

BR 9127778
INIS-BR -- 280

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

MARCAÇÃO DA MOSCA-DO-MEDITERRÂNEO, *Ceratitis capitata*
(WIED., 1824) (DIPTERA: TEPHRITIDAE), COM MANGANÊS
ESTÁVEL E ATIVAÇÃO NEUTRÔNICA, PARA
ESTUDOS DE COMPORTAMENTO

VALDEMAR LUIZ TORNISIELO



Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau
de Doutor em Tecnologia Nuclear.

Orientador: Dr. FREDERICO MAXIMILIANO WIENDL

SÃO PAULO
1990

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de um forma ou outra, me auxiliaram neste trabalho, e especificamente:

- Ao *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN - CNEN - S.P.* pela oportunidade;
- Ao *Centro de Energia Nuclear na Agricultura* pelas facilidades oferecidas;
- À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES*, pela bolsa concedida.
- Ao professor *Dr. Frederico Maximiliano Wiendl* pela orientação e incentivo;
- Aos professores *Dr. Valter Arthur* e *Dr. Julio Marcos Melges Walder* da Seção de Entomologia do CENA, pelas sugestões;
- Ao professor *Paulo Marcos da Silva* da Seção de Ecologia do CENA pela colaboração nas análises;

- À professora Dra. *Marina Beatriz Vasconcellos* e ao Técnico *Gerson Paletti* da Seção de Radioquímica do IPEN pela colaboração nas análises.

- Aos Técnicos das Seções de Ecologia e Entomologia do CENA pela colaboração;

- Aos professores Dra. *Elisabeth A. N. Fernandes* e Dr. *Epaminondas Sansigolo de B. Ferraz* e ao Ms. *Elder de Oliveira* da Seção de Radioisótopos do CENA pelas sugestões e auxílio;

- Ao professor Dr. *Virgilio F. Nascimento Filho* da Seção de Metodologia de Radioisótopos do CENA pelas sugestões.

- A srta. *Eliane Zaidan Silvestre* das Seções de Ecologia e Entomologia do CENA, pela digitação desse trabalho.

À memória de minha mãe,

ao meu pai

OFEREÇO

**À minha esposa Julia,
aos meus filhos Raymond, Alex,
Daniel e Bruno, pelo carinho**

DEDICO

INDICE

	Página
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Análise por Ativação Neutrônica	09
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Marcação das Moscas	15
3.2. Capacidade de Vôo Inicial	16
3.3. Porcentagem de Pupas, Emergência e Longevidade	18
3.4. Ativação das Amostras e Detecção	19
3.5. Padrão de MnCl ₂	21
3.6. Diferenciação entre Moscas Selvagens Criadas em Frutos de Diferentes Espécies	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Efeito do MnCl ₂ na Criação de <i>C. capitata</i> ..	23
4.2. Teste de Arranque de Vôo	26
4.3. Longevidade dos Adultos	28
4.4. Ativação da Dieta para Detecção do Manganês ..	32
4.5. Padrão de MnCl ₂ e Branco de Embalagem	33
4.6. Detecção de Moscas Marcadas	35
4.7. Análise das Moscas Selvagens	40
5. CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
APÊNDICE	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cilindro usado no teste de arranque de vôo.	17
2	Histograma representativo da porcentagem de: pupas obtidas a partir de 500 ovos, adultos emergidos dessas pupas, e pupas inviáveis de <i>C. capitata</i> .	27
3	Porcentagens de <i>C. capitata</i> que não alcançaram vôo nas concentrações de 0; 0,0001; 0,0005 e 0,0010 g de MnCl ₂ por g de dieta de larvas.	29
4	Histograma representativo das médias de esperança de vida e_x^0 para machos e fêmeas de <i>C. capitata</i> , alimentadas na fase larval com diferentes concentrações de MnCl ₂ .	31
5	Espectro obtido de padrão de MnCl ₂ ativado por 60 segundos com fluxo de $2,67 \cdot 10^{11}$ n/cm ² /s e detectado por 120 segundos.	34

Figura

Página

- 6 Espectro obtido da embalagem de polietileno após ativação por 60 segundos com fluxo de $2,67 \cdot 10^{11}$ n/cm²/s e detectado por 120 segundos. 38
- 7 Gráfico das médias em cpm, obtidas de machos e fêmeas testemunha, que morreram com 13, 25, 37 e 57 dias, após ativação por 60 segundos com fluxo de $2,67 \cdot 10^{11}$ n/cm²/s e detecção por 120 segundos. 42

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Número total de pupas (T), número de adultos de <i>C. capitata</i> emergidos (E), número de pupas inviáveis (I) e respectivas médias provenientes de larvas criadas em dietas enriquecida com MnCl ₂ .	24
2	Porcentagens de pupas obtidas a partir de 500 ovos (T), pupas viáveis (V) e inviáveis (I).	25
3	Dados do teste de arranque de vôo de <i>C. capitata</i> , valores numéricos de insetos normais (A), insetos com deficiência de vôo (NA) alimentados na fase de larva com MnCl ₂ , médias, porcentagens e respectiva análise estatística.	28
4	Esperança de vida (e_0^x) em dias e suas respectivas médias para machos e fêmeas de <i>C. capitata</i> , tratadas com várias concentrações de MnCl ₂ g/g de dieta.	30

Tabela	Página
5 Massa em grama de dieta ativada por 60 segundos a um fluxo de $2,67 \cdot 10^{11}$ n/cm ² /s. cpm e cpm/mg obtidas para cada concentração de MnCl ₂ e respectivas médias.	32
6 Massa em grama de MnCl ₂ . contagens por minuto cpm/mg e respectiva média obtida após ativação com neutrons por 60 segundos. tempo de contagem 120 segundos.	35
7 Contagens por minuto e respectivas épocas de coleta, médias obtidas, (pico de energia de 846,9 keV), de <i>C. capitata</i> marcadas com MnCl ₂ , ativados por 60 segundos, fluxo de $2,67 \cdot 10^{11}$ n/cm ² /s e contados por 120 segundos para cada tratamento.	36
8 Média de contagens por minuto obtidas de machos e fêmeas ativadas com fluxo de $2,67 \cdot 10^{11}$ n/cm ² /s por 60 segundos e contadas por 120 segundos, para cada época e concentração.	40
9 Moscas selvagens criadas em diferentes frutos, ativadas com fluxo de $2,67 \cdot 10^{11}$ n/cm ² /s e contagens obtidas no pico de energia de 846,9 keV.	41

RESUMO

MARCAÇÃO DA MOSCA-DO-MEDITERRÂNEO,
Ceratitis capitata (WIED., 1824) (DIPTERA: TEPHRITIDAE),
COM MANGANÊS ESTÁVEL E ATIVAÇÃO NEUTRÔNICA,
PARA ESTUDOS DE COMPORTAMENTO

Valdemar Luiz Tornisielo

Com o objetivo de marcar a mosca do mediterrâneo para estudos de comportamento (etologia) foi montado um experimento alimentando larvas com as concentrações de 0; 0,0001; 0,0005; 0,0010; 0,0050 e 0,0100 gramas de $MnCl_2$ por grama de dieta. Correlacionaram-se moscas marcadas com dieta larval enriquecida com manganês e selvagens, criadas nos seguintes frutos: *Coffea arábica*, *Eriobotaya japônica*, *Syzugium jambos*; *Eugenia uvalha*; *Prunus persica* e *Psidium guajava*.

Baixa concentração (0,0001 grama de $MnCl_2$ por grama de dieta) atuou como micronutriente, aumentando o número de pupas obtidas em relação à testemunha. Concentrações de 0,0005 e 0,0010 não afetaram as larvas e adultos aumentando a longevidade das fêmeas. Valores de 0,0050 e 0,0100 g de $MnCl_2$ por grama de dieta inibiram totalmente o desenvolvimento das larvas.

A ativação das moscas por meio de nêutrons com um fluxo de $2,67 \cdot 10^{11}$ n/cm²/s durante 60 segundos e posterior contagem em um detector de germanio durante 120 segundos, mostrou que os machos e as fêmeas permanecem perfeitamente marcadas até o 19^o dia de vida, quando

suas larvas foram alimentadas com concentrações de 0,0005 e 0,0010 grama de $MnCl_2$ por grama de dieta. Porém, com 25 dias somente os machos provenientes de larvas alimentadas em dieta com concentração de 0,0005 mantiveram a marca, pois as fêmeas excretaram o manganês fornecido, provavelmente através da oviposição.

A quantidade de manganês acumulada pelas larvas e detectadas nos adultos, oriundos de diferentes frutos, foi semelhante.

ABSTRACT

LABELING OF THE MEDITERRANEAN FRUIT FLY
Ceratitis capitata (WIED., 1824) (DIPTERA:TEPHRITIDAE)
WITH STABLE MANGANESE AND NEUTRON ACTIVATION,
FOR BEHAVIOUR STUDIES

Valdemar Luiz Tornisielo

In view to label adults of the Mediterranean fruit fly for behaviour studies (etology) experiments were carried out using larvae fed with enriched stable manganese on concentrations of 0; 0.0001; 0.0005; 0.0010; 0.0050 and 0.0100 grams of $MnCl_2$ per gram of diet.

Also a comparison was done between larvae reared on natural fruits (*Coffea arabica*, *Eriobotaya japonica*, *Syzugium jambos*, *Eugenia uvalha*, *Prunus persica* and *Psidium guajava*) and on artificial diet.

The low concentration of manganese (0.0001 grams of $MnCl_2$ per gram of larval diet) acted only as a micronutrient. Concentrations of 0.0005 and 0.0010 grams of $MnCl_2$ per gram of diet didn't affect larvae or adults, increasing the longevity of the females. Concentrations of 0.0050 and 0.0100 grams of $MnCl_2$ per gram of larval diet completely inhibited the development of the insects.

The flies activated by a flux of $2.67 \cdot 10^{11}$ n/cm²/s during 60 second and counted by a germanium detector during 120 seconds showed that males and females remained well labeled until the 13th day of adult life, if their larvae were feed on diet containing 0.0005 and 0.0010g of MnCl₂ per gram of diet. However, after 25 days only the males emerged from larvae reared on diet containing 0.0005 g of MnCl₂ per gram of diet remained labeled. The females excreted the most of manganese, probably through their laying eggs.

The quantity of accumulated manganese detected on the adults after neutron activation and reared on different fruits was very similar, for any kind of fruit.

1. INTRODUÇÃO

A ativação neutrônica é considerada como um método instrumental, pois não envolve separações químicas ou pré-tratamento de amostras. Além disto o manuseio das amostras dispensa cuidados especiais e equipamentos sofisticados, podendo ser guardadas por tempo indeterminado.

A técnica de análise por ativação resultou, segundo EHMANN (1970) do trabalho pioneiro realizado por HEVESY & LEVY (1936) que estudaram reações de nêutrons com terras raras. Esta técnica, porém, só foi largamente utilizada após 1950, no início de um período de crescimento rápido no número de publicações, principalmente em campos relacionados à metalurgia, à medicina, à geologia e mais recentemente à agricultura e ecologia. No entanto, a técnica tem sido pouco utilizada em trabalhos científicos no Brasil.

A aplicação desta técnica em ecologia de insetos pode contribuir sobremaneira para facilitar o método de marcação, visando determinar parâmetros tais como comportamento e densidade populacional, hospedeiros intermediários, distribuição e raio de voo. O inseto escolhido para a aplicação desta técnica é a mosca-do-Mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera-Tephritidae), praga de destacada importância para a citricultura brasileira.

Segundo MARICONI & IBA. (1955) esta praga foi constatada pela primeira vez no Brasil em 1901, tendo como principais hospedeiros alternativos, o pêssego, a goiaba, a pera, a ameixa, a manga e o café. Esse último mantém uma população estoque de moscas durante a entressafra de citrus.

