

**ALBERTO SOARES CORRÊA**

**RESISTÊNCIA FISIOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DE POPULAÇÕES  
DE *Sitophilus zeamais* À PERMETRINA, ESFENVALERATO E  
ESFENVALERATO + FENITROTIONA.**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009

**ALBERTO SOARES CORRÊA**

**RESISTÊNCIA FISIOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DE POPULAÇÕES  
DE *Sitophilus zeamais* À PERMETRINA, ESFENVALERATO E  
ESFENVALERATO + FENITROTIONA**

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

Aprovada: 13 de Fevereiro de 2009

---

**Prof<sup>ª</sup>. Terezinha M. C. Della Lucia  
(Co-orientadora)**

---

**Prof. Marcelo Coutinho Picanço**

---

**Prof. Antônio Alberto da Silva**

---

**Dr. Leandro Bacci**

---

**Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes  
(Orientador)**

À meus pais, Euro e Norma, meus exemplos;  
À minha irmã Dayana;  
À Julia, meu grande amor;  
À minha Vó Terezinha e ao meu Vô Alberto;  
Aos meus amigos, primos e tios meus companheiros;  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Ao nosso Criador que concedeu a dádiva da vida, a força e a sabedoria necessária para essa jornada.

A Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, ao CNPq pela concessão da bolsa e a todo povo brasileiro que contribuíram diretamente e indiretamente na minha formação, na oportunidade de aprofundamento científico e na conclusão deste trabalho.

Ao Professor Raul Narciso Carvalho Guedes, pela confiança depositada e pela orientação amigável, enriquecedora e presente durante estes seis anos e meio de entomologia; Muito Obrigado!

Aos conselheiros Professora Terezinha Della Lucia e principalmente ao Professor Eliseu José Guedes Pereira pela imprescindível ajuda, paciência e conselhos durante o mestrado;

Aos amigos do laboratório de Ecotoxicologia: Daniel, Badji, Sérgio, Berghem, Eugênio, Leonardo, Rúbia, Hugo, Camila, Bruno, Fábio, Nelsa, Luciana, Célia, Juliana e Geraldo pela convivência maravilhosa e enriquecedora, e principalmente ao Érick, Lucas e Pâmela pela grande e essencial ajuda nos ensaios realizados na confecção deste trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia, cuja orientação nas disciplinas me possibilitou a abertura de novos conhecimentos e horizontes científicos. Principalmente ao Professor Marcelo Picanço e a toda a equipe do laboratório de Manejo Integrado de Pragas pela grande amizade e pela valiosa e presente ajuda em momentos de adversidade;

A todos os meus amigos (essa grande família, importantíssimos nesta jornada) do inesquecível alojamento 1421, de Sem Peixe, do lendário Santa Cana (sem exagero!), da Agronomia e da Entomologia, pela convivência, brincadeiras, estudos e cervejinhas do dia-a-dia;

A toda minha família, primos, tios e meus avôs, com destaque a minha “pequena grande” Vó Terezinha sempre presente na minha vida;

A minha irmã Dayana pelo carinho e apoio incondicional durante os anos de Viçosa;

A Julia pelo amor, carinho, paciência e força depositados durante esses quase quatro anos de convivência;

E agradeço principalmente aos meus pais Euro e Norma que sempre acreditaram que o estudo é a maior herança que poderiam deixar aos seus filhos, algo que pode ser desfrutado por toda a vida.

## **BIOGRAFIA**

Alberto Soares Corrêa, filho de Euro José Lelis Corrêa e de Norma Aparecida Soares Corrêa, nascido no dia 05 de janeiro de 1983, no município de Viçosa, em Minas Gerais, Brasil

Começou sua carreira acadêmica em 1999 quando ingressou no Colégio Agrícola Nilo Peçanha em Pinheiral - RJ, formando-se Técnico Agrícola no ano de 2002.

Em maio de 2002 ingressou na Universidade Federal de Viçosa, iniciando o curso de Agronomia. Realizou estágios no Departamento de Engenharia Agrícola sob Orientação de Dra Lêda D'Antonino Faroni e no Departamento de Biologia Animal, especificamente no laboratório de Ecotoxicologia, onde foi bolsista de iniciação científica da FAPEMIG durante o período de três anos (2004 a 2007) sob orientação de Dr. Raul Narciso Carvalho Guedes, graduando-se Engenheiro Agrônomo em março de 2007.

