



UNICAMP



Giovanna Garcia Fagundes

Análise do Efeito da Radiação de Microondas sobre *Anagasta kühniella* Zeller (1879) (Lepidoptera: Pyralidae) e seus dois Agentes de Controle Biológico, *Bracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H: 3a-3b).

03/07/98

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida por(a) candidato(a)  
*Giovanna Garcia Fagundes*  
e aprovada pela Comissão Julgadora

Orientador: Prof. Dr. Mohamed Habib

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Parasitologia.

1998

F1 39a  
34884/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
CHAMADA:	
F139a	
COM.:	34 884
PRE:	395/98
	X
VALOR:	R\$ 11,00
DATA:	01/09/98
CPD	

CM-00115555-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP

**Fagundes, Giovanna Garcia**

- F139a** Análise do efeito da radiação de microondas sobre *Anagasta kuhniella* Zeller (1879) (Lepidoptera: Pyralidae) e seus dois agentes de controle biológico *Bracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H: 3a-3b)/Giovanna Garcia Fagundes.-- Campinas,SP:[s.n.], 1998. 98f: ilus.

Orientador: Mohamed Habib

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

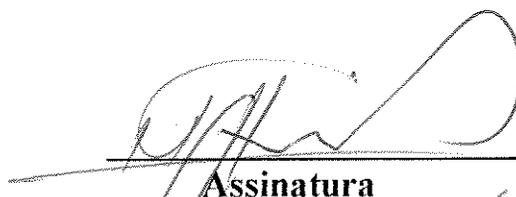
1. Microondas. 2. Controle biológico. 3. *Bacillus thuringiensis*.  
I. Habib, Mohamed. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**LOCAL E DATA: Campinas, 3 de julho de 1998**

**BANCA EXAMINADORA:**

**TITULARES:**

**Prof. Dr. Mohamed Habib**



Assinatura

**Prof. Dr. Benedicto Ferreira do Amaral Filho**



Assinatura

**Prof. Dr. Arício Xavier Linhares**



Assinatura

**SUPLENTE:**

**Dr. José Maria Gusman Ferraz**



Assinatura

# Índice

1. Introdução	1
2. Revisão histórica	4
2.1. A Agricultura e o Armazenamento	4
2.2. O Ecossistema de Armazenagem	9
2.3. As Pragas	10
2.3.1. Pragas Associadas a Grãos e Produtos Armazenados	11
2.3.2. <i>Anagasta kühniella</i> Zeller (1879) (Lepidoptera: Pyralidae)	14
2.4. Controle de Pragas	15
2.4.1. Controle Químico	16
2.4.2. Manejo Integrado de Pragas	20
2.4.3. Inimigos Naturais	22
2.4.3.1. Parasitóides	22
2.4.3.2. Bactérias Entomopatogênicas	24
2.4.4. Controle Físico de Pragas	27
3. Material & Métodos Gerais	32
3.1 Coleta do Material Entomológico e Manutenção das Criações Estoque	32

3.1.1. Coleta	32
3.1.2. Criação de <i>Anagasta kühniella</i> em Laboratório	33
3.1.3. Criação de <i>Bracon hebetor</i> em Laboratório	33
3.2. Obtenção de Material Entomológico para Bioensaios	34
3.2.1. <i>Anagasta kühniella</i>	34
3.2.2. <i>Bracon hebetor</i>	34
3.2.3. Material Bacteriológico	34
3.3. As Microondas e o Sistema de Exposição	35
3.4. Procedimentos para Estabelecer os Tempos de Exposição à Radiação de Microondas	36
4. Resultados e Discussão	37
4.1. Sensibilidade de diferentes fases de desenvolvimento do piralídeo <i>Anagasta küniella</i> Zeller (1879) à radiação de microondas	37
4.2. Influência do estágio de desenvolvimento embrionário na sensibilidade dos ovos de <i>Anagasta kühniella</i> Zeller (1879) à microondas	45
4.3. Interferência do meio na sensibilidade de larvas de último estágio de <i>Anagasta kühniella</i> à radiação de microondas e sintomatologia externa em larvas e adultos irradiados	52
4.4. Efeitos da radiação de microondas (2.450 MHz) na longevidade e na reprodução de adultos de <i>Anagasta kühniella</i> Zeller (1879) sobreviventes da exposição	58

4.5. Tolerância do ectoparasitóide <i>Bracon hebetor</i> (Say, 1836) (Hymenoptera, Braconidae) à radiação por microondas (2.450 MHz)	66
4.6. Tolerância de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> à radiação por microondas (2.450 MHz)	73
5. Conclusões gerais	78
6. Resumo	80
7. Summary	83
8. Bibliografia	86

**À minha mãe Raquel, minha segunda  
mãe, Irene e ao meu pai que deixou  
muita saudade, Gilberto.**

## AGRADECIMENTOS

À minha super-mãe Raquel que sempre me incentivou, agüentou todas as minhas crises via telefone com toda a paciência e o amor ( e ainda pagou as contas!) e que, sozinha e apesar das inúmeras dificuldades, lutou muito para me dar a oportunidade de estudar nesta Universidade.

Aos meus avós, Irene e Gilberto, pelo amor e pelo carinho e exemplos de vida e a toda minha família pelos laços de amizade, especialmente aos meus quatro "mamíferos", Bruna, Gutinho, Renata e Bárbara, pela doçura e alegria que trouxeram para a minha vida.

Ao Teodoro, por estar sempre por perto me ajudando a crescer, transmitindo força, carinho, amizade.

Ao Prof. Mohamed Habib pela orientação, amizade, incentivo e confiança que depositou em mim e no meu trabalho.

Ao Prof. Benedicto F. do Amaral Filho por ter me oferecido a primeira oportunidade de trabalho com Entomologia e pela amizade que desenvolvemos nestes anos de convivência.

Aos meus amigos Jeanne e Aredis por terem me ajudado, desenvolvendo o programa computacional para análise da TEL<sub>50</sub>.

Ao pessoal da minha casa. Janaína, Marlene, Marcelo, Rodrigo, Sebastian, André e Zeca, pelo ambiente familiar, amizade, almoços de domingo, discussões "filosóficas" e muita pizza. Um agradecimento especial ao Marcelo e Rodrigo pelas aulas particulares de física e por terem revisado a parte de microondas.

Aos meus amigos dos tempos de graduação que me acompanharam todos estes anos. Um agradecimento muito especial para a Luciana "Índia Paraguaia", Danibela, Mara Loira, Pan, Juliana, Ana Claudia, Maria Alessandra e Heloísa que com o passar destes anos passaram a ser mais que amigas.

Aos meus amigos dos Laboratórios de Entomologia e Patologia de Insetos, Gílcia, Fernanda, Rejane, Luciana, Carmen, Jairo, Ricardo, Cacá, Joaquim, Alik e Shaula, pela ajuda e amizade nestes anos de convivência e muito papo "cabeça". Um agradecimento especial ao meu amigo Heitor por toda colaboração e amizade imprescindíveis.

À Prof<sup>a</sup> Prafubala Navin Patel pela amizade, por estar sempre disposta a me ajudar no trabalho e me acompanhar nos viciantes cafezinhos do Bello.

Ao Departamento de Parasitologia pelo apoio em todas as etapas do Curso e do desenvolvimento deste trabalho, especialmente ao Prof. Nelson, à Andréia, à Marina e ao Rubens pela colaboração.

Ao Departamento de Zoologia pela ajuda na viabilização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa que tornou possível a execução deste trabalho.

# 1. INTRODUÇÃO

Estima-se que pelo menos 10% da produção mundial de grãos e de seus subprodutos são perdidos devido a infestações por insetos praga (Gallo *et al*, 1988). A situação é bastante crítica principalmente nos países em desenvolvimento, onde, em geral, o clima, a política de gerenciamento e a estrutura precária de armazenagem, transporte e distribuição favorecem os desequilíbrios populacionais e a dispersão dos insetos entre as unidades do complexo de armazenamento (Pedersen & Mills, 1977; Calderon, 1981; Longstaff, 1997). No Brasil, admite-se que o percentual de perda venha se mantendo na faixa de 15% nestes últimos anos (Almeida, 1989; Weber, 1995). Assim, levando-se em consideração que a estimativa da safra de grãos para 1997/ 98 é de 80 milhões de toneladas (fonte: CONAB), pode-se esperar que aproximadamente 12 milhões de toneladas sejam totalmente perdidas ou inviabilizadas para o consumo humano.

O método convencional de controle de infestações por insetos em ecossistemas de armazenagem vem sendo o expurgo através de agentes químicos denominados fumigantes. Estes agentes em contato com a atmosfera passam para o estado gasoso e agem a partir do sistema respiratório dos insetos causando sua morte (Puzzi, 1977). Entretanto, as experiências com o controle químico de pragas, tanto na armazenagem como na agricultura e saúde pública, não têm sido positivas. Existe a possibilidade da seleção de indivíduos resistentes na população, de atingir organismos não - alvo devido à baixa seletividade, o risco de contaminação ambiental, de danos à saúde humana e de acúmulo de resíduos tóxicos nos alimentos. Apesar da indústria de agrotóxicos ter adotado nas últimas décadas um discurso tendendo para o politicamente correto em relação a este método de controle, os princípios de utilização de agrotóxicos continuam os mesmos (Paschoal, 1995). A filosofia do

Manejo Integrado de Pragas (MIP) foi introduzida, buscando-se eliminar ou ao menos minimizar os impactos negativos decorrentes da aplicação das metodologias do controle de pragas ou controle integrado de pragas. Diferentemente destas últimas, o MIP busca associar métodos compatíveis que sejam economicamente viáveis, ambientalmente seguros e socialmente aceitáveis e que mantenham a população praga abaixo do seu nível econômico de dano (Metcalf & Luckman, 1982). Um MIP para sistemas fechados de armazenagem "deve compreender higiene, métodos técnicos, tecnológicos, controle físico, biológico e químico", os quais devem ser harmônicos e garantir prioridade à saúde humana assim como ao meio ambiente (Reichmuth, 1996 *apud* Schöller *et al.*, 1997). Assim, métodos alternativos aos químicos, como a utilização de agentes de controle biológico e de radiações, recebem grande destaque dentro destes programas (Longstaff, 1994; Schöller *et al.*, 1997).

O manejo do ecossistema de armazenagem é bastante delicado, pois o nível econômico de dano das suas pragas é bastante baixo. As pragas associadas a grãos e subprodutos armazenados apresentam um elevado potencial reprodutivo, podendo estabelecer uma infestação expressiva em pouco tempo. Sendo assim, é importante avaliar e analisar todas as possíveis técnicas de manejo e suas interações para que não haja risco de falhas no programa proposto.

Tanto agentes físicos de controle de pragas, como as frequências na faixa das microondas (300 a 300.000 MHz), como dois agentes de controle biológico, a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e o ectoparasitóide *Bracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera: Braconidae) vêm sendo estudados como promissores agentes de controle de algumas espécies pragas em produtos armazenados (Baker *et al.*, 1956; Nelson, 1973; 1987; Hurlock *et al.*, 1979; McGaughey, 1978 a, b, 1980 a, b; Cline & Press, 1990; Brower & Press, 1990).

Porém, a adoção de geradores de microondas em programas de MIP depende da análise vários fatores. Entre eles destaca-se seu efeito em organismos não-alvos, principalmente naqueles ligados ao controle natural de populações pragas, e suas interações com outras possíveis técnicas de manejo de ecossistemas de armazenagem.

Assim, o presente trabalho propõe investigar:

1. A sensibilidade de diferentes fases de desenvolvimento de *Anagasta kühniella* à radiação de microondas;
2. A influência do estágio de desenvolvimento embrionário na sensibilidade dos ovos de *Anagasta kühniella* à microondas;
3. A interferência do meio na sensibilidade de larvas de último estágio de *Anagasta kühniella* à radiação de microondas e sintomatologia externa em larvas e adultos irradiados;
4. Os efeitos da radiação de microondas na longevidade e na reprodução de adultos de *Anagasta kühniella* sobreviventes da exposição;
5. A tolerância do ectoparasitóide *Bracon hebetor* à radiação por microondas;
6. A tolerância de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* à radiação por microondas.

## 2. REVISÃO HISTÓRICA

Esta revisão busca fornecer uma visão abrangente de aspectos relevantes sobre o ecossistema de armazenagem, sua história, diversidade de entomofauna associada, dinâmica, interferências do agroecossistema, principais problemas e soluções que vêm sendo propostas e praticadas.

### 2.1. A Agricultura e o Armazenamento

Entre os principais marcos da evolução cultural humana está o desenvolvimento das atividades agro-pastoris há cerca de 10.000 anos. Apesar das restrições ambientais enfrentadas pelo Homem, a observação dos processos naturais e a percepção das condições adequadas para a produção garantiram o sucesso desta atividade. Seguindo o curso desta evolução, descobriu-se que os excedentes de algumas categorias de itens agrícolas poderiam ser armazenados para quando a sua produção estivesse temporalmente interrompida. A criação destes dois novos ecossistemas artificiais interligados, o agroecossistema e o ecossistema de armazenagem, foram duas inovações que tiveram um enorme impacto positivo nas populações humanas, mudando os hábitos e estruturas sociais, aprimorando o processo de especialização e divisão do trabalho, desenvolvendo áreas de produção e mercados de consumo além de serem responsáveis pelo desenvolvimento progressivo da instrumentalização agrícola. Porém, as mesmas também contribuíram para alterações no ambiente natural através da interferência em interações ecológicas, da seleção genética das espécies de interesse e da destruição de ecossistemas naturais (Heiser Jr., 1977).

Milhares de anos se passaram e as atividades ligadas a agricultura e à armazenagem passaram nesse período por uma série de revoluções no que diz

respeito à tecnologia empregada e ao seu impacto sócio-econômico e ambiental. Com a Revolução Industrial houve a superação das restrições ambientais devido ao desenvolvimento de fontes exógenas de insumos e energia, anteriormente limitadas pela disponibilidade destes recursos dentro de cada espaço agrícola. De uma agricultura que utilizava poucos recursos energéticos externos ao agroecossistema e uma armazenagem rudimentar chegamos, neste século, a uma agricultura e armazenagem grandemente dependentes de recursos tecnológicos e insumos externos, a qual sofre restrições comercial e de gestão do processo produtivo (Romeiro & Salles Filho, 1996).

Atualmente, tanto a produção quanto a armazenagem de alimentos estão muito mais comprometidas com o "agrobusiness" do que com o ideal de garantir a segurança alimentar a toda população. A política de comércio da produção agrícola vigente preza pela comercialização de produtos com altos preços e a restrição comercial manifesta-se pelo favorecimento da produção agrícola dos itens mais rentáveis, buscando-se maior lucratividade (Romeiro & Salles Filho, 1996). Assim, podem-se observar países que mantêm a produção agrícola sob um determinado patamar, planejando o que vai ser plantado e incentivando financeiramente agricultores de algumas regiões a não produzirem em determinados períodos, garantindo que não haja excedentes na safra, que a quantidade armazenada esteja sob controle e que o preço no mercado exterior seja o mínimo projetado. Além disso, inúmeros exemplos de produção agrícola sendo perdida, jogada fora ou queimada para a garantia da manutenção de preços mínimos são divulgadas pela mídia constantemente. Enquanto isso, milhares de pessoas não tem acesso às condições mínimas de alimentação. Dentro deste atual contexto político-econômico mundial, o poder de retenção da safra em bom estado para comercialização durante os picos de preço, assim como a manutenção de estoques reguladores estratégicos pelo Estado são de fundamental importância na economia de um País (Puzzi, 1973;

Cajueiro, 1990). Pelo menos teoricamente são destinados a garantirem o abastecimento e o acesso regular da população à alimentação, independentemente do tempo e das flutuações climáticas a que está sujeita a produção, e possibilitam a exportação para outros países, o que gera recursos para o país exportador.

Devido às recentes preocupações mundiais quanto às atitudes a serem adotadas para a garantia da melhoria da produção agrícola de forma sustentável e para que todos tenham acesso à alimentação adequada e a gêneros alimentícios que sejam culturalmente apropriados, expressas no conceito de segurança alimentar (Maluf, 1995), incluiu-se um capítulo na Agenda 21 (Anônimo, 1995) destinado a traçar as metas para a promoção do desenvolvimento rural e agrícola sustentável. E para tal ressalta-se ser básica “a necessidade de efetuar importantes ajustes nas políticas para a agricultura, o meio ambiente e a macroeconomia, tanto no nível nacional como internacional, nos países desenvolvidos e nos países em desenvolvimento”. Uma das metas propostas aos países envolvidos na adoção da Agenda diz respeito a “identificar problemas de armazenagem e distribuição que afetem a disponibilidade de alimentos; apoiar a pesquisa, quando necessário, para suplantar esses problemas, e cooperar com os produtores e distribuidores na implementação de práticas e sistemas melhorados”.

A armazenagem é um problema por ser totalmente dependente das condições fornecidas pelas unidades armazenadoras, transporte e política de gerenciamento dos estoques. O complexo armazenador precisa ser altamente eficiente para garantir a integridade e qualidade dos produtos por tempos mais longos. Quando a política de armazenamento de um país é falha, baseada em um sistema de armazenagem insuficiente ou inadequado, acaba por comprometer a quantidade e qualidade dos produtos armazenados. A incapacidade de atender corretamente à demanda de consumo interno e

exportação devido ao fluxo irregular destes produtos reflete negativamente na comercialização e dificulta o acesso da população aos gêneros alimentícios básicos (Puzzi, 1986).

As perdas de grãos e outros produtos durante a armazenagem variam dependentemente de vários fatores bióticos e abióticos, o que se reflete em diferenças expressivas tanto dentro de um país quanto entre nações e dificulta o estabelecimento de um índice preciso. Porém, tudo indica que os maiores índices de perda estão associados a países em desenvolvimento, especialmente àqueles de clima tropical e subtropical, onde as condições climáticas e o sistema de armazenagem precário não garantem as condições sanitárias e de inspeção necessárias e, conseqüentemente, favorecem o impacto negativo das pragas (Pedersen & Mills, 1977). Segundo dados da "FAO" (Food and Agriculture Organization), citados por Gallo *et al.* (1988), as perdas mundiais de grãos chegam a 10% da produção total. Entretanto, Almeida (1989) destaca que estes dados se referem somente a perdas ocasionadas pelo ataque do endosperma ou embrião. Ferreira (1983) argumenta que no Brasil são estimadas perdas entre 15 e 30%, referindo-se, provavelmente somente, à perda física, deixando de lado as perdas qualitativas e também as ocasionadas no produto já processado pela indústria. O mesmo autor destaca que, assim como em boa parte do mundo, faltam metodologias adequadas e estudos sobre as perdas reais durante a armazenagem, o que condiz com as colocações feitas pelo CENTREINAR (Centro Nacional de Treinamento em Armazenagem, 1983; *apud* Almeida, 1989). Na safra brasileira de 1991/ 92 foram estimadas, pelo Instituto de Economia Agrícola (EIA) de São Paulo, perdas de cerca de 20% na colheita e armazenamento de milho, soja, arroz, trigo e feijão (Moino Jr., 1993). A EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) elaborou uma tabela contendo um levantamento da produção destas mesmas culturas na safra de 1993. As perdas chegam a 15%, no total, sendo que o processo de armazenagem é o maior responsável por

estas perdas (Weber, 1995). Admite-se que este percentual de perda venha se mantendo nestes últimos anos. Assim, se levarmos em consideração a estimativa da safra de grãos em 1997/98 que aponta para algo em torno de 80 milhões de toneladas (fonte: CONAB), pode-se esperar que aproximadamente 12 milhões de toneladas sejam totalmente perdidas ou inviabilizadas para o consumo humano. Logo, pode-se observar que os esforços de manejo do sistema agrícola e a expansão das áreas de plantio, visando o aumento da produção, devem ser acompanhados por melhorias nas condições de armazenamento e de controle de suas pragas para evitar o desperdício de investimentos tecnológico e financeiro para produção da safra (Almeida, 1989; Moino Jr, 1993). O modelo de sistema agrícola vigente no Brasil é bastante oneroso e os elevados índices de perdas na armazenagem não podem ser tolerados. Além disso, é válido ressaltar que o Brasil ainda é dependente da importação de vários produtos para atender a atual demanda, que sua população vem crescendo cerca de 1,5% ao ano na última década (fonte: Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, 1996) e que uma parte bastante expressiva da população ainda apresenta um consumo muito inferior às suas necessidades básicas, o que evidencia a tendência de futuros aumentos na demanda por produtos de origem agrícola.

Os subprodutos de grãos, como as farinhas e farelos, geralmente passam menos tempo armazenados, pois longos períodos de estocagem podem resultar em perdas na qualidade destes alimentos devido à deterioração progressiva do material e, obviamente, em aumento da probabilidade de infestações por insetos e ácaros. O controle de pragas nestes materiais é basicamente feito através de medidas preventivas e de higienização, já que o controle paliativo é bastante delicado, pois os níveis máximos de tolerância a resíduos químicos em produtos destinados à alimentação, previstos pela legislação brasileira, são acertadamente restritivos.

