99

Todos os parâmetros estimados são significativos à $P < 0,0001$ pelo teste T e todos modelos são significativos a $P < 0,0001$ pelo teste F de Fisher. EPM – erro padrão da média; gl_{erro} – graus de liberdade de erro.

O *Sitophiluszeamais* não apresenta nenhum mecanismo de captação de vapor de água atmosférica, uma vez que em nenhuma das umidades testadas foi encontrado ganho de massa.

3.3. Sobrevivência

O modelo de regressão de Cox mostrou haver efeito significativo da umidade relativa ($\chi^2 = 243,31$; $P < 0,001$) e do tratamento ($\chi^2 = 31,83$; $P < 0,001$) nas curvas de sobrevivência. Sendo assim, usando estimadores de Kaplan-Meier foi possível estimar os tempos letais para matar metade da população (TL₅₀) para cada combinação de tratamentos.

O TL₅₀ aumenta exponencialmente com o aumento da umidade relativa, como mostram as retas de regressão tanto para o controle ($R^2 = 0,79$; $F = 15,40$; $P < 0,05$), para o Keepdry[®] ($R^2 = 0,82$; $F = 18,66$; $P < 0,05$), bem como para o Insecto[®] ($R^2 = 0,83$; $F = 19,75$; $P < 0,05$) (Figura 8). Pelo padrão das curvas o controle apresentou maior tempo de sobrevivência, com o tratamento com Keepdry[®] sendo o menor. O tempo de sobrevivência é maior em umidades relativas mais altas como mostra o crescimento exponencial das curvas de regressão (Figura 8;Tabela 6).

O tempo que os carunchos podem tolerar a falta de comida e água foi de 5 dias para o controle e o tratamento com Insecto[®] e de 4 dias para o tratamento com Keepdry[®].

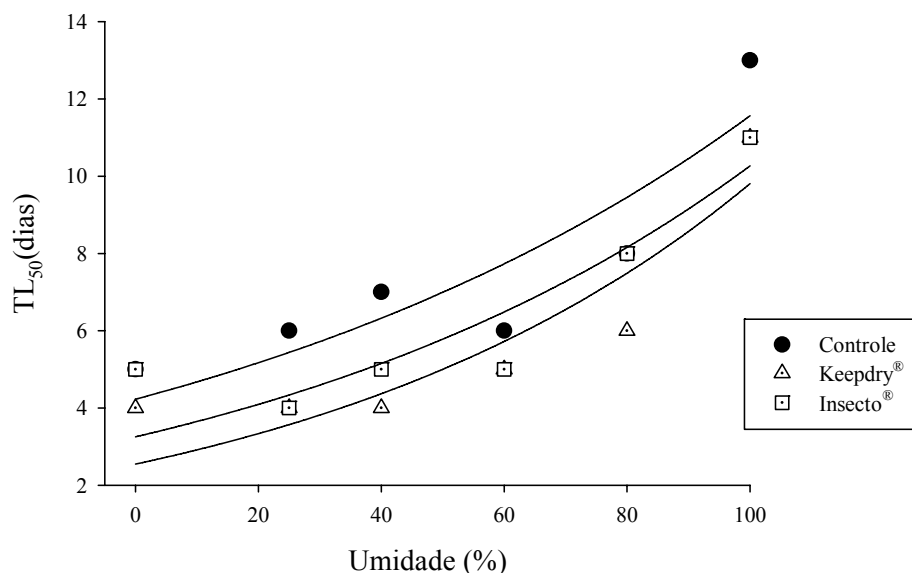


Figura 8—TL₅₀ (dias) do caruncho do milho em diferentes tratamentos. Comparação entre os TL₅₀ a diferentes umidades relativas e entre os três tratamentos. As curvas representam a regressão exponencial do TL₅₀ e umidade relativa nos três tratamentos.

Tabela 6 - Sumário da análise de curvas de regressão mostradas na figura 8.