A cultura de citros, principal atacada, sofre perdas significativas por esta mosca, cujos prejuízos são ocasionadas pelas larvas. Estas destroem a polpa, permitindo a instalação de podridões pela infecção por fungos e bactérias. Mesmo as raras posturas que não possibilitam eclosão de larvas, ou àquelas cujas larvas morrem, causam prejuízos pelo aparecimento de manchas escuras na casca, depreciando e dificultando a comercialização dos frutos (MARICONI & IBA, 1955).

Segundo estatística dos órgãos ligados à agricultura e ao comércio, a produção nacional tem sido ampliada nos últimos anos, crescendo cerca de 175% entre 1970 e 1981, colocando o Brasil como o maior produtor de suco concentrado de laranja em 1985 (MATIOLI, 1985). Em 1987 a produção de frutos *in natura* somou 73.568.815 toneladas, sendo que somente o Estado de São Paulo produziu 60.635.024, (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1989).

Dada a grande importância econômica dessa praga para a citricultura, é imprescindível o conhecimento do seu comportamento populacional e o seu interrelacionamento com plantas hospedeiras intermediárias, que contribuem para manutenção da população "estoque" na época da entressafra.

O propósito do presente trabalho foi estudar a aplicabilidade da marcação de adultos de moscas das frutas *Ceratitis*

capitata (Wied., 1824) com mangânes estável, e sua posterior ativação com nêutrons, para diferenciação, por meio de cintilometria entre insetos marcados e não marcados. Procurou-se também, determinar uma possível diferenciação entre insetos selvagens criados em frutos de diferentes espécies pela análise por ativação neutrônica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A técnica de análise por ativação normalmente é utilizada para a determinação de traços de espécies químicas, principalmente pelo seu alto grau de precisão e não ser destrutiva. O uso de reatores na análise por ativação é apresentado por LIMA (1968), onde são discutidos aspectos importantes dessa técnica e sua aplicação nas áreas de medicina e de ciências biológicas.

Segundo BOWEN (1967), a primeira aplicação agrônômica da análise por ativação é atribuída a SMALES & PATE (1952), que dosaram arsênio em grãos de *Vicia faba* L.. Esta determinação foi, entretanto destrutiva, desde que, após a irradiação foi incorporada à amostra uma quantidade de arsênio, sendo posteriormente realizada uma separação radioquímica desse elemento, a fim de se proceder à determinação quantitativa do mesmo a partir da detecção do ^{77}As com tubo GM.

BODART & DECONNINCK (1977) determinaram a concentração de fósforo, potássio, cloro, magnésio e silício em adubos comerciais. A determinação da concentração de alumínio, cloro, manganês, potássio e sódio em amostras de folhas de feijoeiro foi realizado por ZAGATTO (1974), por meio da ativação em reator com fluxo de $5 \times 10^{12} \text{ n/cm}^{-2}/\text{s}^{-1}$ e posterior detecção em multicanal com detector de Ge (Li).

Com o uso da análise por ativação AYANOGLU & GUENDUEZ

(1978) determinaram a composição química do carvão mineral, onde pode-se esclarecer aspectos da formação da crosta terrestre local, uma vez que as minas de carvão são sítios sem perturbação geológica. HINOMAN *et alii* (1978) compararam e conseguiram diferenciar árvores de *Pinus strobus*, que cresceram em região poluída e não poluída, através da análise por ativação neutrônica.

A determinação multielementar em plantas agrícolas, através de análise por ativação, é discutida por SHERIF *et alii* (1979), onde é enfatizada a simplicidade e precisão analítica para determinação de 17 elementos químicos em 7 espécies de plantas cultivadas no Egito.

LAAG & STEINNES (1978), utilizando a técnica de análise por ativação, estudaram a composição de elementos traços em lâ de carneiro criados em seis diferentes localidades. Nenhuma diferença significativa foi observada quanto a concentração de sódio, potássio, rubídio, césio, cloro, bromo, iodo, cobre, zinco, alumínio, selênio e mercúrio, apesar de lâs de diferentes localidades apresentarem teores de potássio bastante diferenciados entre si.

A marcação de insetos com isótopos, radioativos ou estáveis, é uma técnica muito comum em entomologia aplicada. O grande número de trabalhos publicados durante as últimas duas décadas mostra uma grande variedade de espécies de insetos marcados, elementos usados, métodos de administração e propósitos do uso da marcação.

Porém, especificamente, a aplicação de produtos estáveis e posterior ativação tem sido empregado por poucos autores.

MONRO (1968) determinou a concentração natural de manganês em dietas artificiais para larvas de *Ceratitis capitata*

empregando análise por ativação. Verificou que não houve diferenças significativas de constituição em manganês entre os insetos selvagens capturados na Grécia e em Israel. Ainda, conforme este trabalho, o autor forneceu manganês em concentrações de 0,0001 a 0,001 g de $MnCl_2/g$ na dieta das larvas, com o objetivo de marcar adultos de *C. capitata*, verificando ser a técnica de marcação com elemento estável perfeitamente viável, não havendo influência significativa do $MnCl_2$ na mortalidade de larvas, pupas ou adultos. Cita ainda que *C. capitata* acumula manganês, mas o sítio de estocagem é ainda desconhecido.

Em Vespídeos segundo BOWEN (1950) o sítio de estocagem de manganês é no interior do epitélio. WATERHOUSE (1945) sugere em seu trabalho o uso do cobre para a marcação e ativação de moscas devido ao acúmulo seletivo deste elemento por Dípteros.

RAHALKAR *et alii* (1970) trabalhando com a broca da palmeira *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. (Coleoptera Curculionidae), obtiveram resultados satisfatórios marcando esses insetos com aplicação tópica de cerio estável, para estudos de dispersão, com auxílio da análise por ativação neutrônica. Esses autores verificaram que após 8 semanas os insetos conservavam as marcas, e mesmo quando foram lavados em água, conservavam quantidade suficiente de cerio, possibilitando uma nítida distinção dos insetos marcados dos não marcados dentre todos que foram capturados. Estudos realizados por IPERTI & BUSCARLET (1972) usando irídio-191 como traçador, possibilitaram acompanhar a migração de adultos de *Adonia notata* (Coleoptera, Coccinellidae), empregando-se a técnica de marcação, soltura, recaptura e ativação. A grande preocupação dos autores em empregar a análise por ativação foi evitar a contaminação

ambiental com radioisótopos, além da facilidade de se trabalhar com elemento estável possibilitando aos pesquisadores um maior tempo de experimentação.

LASCEVE *et alii* (1972) estudaram o grau de retenção e a taxa de eliminação de irídio-191, fornecido durante a fase larval de *Laspeyresia pomonella*, empregando-se a técnica de ativação.

WALDER & WIENDL (1974) marcaram através da dieta alimentar de larvas, os adultos de *Musca domestica* L., usando manganês estável. Verificaram que a dosagem de 15,2 mg de MnCl₂ por grama de dieta não afetou a longevidade dos insetos. Após a ativação com nêutrons obtiveram moscas marcadas apresentando 20.000 cpm em média; perfeitamente distinguíveis das testemunhas que apresentaram cerca de 1.000 cpm.

A determinação de nutrientes inorgânicos para *Dacus oleae* (Diptera - Tephritidae) foi estudada por MANOUKAS *et alii* (1978) empregando esta técnica. Determinou-se o sódio, o potássio, o cálcio, o magnésio e o manganês em mesocarpo de azeitonas e em dietas artificiais empregadas para criação desta mosca.

BOOMSMA (1982) marcou operárias de formigas das espécies *Myrmica rubra*, *M. scabronidis* e *Lasius niger*, com europio estável, para estudos do comportamento e da população das colônias. Verificou ser a técnica de marcação muito eficiente nesse estudo e que a longevidade das operárias não foi afetada pela marcação.

HAMANN (1982) mostra em seu trabalho, as possibilidades e vantagens do uso de isótopos estáveis para estudos ecológicos da mosca "Tsetse" *Glossina morsitans*, e apresenta alguns elementos viáveis para

este tipo de trabalho. HAMANN *et alii* (1981) trabalhando com mosca tsetse e análise por ativação neutrônica, forneceram sangue de porco e de boi, através de membranas, para a análise de 21 elementos e não constataram diferença significativa entre moscas criadas com sangue de boi ou porco, apesar de a análise de cada sangue ter apresentado diferenças significativas de constituição.

DEVINE (1982) determinou as concentrações de Na, K, Cl, S, P, Ca, Mg e Fe em saliva de carrapato *Amblyomma variegatum*, utilizando-se dos recursos da análise por ativação neutrônica.

RICHARDSON *et alii* (1970) procuraram desenvolver uma metodologia para marcação de *Drosophila* com elementos estáveis onde testaram os seguintes elementos: háfnio, manganês, samário, alumínio, bromo e disprósio, sendo este último usado para marcação de *D. aldrichi*, *D. mimica*, *D. melanogaster*, onde abordam aspectos tais como o problema de toxidez dos elementos, secção de choque e "excreção da marca", e sugerem a realização de experimentos, com manganês, para melhor elucidar aspectos de durabilidade da marcação e excreção.

Os autores que trabalham com marcação de insetos, usando isótopos estáveis, ativação e detecção são comuns ao citar as várias vantagens do emprego desta técnica, dentre as quais podemos evidenciar:

1. Aplicabilidade em laboratório ou campo, sem elaborada infra-estrutura que requeira grandes investimentos.
2. Pode-se marcar ilimitado número de insetos sem danificá-los e a baixo custo.
3. Pela estabilidade do isótopo, torna-se possível a conservação de amostras por tempo indefinido, até que a ativação possa

ser feita.

4. As amostras não são destruídas, e podem ser guardadas ou reutilizadas em novos experimentos de mesma finalidade após a ativação.

5. Não existe risco de contaminação ambiental, nem de manuseio, já que o material é ativado por pouco tempo e portanto terá meia vida curta, e baixa atividade.

Como limitação do método temos a ativação, que requer um acelerador de partículas ou um reator, e equipamento para detecção de radiações.

2.1. Análise por Ativação Neutrônica

Teoria do Método:

A análise por ativação com nêutrons é uma técnica nuclear de análise elementar, baseada na produção de radioisótopos, formados através de reações nucleares entre os nêutrons e os átomos dos isótopos dos elementos que constituem a amostra.

O espectro dos raios gama dos radioisótopos formados é utilizado para identificar os elementos presentes, e a determinação da taxa de emissão dos raios gama de cada radioisótopo permite estimar a concentração de alguns elementos na amostra.

O número de átomos de um dado isótopo do elemento é igual a $f.N$, onde f é abundância isotópica e N o número de átomos do elemento na amostra. Colocando-se essa amostra em um fluxo de neutrons ϕ

(nêutrons/cm⁻²/s⁻¹), os átomos do isótopo poderão sofrer reações nucleares, resultando na formação de radioisótopos, segundo uma taxa dada pela equação:

$$\text{taxa de formação} = \sigma f N \phi \dots \dots \dots (1)$$

onde σ é uma constante de proporcionalidade, denominada secção de choque e ϕ é uma característica do isótopo alvo, do tipo e da energia da partícula incidente.

A secção de choque σ na equação (1) deve ser expressa em cm². mas em geral é tabelada em barns, sendo 1 barn = 10⁻²⁴ cm² = 1 fermi. Os átomos, do isótopo radioativo formado, têm probabilidade de se desintegrarem, sendo a taxa de desintegração proporcional ao número de átomos radioativos formados N*, isto é,

$$\text{taxa de desintegração} = \lambda N^* \dots \dots \dots (2)$$

onde λ é a constante de desintegração (s⁻¹).