## 2.2. O Ecossistema de Armazenagem

Existem diferentes formas de ecossistemas de armazenamento. Podem-se observar variações quanto à sua estrutura, composição, complexidade, capacidade armazenadora, limites de tempo de conservação e nível de dependência de energia externa (Fields, 1992). Assim, vê-se desde aqueles destinados à armazenagem de pequenas quantidades de produtos, os quais empregam métodos simples e pouco ou nenhum insumo, garantindo a economia de recursos como energia e petróleo, assim como aqueles responsáveis pelo acondicionamento de toneladas de produtos e que são totalmente dependentes destas fontes de recursos para a manutenção das condições adequadas à conservação do produto.

O ecossistema de armazenagem é um ambiente artificial totalmente subsidiado pela ação humana. No geral, é altamente estável e homogêneo no que diz respeito a fatores abióticos. É composto por espécies autotróficas (sementes) ou subprodutos destas, as quais servem de fonte alimentar e habitat para uma cadeia complexa de espécies heterotróficas como fungos, bactérias, insetos, ácaros e até mesmo roedores e aves (Puzzi, 1973; Calderon, 1981; Multon, 1988; Dunkel, 1992). Entretanto, este ecossistema possui uma estrutura ecológica com baixa diversidade na sua biota e teia alimentar simplificada quando comparado a maioria dos outros ecossistemas (Multon, 1988), o que facilita desequilíbrios populacionais. A Tabela 1 nos dá uma visão geral das diferenças entre agroecossistemas e sistemas de armazenagem em relação a ecossistemas naturais.

Cada ecossistema de armazenagem pode ser comparado a uma ilha, isolado, porém conectado com outros através do transporte, comércio e sistemas internacionais para distribuição de comida a áreas carentes (Dunkel, 1992). É mais do que óbvio que juntamente ao comércio e o transporte de

produtos armazenados faz-se a dispersão de organismos associados a este ecossistema.

**Tabela 1.** Comparações entre parâmetros estruturais e funcionais de agroecossistemas convencionais e sistemas de armazenagem em relação a ecossistemas naturais<sup>1</sup>.

<b>Parâmetros</b>	<b>Agroecossistema Convencional</b>	<b>Ecossistema de armazenagem</b>	<b>Ecossistema Natural</b>
<b>Cadeias tróficas</b>	simples, linear	simples, linear	complexa
<b>Diversidade de espécies</b>	baixa	muito baixa	alta
<b>Diversidade genética</b>	baixa	baixa	alta
<b>Estabilidade</b>	baixa	baixa	alta
<b>Entropia</b>	alta	alta	baixa
<b>Necessidade de controle humano</b>	sim	sim	não
<b>Permanência temporal</b>	baixa a média	baixa	longa
<b>Heterogenidade de habitats</b>	simples	simples	complexa
<b>Dependência de fontes de energia externa</b>	alta	alta	não

<sup>1</sup>. modificado de Altieri (1983).

### 2.3. As Pragas

As pragas são caracterizadas e classificadas através de parâmetros antropocêntricos, sendo um conceito considerado sem validação ecológica (Metcalf & Luckman, 1975, 1982). Atualmente, considera-se como praga um ser vivo qualquer que a partir de uma determinada densidade populacional comece interferir nos interesses, nas atividades ou saúde humanas.

Deve-se ressaltar que as pragas de interesse econômico ou médico veterinário são, na maioria da vezes, frutos do impacto negativo das atividades humanas .

### **2. 3.1. Pragas Associadas a Grãos e Produtos Armazenados**

Supõem-se que os insetos associados aos ecossistemas de armazenagem, anteriormente a esta associação, fossem predadores de sementes, brocas de madeira, comedores de detritos ou necrófagos em ecossistemas naturais. Poucas espécies desenvolveram estratégias para se adaptarem comportamental e fisiologicamente às características deste tipo de ambiente. A fauna que ataca grãos é basicamente a mesma, independentemente do tipo de ecossistema armazenador (Santos, 1993). Segundo Pedersen & Mills (1977), somente cerca de 15 espécies de insetos são totalmente adaptadas a desenvolverem-se em grãos íntegros. São as denominadas pragas primárias, as quais são por sua vez categorizadas em internas e externas. A primeira inclui insetos que desenvolvem-se dentro do grão, alimentando-se dele e o destruindo. A segunda, inclui as espécies de insetos que se desenvolvem fora do grão, alimentando-se da parte externa destes, embora esporadicamente possam atacar suas partes internas. Outras poucas espécies possuem adaptações que lhes permitem explorar grãos já danificados pelas pragas primárias, quebrados ou subprodutos destes. São as chamadas pragas secundárias. Estas duas categorias de pragas evoluíram adaptações para a exploração de materiais com baixo conteúdo de umidade, característicos de ecossistemas armazenadores. Possuem mecanismos altamente eficientes na aquisição e conservação da água. Uma terceira categoria de pragas que aparecem quando as condições de armazenagem estão bastante precárias, são as denominadas pragas oportunistas. Estas se alimentam de restos de insetos mortos ou fungos, causando problemas devido

somente a sua incômoda presença (Puzzi, 1977; Gallo *et al.*, 1988; Cajueiro, 1990; Santos, 1993). Porém, apesar da baixa diversidade na biota, as interações ecológicas entre a microflora e a microfauna parecem ser bastante complexas, envolvendo mecanismos de predação e dispersão (Multon, 1988).

Os insetos pragas associados a grãos e alimentos armazenados se beneficiam das condições ambientais oferecidas por este ecossistema. Isto, aliado a sua alta capacidade reprodutiva e de sobrevivência, tamanho pequeno que possibilita a penetração na massa armazenada, capacidade de provocar danos diretos ou indiretos, capacidade de desenvolver resistência a métodos de controle químico convencional, alta polifagia e possibilidade, em alguns casos, de infestação cruzada, elucida seu alto potencial como praga (Gallo *et al.* 1988; Amaral Filho, 1986; Waib, 1992).

Entre os vários fatores favoráveis ao crescimento populacional de pragas nas unidades armazenadoras podemos destacar:

1. a temperatura e umidade dentro das unidades armazenadoras bastante estáveis no decorrer do ano, o que garante condições bastante favoráveis para a reprodução dos organismos presentes no ecossistema ;
2. a estrutura física inadequada da maioria dos locais de armazenagem, os quais fornecem esconderijos para os organismos durante a limpeza e/ou desinfecção;
3. a disponibilidade de uma enorme quantidade de recursos alimentares;
4. inimigos naturais pouco eficientes em penetrar na massa armazenada, atuando mais superficialmente;
5. poucas espécies competidoras;
6. potencial reprodutivo alto;

7. introdução frequente de indivíduos provenientes de outras populações, devido ao transporte e falta de medidas sanitárias preventivas para a infestação.

Apesar dos fatores abióticos serem altamente estáveis e homogêneos neste sistema, no que se refere a macroambiente, os insetos possuem a capacidade de produzirem alterações a partir do nível microambiental. Suas atividades podem tanto aumentar a temperatura quanto a umidade da massa armazenada. Geralmente, estas populações possuem um espectro de tolerância a variações desses fatores bastante estreito. Sendo assim, a partir de um certo valor para estes parâmetros, a taxa de crescimento populacional começa a cair e existe o favorecimento da ocupação deste habitat por outros organismos como fungos e insetos que os consomem (Puzzi, 1973, 1977, 1986).

Apesar de sua origem estar principalmente associada a climas tropicais e subtropicais, algumas espécies pragas podem se instalar em regiões de clima temperado devido à capacidade de tolerar baixas temperaturas e à capacidade de algumas espécies entrarem em diapausa, produzindo novos focos de infestação e dispersão quando existe um favorecimento ambiental (Howe, 1965; Cox *et al.*, 1984a, 1987).

Os principais insetos pragas de grãos e produtos armazenados pertencem a duas ordens: Coleoptera e Lepidoptera. Ambas diferem principalmente na capacidade de penetração na massa do item armazenado, sendo que, de maneira geral, as infestações por lepidópteros são mais superficiais devido ao comportamento de oviposição dos adultos, os quais têm um corpo relativamente grande e asas pouco resistentes e, conseqüentemente, são incapazes de penetrar entre os grânulos dos produtos para ovipor, como fazem os coleópteros (Puzzi, 1977).

Existem quatro famílias de lepidópteros de importância econômica para a armazenagem de produtos de origens animal e vegetal por terem espécies altamente prejudiciais e com ampla distribuição geográfica. São elas: Tineidae, Oecophoridae, Gelechiidae e Pyralidae (Holloway *et al.*, 1992). No caso específico de grãos armazenados e seus sub produtos, as espécies de maior impacto negativo pertencem às duas últimas famílias citadas acima (Almeida, 1989).

### **2.3.2. *Anagasta kühniella* Zeller (1879) (Lepidoptera: Pyralidae)**

Existem duas correntes de pesquisadores que discordam quanto a posição sistemática de *Anagasta kühniella*. A européia a coloca dentro do gênero *Ephestia*. Já a americana aceita a divisão do gênero *Ephestia* em outros, inclusive *Anagasta* (Stein, 1985).

Esta mariposa, popularmente conhecida como traça da farinha ou mariposa da farinha do Mediterrâneo, é uma praga secundária característica de ambientes de armazenagem (Altahtawy *et al.*, 1973). É altamente polífaga, pois ataca uma enorme diversidade de grãos e produtos. Entre os principais podemos citar: milho, trigo, arroz e amendoim, porém demonstram preferência pelo ataque de farinhas, farelos e fubás. Esta preferência é responsável pelo seu papel de praga chave em moinhos de farinha em várias regiões do mundo, principalmente na região temperada (Habib, 1968, 1982; Cox, 1987; Gallo *et al.*, 1988). Sua presença e danos já foram evidenciados em várias regiões do Brasil (Stein, 1985). Entretanto, faltam dados mais atualizados sobre sua distribuição geográfica.

O estágio larval é responsável por expressivos danos qualitativos aos alimentos, pois ao infestarem os produtos formam grumos de seda para se

esconder e empupar. Tal comportamento causa o compactamento da massa alimentar e pode levar ao entupimento das tubulações dos moinhos. Além disso, seu crescimento populacional propicia o estabelecimento de condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos e bactérias, além de outros insetos e ácaros, pragas oportunistas (Habib, 1968; Amaral Filho, 1986).

Esta espécie foi colocada por Howe (1965) dentro do grupo de insetos de grãos armazenados cujas populações toleram baixa umidade relativa e são capazes de sobreviver por um ou mais estágios em baixa temperatura, voltando a aumentar suas densidades quando a temperatura volta a uma condição mais favorável. Cox *et al.* (1984 a) observaram a indução de diapausa em 11 populações européias de *Anagasta kühniella*. Relatou a sobrevivência em diversas temperaturas baixas e concluiu que algumas populações podem permanecer até 4 semanas em temperaturas de  $-2,5^{\circ}\text{C}$  mantendo uma viabilidade de 10% no estágio larval (Cox, 1987). Também observaram que a  $10^{\circ}\text{C}$  e  $15^{\circ}\text{C}$  larvas em diapausa toleram fumigantes, como o brometo de metila e a fosfina, melhor que larvas que não entraram em diapausa (Cox *et al.*, 1984 b). Estes estudos colocam restrições ao uso do controle populacional do piralídeo em ecossistemas de armazenagem através de baixas temperaturas associadas a fumigantes.

#### 2.4. Controle de Pragas

Os primeiros métodos de controle de pragas aplicados tanto para agroecossistemas quanto para sistemas de armazenagem eram mais simples e limitados pelas restrições ambientais de cada propriedade que os atuais. Porém, eram, na maioria das vezes, ecologicamente mais adequados já que se inseriam dentro de um processo amplo de manejo das culturas que resultava em ecossistemas que, apesar de artificiais, eram mais equilibrados e menos

ambientalmente impactantes, garantindo uma maior sustentabilidade. Porém, o interesse econômico e o desenvolvimento dos processos agrícolas promoveram mudanças para o incentivo de plantio de grandes áreas, contribuindo para uma concentração da posse da terra e para o desinteresse pelos pequenos latifúndios, para a monocultura e a mecanização, aumentando o custo da produção, e não dando margens a perdas. O controle químico passou a ser amplamente utilizado partir deste século literalmente como "a salvação da lavoura". Foi também proposto como solução para os problemas com pragas ligadas à armazenagem e saúde pública.

As práticas agrícolas mais ligadas ao manejo adequado de recursos e processos físicos e biológicos, conhecidas como Agricultura Ecológica, ficaram relegadas a segundo plano, pois o sucesso inicial das substâncias químicas sintéticas foi tão grande que praticamente paralisou as pesquisas sobre as interações biocenóticas (Rodrigues, 1994).

#### **2.4.1. Controle Químico**

O emprego de substâncias químicas para o controle de pragas acompanhou o desenvolvimento da agricultura. Durante muito tempo, a ênfase na utilização estava relacionada à compostos inorgânicos, como o enxofre e derivados arsenicais, utilizadas principalmente no controle de insetos mastigadores, e às substâncias orgânicas de origem vegetal, como a nicotina, e de origem petrolífera, como os óleos minerais, empregadas usualmente no controle dos insetos sugadores (Gallo *et al.*, 1988).

Com o avanço na síntese artificial de moléculas neste século, o controle químico baseado em moléculas orgânicas sintéticas desempenha o papel de principal método para controle de pragas e vetores. Sua introdução,

aliada aos preceitos de nutrição vegetal química artificial, propostos por Liebig, à mecanização e à seleção genética de espécies vegetais, permitiu que as atividades agrícolas se voltassem para grandes sistemas de monoculturas.

Atualmente, estas dividem-se em três categorias, conforme sua composição molecular:

1. inorgânicas;
2. orgânicas ;
3. inorgânicas ou orgânicas com exclusiva ação fumigante.

O emprego de inseticidas organosintéticos, como o malathion e DDT, misturados diretamente na massa de grãos ou em pulverizações dentro da unidade de armazenamento para o controle de infestações de insetos foi considerado um grande passo na década de 30, sendo adotado mundialmente, juntamente com outras medidas profiláticas (Munro, 1966).

Entretanto, o que de início parecia a solução milagrosa tornou-se um grave problema. "A Primavera Silenciosa" de Rachel Carson (1962) foi o primeiro grande alerta para as consequências do uso dos agrotóxicos. Os agricultores e armazenadores de repente viram-se frente a um quadro altamente crítico: pragas desenvolvendo resistência; a ressurgência após os tratamentos; insetos anteriormente inócuos adquirindo o papel de pragas; as doses do inseticida tendo que ser rapidamente ampliadas ou substituídas por outras classes de moléculas; a contaminação do solo, lençol freático e mananciais; a interferência na bioquímica das plantas, diminuindo a sua síntese protéica; além de efeitos adversos à saúde humana; elevada persistência no meio ambiente e acúmulo de resíduos na cadeia alimentar (Paschoal, 1995).

Os fumigantes ainda são, na atualidade, os agentes inseticidas químicos mais amplamente empregados em ecossistemas fechados nas operações de expurgo. Por serem substâncias químicas que exalam vapores,

possuem alta capacidade de penetração e difusão tanto na estrutura do local de armazenagem quanto no material armazenado, o que permite que as pragas sejam eliminadas de qualquer possível local de instalação desde que esta esteja adequadamente vedada (Gallo *et al.*, 1988; Bitran, 1989; Santos, 1993). Seu mecanismo de ação tóxica, a partir do sistema respiratório, provoca altos níveis de mortalidade em quase todos os estágios de desenvolvimento dos insetos (Puzzi 1977). Porém, assim como outros agentes químicos empregados na agricultura, são de amplo espectro/ baixa seletividade, atingindo inclusive insetos benéficos e desfavorecendo o controle natural das populações infestantes. Tais produtos estimulam o desenvolvimento de resistência com seu uso prolongado, provocando posteriores problemas com o aumento das doses aplicadas que implicam na elevação do custo da armazenagem além de possíveis riscos à saúde humana. Outros itens negativos quanto ao seu emprego são: a periculosidade para o aplicador, a contaminação dos produtos tratados com resíduos tóxicos que têm ação patológica, a contaminação ambiental e a perda de valor comercial dos produtos tratados inadequadamente com estes agentes químicos no mercado mundial (Astolfi *et al.*, 1977; Sartori, 1996).

Recentemente, vários países cancelaram o registro de alguns tipos de agentes químicos devido às suas excessivas propriedades tóxicas e poluentes. Pode-se citar o exemplo dos fumigantes líquidos, usados para controle de pragas de grãos, proibidos nos mercados norte-americano e canadense a partir de 1984 (Fields, 1992).

No Brasil, utilizam-se amplamente dois produtos para expurgos: a fosfina e o brometo de metila, agentes controladores de pragas mais empregados mundialmente em sistemas de armazenagem.

A fosfina ( $\text{PH}_3$ ) é classificada como substância inorgânica de exclusiva ação fumigante. Geralmente, é apresentada na forma de comprimidos com uma mistura a base de fosfeto de alumínio e de carbonato de amônio. Ao entrarem em contato com a umidade do ar libera gases de fosfina, o anidrido carbônico e o amoníaco, o qual serve como indicador de vazamento já que a fosfina em si é inodora, (Astolfi *et al.*, 1977; Mariconi, 1983; Gallo *et al.*, 1988). A atual legislação fitossanitária estabelece um limite máximo de resíduo de 0,1 ppm para grãos como o amendoim, arroz, cevada, aveia, feijão milho, sorgo, soja, trigo e café. Para o caso da farinha preparada a partir de grãos, o limite máximo é bem menor, 0,01 ppm (Bitran, 1989). Este agente químico, apesar de sua alta eficiência nas operações de expurgo, tem comprovada sua capacidade de desenvolver resistência nos insetos-alvo, além de também provocar intoxicações por inalação e deixar resíduos no ambiente (Puzzi, 1977; Johnson *et al.*, 1995; Leesch, 1995, Sartori, 1996). Alguns autores consideraram que a velocidade de desenvolvimento de resistência nos insetos de ambientes de armazenagem é menor que em agroecossistemas devido a intensa migração passiva ocasionada pela movimentação dos estoques, menor número de gerações por ano e baixa pressão de seleção, já que os fumigantes funcionam como supressores de populações praga em ambientes de armazenagem (Parkin, 1965). Sartori (1996) relata que no período entre 1972/ 73 a FAO não detectou resistência a fosfina em populações brasileiras destes insetos. Entretanto, entre 1989 e 1991, num levantamento feito pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), de Campinas/ SP, em oito estados brasileiros, observou-se resistência à fosfina em porcentagens que variavam entre 80% e 100% nas diversas populações das espécies pragas estudadas (Sartori *et al.*, 1990; Sartori, 1993, 1996). Parkin (1965) aponta as falhas na aplicação, tempo de exposição e vedação do ambiente inadequados, entre outros, como os principais responsáveis pelo desenvolvimento/ seleção da resistência.

O brometo de metila ( $\text{CH}_3\text{Br}$ ), é um gás incolor em temperatura normal, quase sem cheiro e 3,3 vezes mais pesado que o ar (Thompson, 1966; Nakano *et al.* 1977; Mariconi, 1983; Gallo *et al.*, 1988). Apesar de altamente eficiente como nematicida, fungicida e inseticida, é altamente inespecífico, tóxico e causa danos à camada de ozônio. É empregado popularmente como um esterilizador de solo e para controle de ervas daninhas, cupins, formigas como as quen -quéns e saúvas e na fumigação estrutural de moinhos e navios (Taylor, 1994). Sua aplicação contínua em alimentos provoca acúmulo de resíduos de bromo acima dos níveis toleráveis para a saúde, podendo provocar uma intoxicação que atinge os sistemas nervoso e respiratório, inclusive levando à morte (Astolfi *et al.*, 1977). Este fumigante é uma das substâncias citadas no "Protocolo de Montreal sobre Substâncias que destroem a camada de ozônio" e sua retirada do mercado é sugerida como meta a curto prazo. O governo brasileiro se propôs a suspender seu uso a partir de 2001.

Como complemento à fumigação, são empregados, na prevenção de novas infestações, agrotóxicos em pó ou líquidos. No caso da farinha de trigo são permitidos o uso do malathion e do pirimiphosmetil, com tolerâncias de 2 e 5 ppm, respectivamente (Bitran, 1989)

#### **2.4.2. Manejo Integrado de Pragas**

A filosofia do controle de pragas, baseada no uso exclusivo dos produtos químicos organo-sintéticos, tinha a concepção de controle como sinônimo de ausência das populações das pragas. Porém, mostrou-se insatisfatória e foi inicialmente modificada para uma concepção de controle integrado de pragas, onde propunha-se a combinação de agentes de controle biológico com intervenções de controle químico, buscando diminuir as perdas econômicas e minimizar os efeitos adversos ao ambiente. Entretanto, ainda se

propunha a buscar a erradicação total do inseto alvo. A aplicação das medidas de controle em ambas era feita obedecendo um calendário específico, muitas vezes na total ausência da praga (van den Bosch & Messenger, 1973). Porém, verificou-se que aspectos importantes para um real controle estavam sendo ignorados, o que acabou ocasionando uma série de problemas. Surgiu então, a concepção do Manejo Integrado de Pragas (MIP), o qual enfoca o controle de pragas através de uma visão muito mais abrangente e apurada, já que engloba fatores ecológicos, econômicos e sociais e introduz o conceito de nível de dano econômico da praga no sistema, no qual sugere que nem todo dano é intolerável e que o controle busca diminuir a densidade populacional do inseto praga para uma posição de equilíbrio, sem que haja a necessidade de aniquilá-lo (Metcalf & Luckman, 1975). Os métodos utilizados levam em consideração a identidade de cada ecossistema e procuram garantir a integridade e sustentabilidade destes como um todo, prevendo, corrigindo e diminuindo ações impactantes. As interações com os ecossistemas que circundam o ecossistema agrícola ou de armazenagem assim como as interações físicas e biológicas e os ciclos naturais dentro do próprio ecossistema passam a ser reconhecidos e utilizados para a manutenção do equilíbrio. Dentro do MIP, os agentes de controle biológico naturais ou artificiais, como os predadores, parasitóides e patógenos, tiveram finalmente sua importância reconhecida.