Parâmetro	Modelo	Tratamento	Estimativa do parâmetro (± EPM)		gl _{erro}	F	R ²
			a	b			
TL ₅₀	$y = ae^{bx}$	Controle	4,23 ± 0,85	0,010 ± 0,002	4	15,40	0,79
	$y = ae^{bx}$	Keepdry [®]	2,55 ± 0,67	0,014 ± 0,003	4	18,66	0,82
	$y = ae^{bx}$	Insecto [®]	3,25 ± 0,68	0,012 ± 0,003	4	19,75	0,83

Todos os parâmetros estimados são significativos à $P < 0,0001$ pelo teste T e todos modelos são significativos a $P < 0,0001$ pelo teste F de Fisher. EPM – erro padrão da média; gl_{erro} – graus de liberdade de erro.

4. DISCUSSÃO

Os parâmetros conteúdo e perda de água correlacionam-se negativamente e são influenciados pelos mesmos fatores. A redução no conteúdo de água é resultado de um aumento do valor de água perdida.

O conteúdo de água no caruncho do milho reduz com o tempo quando este se encontra sem água ou alimento. Exposição à terra diatomácea resultou em um aumento da perda de água pelo adulto do caruncho do feijão, *Callosobruchus maculatus* (Appel, *et al.*, 1999). O caruncho do milho na fase adulta alimenta-se de milho e estudos anteriores mostram que bebe água depois de colocado em jejum por alguns dias. Ao contrário de algumas pragas que tem mecanismos de tolerância à falta de água (Chown&Nicolson, 2004), embora o caruncho viva em ambientes de baixa umidade relativa, aparentemente esta praga não se adapta bem a falta de alimento por alguns dias uma vez que o seu tempo crítico é de cinco dias quando não tratado. Algumas pragas de grãos armazenados, por habitarem em ambientes secos e quentes, possuem mecanismos de tolerância à falta de água (Appel *et al.*, 1999). Quando esta praga é tratada com a terra diatomácea a redução no conteúdo de água (aumento na perda) é mais acentuada e mais rápida. Sabe-se hoje que a terra diatomácea remove a cera cuticular que faz a barreira entre o interior do inseto e o meio ambiente externo evitando também a perda de água (Korunic, 1998). Uma vez que esta cera é removida, naturalmente, o conteúdo de água vai ser menor nos insetos tratados com a terra diatomácea. Os primeiros dias são os mais críticos a perda de água, onde esta é muito acentuada principalmente quando tratada com terra diatomácea. A umidade relativa também possui um papel importante uma vez que em altas umidades a perda é reduzida. Este aspecto mostra o porquê da terra diatomácea ser considerada eficaz em ambientes de grãos armazenado onde a umidade é relativamente baixa.

O conteúdo de água diferiu também entre os dois tratamentos com terra diatomácea, onde os insetos tratados com Keepdry[®] apresentaram menor conteúdo. Formulações diferentes de terra diatomácea apresentam eficácia diferente dependendo de suas propriedades físicas, uma vez que são essas propriedades que vão determinar como a cutícula vai ser influenciada (Subramanyam&Roesli, 2000).

Aspectos importantes relacionados a eficácia de uma formulação de terra diatomácea incluem tamanho de partículas e poder lipofílico (Korunic, 1998). Partículas de tamanho menor associadas a maior poder lipofílico geralmente proporcionam mais dano a cutícula.