A taxa líquida de produção de átomos radioativos (dN*/dt) é igual à diferença entre a taxa de formação (equação 1) e a taxa de desintegração (equação 2), isto é,

$$\frac{dN^*}{dt} = \sigma f N \phi - \lambda N^* \dots \dots \dots (3)$$

Após ter decorrido um tempo t desde o início da irradiação da amostra, o número de átomos radioativos (N*) formados é dado pela integração da equação (3):

$$N^* = \frac{\sigma f N \phi}{\lambda} (1 - e^{-\lambda t}) \dots \dots \dots (4)$$

A atividade (A), ou seja, o número de átomos que se desintegram na unidade de tempo (dps) é dada pelo produto da constante de desintegração e do número de átomos radioativos formados, conforme visto anteriormente (equação 2):

$$A = \lambda N \dots \dots \dots (5)$$

Substituindo-se essa equação na equação (4), tem-se que,

$$A = \sigma f N \phi (1 - e^{-\lambda t}) \dots \dots \dots (6)$$

Por outro lado, o número de átomos do elemento (N) pode ser expresso pela equação,

$$N = \frac{m \cdot N_0}{M} \dots \dots \dots (7)$$

onde: M = átomo-grama do elemento (grama).

m = massa do elemento (grama)

N₀ = número de Avogadro.

Substituindo a expressão (7) na equação (6), e lembrando que $\lambda = 0,693/T$, onde T é a meia-vida do radioisótopo, tem-se que:

$$A = \sigma f \frac{m \cdot N_0}{M} \phi (1 - e^{-0,693 \cdot t/T}) \dots \dots (8)$$

Como σ é, geralmente, dado em barns, e f em porcentagem (%), e sabendo-se que $N_0 = 6,02 \times 10^{23}$ átomos/átomo-grama, a expressão (8) pode ser reescrita na forma,

$$A = 10^{-24} \cdot 6,02 \times 10^{23} \cdot \frac{\sigma f}{100} \cdot \frac{m}{M} \phi (1 - e^{-0,693 \cdot t/T}),$$

ou

$$A = 6,02 \cdot 10^{-3} \sigma f \frac{m}{M} \phi (1 - e^{-0,693 \cdot t/T}) \dots (9)$$

A título de exemplo, pode-se calcular a atividade a ser obtida no final de um tempo de irradiação de 24 horas para o elemento sódio, presente em uma amostra, na concentração de 1 ppm, ou seja, 1 µg de Na/g de amostra, quando irradia-se 100 mg de amostra com nêutrons em um reator, cujo fluxo de nêutrons térmicos é da ordem de 5×10^{12} nêutrons.cm⁻².s⁻¹. O elemento sódio, só tem um isótopo natural, o Na-23, com uma abundância isotópica natural de 100%. A secção de choque para a reação ²³Na (n, γ) ²⁴Na é 0,526 barns, e a meia-vida do Na-24 é de 15,0

horas. Portanto, ao final de 24 horas de irradiação, essa amostra apresentará uma atividade em Na-24 igual a:

$$A = 6,02 \times 10^{-3} \cdot 0,525 \cdot 100 \cdot \frac{10^{-7}}{22,9898} \cdot 5 \times 10^{12} (1 - e^{-0,693 \cdot 24 / 15})$$

$$A = 0,6874 \cdot 10^4 \cdot 0,67 \text{ dps}$$

$$A = 0,461 \times 10^4 \text{ dps} = 27,63 \times 10^4 \text{ dpm}$$

O Na-24, quando se desintegra, emite um raio gama de 1,368 MeV e outro de 2,754 MeV, com taxa de emissão de 100%, ou seja, em cada desintegração, aparecem os dois raios gama. Desse modo, a atividade de Na-24 na amostra seria de 276300 raios gama de 1,368 MeV por minuto e outros 276300 raios gama de 2,754 MeV por minuto. Se for utilizado um detector de Ge (Li) de alta resolução e baixa eficiência de detecção os raios gama serão detectados com eficiência da ordem de 0,5%; sendo assim, a taxa de contagem obtida seria de aproximadamente 1400 contagens por minuto (cpm).

Usando-se fontes radioativas emissoras de nêutrons com fluxo da ordem de 10^6 nêutrons $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ a taxa de contagem para essa mesma amostra seria insignificante. Neste caso, poder-se-ia pensar em utilizar detectores de radiação gama mais sensíveis e com menor resolução, como o cristal cintilador de NaI (Tl), com uma eficiência de 10 a 20 vezes maior que o raio gama de 1,368 MeV. Só a troca de detectores não seria suficiente e para se atingir uma taxa de contagem razoável, tem-se que pensar em amostras de maior massa e maior concentração. Desse modo, supondo uma amostra de 5 g com um teor de Na de 1% irradiada nas mesmas condições com uma fonte de nêutrons, é de se esperar uma taxa de contagem de 1400 cpm, quando se utiliza um detector de NaI(Tl) com 5% de eficiência; a mesma obtida em um reator e posterior

deteccão com um detector Ge(Li).

Pode ser notado pela equação (8) que a atividade (dpm) ou a taxa de contagem (cpm) depende do tempo de irradiação. Para um tempo infinito ou pelo menos igual a 5 meias-vidas do radioisótopo, o valor entre parênteses da equação (9) tende para 1, onde se teria o valor máxima da atividade, chamada de atividade de saturação. Portanto, para um tempo de irradiação igual a infinito, tem-se:

$$A = A_{sat} = 6,02 \times 10^{-3} \sigma f \frac{m}{M} \phi \dots \dots \dots (10)$$

Para radioisótopos de meia-vida longa é quase impossível se atingir essa atividade de saturação, pois o tempo de irradiação seria excessivamente longo. Para o Na-24, 5 meias-vidas correspondem a 75 horas ou aproximadamente 3 dias.

Pode ser visto pela equação (9) que se o tempo de irradiação for igual a uma meia-vida, seria obtido uma atividade igual à metade da atividade de saturação, pois o termo entre parênteses é igual a meio:

$$A = \frac{6,02}{2} \times 10^{-3} \sigma f \frac{m}{M} \phi = \frac{A_{sat}}{2} \dots \dots \dots (11)$$

Para tempos relativamente curtos, em relação à meia-vida do radioisótopo, a atividade ou a taxa de contagem é diretamente proporcional ao tempo de irradiação.

No Apêndice 1, pode-se observar essa correspondência entre o tempo de irradiação e a atividade obtida para dois radioisótopos: ^{56}Mn com meia-vida de 2,58 horas e para ^{24}Na , com meia-vida de 15,0 horas.

Após o término do tempo de irradiação, o radioisótopo formado continua a se desintegrar e a sua atividade vai diminuindo

exponencialmente com o tempo, chamado tempo de resfriamento (t_r). Assim, pela lei do decaimento radioativo, a atividade A' após um tempo t_r de resfriamento, é dada pela equação:

$$A' = A e^{-0,693 t_r / T} \dots \dots \dots (12)$$

onde:

A = atividade ao término do tempo de irradiação.

Em resumo, a sensibilidade da análise elementar por meio da ativação com nêutrons depende do fluxo de nêutrons (ϕ), da secção de choque do isótopo (σ), da abundância natural isotópica (f), da massa da amostra a ser irradiada, da concentração do elemento na amostra, da meia-vida do radioisótopo formado e dos tempos de irradiação (t) e de resfriamento (t_r), e da eficiência do detector (SIMABUCO, 1984).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Marcação das Moscas

A presente pesquisa foi desenvolvida na Seção de Entomologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, e na Seção de Radioquímica do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP.

As moscas foram criadas conforme as técnicas de criação da Seção de Entomologia do CENA.

A marcação das moscas (*Ceratitis capitata*) foi feita através da dieta fornecida às larvas, com a seguinte constituição em peso de matéria seca: bagaço de cana 49,5 g; farinha de trigo 49,50 g; levedura de cerveja 49,50 g; Açúcar cristal 80 g, benzoato de sódio 1,35 g, água 270 ml e ácido clorídrico 2,3 ml. Após a parte líquida ter sido misturada acrescentou-se cloreto manganoso ($MnCl_2$) de forma a obter perfeita homogeneização, adicionando, então, a porção seca.

As seguintes concentrações de $MnCl_2$ foram testadas: 0,0001; 0,0005; 0,0010; 0,0050 e 0,0100 grama por grama de dieta, para larvas. Cada concentração foi feita com três repetições, bem como a testemunha (a mesma dieta sem $MnCl_2$). O manganês foi escolhido para marcação das moscas pela facilidade de aquisição, e por não ser tóxico para moscas em baixas concentrações, conforme a literatura

consultada. Apesar de apresentar baixa secção de choque (13.3 barn), uma ativação por período curto permite sua detecção com facilidade e precisão; apresenta meia vida curta (2.58 horas), o que é bastante interessante para sua ativação detecção e posterior decaimento.

A dieta (167 g) foi acondicionada em caixas plásticas medindo 2 x 12 x 18 cm onde colocou-se 500 ovos com idade entre 0 e 6 horas, cuja viabilidade foi determinada em 98%. Todo experimento foi conduzido em uma sala climatizada, com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 5\%$ em fotoperíodo de 14 horas, iniciando as 6 horas o período de luz.

3.2 Capacidade de Vôo Inicial

Uma das formas de se avaliar a qualidade dos insetos produzidos em laboratório, no caso específico de *Ceratitis capitata*, é a avaliação da capacidade de "arranque de vôo". Assim sendo, este parâmetro foi observado, de maneira que pode-se verificar a ocorrência de efeito negativo ou não nos insetos adultos, induzido pelo fornecimento de MnCl_2 na alimentação das larvas.

Para isto, utilizaram-se cilindros de 10 cm de altura por 9 cm de diâmetro, feitos de cartolina preta, revestida internamente com um filme de celulósido.

A base inferior do cilindro ficou apoiada numa placa de Petri onde foram colocadas pupas e pedaços de papel sanfonado, que serviam de apoio aos adultos para aiçarem vôo, (Figura 1).

Os cilindros foram polvilhados internamente com uma camada de talco industrial, sendo que 1 cm da parte inferior do cilindro

não foi untada, para evitar o contato com as pupas. O talco teve a finalidade de não permitir que as moscas recém emergidas subissem pela superfície do cilindro. O processo é o padronizado pelos laboratórios da IAEA de Seibersdorf, Austria e descrito por YAMAMOTO (1988). Assim, somente as moscas que apresentam capacidade de voo inicial, (o "arranque de voo") conseguem sair do cilindro.