O MIP, entretanto, é muito mais conhecido pela sua aplicação em agroecossistemas que em ecossistemas de armazenagem. Porém, existem grandes esforços para sua adoção para este último, principalmente agora que os principais fumigantes utilizados no controle de pragas estão com seu uso restringido.

Dunkel (1992) ressalta a importância do conhecimento dos componentes de cada sistema específico em questão, das espécies que compõem cada comunidade, sua ecologia, o monitoramento das mudanças

sucessionais nas comunidades, da imigração e emigração e a dispersão passiva de indivíduos, para que se possa estabelecer um programa de MIP destinado a ecossistemas de armazenamento.

### **2.4.3. Inimigos Naturais**

#### **2.4.3.1. Parasitóides**

Os insetos parasitóides, principalmente os himenópteros, representam inimigos naturais bastante eficientes como agentes reguladores de populações de espécies prejudiciais, devido ao seu alto grau de especificidade, boa capacidade reprodutiva, elevada capacidade de procura, além do seu total sincronismo bio-ecológico com o seu hospedeiro (Clausen, 1972 ; Silveira Neto *et al.*,1976; DeBach, 1981). Porém, na maioria vezes, tais entomófagos são mais sensíveis aos inseticidas químicos do que os insetos alvo. Ainda são poucos os registros de casos onde espécies parasitóides demonstram resistência a agentes químicos (Baker, 1995; Baker *et al.*, 1995 ).

Em Programas de Manejo Integrado, a associação de insetos parasitóides com outras técnicas, é altamente sofisticada. Estes programas envolvem inclusive a participação de modelagens matemáticas e programas computacionais bastante complexos, para garantir a otimização da sua participação no processo de controle (Waage *et al.*,1985; Hoechberg *et al.*, 1990; Pessoa , 1993).

O controle biológico natural por parasitóides pode ser favorecido através do fornecimento de condições favoráveis para o seu aumento populacional e/ou sua manutenção no ecossistema em pauta. Já o controle biológico artificial pode implicar em criações laboratoriais e posteriores inundações e/ou da introdução de parasitóides exóticos quando os nativos não

se mostram em condição de manter a população praga abaixo do nível econômico de dano (van Den Bosch & Messenger, 1973; Gallo *et al.*, 1988)

*Bracon hebetor* é um himenóptero da família Braconidae. Sua nomenclatura ainda é bastante confusa. Foram relacionadas cerca de 10 sinônimas de *Bracon hebetor* (Muesebeck, 1925; Muesebeck *et al.*, 1951 *apud* Serra, 1992), entre elas *Microbracon hebetor* e *Habrobracon hebetor*. Quicke e Sharkey (1989), trabalhando com a taxonomia de espécies da subfamília Braconinae, separaram os gêneros *Bracon* e *Habrobracon*, mas consideram que o último pode ser um subgênero de *Bracon*.

*Bracon hebetor* tem uma distribuição geográfica cosmopolita, a qual coincide com a distribuição de seus principais hospedeiros. Tem grande importância no controle biológico natural de lepidópteros pragas em ecossistemas de armazenagem, pois exerce o ectoparasitoidismo sobre larvas de algumas famílias de lepidópteros, entre elas Pyralidae e Noctuidae. Ataca quase todas as espécies de lepidópteros de grãos armazenados, sendo os mais frequentemente parasitados: *Anagasta kühniella*, *Ephestia ellutella*, *Ephestia cautella* e *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Richards & Thonson, 1932).

É uma espécie altamente eficiente no parasitismo de larvas que estão se alimentando sobre ou próximo à superfície de produtos infestados (Press *et al.*, 1982; Brower & Press, 1990) o que no caso de alguns lepidópteros associados ao ecossistema de armazenagem ocorre no último estágio larval quando as larvas buscam um local para empupar (Tamashiro, 1960; Habib, 1968; Benson, 1973; 1974; Serra, 1992; Cecílio, 1993). Sua fêmea causa paralisia permanente no hospedeiro antes da oviposição através da inoculação, pelo seu ovipositor, de uma substância que age nas junções neuromusculares. Esta paralisia também possibilita a alimentação na hemolinfa

exudada (Richards & Thonson, 1932; Beard, 1972). Além disso, paralisam o maior número possível de larvas que estejam na sua área antes iniciar a atividade de oviposição (Richards & Thonson, 1932; Cecílio, 1993). Este fenômeno pode ser considerado como significativo na regulação populacional do hospedeiro, incrementando aquela ocasionada pelo parasitismo propriamente dito.

#### **2.4.3.2. Bactérias Entomopatogênicas**

As bactérias entomopatogênicas são patógenos, agentes de controle biológico, altamente promissores para aplicação em programas de MIP. Desde a década de 70, quando as restrições do controle químico ficaram bem evidentes, o desenvolvimento de inseticidas microbianos passou a ser visto como uma alternativa bastante promissora (Watkinson, 1994). Schuh (1995) aponta a especificidade biológica, a menor capacidade para selecionar resistência nos insetos e o menor investimento econômico e de tempo no desenvolvimento de um formulado biológico, em relação às substâncias químicas, como as principais razões que levam atualmente a indústria a investir neste tipo de agente de biótico de mortalidade

Geralmente, as bactérias entomopatogênicas são bastante específicas quanto a seus hospedeiros, possuem a capacidade de se multiplicar e dispersar no ecossistema, o que conseqüentemente pode implicar em um controle prolongado, podendo existir a possibilidade de estabelecerem enzootias. Além disso, podem produzir efeitos secundários que afetam a capacidade adaptativa da população alvo e existe a possibilidade de serem utilizadas associadas a sub-doses de agrotóxicos mais seletivos, com os quais podem estabelecer interações de sinergismo ou compatibilidade (Habib & Garcia, 1981; Jaques & Moris, 1981; Sneh *et al.*, 1983; Alves, 1986).

Para que uma bactéria entomopatogênica venha a ser utilizada como agente de controle biológico artificial, existe a necessidade de que apresente características relacionadas à resistência a radiações e fatores climáticos, facilidade para isolamento e multiplicação, seletividade e baixa toxicidade para outros animais, inclusive humanos. Segundo Habib & Andrade (1986), as bactérias de maior importância encontram-se principalmente nas famílias Enterobacteriaceae e Bacillaceae, além de também abrangerem algumas espécies da ordem Pseudomonadales.

Segundo Falcon (1971), as bactérias entomopatogênicas podem ser classificadas em dois grupos: esporulantes e não esporulantes. Entre as primeiras encontram-se as espécies mais utilizadas no controle microbiano de insetos, como as pertencentes ao gênero *Bacillus*.

O gênero *Bacillus* (família Bacillaceae) inclui bactérias gram positivas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, formadoras de esporo. A maioria das espécies incluídas neste gênero tem a capacidade de formar o endosporo (Milner, 1994).

A primeira descrição de *Bacillus thuringiensis* (Bt) foi realizada por Ishiwata no Japão, em 1912, a partir de larvas doentes de bicho-da-seda. Berliner isolou e descreveu o Bt em larvas de *Anagasta kühniella*, em 1915, na Alemanha (Milner, 1994). Atualmente, este é o agente entomopatogênico mais pesquisado para uso em MIP, sendo empregada no controle de diversas espécies pragas, tanto na agricultura quanto na saúde pública (Watkinson, 1994). É uma espécie cosmopolita, reconhecida pela formação do corpo parasporal, também denominado cristal protéico ou  $\delta$  - endotoxina, durante o processo de esporulação. Já foi isolado em diversos substratos, os quais variam desde solos, superfícies foliares até insetos (Dulmage & Aizawa, 1982).

O Bt produz diversas toxinas que possuem atividade como inseticida, acaricida e nematicida. Entre as toxinas mais estudadas e com maior destaque são as componentes do cristal protéico e a thuringensina (Drummond & Pinnock, 1994). Cada um dos diferentes sorotipos do Bt, categorizados de acordo com o antígeno flagelar e parâmetros bioquímicos (de Barjac & Bonnefoi, 1962), é específico a um grupo de espécies que possuem as características genéticas e condições fisiológicas favoráveis ao desenvolvimento da bacteriose (Habib & Andrade, 1986). A complexidade de interrelações entre os diversos sorotipos no que diz respeito ao espectro de atividade do Bt é atribuído à capacidade dos diferentes sorotipos produzirem cristais com diferentes composições proteicas e, conseqüentemente, um espectro diferenciado de hospedeiros (Drummond & Pinnock, 1994). Sendo assim, existe a possibilidade de se selecionar o sorotipo a ser aplicado para cada espécie de inseto alvo, sem afetar diretamente o restante da biota. Dulmage (1981) forneceu um estudo sobre a atividade de várias linhagens de Bt em 23 espécies de insetos bastante elucidativo quanto ao espectro de hospedeiros do entomopatógeno.

A superioridade deste entomopatógeno em relação aos inseticidas químicos está ligada principalmente à sua alta seletividade (Watkinson, 1994), ao fato de possuir estágio de resistência (esporo) e ser inócuo a vertebrados, insetos benéficos e plantas (Benz & Altwegg, 1975; Amaral Filho, 1986; Marques, 1993; Siegel *et al.* 1995). Entretanto, devem-se observar suas características físicas e biológicas, utilizar um método de aplicação eficiente para o ecossistema em tratamento e conhecimentos sobre a ecologia da praga para se garantir a eficiência do patógeno (Bryant, 1994).

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H:3a-3b) foi isolado por Kurstaki em 1962, a partir de larvas doentes de *Anagasta kühniella* coletadas em armazéns

de grãos na França (Dulmage & Aizawa, 1982). Este sorotipo mostra-se específico a larvas várias famílias de lepidópteros (Drummond & Pinnock, 1994).

A possibilidade de sua aplicação em ambientes com condições físicas estáveis (umidade relativa e temperatura), como armazéns e silos, e a susceptibilidade natural de populações de piralídeos a este agente de controle já foram analisados por vários pesquisadores (McGaughey, 1978 a, b, 1980a,b, 1985; Habib, 1982; Amaral Filho, 1986; Habib *et al.*, 1991). Entretanto, o uso contínuo e exclusivo de formulados a base de *Bacillus thuringiensis* em programas de controle de pragas, assim como o de agrotóxicos, pode, em algumas situações, implicar no aparecimento de resistência nas populações de insetos alvo (Tabasnick *et al.*, 1990, 1991; McGaughey, 1994). Segundo McGaughey (1985), os ecossistemas de armazenamento são ideais para o desenvolvimento de resistência, pois nele o Bt é estável e pode permanecer por longos períodos permitindo que os insetos se multipliquem por várias gerações em contato com esporos e toxinas da bactéria. Porém, este efeito adverso ocorre quando produtos a base deste entomopatógeno ou exclusivamente a base de suas toxinas são utilizados inadequadamente, apenas substituindo os agrotóxicos. Isto pode ser contornado com um programa de MIP que use este entomopatógeno mais racionalmente e associado a outras técnicas compatíveis no manejo do ecossistema.

#### **2.4.4. Controle Físico de Pragas**

A aplicação de métodos físicos de controle de pragas em grãos e produtos armazenados tem sido bastante avaliada e pode ser incluída em programas de MIP. Modificações físicas no ambiente de armazenamento

podem incluir a utilização de temperaturas sub-ótimas ou letais aos insetos, controle de umidade relativa e aplicação de radiação.

Sabe-se que qualquer organismo vivo possui uma faixa ótima de temperatura e umidade na qual sua capacidade adaptativa atinge o nível máximo. Em faixas sub-ótimas esta capacidade é reduzida devido a danos às atividades fisiológicas e em faixas letais têm-se a morte dos indivíduos devido à inadaptabilidade a estas condições extremas (Howe, 1965; Fields, 1992). Utilizando-se este conhecimento biológico, a manipulação da temperatura em ecossistemas de armazenagem vem sendo adotada para o controle de insetos, ácaros e fungos. Fields (1992) relata que, em relação ao uso de altas temperaturas na faixa letal para o controle de pragas, têm-se cogitado a aplicação de ar quente, ondas eletromagnéticas nas frequências de rádio, microondas, infra vermelho e radiações ionizantes.

O primeiro trabalho sobre o impacto de microondas sobre seres vivos provavelmente foi feito por d'Arsonval, em 1893, o qual constatou o aumento da temperatura em animais de laboratório submetidos a campos de alta frequência. O emprego de geradores de energia de microondas e rádio frequência (RF) também tem sido pesquisado como possibilidade promissora para a supressão de insetos em ambientes fechados desde o início deste século (Nelson, 1973; Reagan *et al.*, 1980). Outras possíveis aplicações em produtos agrícolas foram progressivamente propostas, como a secagem de produtos, tratamento de sementes e a determinação do conteúdo de água (Webber *et al.*, 1946; Marsaioli Jr, 1991; Halverson *et al.*, 1996). Isto vem aumentando sua viabilidade para emprego na área agrícola pois há o interesse de se desenvolver um único aparelho que possa vir a ser empregado em mais de uma dessas funções (Nelson, 1966, 1973, 1987; Barker & Craker., 1991). Além disso, a utilização de microondas vem sendo feita em processos de industrialização e tecnologia de alimentos (Olsen, 1965; Copson, 1975; Cunningham, 1980; Fung & Cunningham, 1980; Chang, 1982; Diaz, 1982;

Hanmerius *et al.*, 1985; Campos, 1985; Heddleson *et al.*, 1991, 1996) e na área médica (Goldblith & Wang, 1968; Lohmann & Manique, 1986).

Os limites entre as faixas de frequência de rádio e de microondas não são bem estabelecidos, existindo uma região de sobreposição. As rádio frequências são consideradas como ocupando a região do espectro eletromagnético entre as áudio frequências e a região de infra vermelho, ou seja, aproximadamente entre 10kHz a 100 GHz (Nelson, 1987) As microondas são ondas na região de RF, geralmente consideradas entre 300 e 300.000 MHz, e com comprimentos de onda entre 1m a 1mm no ar (Lambert, 1980) (Figura 1), abrangendo bandas do espectro eletromagnético correspondentes às frequências ultra altas (UHF = "ultra high frequency" = 300 a 3.000 MHz) e super altas (SHF = "super high frequency" = 3 a 30 GHz) (Copson, 1975). Sendo assim, torna-se fundamental para qualquer trabalho especificar a frequência ou comprimento de onda utilizado.

As frequências comerciais usulamente empregadas em aparelhos de microondas correspondem a 915 e 2450 MHz (Copson, 1975).

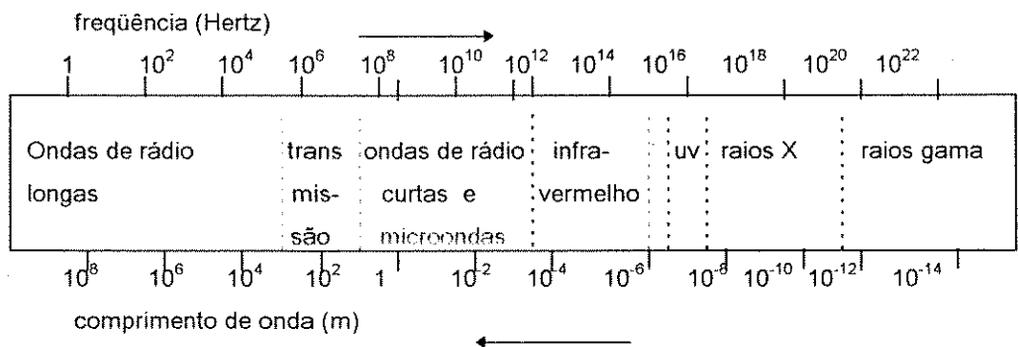


Figura 1. Espectro de radiação eletromagnética (Lambert, 1980).

Tanto as rádio frequências (RF) quanto as de microondas produzem aquecimento do tipo dielétrico. Os materiais dielétricos (condutores não ideais) expostos a campos elétricos formados por microondas ou (RF), de intensidade e frequência suficientemente altas, são rapidamente aquecidos com a absorção de energia do campo elétrico (Nelson & Stetson, 1974). O material exposto é submetido a um campo elétrico que oscila rapidamente. As moléculas polares contidas no material, como a água, alinham-se com o campo e são levadas a oscilar em concordância com este (Hurlock *et al.*, 1979; Annis, 1980). Já as apolares sofrem uma polarização induzida, a qual permite a interação entre as moléculas e o campo eletromagnético (Cornutte, 1980). Esta oscilação gera uma agitação térmica responsável pelo aquecimento do material. Tal aquecimento é dependente das propriedades dielétricas do material, da frequência da onda e da intensidade do campo elétrico.

As propriedades dielétricas importantes para os materiais de interesse para aplicações de microondas são:

- a constante dielétrica, a qual indica a capacidade do material armazenar energia no campo elétrico;
- o fator de perda, o qual é um indicativo da capacidade do material em absorver ou dissipar energia de um campo elétrico alternado;
- tangente de perda ou fator de dissipação, o qual também serve como indicativo das características de perda de energia do material, ou seja, relaciona-se à capacidade de um material ser penetrado pelo campo elétrico e dissipar energia na forma de calor (Mudget, 1986; Nelson, 1987).

A taxa de absorção de energia de qualquer substância, sendo dependente de suas características elétricas, pode vir a proporcionar a oportunidade de aquecimento diferencial em uma mistura de substâncias quando submetidas a microondas. Assim, se um inseto absorve energia em uma taxa maior que seu meio, ele poderá atingir, mais rapidamente, níveis

letais de temperatura sem que o material hospedeiro sofra danos (Nelson, 1973; Hurlock *et al.*, 1979; d'Ambrósio *et al.*, 1982). A faixa de frequência mais vantajosa para o aquecimento seletivo de insetos vai de 10 a 100 MHz, ou seja, abaixo da faixa de microondas. Nela pode-se esperar um aquecimento significativamente maior nos insetos que nos grãos quando comparado a faixa de microondas (Nelson & Stetson, 1974; Nelson, 1987). Porém, as microondas ainda vêm sendo utilizadas e aplicadas a processos agrícolas e mostram perspectivas de utilização no controle de insetos isoladamente ou associadas a outros métodos (Tilton & Vardell, 1982a,b; Crocker *et al.*, 1987 ).

Segundo Lambert (1980), os efeitos das microondas sobre materiais biológicos podem ser divididos em térmicos e não térmicos. Os primeiros ocorrem em casos de exposição a altos níveis de radiação, causando hipertermia e outras respostas biológicas, enquanto o segundo causa distúrbios no nível celular e metabólico, pois é decorrente de rearranjos macromoleculares e em estruturas subcelulares.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS

#### 3.1. Coleta do Material Entomológico e Manutenção das Criações Estoque.

##### 3.1.1. Coleta

Efetuaram-se coletas de “descarte de farinha de trigo” extraído das tubulações do moinho Braswey, Campinas, SP. Este material foi levado para o Laboratório de Criação de Insetos do Departamento de Zoologia da UNICAMP, onde se realizou a triagem manual para a obtenção de exemplares sadios de *Anagasta kühniella*, assim como larvas parasitadas desta e adultos do ectoparasitóide *Bracon hebetor*, com o objetivo de servirem como matriz da criação de estoque dessas duas espécies .

As condições laboratoriais adotadas para criação neste trabalho foram de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura,  $60 \pm 10\%$  de umidade relativa (UR) e 12 horas de fotoperíodo, consideradas apropriadas por Habib (1968) e Amaral Filho (1986).

As criações estoque foram mantidas por 7 gerações antes da realização dos bioensaios para garantir sua homogeneidade genética e melhor desempenho nas respostas indicadoras de sensibilidade (Amaral Filho & Habib, 1993).

### 3.1.2. Criação de *Anagasta kühniella* em Laboratório.

Para a criação de *Anagasta kühniella* utilizaram-se frascos padrão de plástico transparente ( 17 de diâmetro x 6,5 cm de altura ), cuja tampa possuía uma abertura central, coberta por organza, para garantir a aeração adequada no recipiente. Cada frasco padrão recebeu 160 g da dieta básica, composta por farinha de trigo integral, gérmen e farelo de trigo (8:1:1), onde, posteriormente, foram distribuídos os ovos do lepidóptero (150 a 200 ovos/ frasco). Todos os frascos receberam um rótulo com número de série e data de oviposição para controle do desenvolvimento do inseto.

Os adultos obtidos na criação foram coletados diariamente, por sucção, e transferidos para frascos de vidro (7,5 de diâmetro x 18,0 cm de altura) fechados com nãilon e elástico onde ocorriam o acasalamento e a oviposição. Tais frascos foram colocados com a abertura para baixo em um suporte cônico de plástico sobre uma placa de Petri. Os ovos que caíram na superfície da placa foram recolhidos diariamente.