Em março de 2007 iniciou o curso de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do Professor Raul Narciso Carvalho Guedes, submetendo-se à defesa aos 16 de fevereiro de 2009, já sendo aprovado para o doutorado no mesmo programa.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	06
2.1 Populações de <i>Sitophilus zeamais</i> .....	06
2.2 Inseticidas e solvente .....	08
2.3 Bioensaios de detecção de resistência .....	08
2.4 Bioensaios comportamentais .....	09
2.5 Bioensaios de taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ) .....	11
2.6 Bioensaios respirométricos .....	11
2.7 Bioensaios enzimáticos .....	12
2.8 Análises estatísticas .....	12
3. RESULTADOS .....	15
3.1 Bioensaios de detecção de resistência .....	15
3.2 Bioensaios comportamentais .....	24
3.3 Bioensaios de taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ), taxa respiratória e enzimáticos .....	33
4. DISCUSSÃO .....	40
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

## RESUMO

CORRÊA, Alberto Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Resistência fisiológica e comportamental de populações de *Sitophilus zeamais* à permetrina, esfenvalerato e esfenvalerato + fenitrotiona**  
Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-orientadores: Eliseu José Guedes Pereira e Terezinha Maria Castro Della Lucia.

O caruncho do milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) é considerado a principal praga do milho armazenado no Brasil, sendo o seu controle realizado principalmente por inseticidas. A utilização maciça e intensa destes compostos pode levar à seleção de populações resistentes e, conseqüentemente, à diminuição da eficiência do controle deste inseto-praga em armazéns brasileiros. Neste trabalho foi realizado um levantamento da resistência fisiológica e comportamental aos inseticidas esfenvalerato, permetrina e a mistura esfenvalerato + fenitrotiona em 27 populações de *S. zeamais* coletadas em várias cidades brasileiras e no Paraguai, investigando também, possíveis custos adaptativos relacionados ao fenômeno. Os insetos foram submetidos a bioensaios de concentração-mortalidade com determinação das concentrações letais CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub>. As populações foram também submetidas a dois ensaios de caminhamento em superfície tratada e não-tratada com resíduo seco de inseticida para detecção de resistência comportamental. Foram também determinados a taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ ), o consumo de grão de milho e massa corporal dos indivíduos de cada população estudada. Determinou-se ainda a taxa respiratória, a atividade de amilase e de lipase como indicativo da taxa metabólica dos insetos. Os resultados dos bioensaios de mortalidade indicaram variação da razão de resistência de 0,63 a 66,65 vezes para esfenvalerato, de 1,00 a 5,02 vezes para a mistura esfenvalerato + fenitrotiona e de 0,79 a 69,59 vezes para permetrina em relação à população padrão de suscetibilidade (Sete Lagoas). Estes resultados indicam uma diminuição da resistência a piretróides em populações brasileiras de caruncho do milho em relação a estudos anteriores. As características comportamentais de caminhamento na área tratada variaram entre as populações e sexo. Houve repelência de fêmeas para permetrina e esfenvalerato quando comparado entre as populações.



Não foi detectada correlação entre a resistência fisiológica e a resistência comportamental, evidenciando que a resistência fisiológica é independente da resistência comportamental nas populações testadas. Não se detectou diferença significativa na taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ), na massa corpórea e na taxa respiratória dos insetos. Detectou-se diferenças no consumo alimentar e na atividade de amilase e atividade de lipase entre as populações testadas. Assim, podemos concluir que não houve custo adaptativo associado aos níveis de resistência verificados nas populações estudadas.

## ABSTRACT

CORRÊA, Alberto Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2009.  
**Physiological and behavioral resistance of populations of *Sitophilus zeamais* to permethrin, esfenvalerate and esfenvalerate + fenitrothion**  
Advisor: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-advisors: Eliseu José Guedes Pereira and Terezinha Maria Castro Della Lucia.

The maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) is considered the main pest of stored maize in Brazil and its control is achieved mainly by insecticides. The massive and intensive use of these compounds may lead to selection of resistant populations and consequently compromise the control efficacy of this insect pest in Brazilian storage facilities. This work was a survey of physiological and behavioral resistance to the insecticides esfenvalerate, permethrin and the insecticide mixture esfenvalerate + fenitrothion in 27 populations of *S. zeamais* collected in several Brazilian counties and Paraguay, and also investigated possible costs associated with this phenomenon. The insects were subjected to concentration-mortality bioassays to determine the lethal concentrations  $LC_{50}$  and  $CL_{95}$ . The populations were also subjected to two walking trials on surfaces treated and untreated with dried insecticide residues for detection of behavioral resistance. We also determined the instantaneous rate of population increase ( $r_i$ ), maize consumption and body mass of individuals of each population. We also determined the respiration rate, as well as amylase and lipase activity of the insects from each population as an indication of their metabolic rate. The concentration-mortality bioassays indicated resistance ratios ranging from 0.63 to 66.65x for esfenvalerate, 1.00 to 5.02x for the insecticide mixture esfenvalerate + fenitrothion from 0.79 to 69.59x for permethrin compared with the susceptible standard population (Sete Lagoas). These results indicate a decrease in pyrethroid resistance in Brazilian populations of maize weevil compared with previous studies. The behavioral characteristics of walking in treated area varied among populations and sex. There was avoidance to permethrin- and esfenvalerate-treated surfaces by females from different populations. There was no correlation between physiological and behavioral resistance, indicating that physiological resistance is independent of