Exposição à terra diatomácea resultou no aumento dos valores de permeabilidade cuticular. A taxa de perda de água é que vai determinar a quantidade de água perdida. À 0% UR e 25°C não existe água disponível para absorção, então se assume que toda alteração na massa de água é por perda. É nessa condição que se determina o valor real de perda de água do inseto. Os valores de taxa de perda de água encontrados foram de 12, 23 e 18%/dia, para o controle, tratamento com Keepdry[®] e com Insecto[®] respectivamente. Estes valores de perda são elevados e explicam a baixa sobrevivência do caruncho a condições de baixa umidade relativa. Bedick (2006) afirma que besouros com alta taxa de perda de água têm baixos tempos de sobrevivência, precisando de uma fonte de água constante para reposição. Uma provável explicação para o aumento na taxa de perda de água em carunchos tratados com terra diatomácea é o aumento da permeabilidade cuticular. Segundo Appelet *al.* (1999), a permeabilidade não é constante e é afetada por vários fatores relacionados a umidade relativa. Claramente terra diatomácea aumenta a permeabilidade cuticular. *Prostephanustruncatus* que é outra importante praga do milho armazenado apresenta taxas de perda de água bem menores que as do caruncho, (Benoit *et al.*, 2005), apesar de as duas espécies serem relativamente do mesmo tamanho e atacarem o mesmo substrato nas mesmas condições. Por outro lado, *Prostephanustruncatus* perde água 5 vezes mais rápido que 2 espécies do deserto, mostrando que pragas de grãos armazenados não são similares a espécies de deserto (Benoit *et al.*, 2005).

Os resultados deste experimento não mostraram evidências de absorção de vapor de água. Provavelmente o caruncho do milho não possui nenhum mecanismo de captação de água do vapor, mas Devine (1978) encontrou que adultos de *Sitophilus granarius* consumindo tapioca à 80% UR ganham muito mais água a partir do metabolismo e da absorção passiva do vapor que da própria comida. Arlian (1979) encontrou aumentos na taxa de absorção de vapor em altas umidades relativas para *Sitophilus oryzae*. Estas três espécies apresentam muitas semelhanças

morfológicasmas não existe evidência clara de uso do vapor atmosférico pela historia de vida desses caruncho.

O tempo de sobrevivência para o *S. zeamais* 0% de umidade e 25°C foi de cerca de 5 dias no controle e tratamento com Insecto[®] e de 4 dias no tratamento com Keepdry[®]. Esse é considerado o tempo crítico em que o inseto pode tolerar a falta de comida e água. Benoit *et al.* (2005) encontrou tempos de 72 dias para *Gibbiumaequinoctiale*, 95 dias para *Meziumaffine* e 24 dias para *Prostephanustruncatus*. As duas primeiras espécies são de deserto e o elevado período crítico é relativamente maior. O *P. truncatus* é praga de milho armazenado e apresenta maior tempo de sobrevivência que o caruncho do milho nas mesmas condições. Provavelmente esta praga é mais adaptada que o *S. zeamais* a condições xéricas.

O TL₅₀ aumentou exponencialmente com o aumento da umidade relativa. À menores umidades a diferença entre a atividade de vapor e a atividade de água é maior, levando a uma maior taxa de perda e conseqüentemente menor tempo de vida (Wharton, 1985). A curva de sobrevivência dos insetos tratados com terra diatomácea foi menor, confirmando que a remoção da cera cuticular reduz o tempo de sobrevivência.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addo-Bediako, A., Chown, S. L., Gaston, K.J., 2001. Revisiting water loss in insects: a large scale view. *Journal of Insect Physiology* 47(12): 1377-1388.
- Appel, A.G., Reiersen, D.A., Rust, M.K., 1983. Comparative water relations and temperature sensitivity of cockroaches. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 74(2): 357-361.
- Appel, A.G., Moar, W.J., Tanley, M.J., 1999. Water loss and mortality of adult cowpea weevils (Coleoptera: Bruchidae) exposed to desiccants and desiccating environments. *Environ. Entomol.* 28:979–982.
- Arlian, L.G., 1979. Significance of passive sorption of atmospheric water vapor and feeding in water balance of the rice weevil, *Sitophilus oryzae*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 62(3): 725-733.
- Bedick, J.C., Hoback, W.W., Albrecht, M.C., 2006. High water-loss rates and rapid dehydration in the burying beetle, *Nicrophorus marginatus*. *Physiological Entomology* 31(1): 23-29.
- Benoit, J.B., Yoder, J.A., Rellinger, E.J., Ark, J.T., Keeney, G.D., 2005. Prolonged maintenance of water balance by adult females of the American spider beetle, *Mezium affine* Boieldieu, in the absence of food and water resources. *Journal of Insect Physiology* 51(5): 565-573.
- Chown, S.L., Sørensen, J.G., Terblanche, J.S., 2011. Water loss in insects: An environmental change perspective. *Journal of Insect Physiology* 57(8): 1070-1084.
- Chown, S.L., Nicolson, S.W., 2004. *Insect Physiological Ecology. Mechanisms and Patterns*. Oxford University Press, Oxford.
- Devine, T.L., 1978. The turnover of the gut contents (traced with inulin-carboxyl-¹⁴C), tritiated water and ²²Na in three stored product insects. *Journal of Stored Products Research* 14(4): 189-211.
- Gibbs, A.G., 1998. Water-proofing properties of cuticular lipids. *American Zoologist* 38(3): 471-482.
- Gibbs, A.G., 1999. Laboratory selection for the comparative physiologist. *Journal of Experimental Biology* 202, 2709–2718.