### 3.1.3. Criação de *Bracon hebetor* em Laboratório.

A criação estoque de *Bracon hebetor* foi mantida no frasco padrão anteriormente citado, o qual continha larvas de último estágio do seu hospedeiro natural *Anagasta kühniella*. Adultos do braconídeo foram introduzidos no frasco para efetuar o parasitismo. Quando havia a emergência de novos adultos, estes eram transferidos para novos frascos padrão. As condições laboratoriais adotadas para a criação foram as mesmas citadas para a criação de *Anagasta kühniella*.

## **3.2. Obtenção de Material Entomológico para Bioensaios**

### **3.2.1. *Anagasta kühniella***

Tanto os ovos, quanto as larvas e os adultos deste lepidóptero para os bioensaios foram obtidos diretamente da criação estoque.

### **3.2.2. *Bracon hebetor***

Para a obtenção de adultos desse braconídeo a serem utilizados nos bioensaios, separam-se casais da criação estoque e estes foram transferidos para placas de Petri (10 cm de diâmetro) (2 casais / placa), contendo 10 larvas de último estágio de *Anagasta kühniella* e vedadas com fita crepe para evitar a fuga dos parasitóides. Diariamente, os casais eram mudados para uma placa nova contendo a mesma quantidade de larvas hospedeiras sadias. Marcou-se nas placas o dia da exposição ao parasitismo, assim pode-se acompanhar o desenvolvimento do parasitóide e se obter larvas na idade desejada para os bioensaios. As placas foram mantidas sob as mesmas condições laboratoriais anteriormente citadas.

### **3.2.3. Material Bacteriológico**

Para os bioensaios de avaliação da sensibilidade de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* a microondas foram utilizadas amostras do produto Dipel (Abbot®), contendo o complexo esporo - cristal desta bactéria, 16.000 UI de virulência, formulação em pó molhável.

### 3.3. As Microondas e o Sistema de Exposição

Todos os bioensaios, envolvendo a utilização de radiação, foram realizados sob a potência máxima de um forno microondas Panasonic NN 7954 BH/K, operando na frequência de 2.450 MHz.

Os bioensaios foram realizados na mesma placa de vidro ou conjunto de duas placas de mesmo tamanho (13,0 de diâmetro x 1,7 cm de altura), dependendo do bioensaio, pois existe uma variação na espessura deste material entre diferentes placas e conseqüentemente na sua capacidade de reter calor, o que poderia interferir nos resultados. A placa contendo o material a ser irradiado foi primeiramente levada a estufa BOD, a temperatura de  $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$  C durante 10 minutos, para se garantir uma maior homogeneidade na temperatura inicial deste (Harrison, 1980). Logo após este período, a placa era posicionada sobre um suporte de plástico de 10,0 cm de altura em cima do prato giratório. Para os bioensaios do sub-capítulo 4.2, usou-se um suporte de 2 cm de altura. Esse procedimento teve como função proteger os insetos expostos da propagação do calor oriundo do prato giratório. Logo após o término da exposição o material foi retirado do forno e devolvido à estufa BOD.

As avaliações da mortalidade das larvas e adultos de *Anagasta kühniella* e adultos de *Bracon hebetor* em cada tratamento foram efetuadas 30 minutos e 24 horas após a exposição, seguindo o critério de "tudo ou nada"; isto é apenas o efeito fatal foi levado em conta. Para tal, considerou-se como mortos os indivíduos que não apresentassem movimentos e não respondessem mais ao estímulo de toque por um estilete. Para o caso de ovos do piralídeo, o parâmetro de análise para verificação da sensibilidade à radiação foi a eclosão. Já para larvas do ectoparasitóide foi considerada a capacidade de empupar.

### 3.4. Procedimentos para Estabelecer os Tempos de Exposição à Radiação de Microondas.

Para estabelecer os tempos de exposição letais medianos (TEL<sub>50</sub>) dos tratamentos usaram-se as recomendações para a aplicação da fórmula de Thompson (1947) e adaptada por Habib (1982 e 1986).

Foi feita uma avaliação preliminar, na qual usou-se um fator de progressão geométrica (q=1,5) entre os diferentes tratamentos, para assim se estipular a faixa de tempo a ser utilizada nos ensaios definitivos. A partir dos dados obtidos nesta avaliação inicial encontrou-se o menor intervalo que nos fornecesse mortalidades entre ± 10% e ± 98%. Então, o valor de q foi recalculado para aumentar o número de tratamentos dentro deste intervalo.

A mortalidade de cada estágio após exposição foi corrigida pela equação de Abbott (1925), onde:

$$M.C = \frac{(\% \text{ mortalidade no tratamento}) - (\% \text{ mortalidade no controle})}{100 - (\% \text{ mortalidade no controle})} \times 100$$

M.C. = mortalidade corrigida

Os dados para o cálculo das TEL<sub>50</sub> foram avaliados através de um programa computacional produzido exclusivamente para este fim.

Para as análises estatísticas e confecção de gráficos foram utilizados os programas computacionais Excel e Systat.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo está dividido em 6 sub-capítulos, apresentados como artigos para facilitar a leitura e posterior publicação.

### 4.1. SENSIBILIDADE DE DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO DO PIRALÍDEO *Anagasta kühniella* ZELLER (1879) À RADIAÇÃO DE MICROONDAS.

#### Introdução

O emprego da radiação eletromagnética na faixa de microondas (300 a 300.000 MHz) como possível método de controle físico de infestações por insetos em ambientes destinados à conservação de sementes e alimentos, como silos e armazéns, vem sendo estudado desde o início do século XX (Webber *et al.*, 1946; Nelson & Kantack, 1966; Nelson, 1973). A utilização deste método possui diversas vantagens sobre os métodos químicos de controle de pragas por não produzir resíduos tóxicos, ter pouca probabilidade de provocar resistência e pela multifuncionalidade do um gerador deste tipo de radiação na área agrícola (Nelson & Kantack, 1966; Nelson, 1987; Hurlock *et al.* 1979). Além disso, por não ser uma fonte contínua de radiação e não entrar em contato direto com o operador, seu manuseio é mais seguro que o de produtos químicos, como os agrotóxicos, ou de fontes de radiação ionizante. Tal quesito é fundamental para um país onde a mão de obra ligada às atividades agrícolas é muito pouco qualificada.

Com o desenvolvimento tecnológico na área de produção de fontes geradoras de microondas torna-se cada vez mais viável o seu emprego, inclusive já existindo o aparelho patenteado nos Estados Unidos (Tilton e Vardell, 1982 a, b). Entretanto, estudos sobre as relações entre os insetos e as microondas são de extrema importância para a análise de seu emprego em programas de manejo integrado de pragas de uma maneira ecologicamente segura e economicamente viável. A análise das respostas dos insetos à radiação de microondas permite que se estabeleçam as condições básicas para seu uso e estimativas das condições necessárias para a garantia da total desinfecção do material.

Vários trabalhos analisaram a sensibilidade de algumas espécies de insetos pragas de ambientes de armazenagem, solo, madeira e tecidos, às microondas e os vários fatores físicos e biológicos que influenciam as respostas à radiação (Headlee & Jobbins, 1938; Webber *et al.*, 1946; Nelson & Kantack, 1966; Rai *et al.*, 1972; Nelson, 1973; Nelson & Stetson, 1974; Watters, 1976; Hurlock *et al.*, 1979; Reagan *et al.*, 1980; Del Estal *et al.*, 1986; Locatelli & Traversa, 1989; Halverson, 1996; Lewis & Haverty, 1996). Estes apontaram para a existência de diferenças tanto interespecíficas quanto intraespecíficas, além daquelas devidas à interações com o meio hospedeiro e com fatores físicos associados à fonte geradora de radiação (Frings, 1952; Locatelli & Traversa, 1989).

Este estudo têm como objetivo avaliar e analisar a sensibilidade de diferentes fases de desenvolvimento (ovos, larvas de terceiro estágio, larvas de último estágio e adultos) do piralídeo praga de produtos armazenados, *Anagasta kühniella*, à radiação direta de microondas (2.450 MHz), fornecendo os dados básicos sobre suas respostas biológicas.

## Material & Métodos

Para os bioensaios foram utilizados ovos com 24 horas de idade, larvas de terceiro estágio, larvas de último estágio e adultos com 24 horas de emergência. Cada tratamento constou de aplicação de radiação por um tempo previamente estabelecido (ver pág. 36). Com exceção de estágio de ovo, no qual cada repetição contou com 50 indivíduos, em todos os demais estágios foram expostos à radiação de microondas, 25 indivíduos por repetição. Em todos os tratamentos foram feitas 4 repetições. Separaram-se 100 indivíduos de cada estágio como testemunha em cada bioensaio.

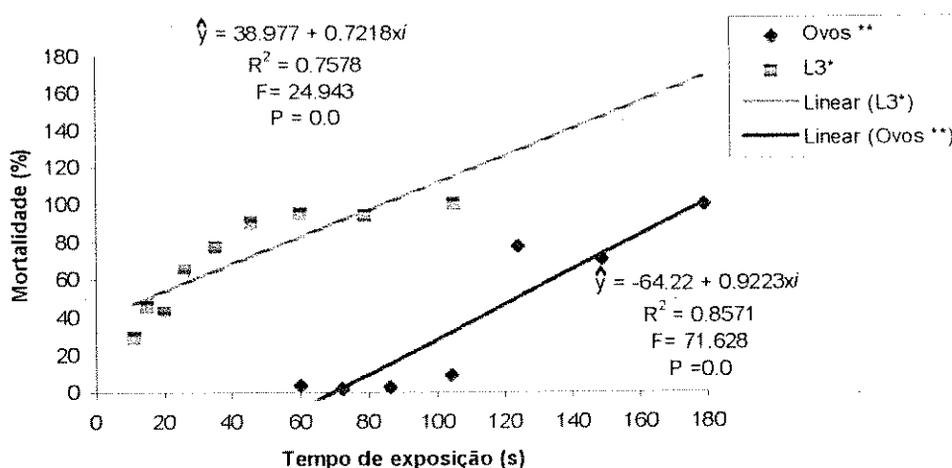
Os indivíduos de cada uma das repetições foram distribuídos dentro de 2 placas de vidro (13 de diâmetro x 1,7 cm de altura) fechadas com fita crepe. Antes de serem submetidos à radiação, o conjunto de placas contendo os insetos, foi deixado durante 10 minutos em estufa BOD a  $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  para que a temperatura corporal inicial destes fosse a mesma, garantindo maior homogeneidade nas respostas à exposição das diferentes fases de desenvolvimento do piralídeo (Harrison, 1980). A metodologia da exposição encontra-se no capítulo 3 (pág.35).

Após a aplicação da radiação, os indivíduos tratados foram retirados da placa. As larvas e ovos foram transferidos para placas de Petri (8,5 cm de diâmetro) enquanto os adultos foram colocados em frascos de vidro (18,0 cm de altura). Todos os recipientes foram então devolvidos à estufa BOD ( $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

A mortalidade de larvas e adultos foi verificada 30 minutos e 24 horas após o tratamento com a radiação enquanto nos ovos o parâmetro que serviu como indicador do impacto letal das microondas foi a sua viabilidade.

## Resultados & Discussão

Pode-se observar que em todas as fases de desenvolvimento do piralídeo avaliadas neste trabalho encontra-se uma relação positiva entre o tempo de exposição e a mortalidade (Figuras 1 e 2). Com o aumento do tempo de exposição à radiação, o material biológico é submetido a uma maior exposição ao campo eletromagnético e conseqüentemente a um maior aquecimento, chegando progressivamente mais perto da faixa de aquecimento corpóreo letal, resultando em aumentos no nível de mortalidade.



L3 = larvas de terceiro estágio

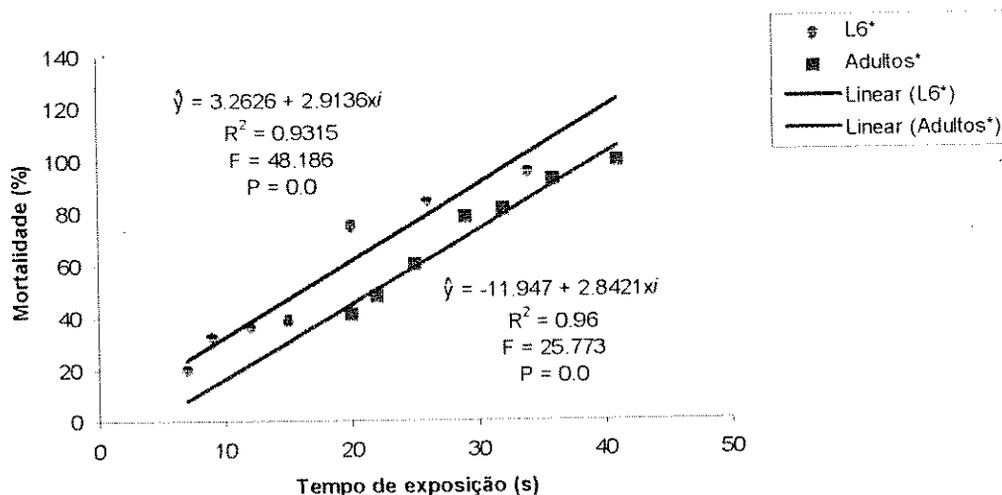
\* n = 25/repetição; 4 repetições/tratamento

\*\* n = 50/repetição; 4 repetições/tratamento

**Figura 1.** Relação linear entre mortalidade e tempo de exposição a microondas (2.450 MHz) em larvas de terceiro estágio e ovos de *Anagasta kühniella*.

Observou-se, através dos valores de TEL<sub>50</sub>, a existência de um gradiente de sensibilidade à microondas entre os diversos níveis avaliados de desenvolvimento do piralídeo (larvas de último estágio > larvas de terceiro estágio > adultos > ovos) (Tabela 1). Estas diferenças se devem a fatores físicos, químicos e biológicos como a constante dielétrica, a condutividade, o

conteúdo de água, a forma, a presença de apêndices e o tamanho dos indivíduos irradiados, os quais podem variar entre os diferentes estádios/estágios.



L6 = larvas de 6<sup>o</sup> estágio;  
 \*n = 25/repetição; 4 repetições/ tratamento

**Figura 2.** Relação linear entre mortalidade e tempo de exposição a microondas (2.450 MHz) em larvas de último estágio e adultos de *Anagasta kühniella*.

Os ovos mostraram uma resistência significativamente maior que a encontrada nos demais estágios de desenvolvimento do piralídeo. Já as larvas de terceiro e último estádios apresentam intervalos de confiança sobrepostos, o que indica que a diferença de sensibilidade não é significativa. A TEL<sub>50</sub> das larvas de último estágio foi menor em relação às de terceiro estágio provavelmente devido ao tamanho e conteúdo de água maiores, o que proporcionaria condições chegar ao nível de aquecimento letal mais rapidamente.

As larvas de terceiro estágio e adultos também tiveram seus respectivos intervalos de confiança das TEL<sub>50</sub> sem diferenças significativas.

Entretanto, observou-se diferença significativa entre os intervalos das TEL<sub>50</sub> de larvas de último estágio e adultos, sendo este último estágio de desenvolvimento mais resistente.

**Tabela 1.** Valores do tempo de exposição letal mediano (TEL<sub>50</sub>) para diferentes fases de desenvolvimento de *Anagasta kühniella* submetidas à radiação de microondas.

	Fase do desenvolvimento			
	L6*	L3*	Adultos*	Ovos*
TEL <sub>50</sub>	15,63s	19,34s	22,61s	121,67s
Limite inferior	13,03s	14,08s	20,19s	115,68s
Limite superior	18,74s	26,57s	25,32	127,98s

Legenda: L6= larvas de último estágio; L3= larvas de terceiro estágio  
 \* n=25 indivíduos / repetição; 4 repetições por tratamento  
 intervalo de confiança calculado com P=95%

Gradientes de resposta, como os apresentados neste trabalho, já foram evidenciados para outras espécies de insetos (Watters, 1976). Baker *et al.* (1956) trataram *Tribolium confusum* Duv. (Coleoptera: Tenebrionidae) com microondas (2.450 MHz) em meio a farinha de trigo integral e observaram que o estágio de ovo mostrava-se mais resistente que larvas e adultos. Tateya & Takano (1977, apud Del Estal *et al.*, 1986) observaram que larvas de *T. confusum*, tratadas com microondas em meio de farinha de trigo, eram muito mais sensíveis à radiação que os outros estágios de desenvolvimento. O mesmo foi feito para *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) em meio a trigo e foi constatado o mesmo fenômeno. Nelson (1973) oferece um quadro com vários estudos sobre a sensibilidade de várias espécies de coleópteros pragas primárias e

secundárias de grãos ou subprodutos a várias frequências de microondas e em vários meios hospedeiros onde pode-se observar os gradientes de sensibilidade. Neste, um exemplo interessante é relacionado às larvas de *Tribolium confusum* que ao ser exposto a radiação de microondas (11 e 90 MHz) em farinha alcançam 100% de mortalidade em temperaturas menores que os adultos, enquanto quando expostos a frequências maiores (2450 MHz) o estágio adulto é o mais sensível, mostrando que a sensibilidade a radiação é dependente da frequência.

Reagan *et al.* (1980) estudando o controle de *Tineola bisselliella* (Humm.) (Lepidoptera: Tineidae) em lã e itens relacionados, através de microondas (2.450 MHz), verificaram que os ovos deste lepidóptero também eram, de maneira geral, menos sensíveis à radiação que larvas e adultos. Os ovos precisaram ser irradiados por mais de 3 minutos para atingir 50% de mortalidade enquanto este mesmo nível de impacto foi alcançado nas larvas em 1 min e 30 s e em pouco menos de 1 min nos adultos, fornecendo o seguinte gradiente de sensibilidade: adultos > larvas > ovos. Entretanto, a mortalidade das larvas foi verificada apenas uma vez e num período muito curto após a exposição (1h), o que pode sugerir que os valores de mortalidade para larvas de *T. bisselliella* foram subestimados, já que pode-se observar durante a execução deste trabalho que a mortalidade acumulada nas 24 horas que seguem a exposição à radiação segue aumentando (Tabela 2). O efeito danoso da radiação, principalmente em exposições subletais causam danos fisiológicos ao inseto, os quais levam algum tempo para se manifestarem totalmente e provocarem a morte dos indivíduos (Lambert, 1980). Nelson & Kantack (1966), trabalhando com coleópteros pragas de grãos, também registraram e chamaram a atenção para o efeito da mortalidade acumulada após o tratamento com microondas.

**Tabela 2.** Mortalidade acumulada em larvas de último estágio de *Anagasta kühniella* submetidas a tempos de exposição subletais à radiação de microondas, 30 min e 24 horas após o tratamento.

Tempo de exposição (s)	Mortalidade média acumulada (%) ± E.P. após	
	30 min	24 horas
7	8,0 ± 1,633	15,0 ± 3,00
9	21,0 ± 4,12	29,0 ± 1,92
12	32,0 ± 5,89	34,0 ± 5,29
15	40,0 ± 7,30	49,0 ± 6,61
20	65,0 ± 4,12	75,0 ± 3,00
26	79,0 ± 3,79	84,0 ± 1,63
34	94,00 ± 2,00	95,0 ± 1,92

n= 25/repetição; 4 repetições para cada tempo de exposição.  
E.P. = erro padrão

## Conclusões

Observou-se uma relação positiva entre o aumento do tempo de exposição e a mortalidade em todos os estágios de desenvolvimento avaliados de *Anagasta kühniella*.

Existe um gradiente de sensibilidade entre os níveis de desenvolvimento do piralídeo (larvas de último estágio > larvas de terceiro estágio > adultos > ovos), provavelmente decorrente de diferenças físico-químicas.

## 4.2. INFLUÊNCIA DO ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO NA SENSIBILIDADE DOS OVOS DE *Anagasta kühniella* ZELLER (1879) À MICROONDAS.

### Introdução

A sensibilidade dos insetos à radiação de microondas está condicionada a uma série de fatores físicos e biológicos. Sabe-se que o nível de desenvolvimento dentro de um mesmo estágio de vida pode influir nas respostas a fatores de mortalidade, incluindo a radiação, devido às variações na composição físico-química e estrutural do inseto, assim como devido às variações comportamentais (Nelson, 1973 ; Habib, 1983; Del Estal *et al.*, 1986).

O impacto de alguns tipos de radiações, como ultra violeta, frequências de rádio, microondas e gama, atuando e interferindo no desenvolvimento de ovos de insetos, já foi comprovada em vários estudos. No caso das frequências de rádio, observou-se que a interferência pode tanto ser negativa quanto positiva, dependendo para isso do impacto da exposição. Whitney *et al.* (1961) e Nelson & Kantack (1966) observaram em seus estudos que exposições moderadas a campos elétricos de frequências de rádio podem aumentar a eclosão de ovos de *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) e *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae), enquanto exposições mais severas podem chegar a causar mortalidade de 100% dos ovos. Rai *et al.* (1972), estudando os efeitos letais das frequências de rádio em ovos de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), mencionam ter observado que os ovos de 1 dia de idade são mais sensíveis que os de 3 dias. A radiação afetou mais severamente os embriões ainda no primeiro estágio de formação (1 dia), porém

mesmo nos ovos expostos aos 3 dias de idade houve diferenças histológicas em relação à testemunha.