behavioral resistance in the populations tested. There was no significant difference in the instantaneous rate of increase ( $r_i$ ), body mass and respiration rate among the insects. In contrast, there were significant differences in food consumption and amylase and lipase activity among populations. Therefore, we conclude that there was no fitness cost associated with levels of resistance observed in the populations studied.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso intenso e freqüente de inseticidas na agricultura, com o objetivo de proteger os cultivos do ataque de artrópodes, impõe forte seleção a estes compostos, o que pode resultar no desenvolvimento do fenômeno de resistência a inseticidas (Brattsten *et al.*, 1986). A resistência a inseticidas resulta em problemas econômicos e ambientais, pois acarreta falhas de controle dos organismos-alvo, no aumento da dose aplicada e da freqüência de aplicação dos inseticidas no ambiente (Mullin & Scott, 1992).

Produtos armazenados são constantemente atacados por insetos-praga, principalmente das ordens Coleoptera e Lepidoptera, causando danos quantitativos e qualitativos na massa de grãos. Em regiões tropicais o problema é agravado devido às condições se mostrarem propícias ao desenvolvimento e manutenção das pragas durante todo o ano. A seleção intensa e a evolução rápida da resistência a inseticidas em populações naturais têm sido os principais obstáculos a serem superados no manejo satisfatório de insetos-praga (Kence & Keidje, 1997; Berticat *et al.*, 2008), principalmente se forem considerados ambientes onde o controle químico é o método mais utilizado, como no caso de pragas de grãos armazenados (Guedes *et al.*, 1994, 1995; Ribeiro *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005).

A resistência a inseticidas em pragas de produtos armazenados é um caso particular de resistência, pois além dos prejuízos diretos associados a esta, ainda pode ser disseminada pelo comércio de produtos infestados por indivíduos resistentes (Champ & Dyte, 1976; Subramanyam & Hagstrum, 1996). Esforços têm sido constantemente empregados na elaboração de métodos alternativos ao controle químico (Faroni *et al.*, 2001; Gudrups *et al.*, 2001; Collins & Cook, 2006; de Oliveira *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2008; Velten *et al.*, 2008), entretanto a utilização de inseticidas continua sendo o principal método empregado para o controle de insetos-praga de produtos armazenados, devido à sua maior eficiência e menor custo (Guedes, 1990, 1991; Braga *et al.*, 2001; White & Leesch, 1996).

O caruncho do milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae), está entre as pragas mais destrutivas e mundialmente bem

distribuídas dentre as de grãos armazenados (Rees, 1996; Danho *et al.*, 2002; Danho & Haubruge, 2003). É considerada a principal praga do milho armazenado no Brasil, sendo uma praga primária por atacar o grão intacto (Lorini, 2002). Esta espécie inicia a infestação no campo (Adda *et al.*, 2002; Brown & Lee, 2002) e juntamente com sua grande autonomia de vôo e ao seu grande poder destrutivo (Hagstrum *et al.*, 1996) proporciona uma elevada perda do produto na fase de pós-colheita (Santos *et al.*, 1986, Santos & Montovani, 1997).

Historicamente, o controle químico do caruncho do milho foi realizado predominantemente mediante a utilização de dicloro-difenil tricloretano (DDT). Contudo, com a proibição da utilização destes compostos para fins agrícolas em meados da década de 80, novos compostos passaram a serem utilizados com destaque para os inseticidas pertencentes aos grupos dos organofosforados e piretróides (Guedes, 1990; Braga *et al.*, 1991; Guedes *et al.*, 1995) e mais recentemente misturas advindas destes compostos. A utilização massiva e intensa destes compostos pode levar à seleção de populações resistentes e, conseqüentemente, à diminuição da eficiência do controle deste inseto-praga em armazéns brasileiros (Brattsten *et al.*, 1986; Feyereisen, 1995; Fragoso *et al.*, 2003, 2005; Ribeiro *et al.*, 2003, 2007).

A resistência a inseticidas se traduz em mecanismos que são resultado de alterações genômicas apresentadas por alguns organismos possibilitando a sua sobrevivência frente a doses letais de inseticidas para a maioria dos indivíduos de uma população normal da mesma espécie. A resistência a inseticidas se desenvolve em insetos mediante a seleção de indivíduos raros na população que conseguem sobreviver à ação destes compostos nas doses utilizadas. Portanto, o fenômeno da resistência é pré-adaptativo e não de efeito mutacional (Brattsten *et al.*, 1986; Guedes, 1990). Os principais mecanismos de resistência podem ser divididos em mecanismos fisiológicos e comportamentais (Georghiou, 1972; Brattsten *et al.*, 1986). No entanto, os mecanismos fisiológicos podem ainda serem divididos em mecanismos bioquímicos e mecanismos fisiológicos propriamente ditos (Georghiou, 1972; Brattsten *et al.*, 1986).