- Hadley, N.F., 1994. Water relations of terrestrial arthropods. Academic Press, New York, NY.
- Kaplan, E.L., Meier P., 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 53: 457-481.
- Korunic, Z., 1998. Diatomaceous earths, a group of natural insecticides. *Journal of Stored Products Research* 34(2-3): 87-97.
- SAS Institute, 2000. SAS/STAT User's Guide. SAS, Cary, NC, USA.
- Subramanyam, B., Roesli, R., 2000. Inert dust. In: SUBRAMANYAM, B.; HAGSTRUM, D.W. (Eds.). *Alternatives to pesticide in stored-product IPM*. New York: Marcell Dekker. p.321-380.
- Wharton, G.W., 1985. Water balance of insects. In: Kerkut, G.A. e Gilbert, L.I. (eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, v.4. Pergamon Press, pp.565-603.
- Wigglesworth, V.B., 1970. Structural lipids in the insect cuticle and the function of the oenocytes. *Tissue and Cell* 2(1): 155-179.
- Willmer, P.G., 1982. Microclimate and the Environmental Physiology of Insects. *Advances in Insect Physiology*. J. E. T. M.J. Berridge and V. B. Wigglesworth, Academic Press. Volume 16: 1-57.
- Winston, P.W., Bates, D.S., 1960. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology* 41:232-237.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi possível confirmar a existência de variação comportamental à nível individual nas populações de caruncho do milho. Populações de diferentes regiões também apresentam respostas comportamentais diferente em vários parâmetros. Essa variação no comportamento não influencia no tempo de sobrevivência à terra diatomácea. As populações aqui avaliadas não apresentam diferenças nos tempos de mortalidade, sendo necessários mais estudos com mais populações de diferentes regiões do mundo para consolidar a teoria de pouca probabilidade de resistência à terra diatomácea. O único parâmetro avaliado que apresentou relação com o tempo de sobrevivência foi o peso dos indivíduos.

O caruncho do milho neste experimento mostrou ser susceptível a dessecação. Apresenta elevada redução no conteúdo de água em poucos dias. Quando tratado com terra diatomácea esta redução no conteúdo de água corporal é ainda mais acentuada, sendo diferente até entre formulações distintas. O tempo e a umidade relativa são dois fatores importantes na perda de água do *S. zeamais*. Em baixas umidades, a perda de água ocorre muito mais rápido e esta é mais acentuada nos primeiros dias. O período crítico de sobrevivência desta praga é relativamente baixo comparado com outros coleópteros. O TL_{50} apresentou um padrão exponencial em relação a umidade relativa, ele é maior a altas umidades e muito curto em ambientes mais secos. Aparentemente o *S. zeamais* não possui nenhum mecanismo de captação de vapor de água, uma vez que mesmo em altas umidades não foi possível detectar aumento da massa de água. Este ponto precisa ser mais esclarecido para eliminar algumas controvérsias encontradas em relação a capacidade de captação de vapor de água no gênero *Sitophilus*.