O objetivo deste trabalho foi analisar o impacto das microondas (2.450 MHz) na eclosão de ovos do piralídeo *Anagasta kühniella* em dois estágios de desenvolvimento embrionário, verificando se há possibilidade desta radiação estimular a eclosão em exposições a tempos subletais, se o estágio de desenvolvimento embrionário interfere na resposta à radiação e se as larvas emergentes apresentam algum tipo de anomalia devido ao tratamento dos ovos.

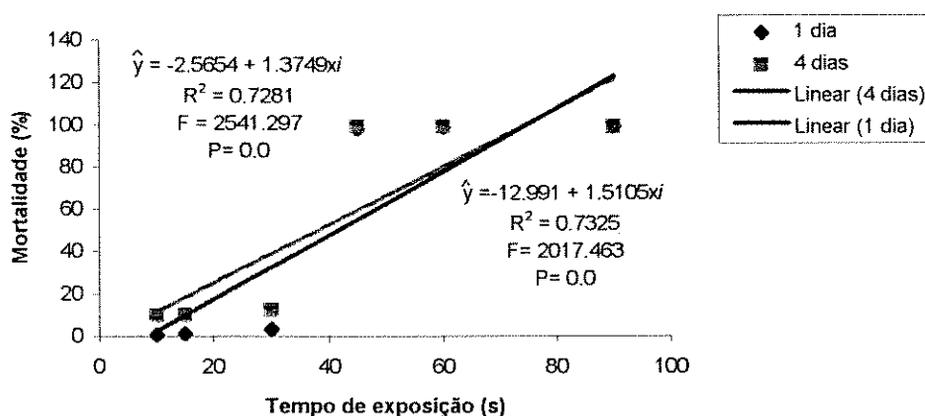
## Material & Métodos

Ovos de *Anagasta kühniella*, de mesma idade, foram separados em lupa estereoscópica e avaliados quanto a sua resposta à radiação de microondas em 2 diferentes estágios de desenvolvimento embrionário (1 dia e 4 dias). Em cada estágio foram feitos 6 tratamentos, cada um consistindo num tempo de exposição previamente estabelecido (10, 15, 30, 45, 60 e 90 segundos) e tendo três repetições. Em cada repetição foram expostos 100 ovos, distribuídos centralmente sobre um recorte circular de pano (algodão), o qual foi também centralizado na placa de vidro (13 de diâmetro X 1,7 cm de altura). A placa foi colocada sobre um suporte de plástico redondo (2 cm de altura) para evitar o contato direto com o prato giratório. Após a exposição, o pano foi retirado da placa e passado para uma placa de Petri devidamente numerada e devolvida à estufa BOD ( $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Foram separadas três placas, com 100 ovos cada, para servirem como testemunha do bioensaio. Um dia antes da eclosão dos ovos, flocos de germe de trigo foram distribuídos pelas placas para evitar que as larvas recém eclodidas canibalizassem os ovos que ainda estivessem por eclodir.

Observou-se as características morfológicas das larvas de primeiro estágio que eclodiram dos ovos tratados para se verificar alguma possível seqüela do tratamento físico. A porcentagem de mortalidade foi corrigida pela fórmula de Abbott (1925).

## Resultados & Discussão

Observou-se que os ovos nos dois estágios de desenvolvimento embrionário avaliados apresentaram uma relação positiva entre o aumento no tempo de exposição e a porcentagem de mortalidade (Figura 1).



n= 100 ovos/ repetição; 3 repetições/ tratamento

**Figura 1.** Relação linear entre a mortalidade de ovos em dois estágios de desenvolvimento embrionário e o tempo de radiação de microondas.

Rai *et al.* (1972) também encontraram este tipo de relação entre mortalidade e tempo de exposição em ovos de *Tenebrio molitor*, submetidos a tratamentos com ondas eletromagnéticas na faixa de frequências de rádio.

A análise de variância (ANOVA) realizada para cada um dos diferentes estágios de desenvolvimento embrionário avaliados (1 e 4 dias), comprovou uma diferença altamente significativa entre os diferentes tratamentos ( $F=2541.297$ ,  $P=0.0$  e  $2017.463$ ,  $P=0.0$ , respectivamente). Podem-se observar 2 níveis de impacto da radiação nos ovos (Tabela 1). O primeiro nível resulta em porcentagens de mortalidade média abaixo de 50%, caracterizando a faixa subletal de resposta à radiação. Esta abrange os tratamentos de 10, 15 e 30 segundos de exposição a microondas, os quais não apresentam diferença significativa entre si (Tabelas 2 e 3). Já o segundo nível de resposta dos ovos à radiação é o letal, onde a mortalidade média é superior a 50%. Este abrange os tratamentos de 45, 60 e 90 segundos de exposição. Neste nível também não se observaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

**Tabela 1:** Mortalidade (%) em ovos de *Anagasta kühniella* de diferentes tempos de desenvolvimento embrionário submetidos à microondas .

Tempo de exposição (s)	Mortalidade média (%) $\pm$ E.P. para ovos de <i>Anagasta kühniella</i> de diferentes idades	
	1 dia	4 dias
10	0,33 $\pm$ 0,67	9,33 $\pm$ 0,88
15	1,00 $\pm$ 1,15	9,67 $\pm$ 1,45
30	3,00 $\pm$ 1,73	12,33 $\pm$ 2,03
45	97,67 $\pm$ 1,33	99,0 $\pm$ 0,0
60	98,67 $\pm$ 0,33	99,0 $\pm$ 0,0
90	99,0 $\pm$ 0,0	99,0 $\pm$ 0,0

n= 100 ovos/ repetição; 3 repetições/ tratamento. E.P = erro padrão

**Tabela 2.** Matriz de comparação de probabilidade de diferenças entre pares de tratamentos, obtida pelo teste de Tukey para ovos de 1 dia de idade submetidos a radiação de microondas \*.

	10 s	15 s	30 s	45 s	60 s	90 s
10 s	1,000					
15 s	0,997	1,000				
30 s	0,506	0,758	1,000			
45 s	0,000	0,000	0,000	1,000		
60 s	0,000	0,000	0,000	0,982	1,000	
90 s	0,000	0,000	0,000	0,941	1,000	1,000

\* existe diferença significativa entre pares onde a probabilidade é menor que 0,05.

**Tabela 3.** Matriz de comparação de probabilidade de diferenças entre pares de tratamentos, obtida pelo teste de Tukey para ovos de 4 dias de idade submetidos a radiação de microondas \*.

	10 s	15 s	30 s	45 s	60 s	90 s
10 s	1,000					
15 s	1,000	1,000				
30 s	0,413	0,530	1,000			
45 s	0,000	0,000	0,000	1,000		
60 s	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	
90 s	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000

\* existe diferença significativa entre pares onde a probabilidade é menor que 0,05.

Não se observou nenhum indício de que as microondas agissem incrementando positivamente a eclosão. A mortalidade média das testemunhas foi de 1%, inferior a todos os tratamentos realizados nos ovos dos dois estágios de desenvolvimento. Entretanto, não se encontrou diferença significativa entre a mortalidade dos ovos da testemunha e os ovos de 1 dia de idade tratados faixa de tempo entre 10 e 30 segundos ( $t < 4,303$ ). Por outro lado, a

mortalidade dos ovos de 4 dias de idade expostos a estes mesmos tempos de radiação à microondas diferiu significativamente da mortalidade da testemunha ( $t > 4,303$ ), evidenciando o impacto mais efetivo da radiação neste estágio de desenvolvimento embrionário dos ovos do piralídeo.

A análise comparativa da mortalidade nos dois estágios de desenvolvimento embrionário, obtida em cada tempo de exposição, também indicou que de maneira geral, os ovos de 4 dias de idade do piralídeo, tratados com as microondas em tempos subletais de exposição e mostraram-se significativamente mais sensíveis à radiação que os tratados com 1 dia de idade. Foram encontradas diferenças significativas entre os dois estágios de desenvolvimento quando submetidos aos tratamentos de 10 segundos ( $t= 5,892$ ) e 30 segundos ( $t= 5,292$ ). Nos demais tratamentos não se verificou a ocorrência de diferenças significativas entre os dois estágios. No que se refere às exposições letais, a inexistência de diferenças na eclosão nos dois diferentes estágios deve-se, provavelmente, ao forte impacto da radiação, a qual em poucos segundos pode ocasionar uma expressiva elevação de temperatura levando os embriões à morte independentemente do seu estágio de desenvolvimento.

Pode-se observar que os ovos não viáveis, em ambos os estágios de desenvolvimento, mostraram sinais de dessecação, ficando escuros e enrugados.

As larvas que eclodiram dos ovos tratados foram observadas e não apresentaram nenhum indício de alteração morfológica, o que nos leva a crer que a frequência de microondas usada neste trabalho não tem ação teratogênica sobre os ovos.

## Conclusões

Encontraram-se diferenças significativas quanto ao impacto de microondas nos diferentes estágios de desenvolvimento avaliados quando usado tempos de exposição subletais (10 e 30 segundos). Os ovos de 4 dias demonstraram ser mais sensíveis à radiação que os de 1 dia de idade. Já no caso das exposições letais não houve indício de diferenças na eclosão nos dois diferentes estágios.

As larvas que eclodiram dos ovos tratados com radiação não portavam nenhum tipo de alteração morfológica.

### 4.3. INTERFERÊNCIA DO MEIO NA SENSIBILIDADE DE LARVAS DE ÚLTIMO ESTÁDIO DE *Anagasta kühniella* À RADIAÇÃO DE MICROONDAS E SINTOMATOLOGIA EXTERNA EM LARVAS E ADULTOS IRRADIADOS.

#### Introdução

As interações entre os insetos e o meio onde se encontram são de extrema importância no que se refere à sensibilidade daqueles à radiações (Pyenson, 1933). O meio pode tanto proporcionar um refúgio ao inseto, protegendo-o da ação do campo eletromagnético formado pela radiação, quanto acelerar o processo de aquecimento dependendo de suas propriedades físicas e do modo como o inseto se encontra nele. Sabe-se que no caso de insetos que se desenvolvem dentro de materiais biológicos como os grãos, estes os protegem, o que geralmente torna os estágios larval e pupal muito mais resistentes que o de adultos, já que estes estão fora dos grãos e conseqüentemente mais expostos (Nelson, 1973). Já aquelas espécies que se encontram em meios bons absorvedores de energia, como as farinhas, tornam-se bastante vulneráveis em todos os estágios de desenvolvimento quando compara-se com a categoria anterior (Pyenson 1933; Locatelli & Traversa, 1989).

O objetivo deste estudo é comparar e avaliar a sensibilidade de larvas de último estágio de *Anagasta kühniella* quando irradiadas com microondas em duas diferentes situações;

1. diretamente expostas, sem a interferência de nenhuma substância além do ar;
2. cercadas por farinha de trigo integral, simulando uma situação real no produto infestado.

Além disso, buscou-se dados sobre a sintomatologia externa dos efeitos adversos da radiação sobre adultos e larvas de *Anagasta kühniella*.

## Material & Métodos

Para os dois blocos de bioensaio, com e sem farinha de trigo integral, foram utilizadas larvas de último estágio (25 indivíduos em cada uma das 4 repetições) obtidas da criação estoque do pirálídeo. Estas foram expostas à radiação de microondas dentro de 2 bases de placas de Petri (13cm de diâmetro x 1,7 cm de altura) fechadas com fita crepe. No bloco exposto em meio de farinha utilizou-se 25 g deste produto espalhado pela placa. Foram separados 200 indivíduos deste estágio como testemunha dos bioensaios, 100 colocados em farinha e 100 deixados diretamente na placa de Petri. Antes de serem submetidos à radiação, o conjunto de placas, contendo os insetos, foi deixado durante 10 minutos em estufa BOD a  $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$  C. Os tempos de exposição para as larvas expostas diretamente foram 7, 9, 12, 15, 20, 26 e 34 segundos. Já para as larvas tratadas em meio de farinha estes corresponderam a exposições de 10, 12, 15, 19, 23, 28 e 35 segundos. A metodologia de exposição consta na página 35.

Para estabelecer os tempos de exposição letais medianos (TEL<sub>50</sub>) dos tratamentos, usaram-se as recomendações para a aplicação da fórmula de Thompson (1947) e adaptada por Habib (1982; 1986).

Para os estudos sintomatológicos das alterações causadas às larvas pela radiação, foram examinadas as mesmas larvas tratadas nos dois blocos mencionados acima. As observações, neste caso, foram feitas até a morte das larvas ou até a mudança de estágio.

## Resultados & Discussão

Observou-se um aumento da mortalidade larval, variando em função do aumento do tempo de exposição ao campo eletromagnético formado pelas microondas tanto nos testes feitos com a radiação direta quanto naqueles realizados com as larvas inseridas em meio de farinha de trigo integral (Tabelas 1 e 2)

**Tabela 1.** Mortalidade média (%), das diferentes repetições, e erro padrão (E.P.) para larvas de último estágio de *Anagasta kühniella* submetidas a diferentes tempos de exposição a radiação direta de microondas.

Tempo de exposição (s)	Mortalidade Média $\pm$ E.P.
7	15 $\pm$ 3.00
9	29 $\pm$ 1.92
12	36 $\pm$ 3.65
15	49 $\pm$ 6.61
20	75 $\pm$ 3.00
26	84 $\pm$ 1.63
34	95 $\pm$ 1.92

n= 25/repetição; 4 repetições/tratamento  
E.P.= erro padrão

**Tabela 2.** Mortalidade média (%), das diferentes repetições, e erro padrão (E.P.) para larvas de último estágio de *Anagasta kühniella* submetidas a diferentes tempos de exposição a radiação em meio de farinha de trigo integral.

Tempo de exposição (s)	Mortalidade Média $\pm$ E.P.
10	24 $\pm$ 4.00
12	22 $\pm$ 10.39
15	33 $\pm$ 3.86
19	60 $\pm$ 5.88
23	85 $\pm$ 3.42
28	95 $\pm$ 1.92
35	97 $\pm$ 3.00

n= 25/repetição; 4 repetições/tratamento; E.P.= erro padrão

Há indicação de que a quantidade de dieta de farinha de trigo integral utilizada neste trabalho não interferiu na resposta das larvas de último estágio à radiação, pois não houve diferença significativa entre os dois tratamentos (com e sem farinha). Os intervalos de confiança onde se encontram as respectivas TEL<sub>50</sub> apresentam uma elevada sobreposição (Tabela 03).

**Tabela 3.** Tempos de Exposição Letais Medianos (TEL<sub>50</sub>) e seus respectivos limites de confiança para larvas de último estágio (L6) de *Anagasta kühniella* submetidas à radiação de microondas diretamente e em meio de farinha de trigo integral.

	L6 direta	L6 em farinha
TEL <sub>50</sub>	15,63	16,28
Limite Inferior	13,03	14,73
Limite Superior	18,75	18,02

intervalo de confiança P=95%

Diferentemente do que se observa em exposições à radiação de microondas em insetos que se desenvolvem dentro de grãos, a farinha de trigo integral, que é o meio que envolve a praga neste trabalho, não atua como obstáculo à penetração das microondas. As farinhas são consideradas como material bom absorvedor de energia, o que garante um aquecimento sem interferência bloqueadora dos insetos que as infestam (Pyenson, 1933; Baker *et al.*, 1956). Todos os estágios de desenvolvimento da praga estão expostos à radiação, o que provavelmente acarretará em maior índice de mortalidade quando comparados a insetos em grãos.

As alterações morfológicas e comportamentais causadas pela exposição às microondas se devem, provavelmente, ao grande aquecimento do corpo do inseto. Um fenômeno bastante característico nos insetos durante a

exposição à radiação de microondas é conhecido como "knockdown", no qual os apêndices, principalmente as juntas das pernas, sofrem uma ação mais intensa do campo eletromagnético formado a sua volta e causam a queda de inseto e distúrbios no sistema neuromuscular locomotor (Frings, 1952; Whitney *et. al.* 1961). Alguns adultos perdem completamente a capacidade locomotora, permanecendo no fundo do frasco até a morte. Mas, mesmo assim, pode-se observar que as fêmeas neste estado mantiveram a capacidade de oviposição. Também observou-se um batimento intenso das asas nos adultos e uma movimentação intensa nas larvas durante a exposição, mecanismos provavelmente ligados a tentativas de dissipação do calor corporal. Após a exposição à radiação, os indivíduos, principalmente aqueles sobreviventes de exposição a tempos letais, apresentaram-se letárgicos.

Foram observados sintomas externos em larvas de *Anagasta kühniella*, após o tratamento com os diversos tempos de exposição a microondas, tais como:

- em tempos subletais de exposição, as larvas mais atingidas apresentaram enrijecimento (endurecimento) após a exposição e, posteriormente, na maioria dos casos, observou-se o escurecimento gradual de seu tegumento;
- em tempos letais, houve a dessecação durante a exposição, ficando a larva completamente ressecada e enrugada.

Todas as larvas que não morreram até 24 horas após a exposição à radiação chegaram ao estágio de pupa.

## Conclusões

As larvas de *Anagasta kühniella* em ambos os bioensaios apresentaram um aumento gradual da mortalidade em relação ao aumento do tempo de exposição.

Não se observou diferença significativa entre as larvas expostas diretamente e em meio de farinha de trigo integral à radiação, nas condições experimentais

Os sintomas apresentados após a exposição à radiação variaram em função do impacto da exposição. Observou-se desde letargia, disfunção do sistema locomotor até dessecação, escurecimento do tegumento e morte.

#### 4.4. EFEITOS DA RADIAÇÃO DE MICROONDAS (2.450 MHz) NA LONGEVIDADE E NA REPRODUÇÃO DE ADULTOS DE *Anagasta kühniella* ZELLER (1879) SOBREVIVENTES DA EXPOSIÇÃO.

##### Introdução

O controle de pragas de grãos e alimentos armazenados através de aquecimento dielétrico, como o gerado por frequências na faixa de microondas, é altamente viável, atendendo as necessidades de uma tecnologia limpa e segura para a manutenção de estoques alimentares por longos tempos (Hurlock *et al.*, 1979; Nelson, 1987).

O efeito letal da radiação de microondas nos insetos é provavelmente causado pelo rápido aumento da temperatura corporal dos insetos no processo de exposição ao campo eletromagnético (Nelson, 1973). Porém, existe também a possibilidade da radiação, quando aplicada em tempos subletais, causar danos fisiológicos. Lambert (1980) indica dois tipos de mecanismos de interação entre as microondas e os organismos vivos: o térmico e o não térmico. O primeiro geraria hipertermia e outras respostas biológicas em níveis elevados de exposição, já o segundo seria responsável por efeitos em estruturas moleculares, os quais resultariam em distúrbios metabólicos ou funcionais no nível celular. Sabe-se que as microondas, com seu longo comprimento de onda, são mais eficazes na produção de calor em tecidos mais profundos, como gônadas, que em tecidos superficiais (Salisbury *et al.*, 1949). Sistemas e órgãos do corpo com maior conteúdo de água também estariam mais sujeitos a sofrerem os efeitos danosos da radiação (Lambert, 1980).

Na literatura, os estudos sobre os efeitos das microondas nos insetos geralmente dão ênfase somente aos efeitos letais da radiação, pouco se sabe dos efeitos crônicos que podem ser causados em exposições subletais. Nelson (1973) apresenta uma revisão onde cita que alguns autores observaram que determinados tratamentos com ondas na faixa de frequências de rádio podem ter impacto negativo na capacidade reprodutiva dos insetos.

O objetivo deste estudo é avaliar os possíveis danos causados pelas microondas (2.450 MHz) na capacidade reprodutiva e na longevidade de adultos do piralídeo *Anagasta kühniella*.

### **Material & Métodos**

Para os bioensaios foram utilizados adultos com 24 horas de idade. Estes foram expostos à radiação de microondas, dentro de 2 bases de placas de Petri de vidro (13 de diâmetro x 1,7 cm de altura), fechadas com fita crepe. Cada tratamento foi equivalente a um tempo de exposição previamente determinado (20, 22, 25, 29, 32 e 36 segundos) (ver página 36). Para cada tratamento foram expostos 100 indivíduos, subdivididos em quatro repetições, com 25 adultos cada. Foram separados 25 indivíduos deste estágio, com a mesma idade, como testemunha nos bioensaios. A exposição seguiu a metodologia abordada no capítulo 3 (pág. 35).

Após o tratamento, os adultos de cada repetição foram transferidos para um frasco de vidro (7,5 de diâmetro x 18,0 cm de altura), fechado com malha sintética e elástico, e internamente envolto com papel para evitar que os ovos ficassem aderidos às suas paredes. Tais frascos foram posicionados, com a abertura para baixo, em um suporte cônico de plástico sobre uma placa de Petri, para o acasalamento e oviposição. Os ovos foram recolhidos das placas

diariamente, contados e separados em placas numeradas, as quais permaneceram em estufa BOD ( $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) até a eclosão. Os adultos também foram observados diariamente, sendo que os mortos eram retirados do frasco e sexados. A sexagem não precedeu o teste para se evitar que os indivíduos perdessem escamas e apêndices ou sofressem um estresse desnecessário, o qual poderia interferir nos resultados do bioensaio.