Os mecanismos bioquímicos são aqueles de ocorrência mais freqüente e que levam a níveis mais elevados de resistência (Scott, 1999). Estes estão relacionados ao

aumento da destoxificação metabólica devido à ação de enzimas destoxificativas e à redução da sensibilidade do sítio de ação do inseticida (Taylor & Feyereisen, 1996; Scott, 1999). As principais enzimas destoxificativas envolvidas na resistência a inseticida são monooxigenases dependentes de citocromo P450, esterases (carboxilesterases e fosfotriesterases) e glutathiona-S-transferases (Sonderlund & Bloomquist, 1990; McKenzie, 1996).

Os mecanismos fisiológicos (*stricto sensu*) são aqueles que envolvem o aumento da taxa de excreção dos compostos tóxicos pelo organismo, o seqüestro de substâncias tóxicas (armazenando-as em tecidos ou órgãos ricos em lipídeos) e a redução da penetração do inseticida no inseto, este dependente das características químicas da molécula de inseticida, da estrutura do tegumento e da fase de desenvolvimento do inseto (Brattsten *et al.*, 1986; Sonderlund & Bloomquist, 1990; McKenzie, 1996).

Os mecanismos comportamentais são determinados por ações que influenciam a resposta do organismo a pressões seletivas exercidas por um determinado inseticida. Os mecanismos comportamentais aumentam a capacidade de uma população de insetos escapar dos efeitos letais do inseticida, podendo estar relacionados à capacidade de aprendizagem do inseto (Lockwood *et al.*, 1984; French-Constant, 1994; Lorini & Galley, 1998; Hoy *et al.*, 1998). Assim, a população conserva a sua susceptibilidade intrínseca ao inseticida, porém muda o seu comportamento de forma a evitar o contato com o inseticida.

Mecanismos comportamentais podem ser estímulo-independentes ou estímulo-dependentes (Georghiou, 1972). Resistência comportamental estímulo-independente inclui um comportamento padrão que previne a exposição à substância tóxica, ou seja, o indivíduo não necessita de contato prévio com o inseticida (Georghiou, 1972; Lockwood *et al.*, 1984). Resistência comportamental estímulo-dependente refere-se a um aumento na habilidade do inseto de detectar a substância tóxica, onde a mesma assume uma propriedade irritante e repelente que excita a resposta de fuga do inseto após a detecção da substância (Lockwood *et al.*, 1984). Estudos sobre a ação dos inseticidas usualmente priorizam os efeitos de caráter fisiológico e bioquímico, dando pouca atenção às respostas comportamentais do

organismo resultantes da exposição ao inseticida (Kongmee *et al.*, 2004; Guedes *et al.*, 2009a).

Insetos-praga podem apresentar resistência a dois ou mais compostos tóxicos mediante o surgimento da resistência cruzada ou resistência múltipla (Guedes *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 2003; Berticat *et al.*, 2008). Resistência cruzada refere-se a um único mecanismo conferindo resistência a dois ou mais compostos tóxicos. Enquanto resistência múltipla envolve a coexistência de dois ou mais mecanismos de ação conferindo resistência a dois ou mais compostos tóxicos. Vários relatos de resistência cruzada a DDT e piretróides em insetos são exclusivamente resultado de uma única mutação genética no canal de sódio (sítio de ação destes inseticidas) conhecida como “knock-down resistance”, conferindo altos níveis de resistência a ambos os compostos (Guedes *et al.*, 1995; Soderlund & Knipple 2003; Wondji *et al.*, 2008).

A seleção para uma nova característica pode levar a mudanças em outras, fenômeno conhecido como pleiotropia, que é a habilidade de um único gene afetar mais de uma característica do indivíduo (Raymond *et al.*, 2005). Seleção para resistência a inseticida, pelo menos inicialmente, acarreta o surgimento de correlações genéticas negativas para a adaptação do indivíduo a ambientes isentos de inseticida (Coustau *et al.*, 2000, Berticat *et al.*, 2002, Bourguet *et al.*, 2004; Guedes *et al.*, 2006). Esta idéia se baseia no princípio de que existe uma realocação de recursos dos processos metabólicos básicos para processos envolvidos na resistência a inseticidas (p. ex. destoxificação), diminuindo o potencial reprodutivo do organismo (Berticat *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2007). Esta desvantagem adaptativa pode resultar em um declínio da frequência de indivíduos resistentes na população na ausência destes compostos, ocasionando uma alteração ou redução da seleção promovida pela aplicação do inseticida. Entretanto, observam-se casos na literatura em que uma população apresenta resistência, mas não custo adaptativo associado a ela por serem capazes de mitigar os custos adaptativos ocasionados pelo fenômeno (Beeman & Nanis, 1986; Haubruge & Arnaud, 2001; Raymond *et al.*, 2001; Fragoso *et al.*, 2005; Guedes *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007).