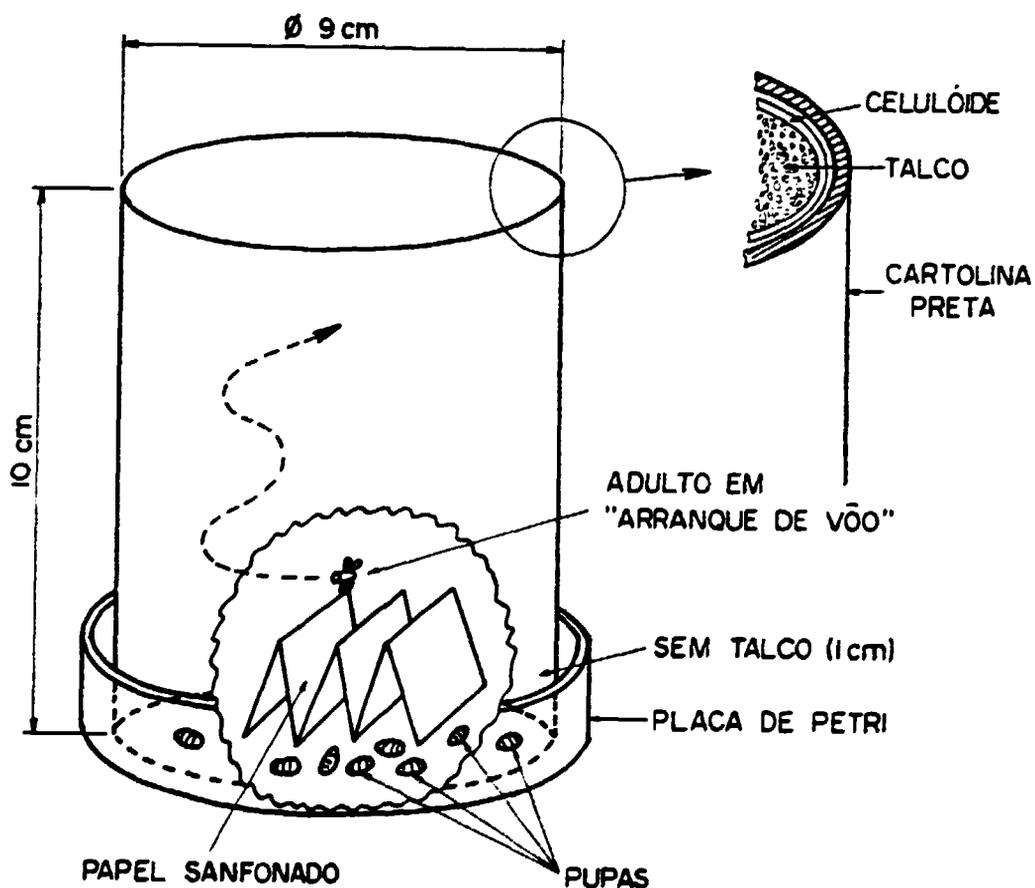


Figura 1 - Cilindro usado no teste de arranque de voo.

Foram feitas 3 repetições para cada tratamento, utilizando-se todas as pupas obtidas a partir dos 500 ovos inoculados inicialmente.

Após o final da emergência dos adultos, os cilindros foram verificados anotando-se o número de adultos no seu interior que não arrancaram vôo, além do número de pupas inviáveis. Por diferença, calculou-se o número de adultos com comportamento normal de arranque de vôo.

3.3. Porcentagem de Pupas, Emergência e Longevidade

Foi determinado o número de pupas obtidas a partir de 500 ovos de cada repetição, bem como a porcentagem de emergência de adultos de cada tratamento. Após a emergência, foram contados e anotados os números de machos e fêmeas emergidos e o número de pupas inviáveis.

Para cálculo da longevidade, foram usados todos adultos emergidos e que arrancaram vôo do interior dos cilindros descritos acima, e que foram mantidos em gaiolas de 15 x 15 x 25 cm, com armação de arame e tecido de "voil".

A longevidade dos adultos foi determinada através da sexagem e contagem dos insetos mortos, a cada em quatro dias. Os mortos foram secos e guardados. Com estes dados calculou-se a esperança de vida (e^x) segundo BARCLEY (1966). Foi feita a análise estatística e aplicado o do teste de Tukey a 5%.

A dieta oferecida aos adultos constituiu-se de: açúcar refinado, proteína hidrolisada ("Vegamine" n^o 3) glucose de milho e mel. Esta dieta foi colocada na parte superior da gaiola entre duas camadas

de papel de filtro. Ofereceu-se também a água destilada, em chumaço de algodão hidrófilo, sobre a tela da gaiola, coberto com plástico para diminuir a evaporação.

3.4. Ativação das Amostras e Detecção:

As moscas mortas foram coletadas de cada gaiola a cada quatro dias, sexadas, contadas e secas a 40°C em estufa, guardadas em frascos para posterior ativação com nêutrons em reator.

Dessas, quatro amostragens em épocas diferentes foram tomadas, como segue: 13^o dia de vida dos adultos, foi o primeiro intervalo de 4 dias no qual as primeiras mortes ocorreram naturalmente. No 25^o dia é o intervalo em que ocorreu cerca de 50% da mortalidade. No 37^o dia dessa sequência, no qual ocorreu cerca de 60% de mortalidade, fez-se nova amostragem. A quarta amostragem feita aos 57 dias, quando a mortalidade da população atingiu 99% em todos os tratamentos. Para cada época, tratamento e respectivas repetições, amostrou-se ao acaso, um macho e uma fêmea, que foram hermeticamente embalados em polietileno, etiquetados e posteriormente ativados no reator do IPEN.

Para essa irradiação, foi usado um frasco de polietileno com tampa rosqueável (coelho¹) medindo 5 cm de altura onde as moscas, foram colocadas pré-embaladas. Para se evitar diferenças na disposição ao fluxo de nêutrons, as moscas foram colocadas no interior

¹Termo frequentemente utilizado em trabalhos com ativação. Provém de "rabbit" da língua inglesa.

do coelho na mesma posição e irradiadas em grupos de dez amostras de cada vez. As amostras foram expostas por 60 segundos a um fluxo de $2.67.10^{11}$ nêutrons por cm^2/s . Decorridos cinco minutos após irradiação, para "resfriamento", as amostras foram retiradas do coelho e colocadas em tubos de contagem de polietileno para serem individualmente contadas por 120 segundos em um detector germânio hiperpuro: Modelo GMX-20 série γ X HPGE.

As taxas de contagens por segundo (cps) obtidas de cada amostra, foram extrapoladas ao tempo inicial, aplicando-se a seguinte fórmula:

$$A_0 = \frac{A}{e^{-\ln \frac{2}{T} \times t}}, \text{ onde:}$$

A_0 - contagem no tempo zero

A - contagem obtida

t - tempo decorrido da irradiação até a contagem

T - meia - vida

Para facilitar e melhorar a visualização dos resultados, as contagens por segundo (cps) do tempo inicial foram transformadas em contagens por minuto (cpm). Para detecção do ^{56}Mn utilizou-se os picos de energia 846,9 keV e sua confirmação pelo pico de 1.810,7 keV. Utilizaram-se para comparação das amostras, as cpm obtidas do primeiro pico, tendo em vista que a taxa de contagem nesse pico é mais intensa que as taxas de contagens nos demais picos.

De maneira que se verificasse o enriquecimento da dieta

com manganês, amostras da dieta usada, foram secas, trituradas em almofaris e cerca de 0.2 g foram embaladas e irradiadas conforme processo já descrito. Para cada lote irradiado, foram colocados embalagens de polietileno vazias com a mesma massa das usadas para embalagem das moscas, bem como dietas e padrão de $MnCl_2$, de maneira a se descontar possíveis interferências de contagens do polietileno.

3.5. Padrão de $MnCl_2$

Amostras de $MnCl_2$ com massa de 0.0011; 0.0012; 0.0004 e 0.0010 gramas foram ativadas juntamente com as amostras de moscas e dieta, para que fosse possível a comparação e aferição com as amostras objeto de estudo, além de servir como padrão para determinação dos picos de 846.9 keV e 1.810,7 keV, característicos do manganês. Os padrões, após a irradiação, foram deixados em "resfriamento", até que se pudesse obter contagens com "tempo morto" próximo do valor zero %. O "tempo morto" ocorre normalmente em amostras com alta atividade e é devido ao tempo em que o sensor não pode detectar radiações, sendo que no caso este foi compensado automaticamente pelo circuito eletrônico do equipamento usado.

3.6. Diferenciação entre Moscas Selvagens Criadas em Frutos de Diferentes Espécies

Criaram-se larvas de *Ceratitis capitata* selvagens, da fase de ovo à de pupa nos seguintes frutos: café (*coffea arabica*), nêspera (*Eriobotaya japonica*), jambo (*Syzugium jambos*), uvaia (*Eugenia uvaia*), pêssego (*Prunus persica*) e goiaba (*Psidium guajava*). Após a

emergência dos adultos, estes foram mortos, secos e um macho e uma fêmea, obtidos de cada espécie de fruta, foram submetidos à ativação, seguida da detecção, conforme descrito anteriormente. Comparou-se os espectros obtidos para cada amostra, entre si e entre as amostras de moscas marcadas com manganês, em laboratório.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito do $MnCl_2$ na Criação de *C. capitata*

A Tabela 1 apresenta os valores numéricos e respectivas médias de pupas obtidas, adultos emergidos e pupas inviáveis provenientes de larvas de *C. capitata* criadas em dietas enriquecidas com diferentes concentrações de $MnCl_2$. Na Tabela 2 estão as porcentagens de adultos emergidos à partir de 500 ovos, pupas viáveis e não viáveis. Os resultados apresentados nestas tabelas sugerem que o $MnCl_2$ é um micronutriente importante para *C. capitata*, mas é também tóxico, visto que em concentrações de 0,005 e 0,01 g de $MnCl_2$ por grama de dieta, causou mortalidade total das larvas. O mecanismo de toxidez não foi estudado neste trabalho, a hipótese que se pode levantar é a de que cloro presente na fórmula tenha sido tóxico, pois nem mesmo fungos ou bactérias se desenvolveram sobre as dietas preparadas com essas concentrações de $MnCl_2$ após 30 dias. Já concentrações inferiores 0,001; 0,0005; 0,0001 e a testemunha guardadas nas mesmas condições ficaram infectadas com colônias de fungos e bactérias. A repetição do experimento conduziu a resultados semelhantes, portanto a conclusões também semelhantes.

Tabela 1 - Número total de pupas (T), número de adultos de *C. capitata* emergidos (E), número de pupas inviáveis (I) e respectivas médias provenientes de larvas criadas em dietas enriquecida com MnCl₂.

CONCENTRAÇÃO g/g DIETA		REPETIÇÃO			MÉDIA
		1	2	3	
0	T	453	436	393	427.3
	E	427	416	369	404.0
	I	26	20	24	23.3
0,0001	T	467	440	461	456.0
	E	429	407	430	422.0
	I	38	33	31	34.0
0,0005	T	423	431	432	428.6
	E	383	398	372	384.3
	I	40	33	60	44.3
0,0010	T	358	326	355	346.3
	E	331	300	326	319.0
	I	27	26	29	27.3
0,0050	T	0	0	0	0.0
	E	0	0	0	0.0
	I	0	0	0	0.0
0,0100	T	0	0	0	0.0
	E	0	0	0	0.0
	I	0	0	0	0.0

Tabela 2 - Porcentagens de pupas obtidas a partir de 500 ovos (T), de pupas viáveis (V) e inviáveis (I).

CONCENTRAÇÃO g/g DIETA		REPETIÇÃO		
		1	2	3
0	T	90.6	87.2	78.6
	V	94.2	95.4	93.9
	I	5.8	4.6	6.1
0.0001	T	93.4	88.0	92.2
	V	91.8	92.5	93.2
	I	8.2	7.5	6.8
0.0005	T	84.6	86.2	86.4
	V	90.5	92.3	86.1
	I	9.5	7.7	13.9
0.0010	T	71.6	65.2	71.0
	V	92.4	92.0	91.8
	I	7.6	8.0	8.2
0.0050	T	0.0	0.0	0.0
	V	0.0	0.0	0.0
	I	0.0	0.0	0.0
0.0100	T	0.0	0.0	0.0
	V	0.0	0.0	0.0
	I	0.0	0.0	0.0

Com os valores das médias das porcentagens foi construído o gráfico da Figura 2. Pode-se observar que o $MnCl_2$ fornecido na dieta de larvas de *C. capitata* em baixa concentração (0,0001), favoreceu um pequeno aumento da porcentagem de pupas obtidas mas que estatisticamente não difere das concentrações zero e 0,0005. Nota-se ainda que, para a

concentração de 0,0010 g de $MnCl_2$ por g de dieta, houve um efeito negativo, estatisticamente significativo, em porcentagem na produção de pupas, apesar de não ter havido redução da porcentagem de pupas viáveis. Estes resultados diferem dos obtidos por MONRO (1968), onde o mesmo afirma que, para a concentração de 0,0010 de $MnCl_2$, aparentemente não houve efeito no desenvolvimento de larvas, pupas e adultos.