## Resultados & Discussão

Pôde-se observar que a mortalidade nos adultos de *Anagasta kühniella* imediatamente após o tratamento variou em função do tempo de exposição à radiação de microondas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Mortalidade média imediata em adultos de *Anagasta kühniella* submetidos a diferentes tratamentos de exposição a microondas.

Tempo de exposição (s)	Média (%) $\pm$ E. P.
20	14 $\pm$ 1.16
22	18 $\pm$ 4.76
25	58 $\pm$ 8.41
29	63 $\pm$ 3.78
32	71 $\pm$ 6.61
36	78 $\pm$ 4.76

n= 25 indivíduos/repetição; 4 repetições/ tratamento  
E.P. = erro padrão

Apesar de quatro gerações de diferença, o  $\text{TEL}_{50}$  obtido para os adultos neste estudo ( $\text{TEL}_{50} = 26,094$  s; limite inferior: 23,92 s ; limite superior: 28,46 s) não apresentou diferença significativa do obtido no sub-capítulo 4.1

(TEL<sub>50</sub> = 22,61 s), estando localizado dentro dos limites de confiança deste último (limite inferior: 20,19 s; limite superior: 25,32 s).

Em relação ao impacto na capacidade reprodutiva, observaram-se variações no número médio de ovos / fêmea entre os diversos tratamentos (Tabela 2). A análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a este parâmetro indicou a existência de diferença significativa entre os tratamentos e entre estes e a testemunha ( $F = 21,506$ ;  $P = 0,0$ ) (Tabela 3).

**Tabela 2.** Número médio de ovos depositados por fêmea, em diferentes tratamentos de exposição a microondas.

Tempo de exposição (s)	número total de fêmeas do tratamento	número médio de ovos / fêmea (%) ± Erro padrão	Mínimo	Máximo
20	51	62,42	50,36	80,82
22	46	91,56	26,83	140,00
25	50	23,64	9,85	51,53
29	52	13,48	1,19	21,64
32	46	25,24	0,00	48,67
36	46	1,04	0,00	3,62

**Tabela 3.** Análise de variância da média do número de ovos por fêmea de *Anagasta kühniella* sobreviventes à exposição à radiação de microondas.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	P
entre tratamentos	66556,573	6	11092,762	21,506	0,000
Erro	9284,370	18	515,798		

O teste de Tukey localizou diferenças significativas entre a testemunha e todos os tratamentos, entre o tratamentos de 20 segundos e o de 36 segundos e entre o de 22 segundos e todos os demais. O impacto dos tratamentos em relação à testemunha, onde o número médio de ovos por fêmea foi de 248,92, é bastante expressivo. Mesmo as exposições a tempos subletais (20 e 22 segundos) chegaram a diminuir o número médio de ovos por fêmea cerca de, no mínimo, 2 vezes. Sendo assim, pode-se considerar que a radiação de microondas, na frequência avaliada, interfere direta e significativamente no potencial reprodutivo de adultos do piralídeo.

**Tabela 4.** Matriz de comparação de probabilidade de diferenças entre pares de tratamentos, obtida pelo teste de Tukey, para o número médio de ovos/ fêmea de *Anagasta kühniella* submetidas a microondas \*.

	testemunha	20 s	22 s	25 s	29 s	32 s	36 s
testemunha	1,000						
20 s	0,000	1,000					
22 s	0,000	0,556	1,000				
25 s	0,000	0,248	0,008	1,000			
29 s	0,000	0,082	0,002	0,995	1,000		
32 s	0,000	0,289	0,009	1,000	0,989	1,000	
36 s	0,000	0,018	0,001	0,791	0,985	0,738	1,000

\* existe diferença significativa entre pares onde a probabilidade é menor que 0,05.

Tais resultados coincidem com os obtidos por Whitney *et al.* (1961). Estes observaram que adultos de duas espécies de coleópteros pragas de grãos armazenados, sobreviventes de exposições a frequências de rádio (39 MHz) eram capazes de continuar se reproduzindo. No entanto, os tratamentos mais severos interferiram na capacidade reprodutiva, diminuindo a progênie de ambas as espécies. Nelson (1973) também relata que algumas espécies de brocas de grãos têm sua capacidade reprodutiva afetada quando submetidas a tratamentos de frequências de rádio que causam mais de 50% de mortalidade.

A viabilidade dos ovos colocados por fêmeas tratadas com diferentes tempos de radiação de microondas, apesar das aparentes diferenças numéricas, não diferiu significativamente ( $F= 1,7552$ ;  $P= 0,114$ ) O mesmo observou-se na comparação entre os ovos das fêmeas tratadas e os obtidos a partir da testemunha. Tal fato leva-nos a crer que a radiação não interfere na capacidade de eclosão dos ovos (Tabela 5). Aliás, estes dados coincidem coerentemente com os apresentados no sub-capítulo 4.2, onde tempos de exposição nesta mesma faixa não resultaram em grande impacto na viabilidade dos ovos do mesmo pirálídeo expostos diretamente à radiação.

**Tabela 5.** Média da viabilidade dos ovos colocados por fêmeas de *Anagasta kühniella* após tratamento com diferentes tempos de exposição a microondas\*.

Tempo de exposição (s)	Média da viabilidade das oviposições (%) $\pm$ E. P.
20	94,43 $\pm$ 1.6a
22	98 $\pm$ 0,41 a
25	76,44 $\pm$ 12,05a
29	74,36 $\pm$ 21,8 a
32	87,34 $\pm$ 6,94 a
36	76,44 $\pm$ 19,35 a

\* médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa com 95% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Em relação à longevidade dos adultos tratados (Tabela 6), pode-se observar que a radiação em pauta causou níveis de impacto significativamente diferentes ( $F=11,616$ ;  $P= 0,0$ ). Os tratamentos com 20 e 22 segundos de

exposição não diferiram significativamente entre si, mas diferiram do tratamento de 36 segundos de exposição à radiação (Tabela 7). As exposições à microondas conferiram, através de danos fisiológicos, uma longevidade significativamente menor aos adultos em relação à testemunha.

**Tabela 6.** Médias da longevidade (dias) de adultos de *Anagasta kühniella* sobreviventes de tratamentos com radiação de microondas.

Tempo de exposição (s)	n	Média ± Erro Padrão (E.P)
20 s	86	4,953 ± 0,47
22 s	82	5,659 ± 0,50
25 s	42	4,214 ± 0,54
29 s	37	3,324 ± 0,651
32 s	29	4,59 ± 0,75
36 s	22	1,818 ± 0,25
Testemunha	25	10,56 ± 0,86

**Tabela 7.** Matriz de comparação de probabilidade de diferenças entre pares de tratamentos, obtida pelo teste de Tukey, para a longevidade de adultos de *Anagasta kühniella* sobreviventes de diferentes tratamentos com radiação de microondas \*.

	20 s	22 s	25 s	29 s	32 s	36 s	Testemunha
20 s	1,000						
22 s	0,969	1,000					
25 s	0,962	0,584	1,000				
29 s	0,393	0,081	0,961	1,000			
32 s	1,000	0,924	1,000	0,875	1,000		
36 s	0,022	0,002	0,277	0,816	0,197	1,000	
Testemunha	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000

\* existe diferença significativa entre pares onde a probabilidade é menor que 0,05.

## Conclusões

A mortalidade imediata após o tratamento, dos adultos de *Anagasta kühniella*, variou em função do tempo de exposição a microondas, como visto nos capítulos anteriores.

O tempo de exposição dos adultos à radiação alterou sua capacidade reprodutiva. Foram observados dois níveis de resposta à radiação. O tratamento de 36 segundos de exposição diferiu significativamente dos demais, comprovando grande alteração no potencial reprodutivo.

A viabilidade dos ovos de adultos submetidos à radiação de microondas não diferiu entre os diversos tempos de exposição avaliados neste trabalho.

Foram observadas alterações negativas na longevidade dos adultos tratados com radiação em tempos de exposição maiores que 29 s, provavelmente em função de danos fisiológicos.

#### 4.5. TOLERÂNCIA DO ECTOPARASITÓIDE *Bracon hebetor* (SAY, 1836) (HYMENOPTERA, BRACONIDAE) À RADIAÇÃO POR MICROONDAS (2.450 MHz).

##### Introdução

Programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) buscam associar métodos eficientes, ecologicamente seguros, socialmente aceitáveis e economicamente viáveis para a otimização e sustentabilidade de um sistema de produção. Dentro desta proposta, deve-se levar em conta aspectos importantes de ecologia do inseto alvo, os agentes naturais de mortalidade e o seu impacto nas populações das pragas. A análise sobre a atuação dos inimigos naturais, dentro do ecossistema, e as possíveis interações destes agentes biológicos com outros métodos de manejo são de grande importância (Metcalf & Luckman, 1975; 1982).

O ectoparasitóide *Bracon hebetor* atua naturalmente em ecossistemas de armazenagem, controlando com alta eficácia larvas de lepidópteros pragas (Press *et al.*, 1982). As fêmeas deste braconídeo paralisam irreversivelmente as larvas de seus hospedeiro e, posteriormente, escolhem algumas como sítios de reprodução. Desta forma, mesmo que a larva não seja efetivamente parasitada, a paralisia irreversível leva-as a morte por inanição, incrementando o efeito do parasitismo em si (Richards & Thonson, 1932; Serra, 1992; Cecílio, 1993).

Estudos sobre o efeito de radiação sobre insetos pragas são bastante comuns. Entretanto, são raras as investigações sobre a tolerância dos parasitóides a estes agentes físicos de mortalidade. Encontrou-se duas únicas referências sobre o assunto. Nelas ovos de *Bracon hebetor*, em diversas fases

de desenvolvimento, foram submetidos à exposição a diferentes tipos de radiações, como UV, gama, X e beta, para avaliação de seu impacto (Amy, 1955; Amy & Ernst, 1958 *apud* Rai *et al.*, 1972). Porém, não existe nenhum trabalho referindo-se à atuação de frequências de microondas neste inimigo natural, apesar deste tipo de radiação eletromagnética já ser considerada viável para uso como agente controlador de pragas de grãos e alimentos em unidades de armazenagem (Tilton & Vardell, 1982a, b; Nelson, 1987).

Os objetivos deste estudo são de avaliar a sensibilidade de larvas e adultos de *Bracon hebetor* a diversos tempos de exposição a microondas (2.450 MHz) e compará-la a de seu hospedeiro *Anagasta kühniella* (sub-capítulo 4.1), verificando a compatibilidade entre os agentes de mortalidade biológico (parasito) e físico (microondas).

## Material & Métodos

Para as avaliações do efeito da radiação sobre os adultos de *Bracon hebetor*, 60 casais por tratamento (120 indivíduos), subdivididos em 4 repetições com 15 casais cada, foram colocados entre 2 placas de Petri (13 de diâmetro x 1,7cm de altura) fechadas com fita crepe e submetidos à radiação. Utilizaram-se tempos de exposição previamente calculado para cada tratamento (69, 83, 100, 120 e 144 segundos) (ver página 36). A mortalidade considerada para os cálculos da TEL<sub>50</sub> foi a de 24 horas após o tratamento.

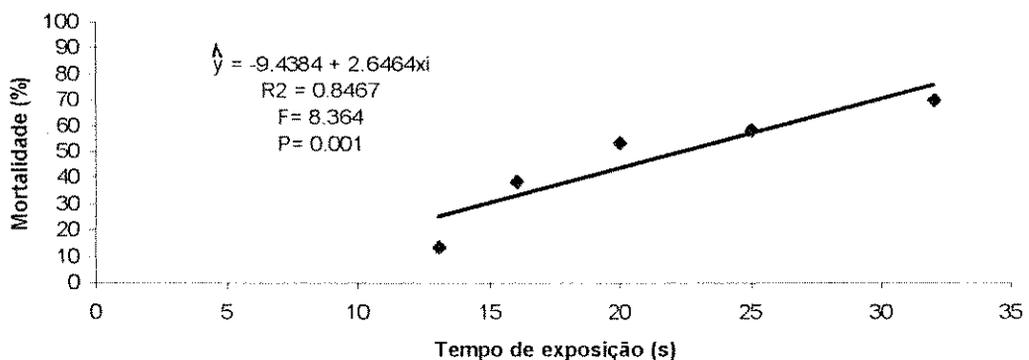
Para o bioensaio com as larvas deste ectoparasitóide foram separados indivíduos de dois dias de idade. Estes foram colocados sobre larvas do hospedeiro paralisadas anteriormente pela fêmea do braconídeo, dispostas circularmente no sistema composto de placas Petri. Os tempos de exposição à

radiação utilizados em cada tratamento foram 13, 16, 20, 25 e 32 segundos. A metodologia de exposição encontra-se detalhada na página 35.

Para evitar danos e estresse desnecessário às larvas do parasitóide, o que poderia interferir na sua resposta à radiação, observou-se o efeito das microondas através da mudança de estágio das larvas para pupas.

## Resultados & Discussão

Constatou-se uma relação positiva entre o aumento do tempo de exposição e a mortalidade das larvas do braconídeo (Figura 1), repetindo o mesmo padrão de respostas observado para os diversos estágios do seu hospedeiro *Anagasta kühniella*. Obviamente, isto se deve ao fato de que maiores tempos de exposição resultam em maior absorção de energia do campo eletromagnético e, conseqüentemente, em maior aquecimento dos indivíduos expostos (Hurlock *et al.*, 1979; Lambert, 1980).



n= 100/ tratamento

**FIGURA 1.** Mortalidade em larvas de 2 dias de idade de *Bracon hebetor* submetidas a diferentes tempos de radiação de microondas.

**Tabela 1.** Mortalidade de larvas de 2 dias de idade de *Bracon hebetor* submetidas a diferentes tempos de exposição a microondas (2.450 MHz).

Parâmetros	Tempo de Exposição (s)					
	0 s	13 s	16 s	20 s	25 s	32 s
Mort. Média (%)	4,0	17,0	41,0	55,0	60,0	71,0
Desvio Padrão	4,619	18,58	6,831	22,24	19,04	15,0
Erro Padrão	2,31	9,29	3,42	11,12	9,52	7,5
Mort. Mínimo (%)	0	0	32,0	24,0	32,0	52,0
Mort. Máximo (%)	8,0	40,0	48,0	76,0	72,0	88,0

n= 25/ repetição; 4 repetições/ tratamento

Apesar disso, observaram-se pequenas variações no nível de sensibilidade entre as diversas repetições de alguns tratamento (Tabela 1). Provavelmente, isto ocorreu pela mobilidade das larvas sobre o hospedeiro, já que a orientação dentro do campo eletromagnético, principalmente em corpos tão pequenos, influencia na resposta à radiação (Frings, 1952).

Existem diferenças significativas ( $F= 10,894$ ;  $P=0,0$ ) entre os tratamentos e entre os tratamentos e a testemunha (Tabela 2). Podem-se, assim, localizar dois níveis de impacto. Um primeiro, abrangendo os tratamentos de 13 e 16 segundos, onde a mortalidade foi baixa, não diferindo significativamente da testemunha. O segundo, abrangendo os demais tratamentos, onde a mortalidade foi mais acentuada. Neste observou-se que existe diferença significativa em relação à testemunha e ao tratamento de 13 segundos.

**Tabela 2.** Matriz de comparação de probabilidade de diferenças entre pares de tratamentos, obtida pelo teste de Tukey, para larvas de 2 dias de idade de *Bracon hebetor* submetidas à radiação de microondas

	testemunha	13 s	16 s	20s	25 s	32 s
testemunha	1,000					
13 s	0,848	1,000				
16 s	0,380	0,308	1,000			
20 s	0,030	0,032	0,806	1,000		
25 s	0,001	0,013	0,549	0,997	1,000	
32 s	0,000	0,002	0,127	0,709	0,917	1,000

\* existe diferença significativa entre pares onde a probabilidade é menor que 0,05 .

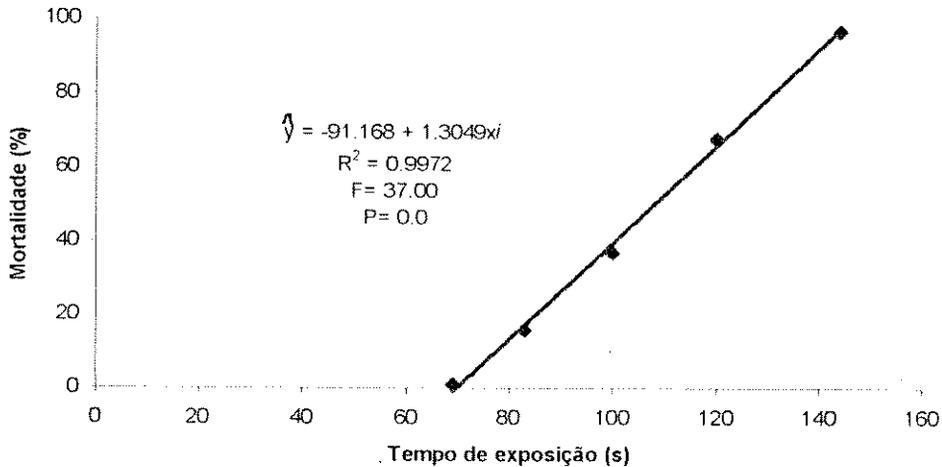
A TEL<sub>50</sub> das larvas do parasitóide não diferiu significativamente das larvas do seu hospedeiro, anteriormente avaliada (sub-capítulo 4.1), apesar de todas as diferenças no tamanho e, provavelmente também, na composição química e propriedades físicas (Tabela 3). A mortalidade deste estágio de desenvolvimento do braconídeo pode tanto estar ocorrendo devido à ação direta do campo eletromagnético de microondas quanto ser ocasionada pelo efeito letal da radiação no hospedeiro, o que bloquearia o desenvolvimento do parasitóide, levando-o a morte.

**Tabela 3.** Valores e limites de confiança do tempo de exposição letal mediano (TEL<sub>50</sub>) para larvas de último estágio de *Anagasta kühniella* e larvas (48h) de *Bracon hebetor* submetidas a microondas.

	Larvas de <i>Bracon hebetor</i>	Larvas de <i>Anagasta kühniella</i>
TEL <sub>50</sub>	20,31	15,63
Limite inferior	17,04	13,03
Limite superior	24,21	18,75

n= 25/ repetição, 4 repetições/ tratamento  
intervalo calculado com P=95%

O estágio adulto de *Bracon hebetor*, da mesma forma que o larval, também demonstrou manter uma relação positiva entre a mortalidade e o aumento do tempo de exposição à radiação de microondas (Figura 2)



n= 120/ tratamento

**Figura 2.** Mortalidade (%) em adultos do ectoparasitóide *Bracon hebetor* submetidos a diferentes tempos de exposição a microondas.

Nesta fase final do desenvolvimento, o braconídeo demonstrou ser bastante tolerante à radiação de microondas, quando comparados ao seu hospedeiro natural, *Anagasta kühniella*, sendo superado somente pelos ovos do piralídeo (Tabela 4).

**Tabela 4.** Valores do tempo de exposição letal mediano (TEL<sub>50</sub>) e respectivos intervalos de confiança para diversas fases de desenvolvimento de *Anagasta kühniella* e para adultos (24h) de *Bracon hebetor* submetidos à radiação de microondas.

	<i>Anagasta kühniella</i>			<i>H. hebetor</i>	
	L6	L3	Adultos	Ovos	Adultos
n <sup>o</sup> ind./ repetição	25	25	25	50	30
n <sup>o</sup> ind./ tratamento	100	100	100	200	120
TEL <sub>50</sub>	15,63s	19,34s	22,61s	121,67s	106,57
Limite inferior	13,03s	14,08s	20,19s	115,68s	100,36
Limite superior	18,74s	26,57s	25,32	127,98s	113,17

L3 = larva de terceiro estágio, L6 = larva de último estágio.  
intervalo de confiança calculado com P=95%

## Conclusões

Os resultados acima discutidos nos indicam que, nas condições propostas neste trabalho, os adultos de *Bracon hebetor* possuem um nível de tolerância à radiação de microondas bem maior que as larvas e adultos do seu hospedeiro, *Anagasta kühniella*, enquanto as larvas do braconídeo aparentemente apresentam o mesmo nível de sensibilidade do piralídeo praga.

#### 4.6. TOLERÂNCIA DE *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* À RADIAÇÃO POR MICROONDAS (2.450 MHz).

##### Introdução

O uso de variedades da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* tanto quanto frequências eletromagnéticas na faixa de microondas no controle de insetos pragas são alternativas promissoras para a substituição do controle exclusivamente químico em ecossistemas de armazenagem em programas de Manejo Integrado sob certas circunstâncias (McGaughey, 1978 a, b, 1980 a, b; Nelson, 1987; Waib, 1992). Entretanto, para uma associação viável entre estes componentes deve-se pressupor compatibilidade ou sinergismo entre eles. Sendo assim, o estudo das interações entre esses dois fatores de mortalidade torna-se essencial para se garantir a eficiência na atuação dentro do ecossistema em pauta.