O consumo de O<sub>2</sub> (ou produção de CO<sub>2</sub>) juntamente com atividade de enzimas do metabolismo digestivo e energético são informações úteis para o entendimento dos custos associados à resistência a inseticidas (Marais & Chow,

2003; Guedes *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2008ab). Ensaios realizados por Araújo *et al.* (2008a) com populações resistentes de *S. zeamais* evidenciaram maiores valores da taxa respiratória e da atividade de amilase na população resistente com ausência de custo adaptativo, contribuindo para o entendimento do fenômeno e seus respectivos efeitos pleiotrópicos.

Levantamentos de resistência a determinado grupo de inseticidas podem auxiliar na escolha de produtos eficientes no controle de populações de insetos-praga e a existência de custo adaptativo pode ser uma informação útil no manejo de resistência a inseticidas (McKenzie & Batterham, 1994; Haubruge & Arnaud, 2001; Oliveira *et al.*, 2007). No entanto, são ainda escassos os levantamentos de resistência a inseticidas em populações brasileiras de insetos-praga de produtos armazenados (Ribeiro *et al.*, 2003). Portanto o presente trabalho teve como objetivo realizar um levantamento de resistência a inseticidas piretróides, de forma isolada e em mistura com organofosforado, em populações de *S. zeamais*, uma vez que este constitui um grupo importante e em ampliação (principalmente em mistura com sinergistas ou outros inseticidas) para o controle deste inseto-praga nas unidades armazenadoras de grãos em regiões tropicais (Lorini, 2002). Além deste levantamento, buscou-se verificar padrões comportamentais de caminhamento dos indivíduos frente à superfície tratada com resíduo seco de inseticida que possam indicar uma possível ocorrência de resistência comportamental nas populações. Investigou-se ainda o desempenho reprodutivo e metabólico dos insetos de todas as populações com o intuito de correlacioná-los com o nível de resistência, na tentativa de detectar possíveis custos adaptativos associados ao fenômeno de resistência a inseticidas.