4.2 Teste de Arranque de Vôo

Na Tabela 3, pode-se observar que a marcação, de *C. capitata* com $MnCl_2$ teve um efeito, estatisticamente, significativo a nível de 5% em relação à capacidade de arranque de vôo para moscas tratadas na concentração 0,0010 g de $MnCl_2$ por g dieta, confirmando o que foi descrito sobre as Tabelas 1 e 2. Configura-se assim o $MnCl_2$, em concentrações iguais ou superiores a 0,0010 g/g, como agente inibidor para larvas, pupas e adultos de *C. capitata*. Com as médias de porcentagens de moscas com deficiência de vôo construiu-se a Figura 3, onde podemos observar que na concentração de 0,0001 grama de $MnCl_2$ por grama de dieta de larvas, houve redução no número de adultos que não arrancaram vôo em relação a concentração zero, que também apresentou insetos com deficiência de vôo. Concentrações superiores a essa causaram um pequeno aumento no número de indivíduos incapazes de voar. Essa pequena porcentagem de insetos incapazes de voar observados na concentração zero, segundo BOLLER *et alii* (1981) é natural e ocorre tanto com insetos criados em laboratório como em condições naturais de campo.

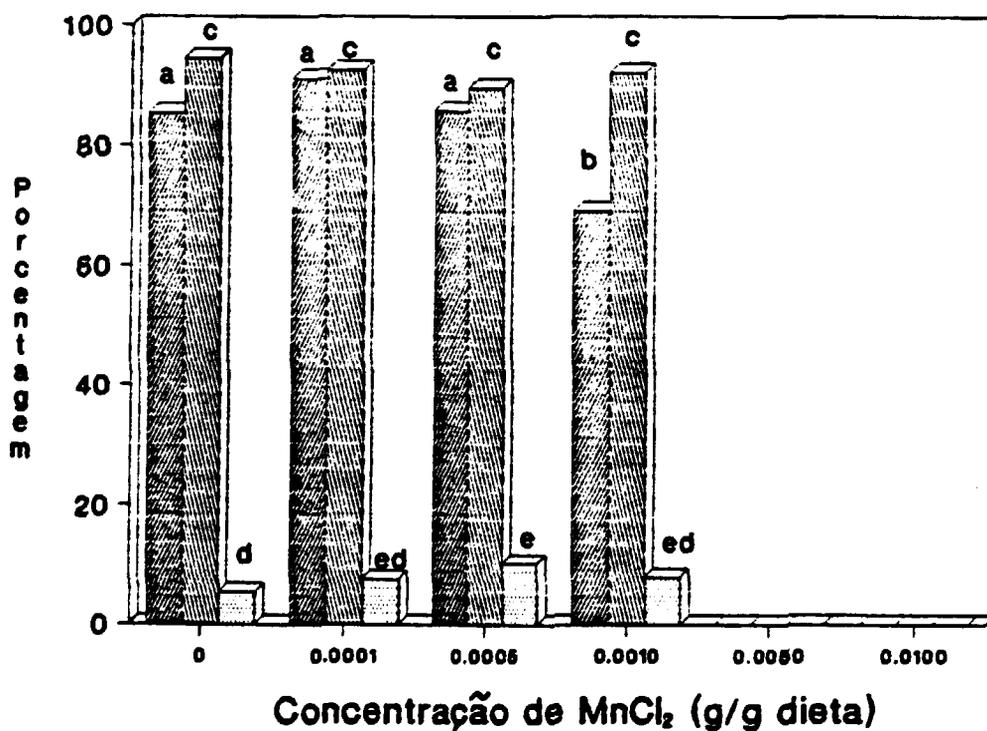


Figura 2 - Histograma representativo da porcentagem de : pupas obtidas a partir de 500 ovos (), adultos emergidos dessas pupas (), e pupas inviáveis () de *C. capitata*. Letras distintas diferem entre si ao nível de 5% (Tukey).

Tabela 3 - Dados do teste de arranque de vôo de *C. capitata*, valores numéricos de insetos normais (A), insetos com deficiência de vôo (NA) alimentados na fase de larva com $MnCl_2$, médias, porcentagens e respectiva análise estatística. (Letras distintas diferem entre si - Tukey 5%).

REPETIÇÃO	CONCENTRAÇÃO g $MnCl_2$ /g dieta							
	0		0,0001		0,0005		0,001	
	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA
1	417	10	422	7	354	29	309	22
2	392	24	394	13	373	25	268	32
3	357	12	417	13	357	15	304	22
média	388	15	411	11	361	23	293	25
% média	96 a		97 a		94 ab		92 b	

Comparando esses resultados com os obtidos por YAMAMOTO (1988), verificamos que os mesmos são bastantes distintos, pois esta autora obteve 81% de moscas com capacidade normal de arranque de vôo.

4.3. Longevidade dos Adultos

Todo estudo que envolva marcação de insetos ou outros animais, tem obrigatoriamente que considerar as interferências da "marca" em relação à longevidade do animal, de maneira que a mesma seja o mais semelhante possível à dos normais. Assim sendo, a longevidade dos machos e fêmeas de *C. capitata*, alimentadas durante a fase de larva com dieta enriquecida com $MnCl_2$ foi calculada a partir da esperança de vida

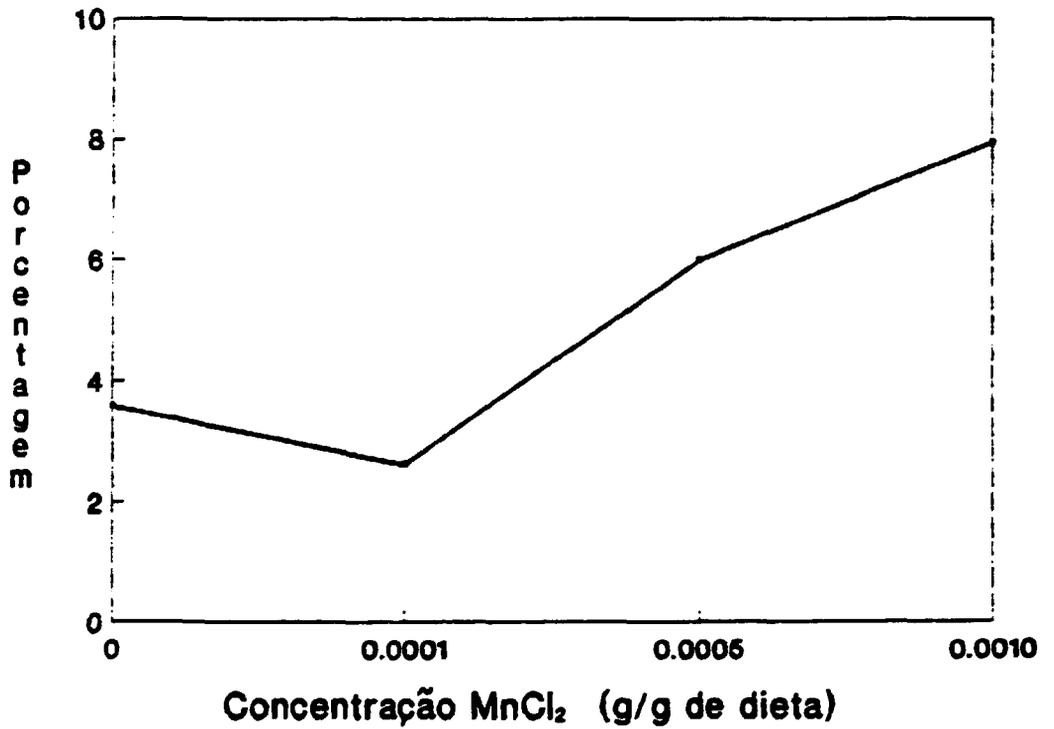


Figura 3 - Porcentagens de *C. capitata* que não alçaram vôo nas concentrações de 0; 0.0001; 0.0005 e 0.0010 g de MnCl₂ por g de dieta para larvas.

e^x , em dias. Na Tabela 4 estão os dados de esperança de vida, as médias respectivamente para machos e fêmeas. Na Figura 4, pode-se observar que as fêmeas marcadas com $MnCl_2$ nas doses de 0,0005 e 0,0010 g/g de dieta tiveram um aumento, estatisticamente significativo na esperança de vida. Os machos em todos os tratamentos, inclusive na concentração zero e fêmeas da concentração 0,0001 g de $MnCl_2$ por g de dieta apresentaram longevidade semelhante. Mas que não está de acordo com YAMAMOTO (1988), já que esta encontrou para testemunha, uma esperança de vida de apenas 17,46 e 20,79 dias para machos e fêmeas respectivamente. Durante as observações da mortalidade diária, observou-se que o intervalo de duração de vida mínima e máxima para machos normais foi de 13 e 81 dias, para fêmeas normais a duração de vida mínima e máxima foi de 13 e 90 dias. Estes dados quando comparados com os obtidos por YAMAMOTO (1988) são bastante distintos, apesar de os trabalhos terem sido realizados sob as mesmas condições de temperatura, umidade e fotoperíodo.

Tabela 4 - Esperança de vida (e^x) em dias e suas respectivas médias para machos e fêmeas de *C. capitata*, tratadas com várias concentrações de $MnCl_2$ g/g de dieta.

REPE- TIÇÃO	CONCENTRAÇÃO							
	0		0,0001		0,0005		0,0010	
	MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA
1	32,3	35,2	29,8	30,9	26,9	37,3	33,6	48,4
2	31,7	34,8	29,9	42,0	26,7	37,9	26,5	38,4
3	32,1	38,6	28,6	31,9	34,6	47,9	27,5	40,8
média	32,0	36,2	29,4	34,9	29,4	41,1	29,2	42,5

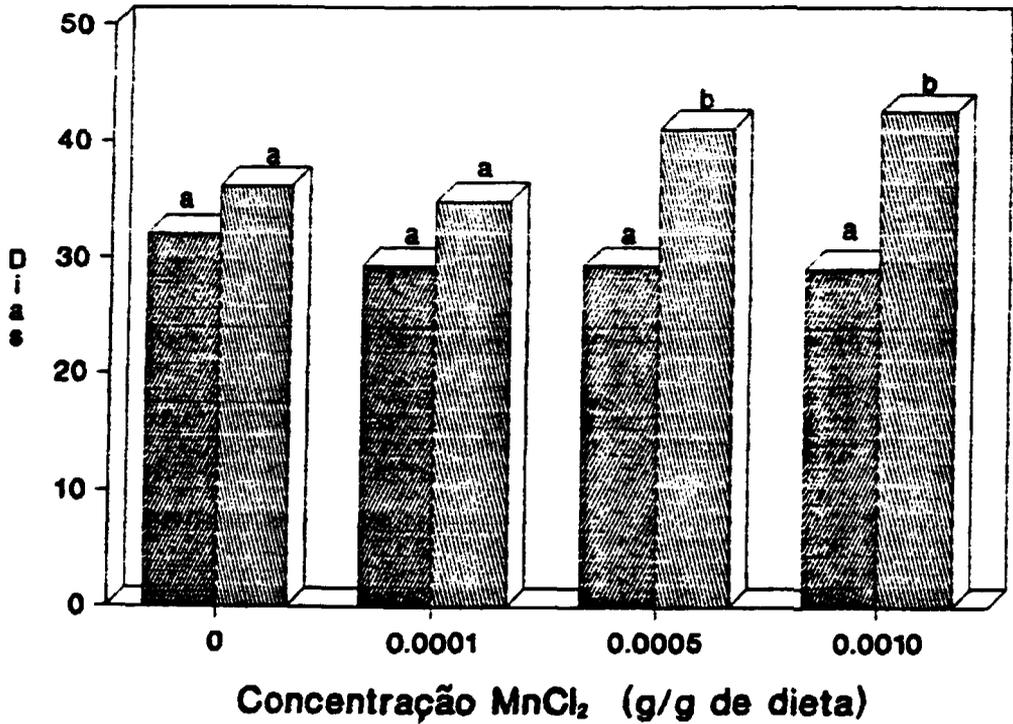


Figura 4 - Histograma representativo das médias de esperança de vida e^x para machos () e fêmeas () de *C. capitata*, alimentadas na fase larval com diferentes concentrações de $MnCl_2$. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si ao nível de 5% (Tukey).