Análises das interações entre microorganismos e frequências de microondas vêm sendo feitas principalmente com bactérias de importância médica ou contaminantes de alimentos. As microondas têm comprovada ação térmica sobre a estrutura celular da microflora (Goldblith & Wang, 1967), podendo ser utilizada em processos de esterilização, pasteurização e secagem (Cunnigham, 1980; Fung & Cunningham, 1980; Hamnerius *et al.*, 1985; Decareau & Peterson, 1986). O princípio de aquecimento dielétrico pode garantir, em certas circunstâncias, o aquecimento seletivo do microorganismo em relação a materias com baixas perdas dielétricas (capacidade de dissipar energia elétrica na forma de calor), como o vidro (Lohmann & Manique, 1986). Porém, fatores como a posição dos microorganismos em relação à fonte de radiação e em relação ao meio que os envolve e a capacidade de certos

microorganismos de formar esporos, interferem no grau de impacto das microondas (Copson, 1975).

O objetivo deste estudo, portanto, é avaliar a tolerância de esporos da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* à radiação de microondas (2.450 MHz), utilizando-se de larvas de terceiro estágio de *Anagasta kühniella* como bio-indicador da sensibilidade da bactéria à radiação.

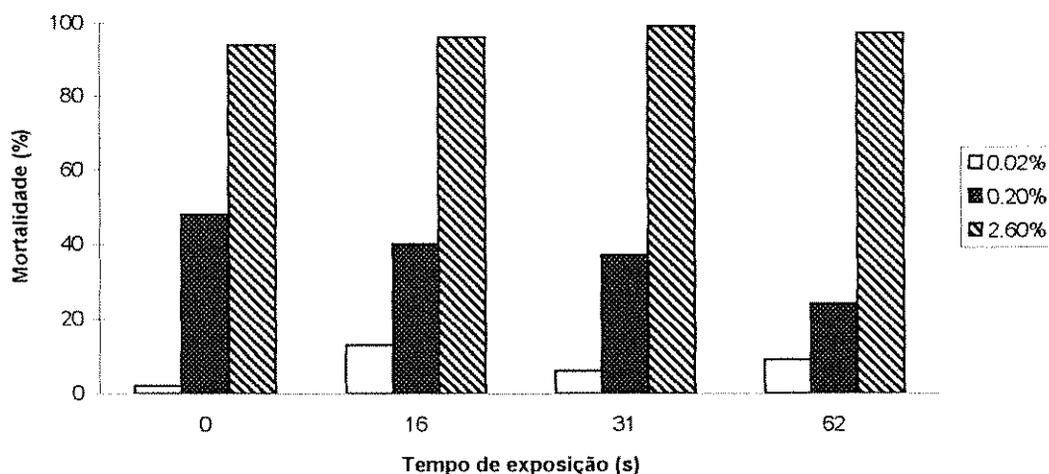
### **Material & Métodos**

Amostras (3g) do produto Dipel (Abbot ®), contendo o complexo esporo - cristal da bactéria, com 16.000 UI , foram espalhadas no centro de uma placa de vidro (13 de diâmetro x 1,7 cm de altura) e submetidas a tempos de exposição a microondas em segundo metodologia descrita na página 35. Estes tempos de tratamento com radiação correspondem aos valores da TEL<sub>50</sub> (15s), TEL<sub>90</sub> (31s) e 2 vezes o valor deste último (62s) para larvas de último estágio de *Anagasta kühniella*.

Após a exposição, as amostras foram divididas em subamostras de 0,02 g, 0,2 g e 2,26 g e adicionadas a farinha integral de trigo para obtenção de amostras homogêneas de 100 g da mistura nas concentrações de 0,02%, 0,2% e 2,26%, respectivamente (Amaral Filho, 1986; Habib *et al*, 1991). De cada uma destas, transferiu-se 20 g por placa de Petri, na qual foram colocadas 100 larvas de terceiro estágio. Uma placa contendo 20 g de farinha e 100 larvas deste estágio ainda foi separada para servir como testemunha do bioensaio. A mortalidade larval foi avaliada após 96 horas da exposição.

## Resultados & Discussão

O tempo de exposição à radiação de microondas na faixa avaliada não alterou a patogenicidade da bactéria nas concentrações de 0,02% e 2,6% ( $X^2_{6\text{ gl}} = 15,46$ ), pois o nível de mortalidade obtido em ambas não variou em função do tempo de exposição a que foram submetidas as amostras do produto bacteriológico. As pequenas variações observadas nestes casos (Figura 1), provavelmente são consequência da heterogeneidade da mistura do complexo esporo-cristal no produto. Entretanto, o efeito da radiação sobre o produto pode estar sendo mascarada pela influência da concentração sobre a mortalidade do hospedeiro, já que estas duas concentrações em questão encontram-se em faixas extremas (mínima e máxima) de ação.



n= 100 indivíduos/ tratamento

**Figura 1.** Impacto de três tempos de radiação de microondas (2.450 MHz) na patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* a larvas de terceiro estágio de *Anagasta kühniella*.

Na concentração equivalente a 0,2%, considerada próxima à concentração letal mediana (Amaral Filho, 1986) das larvas de terceiro estágio, observou-se uma clara relação entre o tempo de exposição e a mortalidade. Sendo que o tratamento de maior impacto (62 segundos) foi responsável por uma diminuição de cerca de 50% na mortalidade das larvas, após 96 horas (Tabela 1).

Os dados acima mencionados são condizentes com as observações de Lohmann & Manique (1986), os quais comprovaram uma redução na viabilidade de esporos em *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus* após tratamento com microondas na frequência de 2.450 MHz. Fung & Cunningham (1980) em uma revisão que analisa vários trabalhos sobre os efeitos da energia de microondas em microorganismos de alimentos, colocam a composição físico química e o estágio de vida presente (célula vegetativa ou esporo, fase de crescimento, úmido ou seco, etc) como fatores importantes e determinantes para a resposta à radiação. Cunningham (1980) demonstrou que o impacto negativo das microondas, nas frequências comercialmente mais empregadas (915 e 2450 MHz), em bactérias não esporulantes, responsáveis pela deterioração de carnes e produtos a base de carne de frangos, dá-se em tempos de exposição bem menores a 30 segundos. Heddlsson *et al.*(1996) também verificou perda de viabilidade em espécies de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* em diferentes alimentos aquecidos por microondas (2.450 MHz) em tempos de exposição menores que 1 minuto.

**Tabela 1.** Mortalidade de larvas de terceiro estágio do pirálídeo *Anagasta kühniella* tratadas com três diferentes concentrações de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* submetidas a diferentes tempos de exposição a microondas (2450 MHz).

Concentração (%)	Mortalidade (%)			
	testemunha	15 s	31 s	62 s
0.02	2	13	6	9
0.2	48	40	37	24
2.6	94	96	99	97

n= 100 larvas/ tratamento

### Conclusão

A exposição do produto à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* à radiação de microondas, nas concentrações letais (2,6%) e sub-letais (0,02%), não influenciou no seu potencial patogênico. Entretanto, na concentração próxima à letal mediana (CL<sub>50</sub>) observou-se que o aumento do tempo de exposição à radiação diminuiu a patogenicidade da bactéria.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

A radiação de microondas, na frequência avaliada neste trabalho (2.450 MHz), comprovou ser altamente eficaz no controle do piralídeo praga de armazéns e moinhos, *Anagasta kühniella*, proporcionando níveis de mortalidade bastante expressivos em tempos de exposição à radiação entre 16 e 121 segundos, dependendo do estágio de desenvolvimento do piralídeo. Para fins de controle deste piralídeo praga, deve-se observar que a mortalidade total (100%) de todos os estágios de desenvolvimento, nestas condições experimentais, pode ser alcançada a partir de 3 minutos de exposição direta às microondas. Porém, para uso em MIP este tempo pode ser menor, pois existe a possibilidade de se associar às microondas outras técnicas compatíveis para o manejo. Estudos sobre as propriedades organolépticas da farinha submetida à radiação de microondas, como os realizados por Diaz (1982) e Campos (1985), indicam que tratamentos até 3 minutos não causa danos à qualidade deste produto.

O estágio adulto do ectoparasitóide *Bracon hebetor* revelou tolerância a tempos de exposição à radiação considerados letais para a maioria dos estágios de desenvolvimento da praga. Assim, pode-se considerar que existe um nível razoável de compatibilidade entre a radiação e o parasitóide. Tal fato possibilita a aplicação da radiação na farinha sem que se elimine totalmente o inimigo natural. Entretanto, deve-se ainda analisar o impacto da radiação na capacidade reprodutiva do braconídeo futuramente.

Aplicações de microondas em farinhas tratadas com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em dosagens recomendadas para o controle de *Anagasta kühniella* podem ser feitas em programas de MIP.

Levando-se em consideração que o objetivo da associação de agentes biológicos com físicos dentro de um programa de MIP não pressupõem a erradicação de todos os estágios de desenvolvimento da população praga, mas sua manutenção em densidades abaixo do nível econômico de dano, as microondas poderiam ser usadas para eliminação dos estágios larval e adulto do piralídeo, enquanto as larvas que emergissem dos ovos não danificados pela radiação poderiam ser controladas através de uma nova irradiação ou por outros agentes de mortalidade como o próprio parasitóide natural ou bactérias entomopatogênicas, como o *Bacillus thuringiensis*. A radiação também poderia ser utilizada para causar interferências na capacidade reprodutiva e longevidade dos adultos do piralídeo.

O presente trabalho abre novas perspectivas de investigação, tanto no campo acadêmico, aprofundando questões sobre o modo de ação e impacto da radiação em sistemas biológicos, quanto no campo aplicado, desenvolvendo técnicas e equipamentos que garantam a viabilização do uso das microondas como agente físico de controle em ecossistemas de armazenamento.

## 6. RESUMO

O conceito de Manejo Integrado de Pragas (MIP) busca a utilização consciente de métodos de controle ambientalmente seguros e economicamente viáveis. Neste contexto, é de extrema importância o conhecimento das interações entre os agentes de controle a serem empregados, para garantir maior eficiência na implantação de tais programas. Tanto as microondas (300 a 300.000 MHz), como o *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e o ectoparasitóide *Bracon hebetor* (Say, 1836) vêm sendo estudados isoladamente como promissores agentes de controle de pragas em produtos armazenados. Este trabalho teve por objetivo analisar as respostas e relações do parasitóide *Bracon hebetor*, do seu hospedeiro natural, o piralídeo *Anagasta kühniella* Zeller (1879) e do entomopatógeno, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Sorotipo H-3a:3b) à radiação de Microondas (2.450 MHz).

O material entomológico foi coletado em moinho de farinha em Campinas, SP, e utilizado para dar início a criações laboratoriais. As condições adotadas neste trabalho foram de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  de umidade relativa (UR) e 12 horas de fotoperíodo.

Para os biensaíes de avaliação da sensibilidade de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* a microondas foram utilizadas amostras do produto Dipel (Abbot®), contendo o complexo esporo - cristal desta bactéria, 16.000 UI/ mg de virulência, formulação em pó molhável.

Todos os bioensaíes, envolvendo a utilização de radiação, foram realizados sob a potência máxima de um forno microondas Panasonic NN 7954 BH / K, operando na frequência de 2.450 MHz.

Tanto o piralídeo, como o parasitóide, apresentaram uma relação positiva entre o aumento do tempo de exposição e a mortalidade, independentemente do estágio de vida avaliado. No caso de esporos de *B. thuringiensis* irradiados, esta relação foi visualizada no bioensaio realizado na concentração de 0,2%, a qual é próxima à  $CL_{50}$  das larvas de terceiro estágio.

Quanto à sensibilidade das diferentes fases de desenvolvimento de *Anagasta kühniella* à microondas observou-se a existência de um gradiente de sensibilidade entre os estágios de desenvolvimento do piralídeo : larvas de último estágio ( $TEL_{50} = 15,63$  s) > larvas de terceiro estágio ( $TEL_{50} = 19,34$  s) > adultos ( $TEL_{50} = 22,61$  s) > ovos ( $TEL_{50} = 121,67$  s), provavelmente decorrente de diferenças físico- químicas.

Encontrou-se diferenças significativas quanto ao impacto de microondas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Anagasta kühniella* (1 e 4 dias de idade) quando usado tempos de exposição subletais (10 e 30 segundos). Os ovos de 4 dias demonstraram ser mais sensíveis à radiação que os de 1 dia de idade. Já no caso das exposições letais (45, 60 e 90 segundos) não houve indício de diferenças nas duas etapas de desenvolvimento embrionário. As larvas que eclodiram dos ovos tratados com radiação não portavam nenhum tipo de alteração morfológica.

Quanto à interferência do meio no impacto causado em larvas de último estágio por exposição à radiação não se constatou diferença significativa entre as larvas expostas diretamente ( $TEL_{50} = 15,63$  s) e em meio de farinha de trigo integral ( $TEL_{50} = 16,28$  s).

A sintomatologia apresentada após o tratamento com radiação variou em função do tempo de exposição. Observou-se desde letargia, disfunção do sistema locomotor até dessecação, escurecimento do tegumento e morte.

A análise da influência da radiação na capacidade reprodutiva e na longevidade de adultos do piralídeo sobreviventes à exposição indicou que as microondas provocam alterações negativas em ambos os casos. Entretanto, a radiação não influenciou na viabilidade dos ovos colocados pelas fêmeas tratadas.

Os adultos de *Bracon hebetor* demonstraram um nível de tolerância à radiação de microondas bem maior ( $TEL_{50} = 106,57$  s) que as larvas ( $TEL_{50} = 15,63$  s) e adultos ( $TEL_{50} = 22,61$  s) do seu piralídeo hospedeiro, *Anagasta kühniella*, enquanto as larvas do braconídeo ( $TEL_{50} = 20,31$  s) aparentemente apresentam o mesmo nível de sensibilidade do piralídeo praga.

A exposição do produto à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* à radiação de microondas, nas concentrações letais (2,6%) e sub-letais (0,02%) não influenciou no seu potencial patogênico. Entretanto, na concentração próxima à letal mediana ( $CL_{50}$ ) observou-se que o aumento do tempo de exposição à radiação diminuiu a patogenicidade da bactéria.

Sendo assim, a radiação de microondas apresentou-se como um método de controle bastante promissor para *Anagasta kühniella* criada em farinha de trigo integral. Pode ser empregado em ecossistemas de armazenagem deste produto em associação ao ectoparasitóide *Bracon hebetor* e ao *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

## 7. SUMMARY

The application of Integrated Pest Management (IPM) means the utilization of efficient control methods which are ecologically safe and economically viable. Therefore, it is extremely important to gather more information about the possible interactions between the different control agents, aiming to optimize such a method. Microwaves (300 a 300.000 MHz), as well as *Bacillus thuringiensis* and the ectoparasitoid *Bracon hebetor* (Say, 1836) are being studied individually by some institutions, as promising control agents of some stored product pests. The present work was developed to study and evaluate the relations among the parasite *Bracon hebetor*, his natural host, *Anagasta kühniella* Zeller (1879), the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H- 3a:3b) and microwaves radiation.

The mother culture of the pyralid and braconid species were initiated from live material collected from flour mills in Campinas municipality, state of São Paulo. The cultures were maintained and experiments were realized under controlled laboratory conditions of  $25 \pm 2^{\circ}$  C,  $60 \pm 10$  % R.H. and 12 hours of photoperiod.

To evaluate the tolerance of *B. thuringiensis* to microwave radiation samples of the commercial product Dipel (Abbot) were utilized. This product contains 16,000 IU/ mg and formulated as a wettable powder. The radiation treatments were undertaken utilizing the maximum potency of a domestic Panasonic microwave oven (NN 7954 BH/K, 2450 MHz).

The mortality rate among the different developmental stages of the two insect species was observed to be positively related with the radiation exposure time.

Among the *Anagasta kühniella* developmental stages, while the last instar larvae showed to be more sensitive to radiation (median letal exposure time,  $LET_{50} = 15,63$  s), the egg stage showed to be more resistant ( $LET_{50} = 121,67$  s). The third instar larvae, as well the adult stage, revealed a moderate sensitivity ( $LET_{50} = 19,34$  s and  $22,61$  s, respectively).

Within the egg stage of *Anagasta kühniella* the full grow embryo showed to be more sensitive than newly deposited eggs.

The impact of the direct exposition to microwaves on the full grow *Anagasta kühniella* larvae ( $LET_{50} = 15,63$  s) did not differ when compared with those larvae imbedded in their natural diet, whole wheat flour ( $LET_{50} = 16,28$  s).

The sequence and intensity of the external symptoms, showed to be directly related to the duration time in which larvae of *Anagasta kühniella* were exposed to the microwave radiation. Letargy and locomotion desfunctions were the initial alterations. Dehydration and body wall darkening , reaching dark brown, were observed before death.

The radiation also showed to be harmful to the adult stage of the same pyralidae species, reducing longevity as well as reproductive capacity.

*Bracon hebetor* adults showed to be more resistant to radiation ( $LET_{50} = 106,57$  s) when compared to *Anagasta kühniella* adults ( $LET_{50} = 22,61$  s) and larvae ( $LET_{50} = 15,63$  s).

Samples of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* were exposed to different times of microwaves radiation (2450 MHz) and were offered to third instar larvae of *Anagasta kühniella* in three different concentrations (0.02 %, 0.2% and 2.6%). This electromagnetic wave did not present any interference in the patogenicity of the entomopathogen in the extrem concentrations (0.02 and 2.6%). However, in the 0.2% concentration, next to LC<sub>50</sub> of the larvae, the patogenicity of *Bacillus thuringiensis* was altered by the time of exposure to the radiation.

Finally, radiation by microwaves could be considered as a promising method, efficient and compatible with biological control ones, to participate in IPM programs of the Mediterranean Flour Moth, *Anagasta kühniella*.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18(2): 265
- Anônimo.1995. Agenda 21. Conferência das Nações Unidas Sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, Rio de Janeiro, 3 - 14 de Junho de 1992. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- Alves, S.B. (cord). 1986. Controle Microbiano de Insetos. Ed. Manole Ltda, São Paulo, Brasil. 407 p.
- Almeida, A.A. 1989. Natureza dos danos causados por insetos em grãos armazenados. Seminário sobre Controle de Insetos, Campinas, SP. SEB, Fund. Cargill.1-32.
- Altahtawy, M.M.; Hammad, S.M. & Habib, M.E.M. 1973. Bionomics of *Anagasta kühniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Indian J. agric. Sci., 43(10):905-908.
- Altieri, M.A. 1983. Agroecology . The Scientific Basis of Alternative Agriculture. University of California, 162p.
- Amaral Filho, B.F. 1986. Estudos biológicos e patológicos de dois piralídeos pragas de produtos armazenados. Tese de Doutorado. IB/UNICAMP.
- Amaral Filho, B.F. & Habib, M.E.M. 1993. Efeito da variabilidade genética de *Anagasta kühniella* na resposta de suas larvas a infecções causadas por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Rev. Agric. 68(1):89-98.
- Amy, R.L. 1955. A comparative study of the effects of beta rays, gamma rays and X-rays on development in *Habrobracon hebetor*. Radiat. Res. 3:166-81.
- Amy, R.L. & Ernst, M.L. 1958. Sensitivity of the developing *Habrobracon* embryo to ultraviolet radiation. Proc. Pa. Acad. Sci. 32: 254-60.
- Annis, P.T. 1980. Design and use of domestic microwave ovens. J. Food Protection 43(8): 629-632.
- Astolfi, E.; Landoni, J.H. & Almeida, E. 1977. Curso por correspondência sobre toxicologia de defensivos agrícolas. vol II. ANDEF. São Paulo, SP.

- Baker, J.E. 1995. Stability of malathion resistance in two hymenopterous parasitoids. *J.Econ. Entomol.* 88(2): 232-236.
- Baker, J.E.; Weaver, D.C. & Zettler, J.L. 1995. Resistance to protectant insecticides in two field strains of the parasitoid *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Econ. Entomol.* 88(3):512-517.
- Baker, V. H.; Wiant, D.E. & Taboada, O. 1956. Some effects of microwaves on certain insects which infest wheat and flour. *J. Econ. Entomol.* 49(1): 33-37.
- Barker, A.V. & Cracker, L.E. 1991. Inhibition of seed germination by microwaves. *Agron. J.* 83: 302-305.
- Beard, R.L. 1972. Effectiveness of paralyzing venom and its relation to host discrimination by braconidae wasps. *Ann. entom. Soc. Am.* 65(1): 90-93.
- Benson, J.F. 1973. Intraespecific competition in the population dynamics of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae). *J. Anim. Ecol.* 42 : 105-24.
- Benson, J.F. 1974. Population dynamics of *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera : Braconidae ) and *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Phycitidae) in a laboratory ecosystem. *J. Anim. Ecol.* 43 : 71-86.
- Benz, G. & Altwegg, A. 1975. Safety of *Bacillus thuringiensis* for earthworms. *J. Invert. Pathol.* 26: 125-126.
- Bitran, E.A. 1989. Controle químico de pragas de grãos. Seminário sobre Controle de Insetos, Campinas, SP. SEB, Fund. Cargill. 2-15.
- Brower, J.H. & Press, J.M. 1990. Interaction of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in suppressing stored products moth populations in small inshell peanut storage. *J. Econ. Entomol.* 53(3) : 1096-101.
- Bryant, J.E. 1994. Application strategies for *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 49: 65-75.
- Cajueiro, I.V.M. 1990. Ecossistema de Armazenamento. CNPDA/EMBRAPA. 18p.
- Calderon, M. 1981. The ecosystem approach for apprehending the extent of postharvest grain losses. *Phytoparasitica*, 9(2):157-167.