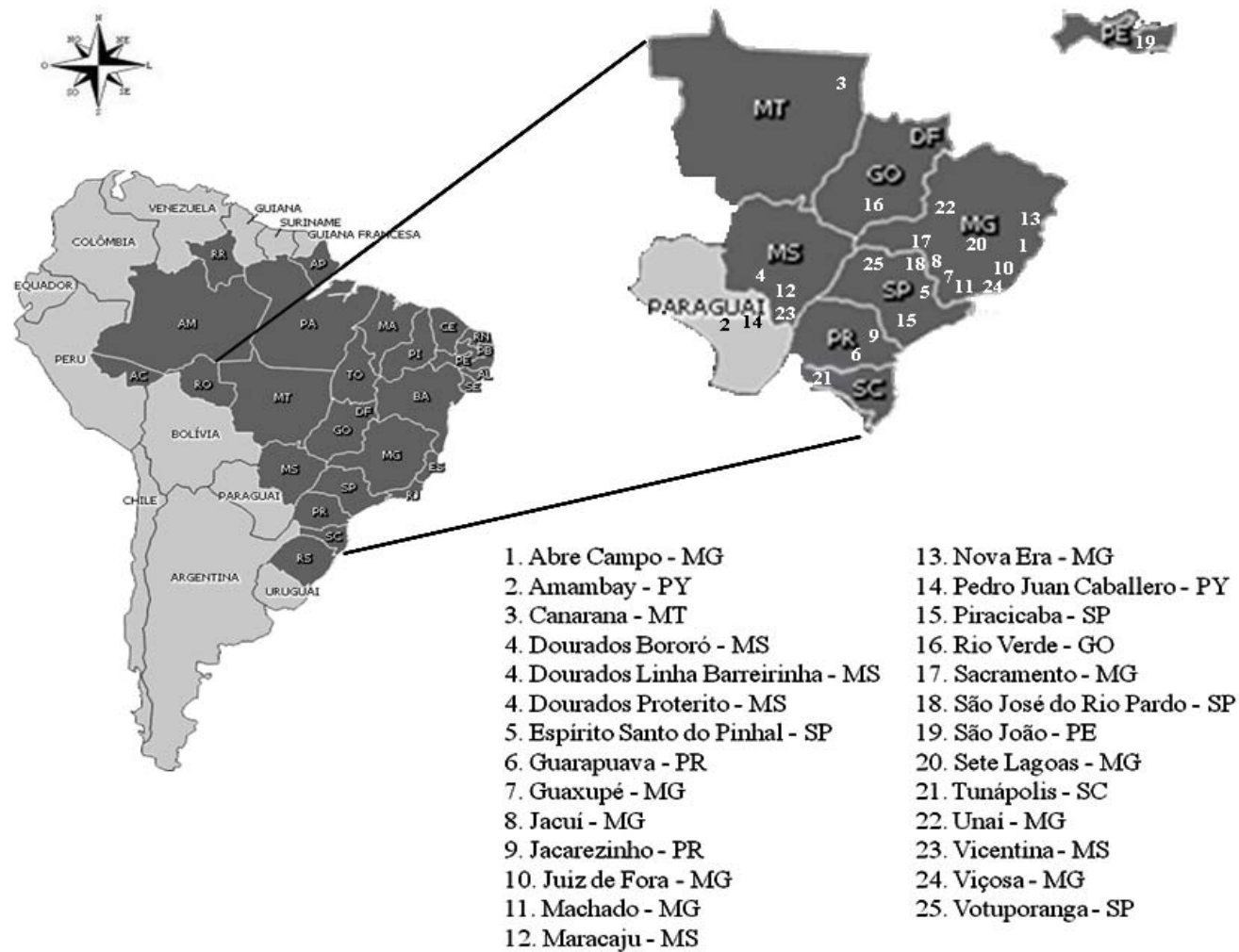


## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Populações de *Sitophilus zeamais*

Vinte e cinco populações de *S. zeamais* provenientes de diferentes cidades brasileiras e duas do Paraguai foram utilizadas nos ensaios experimentais. As populações foram coletadas, em sua maioria, durante os últimos quatro anos nos estados brasileiros de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Santa Catarina, São Paulo e nas regiões de Pedro Juan Caballero e Arroyo Jambure Amambay no Paraguai (Figura 1). A população considerada padrão de susceptibilidade neste trabalho é proveniente da Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa em Milho e Sorgo (CNPMS), localizada em Sete Lagoas, Minas Gerais e vem sendo criada em laboratório por mais de vinte anos na ausência de inseticidas. As populações de Jacarezinho – PR e Juiz de Fora – MG são derivadas de populações coletadas respectivamente no final da década de 80 e em 1990 em armazéns destes municípios, e que em estudos anteriores apresentaram altos níveis de resistência a DDT e piretróides (Guedes *et al.*, 1994, 1995; Ribeiro *et al.*, 2003; Fragoso *et al.*, 2007; Corrêa *et al.*, 2008).

As populações foram multiplicadas a partir dos insetos contidos nas amostras coletadas no campo e mantidas em recipientes de vidro (1,5 L), dentro de câmaras climáticas tipo B.O.D., sob condições controladas de temperatura ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa ( $70 \pm 10\%$ ) e fotoperíodo (LD 12:12). O substrato utilizado para manutenção das populações foi milho isento de pragas e inseticidas.



**Figura 1-** Locais de coleta de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) nos estados brasileiros e Paraguai.

## **2.2 Inseticidas e solvente**

Os inseticidas, em grau técnico, utilizados para os bioensaios são pertencentes ao grupo dos piretróides: permetrina (92,2%, Syngenta, São Paulo, SP, Brasil) e esfenvalerato (96,9%, Iharabrás, Sorocaba, SP, Brasil); e ao grupo dos organofosforados: fenitrotiona (96,8%, Iharabrás, Sorocaba, SP, Brasil). Os inseticidas permetrina e esfenvalerato foram utilizados de forma isolada, enquanto o fenitrotiona foi utilizado em mistura com o esfenvalerato. A proporção dos componentes da mistura, 20 partes de fenitrotiona mais uma parte de esfenvalerato, foi baseada no inseticida comercial registrado no Ministério da Agricultura para o controle do caruncho do milho em grãos de milho armazenado no Brasil (AGROFIT, 2003). Foi utilizado acetona em grau analítico (99,8%, Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) como solvente para as preparações das concentrações dos inseticidas.

## **2.3 Bioensaios de detecção de resistência**

Foram realizados testes preliminares para se determinar o intervalo de concentrações do inseticida que causa mortalidades superiores a zero e inferiores a 100%. Nestes testes, frascos de vidro cilíndricos com área interna equivalente a 35,4 cm<sup>2</sup>, foram tratados com 0,4 mL da solução de cada inseticida diluído em acetona, quantidade necessária para cobrir igualmente toda a parede do frasco para cada concentração (Fragoso et al., 2003; 2005; Oliveira *et al.*, 2005, 2007; Freitas *et al.*, 2009). Os frascos foram colocados em um rotor (Roto-Torque, modelo 7637, Cole Parmer Instruments, Connecticut, EUA) para que o princípio ativo fosse distribuído uniformemente por toda a superfície interna do frasco após a completa evaporação do solvente.