4.4. Ativação da Dieta para Detecção do Manganês

Com o objetivo de fazer uma determinação comparativa do manganês fornecido às larvas através da dieta, foram ativadas três amostras de cada dieta/concentração. Os resultados concernentes à massa, cpm e cpm/mg das dietas estão apresentados na tabela 5. Nesta podemos

Tabela 5 - Massa em gramas de dieta ativada por 60 segundos a um fluxo de $2.67.10^{11}$ n/cm²/s. cpm e cpm/mg obtidas para cada concentração de MnCl₂ e respectivas médias.

CONCENTRAÇÃO	REPETIÇÃO	MASSA (em g)	(cpm)	cpm/mg
0	1	0,2040	325	1,6
	2	0,2046	331	1,6
	3	0,1962	318	1,6
	média	0,2016	324	1,6 ± 0,0
0,0001	1	0,2019	2716	13,4
	2	0,2056	2982	14,5
	3	0,2115	3867	18,3
	média	0,2063	3188	15,4 ± 2,6
0,0005	1	0,1999	14327	71,7
	2	0,2030	14358	70,7
	3	0,2040	14070	68,9
	média	0,2023	14251	70,4 ± 1,4
0,0010	1	0,1992	29040	145,8
	2	0,1993	28845	144,7
	3	0,1996	27008	135,3
	média	0,1993	28297	141,9 ± 5,8

observar pela contagem (cpm/mg) a presença de manganês na dieta testemunha, com seu número de cpm/mg, cerca de dez vezes menor que da

concentração mais baixa usada (0,0001 g/g de dieta), e que não foi suficiente para marcar os adultos, mas funcionou como "estimulante" para o desenvolvimento das larvas criadas nesta concentração de $MnCl_2$. Pode-se ver pelo desvio padrão das médias de cada concentração, terem sido as dietas homogeneamente marcadas.

4.5. Padrão de $MnCl_2$ e Branco de Embalagem

A taxa de contagem, em cpm, do padrão $MnCl_2$ ativados juntamente com as amostras de dieta e moscas são apresentados na Tabela 6 e Figura 5, onde observamos o espectro obtido em uma das amostras do padrão, onde destaca-se com nitidez os 2 picos principais (846,9 e 1.810,7 keV) correspondentes ao ^{56}Mn . Pela Tabela 6 pode-se verificar que existe uma variabilidade em massa para cada amostra. Isto é atribuído pelo fato do $MnCl_2$ se apresentar na forma de cristal e ser altamente higroscópico; embora tenha-se procurado realizar uma pesagem com precisão, a mesma não deve ter ocorrido, pois nota-se um desvio de 10,8%, na média de cpm/mg, ocasionado devido às repetições 3 e 4. Este erro não interferiu nos resultados deste trabalho, uma vez que o mesmo foi qualitativo. De maneira a não ocorrer estas variações, deve-se fazer a preparação dos padrões, com uso de soluções aquosas, e deposição de volumes com concentrações conhecidas em pedaços de papel de filtro e secagem para posterior ativação. A ativação de embalagens de polietileno usado para acondicionar as amostras, mostrou que as mesmas não interferiram nos resultados, conforme o espectro mostrado na Figura 6, que evidencia a ausência de picos significativos na região de 846,9 e 1.810,7 keV.

50000000

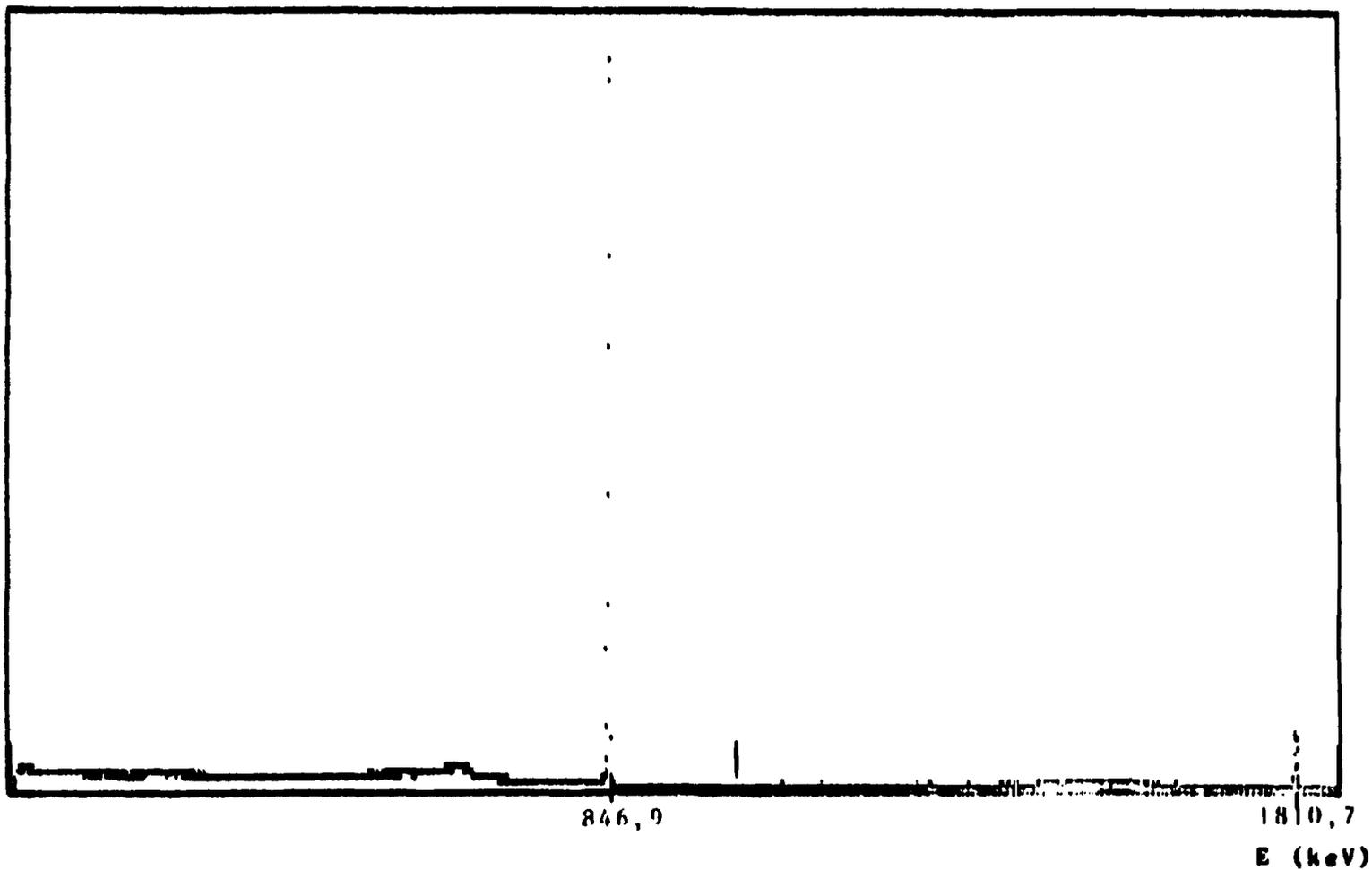


Figura 5 - Espectro obtido de padrão de $MnCl_2$ ativado por 60 segundos com fluxo de $2,67 \cdot 10^{11}$ $n/cm^2/s$ e detectado por 120 segundos.

Tabela 6 - Massa em gramas de $MnCl_2$, contagens por minuto, cpm/mg e respectiva média obtida, após ativação com nêutrons por 60 segundos, tempo de contagem 120 segundos.

REPETIÇÃO	MASSA g	cpm	cpm/mg
1	0,0011	51688	46,989
2	0,0012	56598	47,165
3	0,0004	23494	58,736
4	0,0004	21619	54,048
5	0,0010	46315	46,315
média			50.650 [±] 5.506

4.6. Detecção de Moscas Marcadas

A marcação de *C. capitata* com $MnCl_2$ medida pela cpm obtida após ativação com nêutrons, está apresentada na Tabela 7, onde constam também as respectivas médias. Verifica-se que o manganês aparece nitidamente na testemunha, o que evidencia a importância deste elemento como micronutriente. Este fato reforça o comentário já feito aos dados contantes da Tabela 1, onde o manganês fornecido em baixa concentração às larvas, proporcionou um aumento médio de 5,8% na viabilidade das larvas. Isto sugere que a dieta atualmente usada no CENA poderia ser enriquecida com Mn, mas também que devam ser feitos novos experimentos visando detectar tal necessidade. Basta lembrar que se esta dieta for empregada em criação massal, 5,8% a mais é um valor significativo de ganho na produção, com pequeno acréscimo nos custos.

Tabela 7 - Contagens por minuto e respectivas épocas de coleta, médias obtidas, (pico de energia de 846,9 keV), de *C. capitata* marcadas com $MnCl_2$, ativados por 60 segundos, fluxo de $2,67.10^{11}$ n/cm²/s e contados por 120 segundos para cada tratamento.

ÉPOCA (DIAS)	REP .	CONCENTRAÇÃO*							
		0		0, 0001		0, 0005		0, 0010	
		M	F	M	F	M	F	M	F
13	1	56	52	116	45	480	108	447	193
	2	33	26	58	121	453	43	404	189
	3	31	58	37	19	57	172	490	182
média		40	45	70	61	330	107	447	188
25	1	63	28	43	45	176	54	162	78
	2	47	22	48	42	144	114	102	84
	3	59	32	42	32	145	57	166	50
média		56	27	44	39	155	75	143	70
37	1	79	42	65	32	162	57	83	52
	2	94	61	56	47	216	39	68	50
	3	98	57	65	34	107	83	89	119
média		90	53	62	37	161	59	80	73
57	1	91	101	83	60	225	313	68	74
	2	100	62	34	43	455	20	415	53
	3	82	32	39	76	73	80	74	146
média		91	65	52	59	251	137	185	91

M = machos

F = fêmeas

* = concentração (em grama de $MnCl_2$ por grama de dieta)

Mecanismos fisiológicos ou de comportamento algumas vezes determinam acúmulo de nutrientes diferenciado entre sexos da mesma espécie. Neste experimento, notamos na Tabela 7, que os machos de *C. capitata* acumularam quantidade maior de manganês que as fêmeas alimentadas e mantidas sob as mesmas condições experimentais.

As concentrações de 0,0005 e 0,0010 g de $MnCl_2$ por grama de dieta, foram suficientes para marcar tanto macho como fêmeas que morreram aos 13 dias, sendo que os machos mostraram maior número de cpm média. Já nas épocas de 37 e 57 dias, cerca de 60% dos insetos ativados, apresentaram contagens semelhantes à testemunha, portanto perderam a "marca", possivelmente por excreção, embora machos das concentrações 0,0005 e 0,0010 e fêmeas da 0,0005 tenham conservado quantidade suficiente de manganês para diferenciá-los da testemunha, aos 57 dias.