- Campos, M.S. 1985. Influência de energia de microondas na qualidade tecnológica do trigo. Tese de Mestrado.FEA/UNICAMP.
- Cecílio, A.T.B. 1993. Bioecologia de *Habrobracon hebetor* (Say, 1836) (Hymenoptera : Braconidae), ectoparasitóide de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) sob diferentes fotoperíodos, tipos de alimento, idade e densidade de hospedeiro. Tese de Mestrado. IB/UNICAMP.
- Chang, Y.K.1982. Efeito de branqueadores e da radiação de microondas na qualidade técnica do arroz integral. Tese de Mestrado. FEA/UNICAMP.
- Clausen, C.P. 1972. Hymenoptera. In: Entomophagous Insects. Hafner Publishing Co. New York. p. 3-342.
- Cline, L.D. & Press, J.W. 1990. Reduction in almond moth (Lepidoptera: Pyralidae) infestations using comercial packing of foods in combination with the parasitic wasp *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae ). J. Econ. Entomol. 83(3): 1110-1113.
- Copson, D.A. 1975. Microwave Heating. 2º ed. The Avi Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut, USA. 615 p
- Cornutte, B. 1980. Principles of microwaves radiation. J. Food Protection 43(8): 618-624.
- Cox, P.D.; Allen, L.P.; Pearson, J. & Beirne, M.A. 1984a. The incidence of diapause in seventeen populations of the flour moth *Ephesia kühniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). J.stored Prod. Res. 20: 139- 143.
- Cox, P.D.; Bell, C.H., Pearson, J. & Beirne, M.A. 1984b. The effect of diapause on the tolerance of larvae of *Ephesia kühniella* to methyl bromide and phosphine. J.stored Prod. Res. 20: 215-290.
- Cox, P.D. 1987. Cold tolerance and factors affecting the duration of diapause in *Ephesia kühniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). J. stored Prod. Res. 23 (3): 163-168.
- Crocker, R.L.; Morgan, D.L. & Longnecker, M.T. 1987. Effect of microwave treatment of live oak acorns on germination and on *Curculio* sp (Coleoptera: Curculionidae) larvae. J.Econ. Entomol. 80: 916-20.
- Cunnigham, F.E. 1980. Influence of microwave radiation on psychotropic bacteria. J. Food Protection 43(8): 651-655.

- Fields, P.G. 1992. The control of stored-product insects and mites with extreme temperatures. *J. stored Prod. Res.* 28(2): 89-118.
- Frings, H. 1952. Factors determining the effects of radio frequency electromagnetic fields on insects and materials they infest. *J. Econ. Entomol.* 45(3):396-408.
- Fung, D.Y.C. & Cunningham, F.E. 1980. Effect of microwaves on microorganisms in foods. *J. Food Protection* 43(8):641-650.
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R.P.L.; de Batista, G.C.; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramen, J.D. 1988. *Manual de Entomologia Agrícola*. 2 ed. Ed. Agronômica Ceres Ltda., SP. 649 p.
- Goldblith, S.A. & Wang, D.Y.C. 1967. Effect of microwaves on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol.* 17: 106.
- Habib, M.E.M. 1968. Histopathological studies on the effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner, on the mediterranean flour moth, *Anagasta kuehniella* Zeller. Tese de Mestrado. University of Alexandria, Egito.
- Habib, M.E.M. & Garcia, M.A. 1981. Compatibility and synergism between *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and two chemical insecticides. *Z. ang. Entomol.* 91 : 7-14.
- Habib, M.E.M. 1982. Patogenicidade de duas variedades de *Bacillus thuringiensis* para larvas de Lepidoptera e Diptera. Tese de Livre Docência. IB/ UNICAMP.
- Habib, M.E.M. 1983. Potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against some aquatic dipterous insects. *Z. ang. Entomol.*, 95: 368-376.
- Habib, M.E.M. & Andrade, C.F.S. 1986. Bactérias Entomopatogênicas. In : Alves, S.B. (coord). *Controle Microbiano de Insetos*. Ed. Manole Ltda . 127-170.
- Habib, M.E.M.; Carvalho, G.A.; Souza, C.E.P. & Hofling, J.C. 1991. Patogenicidade de dois formulados à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H-3a:3b) em larvas de *Anagasta kühniella* (Zeller, 1879)(Lep.:Pyralidae). *Bioikos* 5(2): 31-66.

- Hamnerius, Y.; Rasmuson, A. & Rasmuson, B. 1985. Biological effects of high-frequency electromagnetic fields on *Salmonella typhimurium* and *Drosophila melanogaster*. *Bioelectromagnetics* 6:405-414.
- Halverson, S.L.; Burkholder, W. E.; Bigelow, T.S.; Nordheim, E.V. & Misenheimer, M.E. 1996. High-power microwave radiation as an alternative insect control method for stored products. *J.Econ.Entomol.* 89(6): 1639-1648.
- Harrison, D. 1980. Microwave versus conventional cooking methods: effects on food quality attributes. *J.stor. Prod. Res.* 43(8): 633-637.
- Headlee, T.J. & Jobbins, D.M. 1938. Progress to date on studies of radiowaves in insect control. *J.Econ. Entomol.* 29: 181-187.
- Heddleson, R.A., Doores, S.; Anantheswaran, R.C.; Kuhn, G.H. & Mast, M.G. 1991. Survival of *Salmonella* species heated by microwave energy in a liquid menstruum containing food components. *J. Food Protection* 54: 637-642.
- Heddleson, R.A., Doores, S.; Anantheswaran, R.C. & Kuhn, G.H. 1996. Viability loss of *Salmonella* species, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in complex foods heated by microwaves. *J.Food Protection* 59(8):813-818.
- Heiser Jr, C.B. 1977. Sementes para a Civilização; A História da Alimentação Humana. Biblioteca do Espírito Moderno, Série 2 - Ciências, V 30. 253 p.
- Hochberg, M.E.; Hassel, M.P. & May, R.M. 1990. The dynamics of host-parasitoid-pathogen interactions. *Am.Nat.* 135(1) : 74-94.
- Holloway, J.D.; Bradley, J.D. & Carter, D.J. 1992. IIE Guides to Insects of Importance to Man. 1. Lepidoptera. International Institute of Entomology, Londres. 262 p.
- Howe, R.W. 1965. A summary of estimates of optimal conditions for population increase of some stored products insects. *J. stored Prod.Res* 1: 177-184.
- Hurlock, E.T.; Llewelling, B.E. & Stables, L.M. 1979. Microwave can kill insect pests. *Food Manuf.* 54(8): 37-38
- Jaques, R.P. & Morris, O.N. 1981. Compatibility of pathogens with other methods of pest control and with different crops. In: Burges, H.D. *Microbial Control of Pests and Diseases. 1970 / 1980*. Academic Press, Londres & Nova Iorque. 949 p.

- Johson, J.A.; Wofford, P.L. & Gill, R.F. 1995. Developmental thresholds and degree-day accumulations of indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae) on dried fruits and nuts. *J. Econ. Entomol.* 88(3): 735-740.
- Lambert, J.P. 1980. Biological hazards of microwave radiation. *J. Food Protection* 43(8) : 625-628.
- Leesch, J.G. 1995. Fumigant action of acrolein on stored-product insect. *J. Econ. Entomol.* 88(2):326 - 330.
- Lewis, V. R. & Haverty, M.I. 1996. Evaluation of six techniques for control of the western drywood termite (Isoptera: Kalotermitidae) in structures. *J.Econ.Entomol.* 89(4): 922- 932.
- Locatelli, D.P. & Traversa, S. 1989. Microwaves in the control of rice infestations. *Ital. J. Food Sci.* 2: 53-62.
- Lohmann, S. & Manique, F. 1986. Microwave sterilization of vials. *J. Parenteral Scien. & Tech.* 40(1): 25-30.
- Longstaff, B.C. 1994. The management of stored productt pests by non-chemical means: an australian perspective. *J. stored Prod. Res.* 30 (3): 179-185.
- Longstaff, B.C. 1997. Decision tools for grain storage pest management. *J. stored Prod. Res.* 33(2): 99-114.
- Maluf, R.S. 1995. Segurança alimentar, desenvolvimento sustentável e planejamento agroalimentar. *Agricultura Sustentável* 2: 34-44.
- Mariconi, F.A.M. 1983. Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas. Com uma introdução sobre o estudo dos insetos. *Livraria Nobel*, 305p.
- Marques, I.M.R. 1993. Ação de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre *Scrobipalpaloides absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) e a sua interação com o parasitóide *Trichogramma pretiosum* Ryley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Tese de Doutorado, ESALQ/ USP.
- Marsaioli Jr, A. 1991. Desenvolvimento da tecnologia de aplicação de microondas em secador cilíndrico rotativo combinado com ar quente para produtos granulados. Tese de doutorado FEA/ UNICAMP.
- McGaughey, W.M.H. 1978a. Moth control in stored grain: efficacy of *Bacillus thuringiensis* on corn and methods of evaluation using small bins. *J. Econ.Entomol.* 71:835-839.

- McGaughey, W.M.H. 1978b. effects of larval age on the susceptibility of almond moths and indianmeal moths to *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol.71: 923-925.
- McGaughey, W.M.H. 1980a. Methods of applying *Bacillus thuringiensis* to stored corn for moth control. J.Econ.Entomol. 73 : 228-229.
- McGaughey, W.M.H. 1980b. *Bacillus thuringiensis* for moth control in stored wheat. Can Ent. 112: 327-331.
- McGaughey, W.M.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 229 : 93-195.
- McGaughey, W.M.H. 1994. Problems of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Agriculture, Ecosystems and Environment 49: 95-102.
- Metcalf, R.L. & Luckman, W. 1975. Introduction to Pest Management. John Wiley and Sons, Inc. USA. 587p.
- Metcalf, R.L. & Luckman, W.H. 1982. Introduction to Pest Management. 2° ed. John Wiley & Sons Inc., USA. 577 p.
- Milner, R.J. 1994. History of *Bacillus thuringiensis*. Agriculture, Ecosystems and Environment 49: 9-13.
- Moino Jr., A. 1993. Utilização de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* ( Bals. ) Vuill. para o controle de pragas de grãos armazenados. Tese de Mestrado. ESALQ/ USP.
- Muesenbeck, C.F.W. 1925. A revision of the parasitic wasps of the genus *Microbracon* occurring in America North of Mexico. Proceedings of the U.S. National Museum, Washington. 67(8): 1-85.
- Muesenbeck, C.F.W.; Krobein, K.V. & Townes, H.K. 1951. Hymenoptera of America North of Mexico, synoptic catalog. Washington, USDA, 1420p.
- Munro, J.W.1966. Pests of stored products. Hutchinson & Co. (Publishers), Ltd., London. 234 p.
- Mudgett, R.E. 1986. Microwave properties and heating characteristics of foods. Food Tech., 84-92,98.
- Multon, J.L. (ed). 1988. Preservation and Storage of Grains, Seeds and their by Products. Lavoisier Publishing, Inc. Nova Iorque. 1095 p.

- Nakano, O. Siveira Neto, S.; de Batista, G.C. Yoboyama, M.; Degáspari, N. & Marchini, L.C. 1977. Manual de Inseticidas, dicionário. Ed. Agron. Ceres, Ltda, SP. 272p.
- Nelson, S.O. 1966. Stored-grain insect control studies with radio-frequency energy. J.Econ. Entomol 59: 588-594.
- Nelson, S.O. 1973. Insect-control with microwaves and other radiofrequency energy. Bull. Entomol. Soc. Am. 19 : 157-63.
- Nelson, S.O. & Kantack, B.H. 1966. Stored-grain insect control studies with radio-frequency energy. J.Econ. Entomol. 59: 588-594
- Nelson, S.O. & Stetson, L.E. 1974. Comparative effectiveness of 39- and 2450-MHz electric fields for control of rice weevils in wheat. J. Econ. Entomol. 67(5) : 592-95.
- Nelson, S.O. 1987. Potential agricultural applications for RF and microwave energy. Trans ASAE 30 : 818-822, 831.
- Olsen, C.M. 1965. Microwave inhibit bread mold. Food Eng. 37(7) : 51.
- Parkin, E.A. 1965. The onset of insecticide resistance among field populations of stored-product insects. J. stored Prod.Res., 1: 3 -8.
- Paschoal, A.D. 1995. Modelos sustentáveis de agricultura. Agricultura Sustentável, 1: 11-16.
- Pedersen, J.R. & Mills, R.B. 1977. The role of pesticides in preservation of stored grain and grain products. In: White-Stevens, ed. Pesticides in the Environment. vol. 3: 257-312.
- Pessoa, M.C.P.Y.; Pierozzi Jr., I. & Habib, M.E.M. 1993. Sistema especialista para a identificação de fatores de mortalidade natural dos estágios imaturos do bicudo do algodoeiro, na região de Campinas, SP. Anais do 14º Congr. Bras. Entomol., Resumo 233.
- Press, J.W.; Cline, L.D. & Flaherty, B.R. 1982. A comparison of two parasitoids, *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) and *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and a predator, *Xylocoris flavipes* (Hemiptera: Anthocoridae) in suppressing residual populations of the almond moth, *Ephestia cautella* (Lepidoptera: Pyralidae). J. Kans. Entomol. Soc. 55: 725 - 728.

- Puzzi, D. 1973. Conservação de Grãos Armazenados. Editora Agronômica Ceres. São Paulo. 219 p.
- Puzzi, D. 1977. Manual de Armazenamento de Grãos - armazéns e silos. Ed. Agronômica Ceres. São Paulo. 405p.
- Puzzi, D. 1986. Abastecimento e Armazenagem de grãos. Inst. Campineiro de Ensino Agrícola. São Paulo. 232 p.
- Pyenson, L. 1933. The shielding effects of various materials when insects are exposed to the lines of force in a high frequency electro-static field. N.Y. Entomol. Soc. 41(3): 241- 252.
- Quicke, D.L.J. & Sharkey, M.J. 1989. A key to and notes on the genera *Bracon* (Hymenoptera: Braconidae) from America North of Mexico with descriptions of two new genera and three new species. Can.Ent. 121:337-361.
- Rai, P.S.; Ball, H.J.; Nelson, S.O. & Stetson, L.E. 1972. Lethal effects of radiofrequency energy on eggs of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 65(4):807-810.
- Reagan, B.M.; Chiao-Cheng, J.H. & Streit, N. 1980. Effects of microwave radiation on the webbing clothes moth, *Tineola bisselliella* (Humm. ) and textiles. J. Food. Protection 43(8) : 658-663.
- Reichmuth, Ch. 1996. Stored product protection with alternative methods. In: Proceedings of the International Forum on Stored Product Protection and Post-harvest treatment of plant products. Ed. by the Concil of Europe. Strasbourg, France. 129-135.
- Richards, O.W. & Thonson, W.S. 1932. A contribution to the study of genera *Ephestia*, Gn (including *Strymax*, Dyar), and *Plodia*, Gn (Lepidoptera, Phycitidae), with notes on parasites of the larvae. Trans. Ent. Soc. Lo., 80(2): 169-250.
- Rodrigues, R.S.O. 1994. Ponto de vista de uma indústria multinacional sobre o uso de produtos biológicos. In: de Nardo, E.A.B.; Capalbo, D.M.F.; Oliveira, M.C.B. & de Moraes, G.(ed). Memória do workshop "Análise de Risco e Avaliação Ambiental Decorrente do Uso de Agentes de Controle Biológico", CNPMA/EMBRAPA, Jaguariúna, SP. 19-21.
- Romeiro, A. R. & Salles Filho, S. 1996. Dinâmica das inivações sobre restrição ambiental. 83- 122. In: Romeiro, A.R.; Reydon, B.P. & Leonardi, M.L.A. (org). Economia do Meio Ambiente: teoria, políticas e gestão de espaços regionais. UNICAMP, IE, Campinas, SP.384p.

- Salisbury, W.W.; Clark, J.W. & Hines, H.M. 1949. Exposure to microwaves. *Electronics* 22(5):66-67.
- Santos, J.A. 1993. Recomendações para o controle de pragas de grãos e sementes armazenadas. In: Büll, L.T. & Cantarella, H.(ed). *Cultura do Milho. Fatores que afetam a produtividade*. POTAFOS, Piracicaba, SP.197-236.
- Sartori, M.R; Pacheco, I.A. & Vilar, R.M.G. 1990. Resistance to phosphine in stored grain insects in Brazil. In: Fleurat-Lessard & Ducom, editors. *Proceedings 5th International Working Conference on Stored-Product Protection, Bordeaux, France, vol.II:1041-1050*.
- Sartori, M.R. 1993. Resistência de pragas de grãos. *Anais do Simpósio de Proteção de Grãos Armazenados*. 28-43.
- Sartori, M.R. 1996. Resistência de insetos-praga de grãos a pesticidas. *Vetores & Pragas*, 1(3):4-6.
- Schöller, M; Prozell, S; Al-Kirshi, A.-G & Reichmuth, C. 1997. Towards biological control as a major component of integrated pest management in stored product protection. *J. stored Prod. Res.* 33(1): 81-97.
- Scuh, C.A. 1995. Produtos biológicos: uma visão da indústria nacional. In: de Nardo, E.A.B.; Capalbo, D.M.F.; Oliveira, M.C.B. & de Moraes, G. (ed.) *Memória do workshop "Análise de Risco e Avaliação Ambiental Decorrente do Uso de Agentes de Controle Biológico"*, CNPMA/EMBRAPA, Jaguariúna, SP. 19-21.
- Serra, H.J.P. 1992. Bioecologia do ectoparasito *Habrobracon hebetor* ( Say, 1836 ) (Hymenoptera : Braconidae) em *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879 ) (Lepidoptera : Pyralidae). Tese de Mestrado. ESALQ/ USP.
- Siegel, J.P.; Shadduck, J.A. and Szabo, J. 1987. Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for mammals. *J.Econ.Ent.* 80(4):717-723.
- Silveira Neto, S.; Nakano, O.; Barbin, D.; Villa Nova, N.A. 1976. *Manual de Ecologia dos Insetos*. 1º ed. Ed. Agron. Ceres, SP. 419p.
- Sneh, B.; Gross, S. & Gasith, A. 1983. Biological control of *Spodoptera littoralis* (Boisot) (Lepidoptera: Noctuidae) by *Bacillus thuringiensis* subs *entomocidus* and *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Z. ang. Entomol.* 96 : 408-12.

- Stein, C.P. 1985. Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) para estudos com *Trichogramma*. Tese de Mestrado. ESALQ/ USP.
- Tabasnick, B.E.; Cushing, N.L.; Finson, N. & Johnson, M.W. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 83: 1671-1676.
- Tabasnick, B.E.; Finson, N. & Johnson, M.W. 1991. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis*: lessons from the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 85: 1046-1055.
- Tamashiro, M. 1960. The susceptibility of *Bracon*-paralyzed *Corcyra cephalonica* (Stainton) to *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. J. Insect Patol. 2 : 209-219.
- Tateya, A. & Takano, T. 1977. Effects of microwave radiation on two species of stored - product insect. Res. Bull. Prot. Japan 14, 52 - 59.
- Taylor, R.W.D. 1994. Methyl bromide - is there any future for this noteworthy fumigation ? J. stored Prod. Res. 30(4): 253-260.
- Thompson, R.H. 1966. A review of the properties and usage of methyl bromide as a fumigant. J. stored Prod. Res., 1(4): 353-376.
- Thompson, W.R. 1947. Use of moving averages and interpolation to estimate median effective dose. Bacter. Rev. 11: 115-145.
- Tilton, E.W. & Vardell, H.H. 1982. Combination of microwaves and partial vacuum for control of four stored-product insects in stored grains. J. Georgia Entomol. Soc. 17: 106-112.
- Tilton, E.W. & Vardell, H.H. 1982. An evaluation of a pilot-plant microwave vacuum drying unit for stored product insect control *Rhizopertha dominica*, *Sithophylus oryzae*. J. Ga. Entomol. Soc. 17(1): 133-138.
- van Den Bosch, R. & Messenger, P.S. 1973. Biological Control. Intext Educational Publishers. NY. 180p.
- Waage, J.K.; Hassel, M.P. & Godfray, H.C.J. 1985. The dynamics of pest-parasitoid-insecticide interactions. J. Appl. Ecol. 22: 825-838.
- Waib, C.M. 1992. Potencialidade de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* no controle de coleópteros prejudiciais. Tese de Mestrado. IB, UNICAMP.

- Watters, F.L. 1976. Microwave radiation for control of *Tribolium confusum* in wheat and flour. J. stored Prod. Res. 12: 19-25.
- Watkinson, I. 1994. Global view of present and future markets for Bt products. Agriculture, Ecosystems and Environment 49: 3-7.
- Webber, H.H.; Wagner, P. & Pearson, A. 1946. High frequency electric fields as lethal agents for insects. J. Econ. Entom. 39:487-498.
- Weber, E. 1995. Armazenagem Agrícola. Kepler Weber Industrial. Porto Alegre. 400p.
- Whitney, W.K., Nelson, S.O. & Walkden, H.H. 1961. Effects of high-frequency electric fields on certain species of stored grain insects. U.S. Dep. Agric. Mark. Res. Rep. 455, 52p.