Os testes preliminares foram formados por quatro tratamentos e o controle (apenas o solvente) com três repetições cada, onde vinte insetos adultos não-sexados eram expostos ao resíduo seco do inseticida por um período de 48 horas. Após este período, avaliou-se a mortalidade proporcionada pelas concentrações dos respectivos inseticidas utilizados. Com o objetivo de padronizar a avaliação, os insetos eram considerados mortos quando não respondiam a estímulos provocados por um único toque com a pinça.

Após a realização dos testes preliminares e determinação da faixa de concentração a ser usada nos bioensaios definitivos, procedeu-se à realização dos mesmos seguindo o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições contendo 20 insetos cada. Foram utilizados de seis a oito concentrações para cada combinação de inseticida e população, além da testemunha que foi exposta apenas ao solvente acetona. O bioensaio utilizado foi o mesmo anteriormente descrito mantendo-se os frascos em câmaras climáticas tipo B.O.D., com temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotoperíodo LD 12:12.

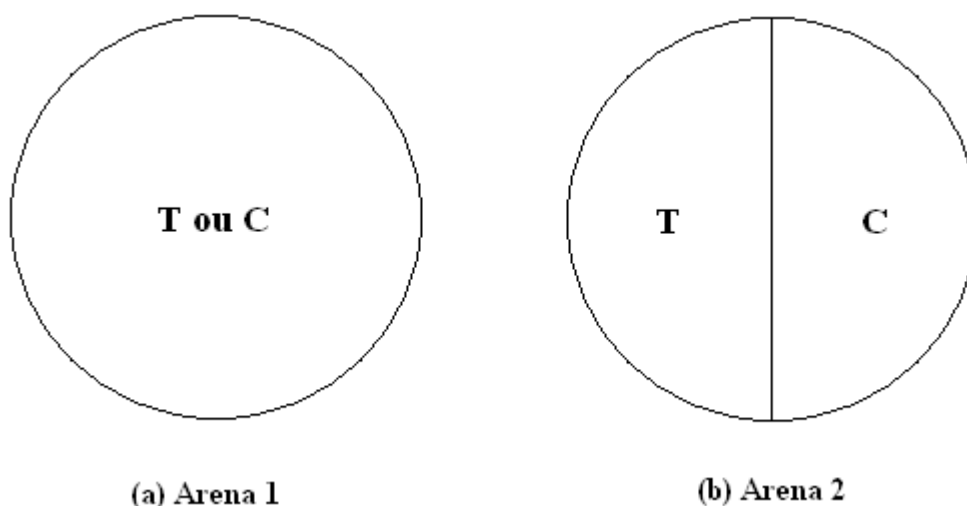
#### **2.4 Bioensaios comportamentais**

Dois ensaios comportamentais de caminhamento foram realizados em arenas totalmente ou parcialmente (metade) tratadas com resíduo seco de inseticidas. As arenas foram confeccionadas em placas de Petri com nove centímetros de diâmetro e dois centímetros de altura, cujo fundo foi recoberto com discos de papel-filtro e as paredes revestidas com teflon para evitar o escape dos insetos. O disco de papel-filtro foi considerado tratado quando embebido com 1 mL da solução inseticida. A solução utilizada proporcionava, após a evaporação do solvente, uma concentração correspondente à  $CL_{95}$  da população padrão de susceptibilidade. Esta concentração de inseticida não é letal aos insetos para o período de exposição utilizado (10 min), como determinado em avaliações preliminares. O controle foi tratado apenas com 1 mL do solvente (acetona). Ambos os discos eram tratados em capela de exaustão e deixados secando por um período de 15 a 20 min.

O primeiro ensaio comportamental foi constituído de arenas impregnadas com resíduo seco do inseticida ou apenas com o solvente (controle) (Figura 2a). As características avaliadas foram distância percorrida, tempo em movimento, velocidade média de caminhamento e número de paradas na arena. No segundo ensaio, uma única arena foi confeccionada com metade da área tratada e metade não tratada (controle). O disco usado no controle foi inserido no fundo da placa de Petri e metade de um disco tratado com a solução de inseticida foi colada com cola branca (base de resina sintética e água) (Göller, China) por cima do disco controle (Figura 2b). A característica comportamental avaliada foi a proporção do tempo total de permanência do indivíduo na metade correspondente ao controle da arena. Os testes

comportamentais foram realizados em sala com iluminação artificial cuja temperatura média foi de 25 ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ), das 14 às 18 horas.

Em ambos os ensaios foram utilizados insetos adultos, sexados, com idade entre 1 e 15 dias após a emergência. Os insetos foram sexados pela observação da textura e perfurações do rostro, como proposto por Tolpo & Morrison (1965). Posteriormente, foram alojados em arenas formadas por discos não tratados por um período de 24 horas com intuito de aclimatação do inseto à arena. Posteriormente, os insetos foram colocados nas arenas, de acordo com o ensaio comportamental. As arenas levadas ao sistema de rastreamento formado por uma câmera de vídeo acoplada a um computador (ViewPoint Life Sciences Inc., Montreal – Canadá) para avaliação dos parâmetros comportamentais por um período de 10 min. O experimento foi delineado inteiramente ao acaso e estruturado em um fatorial (27 populações x 2 sexos x 3 inseticida) com 16 repetições, onde cada repetição constituiu-se de um único inseto. A cada repetição a placa de Petri e os papéis-filtro foram trocados. O lado em que o inseto foi adicionado a cada repetição foi definido aleatoriamente.