Como podemos verificar na Tabela 8, a concentração de 0,0001 g de $MnCl_2$ por g de dieta não é suficiente para marcação de *C. capitata*, pois observou-se nas quatro épocas, (13, 25 37 e 57 dias), que as médias de cpm nesta concentração não diferiram da testemunha (0), apesar da ativação da dieta preparada com esta concentração tenha apresentado contagem cerca de 10 vezes superior à concentração zero. Um aspecto interessante que se nota nos dados desta Tabela, é que na testemunha houve um aumento na média de cpm em relação às moscas que morreram aos 13, 25 e 37 dias, isto é, moscas mortas aos 37 dias apresentaram até o dobro de cpm em relação às que morreram aos 13 dias. A Figura 7 ilustra perfeitamente esse acúmulo gradativo de manganês pelas moscas, sendo os machos os que têm maior capacidade de acúmulo. Disso, podemos deduzir, que os adultos alimentados com

CONTINUA

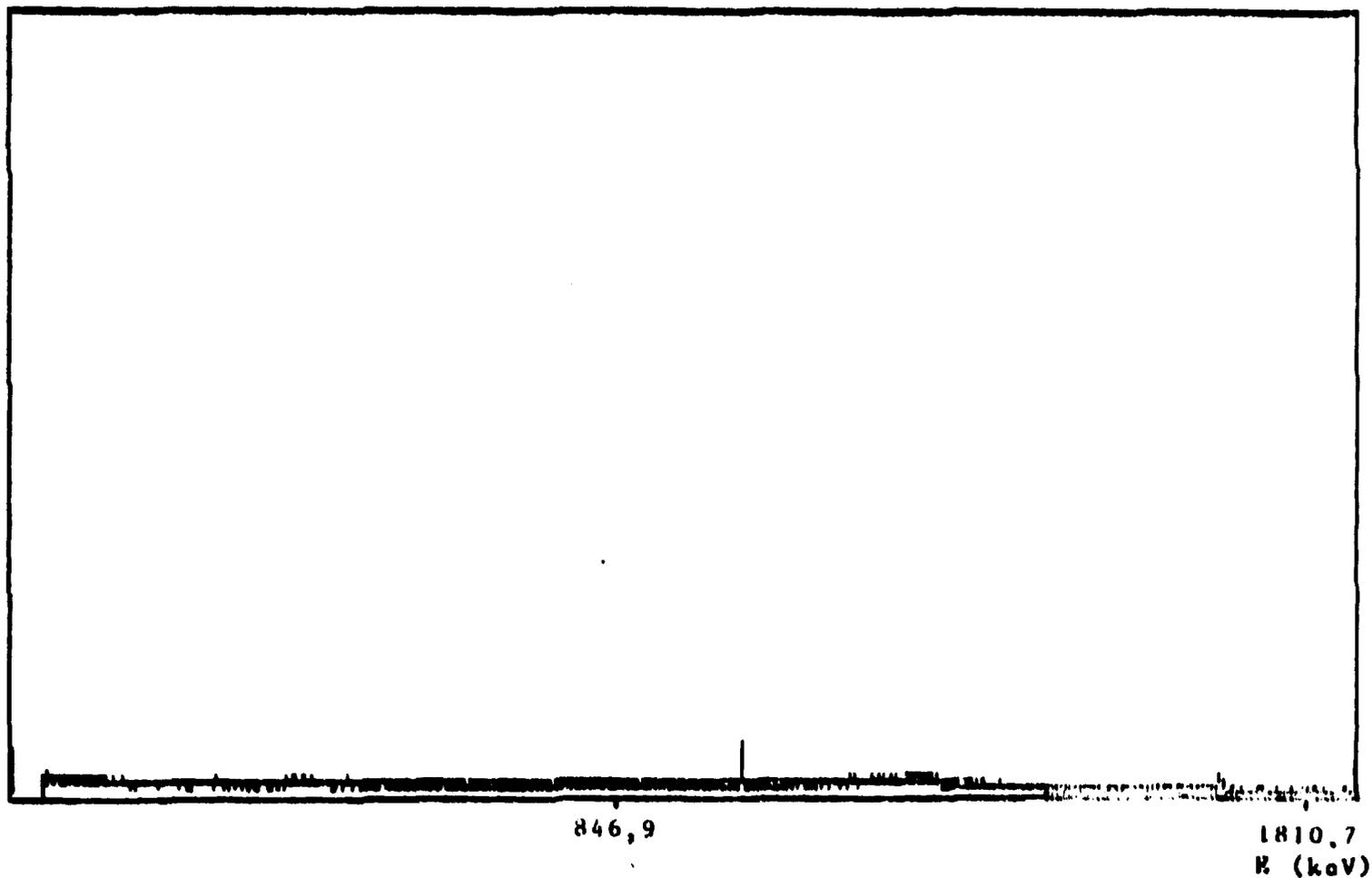


Figura 6 - Espectro obtido da embalagem de polietileno após ativação por 60 segundos com fluxo de $2,67 \cdot 10^{11}$ n/cm²/s e detectado por 120 segundos.

"Vegamine n^o 3", açúcar, mel e glucose de milho concentram manganês contido nesse alimento, chegando a dobrar o valor em cpm com 37 dias (no caso dos machos), a partir do qual a ingestão e excreção parecem se equilibrar tanto nos machos, como nas fêmeas.

O fator excreção, mencionado acima, é importante neste caso deste trabalho, pois temos que considerar que, os insetos usados no experimento tiveram o tempo todo água e alimento disponíveis, o que pode acelerar a excreção, além de condições ideais de temperatura e umidade relativa. Ainda mais, todos estes fatores favoráveis podem ter contribuído para um aumento significativo da longevidade dos adultos, como já comentado anteriormente.

Portanto, considerando-se que *C. capitata* marcadas tivessem sido liberadas no campo, provavelmente estas teriam suas longevidades menores, além de excreção reduzida. Isto permitiria a conservação por tempo maior de conteúdo significativo de manganês em seus corpos, suficiente para diferenciá-las dos insetos selvagens após a ativação. O que está próximo aos dados de KATIYAR & VALERIO (1963) e SILVA (1990), cujos trabalhos desenvolvidos com ³²P como marcador de *C. capitata*, tiveram duração de quatro semanas apenas. MONRO (1968) admite tal sugestão ao observar que machos e fêmeas de *C. capitata* marcados com manganês fornecido em dieta durante a fase de larva, conservam a marca. Constatou que as moscas conservavam a marcação por pelo menos duas semanas, quando então os adultos foram mortos e ativados.

Tabela 8 - Média de contagens por minuto obtidas de machos e fêmeas ativadas com fluxo de $2,67.10^{11}$ n/cm²/s por 60 segundos e contadas por 120 segundos, para cada época e concentração.

CONCENTRAÇÃO	ÉPOCA (EM DIAS)							
	13		25		37		57	
	M	F	M	F	M	F	M	F
0	40Ab	45Aa	56Aa	27Aa	90Bb	53Bb	91Aa	65Aa
0,0001	70Ab	61Aa	44Aa	39Aa	62Bb	37Bb	52Aa	59Aa
0,0005	330Aa	107Ba	155Ab	75Bb	161Aa	59Bb	251Ab	137Aa
0,0010	447Aa	188Ba	143Ab	70Bb	80Bb	73Bb	185Ab	91Ba

Letras maiúsculas distintas, em cada época, diferem entre si. Letras minúsculas distintas, em cada coluna, diferem entre si (Tukey 5%).

4.7. Análise das Moscas Selvagens

Na Tabela 9 são apresentados os valores em cpm e respectivas médias, obtidas das moscas criadas nas várias espécies de frutas (ativação por 60 segundos, com Fluxo de $2,67.10^{11}$ n/cm²/s e detecção por 120 segundos, pico de energia de 846.9 keV). Verifica-se por esta Tabela, que moscas selvagens estocam manganês durante a fase de larva, independente da espécie vegetal que serviu de alimento. Comparando-se estes resultados com os da Tabela 7, verificamos que os mesmos são semelhantes aos da testemunha; isto demonstra nitidamente, a importância do manganês como micronutriente para *C. capitata*. Observa-se ainda variações em cpm entre as moscas criadas em frutos diferentes, mas que são semelhantes às ocorridas com insetos criados em laboratório, em

dieta artificial, sem enriquecimento com manganês. Portanto, a marcação de *C. capitata* com manganês para estudos de seu comportamento e levantamento populacional, deve considerar este aspecto, de maneira a não considerar como marcadas moscas que na realidade são selvagens.

Tabela 9 - Moscas selvagens criadas em diferentes frutos, ativadas com fluxo de $2.67.10^{11}$ n/cm²/s e contagens obtidas no pico de energia de 846,9 keV.

FRUTA	cpm		MÉDIA
	M	F	
Goiaba	44	46	45
Pêssego	18	20	19
Uvaia	77	60	68
Jambo	41	45	43
Café	21	24	22
Nespera	44	38	41

M = macho

F = fêmea

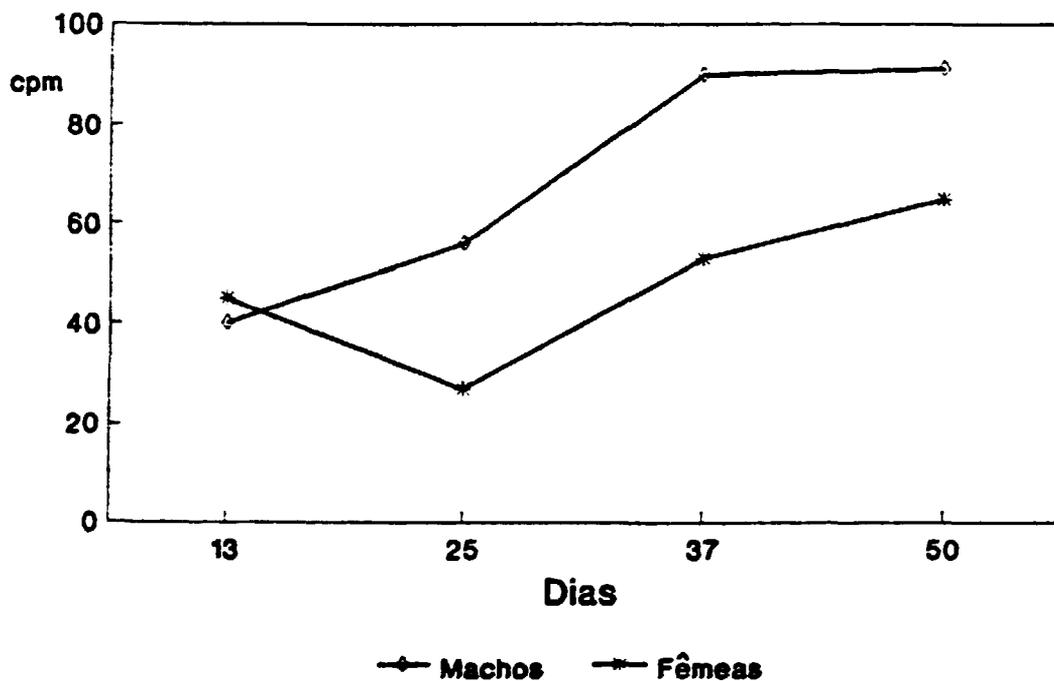


Figura 7 - Gráfico das médias em cpm, obtidas de machos e fêmeas testemunha, que morreram com 13, 25, 37 e 57 dias, após ativação por 60 segundos com fluxo de $2,67 \cdot 10^{11}$ n/cm²/s e detecção por 120 segundos.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram concluir que:

1. Concentrações de 0,0001 e 0,0005 grama de $MnCl_2$ por grama de dieta não afetaram a viabilidade de larvas, pupas e adultos;
2. Valores superiores a 0,0010 g de $MnCl_2$ por grama de dieta causam mortalidade total das larvas;
3. O manganês fornecido na concentração de 0,001 grama por grama de dieta de larvas, causou uma pequena redução na capacidade de arranque de vôo dos adultos de *C. capitata*;
4. A longevidade dos adultos (machos e fêmeas) não foi afetada negativamente em relação à testemunha nas concentrações de 0,0001; 0,0005 e 0,0010 grama de $MnCl_2$ por grama de dieta fornecido na fase de larva e aumentou a longevidade para fêmeas nas concentrações de 0,0005 e 0,0010.

5. O manganês ($MnCl_2$) fornecido às larvas em doses baixas, 0,0001 grama por grama de dieta, não marca os adultos, mas funciona como micronutriente, aumentando o número de larvas viáveis em relação às criadas na dieta não enriquecida com este elemento;
6. Os machos adultos de *C. capitata* se mantêm perfeitamente marcados até a idade de 37 dias de vida, com a dose de 0,0005 g de $MnCl_2$ por grama de dieta fornecida às larvas. Fêmeas adultas com idade superior à 13 dias, em sua maioria, excretam o manganês, talvez através da oviposição, impossibilitando sua diferenciação das não marcadas pela ativação com nêutrons.
7. A quantidade de manganês acumulada pelas moscas *C. capitata* selvagens, criadas em diferentes frutos é praticamente igual, para qualquer tipo de fruta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYANOGLU, S. F.; GUENDUEZ, G. Neutron activation analysis of turkish Cools. PT. 3. J. Radioanal. Chem., 43(1):165-167, 1978.
- BARCLEY, G. N. Techniques of population analysis. 2nd. London, Wiley and Sons Inc., 311p. 1966.
- BODART, F. & DECONNINCK, G. Elemental analysis of fertilizer by fast neutrons activation. Journal of Radioanalytical Chemistry, Amsterdam, Netherlands, 38:241-246, 1977.
- BOLLER, E. F.; KATSOYANNOS, B. I.; REMUND, U.; CHAMBERS, D. L. Measuring, monitoring and improving the quality of mass reared Mediterranean fruit flies, *Ceratitidis capitata* (Wied.). The rapid quality control system for early warning. Z. Angem. Entomol., 87(1):9-25, 1981.
- BOOMSMA, J. J. Estimation of worker numbers in ant populations after marking with europium. OIKOS, 38(2):222-227, 1982.

BOWEN, H. J. M. Activation analysis in botany and agriculture. In *Nuclear Activation Techniques in the life Science*. Amsterdam, Anais. Vienna, IAEA, 287-99, 1967.

BOWEN, V. T. Manganese metabolism of social vespidae. *J. Exp. Zool.*, 115:175-205, 1950.

DEVINE, T. L. Neutron activation analysis of saliva from the tick *Amblyomma variegatum*. *Experintia (BASEL)*, 38(6):676-77, 1982.

EHMANN, W. D. Non-destructive technique activation analysis. *Topics Current Chem.*, 14(1):49-91, 1970.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Anuário estatístico do Brasil. Rio de Janeiro, 1989. v.49, 716p.

HAMANN, H. J. Tagging of Tsetse flies with radio-and stable isotopes. IAEA ed. *Sterile Insect Technique and Radiation in insect Control*. Viena, 495p., 1982.

HAMANN, H. J.; IWANNEK, K.H.; SCHRAMEL, P. Radiochemically determined trace element contents of pigs and cows blood used in membrane feeding of tsetse flies. *Ci. Total Environ.* ISSN 0048-9697, 17(3):277-280, 1981.

HEVESY, G. & LEVI, H. The action of neutrons on the rare earth elements. *Mathematisk - Fysiske Meddelelser*, 14(3):10-17, 1936.

HINOMAN, P. H. S.; GLUFFRE, G.; LITMAN, R. Trace element analysis of pine trees by the Tree-Ring method. *Radiochem. Radional. Lett.* ISSN 0079-9483, 33(5-6):361-372, 1978.

IPERTI, G. & BUSCARLET, L. A. contribution a l'étude d'une migration *D'Adonia notata* SCHN. (Coleoptera, Coccinellidae) par marguage avec l'Iridium 191 stable - *Ann. Zool. - Ecol. Anim.*, 4(2):249-254, 1972.

KATIYAR, K. P. & VALERIO, J. Estudios sobre la dispersión y longevidad de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata* Wied., marcada com ³²P. *Turrialba*, Turrialba, 13(3):181-4, 1963.

LAAG, J.; STEINNES, E. Contents of some minor and trace elements in sheeps wool from different areas of Normay. *Meld. Nor. Landbrukshoegsk*, 0025-8946, 57(13), 11p., 1978.

LASCEVE, G. L. A.; BUSCARLET, L. A.; BOSSI, A. Analyse par radioactivation de carpocapses marques avec de l'Iridium 191. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 23(6):266-270. illus, 1972.

LIMA, F. W. Análise por ativação e suas possibilidades nas ciências biológicas. São Paulo. IEA (Inf. IEA, n^o 11), 42p., 1968.

- MANOUKAS, R. G.; GRIMANIS, A.; MAZOMENOS, B. Inorganic nutrients in natural and artificial food of *Dacus oleae* larvae (Diptera: Tephritidae). *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 10(1):123-128, 1978.
- MARICONI, E. A. M. & IBA, S. A mosca do Mediterrâneo. *O Biotécnico*, 21(2):17-23, 1955.
- MATIOLI, J. C. Moscas-das-frutas. Situação e perspectivas de controle no Brasil. *Agroquímica Ciba-Geigy*, São Paulo, 27:19-26, 1985.
- MONRO, J. marking insects with dietary manganese for detection by neutron activation. *Ecology*, 49(4):774-776, 1968.
- RAHALKAR, G. W.; MISTRY, K. B.; HARWALKAR, M. R.; BHARATHAN, K. G. & GOPAL-AYNGAR, A. R. Labelling adults of red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) with Cerium for detection by neutron activation. *Ecology*, 52(1):186-188, 1970.
- RICHARDSON, R. H.; WALLACE Jr., R. J.; GAGE, S. J.; BOUCHEY, G. D.; DENELL, M. Neutron Activation Techniques for Labeling *Drosophila* in Natural Populations. *Studies in Genetics*, Houston, 5:171-86, Sept., 1970.

SHERIF, M. K.; AWADALLAH, R. M.; MOHAMED, A. E. Determination of trace elements of Egyptian crops by neutron activation analysis. J. Radioanal. Chem. ISSN 0134-0719, 53(1-2):145-153 (1979).

SILVA, E. B. da. Aspectos da dispersão da Mosca-do-Mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Wied., 1824) (Diptera: Tephritidae), marcada com ^{32}P em citros. (Dissertação de Mestrado - Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP), 74p. 1990.

SIMABUCO, S. M. Uso da ativação neutrônica e fluorescência de raios-X com fontes radioativas (Cf-252 e Am-241) na análise quali-quantitativa instrumental e simultânea de alguns elementos em amostras de suplemento mineral para animais. Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, SP, 1984.

SMALES, A. A. & PATE, B. D. The determination of arsenic in biological material. *Analyst.*, 77:196-202, 1952.

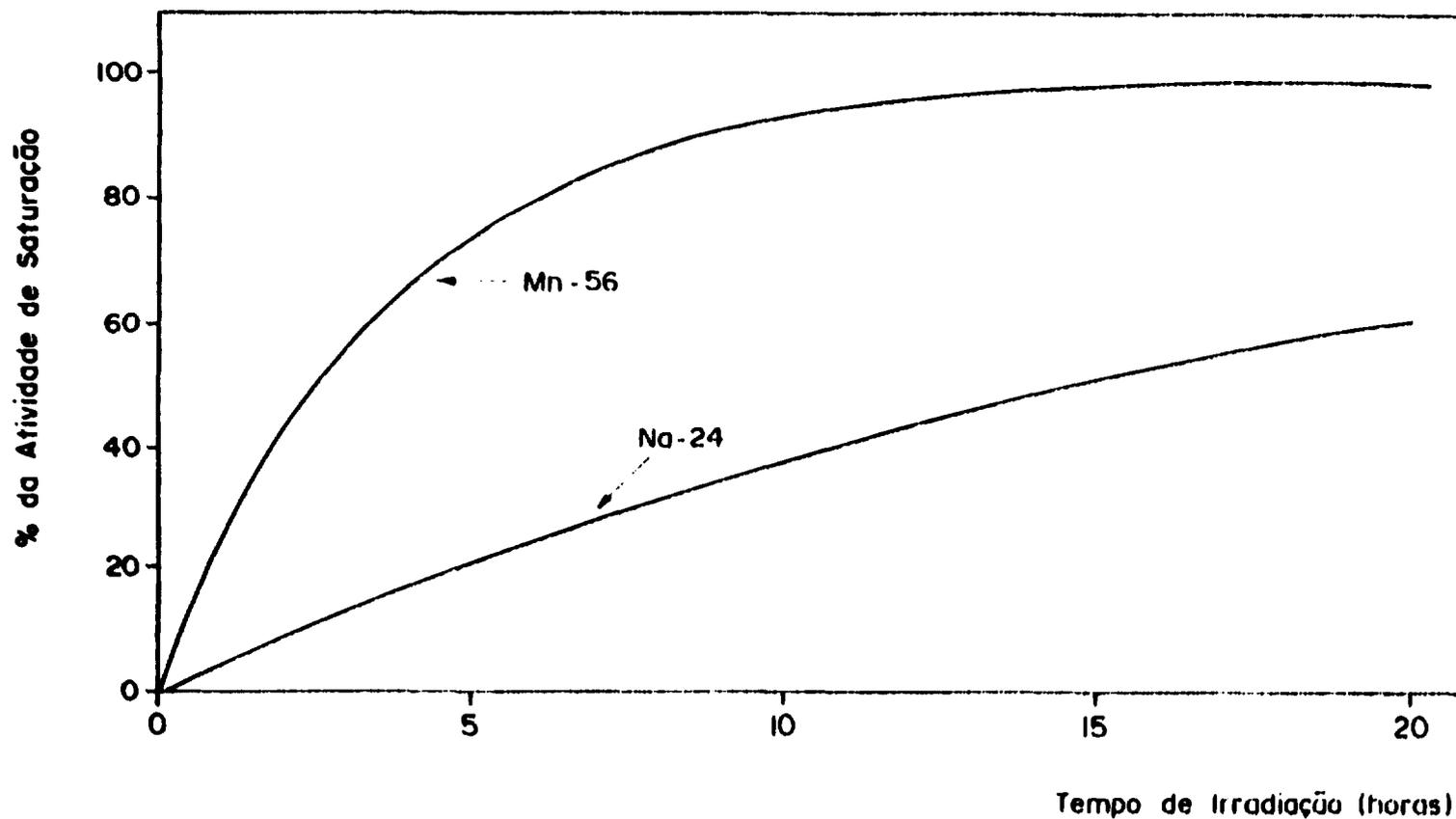
WALDER, J. M. M. & WIENDL, F. M. Marcação de *Musca domestica* L. por ativação. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 26. Resumos. Ciência e Cultura. Suplemento. julho, 1974, 336(7):7.

WATERHOUSE, D. F. Studies of the physiology and toxicology of blowflies. *Bull. Coun. Sci. Ind. Res. Austrália*, (19):1-39, 1945.

YAMAMOTO, I. M. Alguns aspectos do comportamento em diferentes idades de *ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera - Tephritidae) irradiadas com radiação gama. Dissertação de mestrado F.F.C.L. Ribeirão Preto - USP, 53p., 1988.

ZAGATTO, E. A. G. Utilização da análise por ativação neutrônica não-destrutiva para determinação de alguns elementos em folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) tratados com herbicidas. Piracicaba. ESALQ/USP, 79p. (Dissertação de Mestrado), 1974.

APÉNDICE



Apêndice 1 - Relação entre o tempo de irradiação e a atividade (em termos de porcentagem da atividade de saturação), para o Mn-56 e o Na-24, de meias-vidas de 2,58 e 15,00 horas, respectivamente.