**Figura 2** - Arenas de caminamento de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) no teste com o ViewPoint. (a) ensaio 1, arena com disco impregnado com resíduo seco de inseticida (tratado - T) ou com o disco sem inseticida embebido com acetona (controle - C); (b) ensaio 2, arena com metade da área tratada (tratado - T) e metade não tratada (controle - C).

## 2.5 Bioensaio de taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ )

Este ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Cada tratamento (população de *S. zeamais*) foi formado por um pote de vidro com capacidade de 1,5 L contendo 250 g de grãos de milho de umidade conhecida (base úmida), isentos de pragas e inseticida. Cinquenta insetos adultos, não sexados e com idade entre 0 a 15 dias após a emergência foram adicionados aos potes. Os potes com os insetos foram acondicionados em câmaras climáticas tipo B.O.D., com temperatura ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa ( $70 \pm 10\%$ ) e fotoperíodo (LD 12:12) controlados. Após 100 dias foram avaliados o número de insetos vivos e mortos, a massa corporal dos insetos vivos e o peso final da massa de grãos.

A taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ ) foi calculada utilizando-se a equação a seguir (Stark & Bank, 2003).

$$r_i = \frac{\left[ \ln\left(\frac{N_f}{N_i}\right) \right]}{\Delta T}$$

Onde:

$r_i$  = Taxa instantânea de crescimento populacional;

$N_f$  = Número final de insetos vivos;

$N_i$  = Número inicial de insetos vivos;

$\Delta T$  = Variação de tempo (número de dias em que o ensaio foi realizado).

## 2.6 Bioensaios Respirométricos

O ensaio de respirometria foi realizado em condições de laboratório utilizando um respirômetro do tipo TR3C equipado com um analisador de  $\text{CO}_2$  (Sable System International, Las Vegas, EUA) e metodologia adaptada de Guedes *et al.* (2006). Foram separados e sexados grupos de vinte insetos adultos devidamente acondicionados numa câmara com capacidade de 25 mL. Esta câmara foi conectada a um sistema completamente fechado, onde o  $\text{CO}_2$  produzido pelos insetos ( $\mu\text{mL}$  de  $\text{CO}_2$  / hora) é varrido por um fluxo de ar isento de  $\text{CO}_2$  e mensurado por um leitor infravermelho de  $\text{CO}_2$  conectado ao sistema. O experimento foi delineado

inteiramente ao acaso e esquema fatorial (27 populações x 2 sexos) com três repetições.

## **2.7 Bioensaios Enzimáticos**

Para os ensaios de amilase e lipase foram utilizados respectivamente os Kits “K003” e “K025” da BIOCLIN (QUIBASA – Química Básica Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e metodologia adaptada de Araújo *et al.* (2008a). Para ambos os ensaios, os extratos enzimáticos foram obtidos a partir de cinco insetos adultos sexados, macerados com 1 mL de água deionizada (pH 3,0) e centrifugados a velocidade de 10000 gmax por 15 min. O arranjo experimental foi o fatorial (27 população x 2 sexo) com três repetições no delineamento inteiramente casualizado.

O ensaio de amilase é baseado na reação substrato (amido) e reagente de cor com metodologia baseada na cinética de tempo fixo (Caraway, 1959 modificado). O extrato enzimático foi incubado com o substrato e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 660 nm. O ensaio de lipase é também baseado em uma metodologia colorimétrica contendo tampão, inibidor enzimático, reagente de cor, substrato e acetona. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 410 nm. A concentração de proteína nos extratos enzimáticos foi determinada pelo método de Warburg-Christian (1941) para determinação de atividade específica.

## **2.8 Análises Estatísticas**

Os resultados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit (Finney, 1971), por intermédio do procedimento PROC PROBIT do programa System of Statistical Analyses - SAS (SAS Institute, 2000), gerando as curvas de concentração-mortalidade. Os dados de mortalidade obtidos foram corrigidos pela mortalidade que ocorreu no tratamento controle. A razão de resistência indica quantas vezes uma população é mais resistente que a população considerada padrão de suscetibilidade ( $p < 0,05$ ) quando o limite de confiança não inclui o valor 1 (Robertson and Preisler, 1992). Para se mensurar a magnitude da resistência das populações aos inseticidas, foi calculada a razão de resistência (RR) com limite de confiança de 95% baseada nos valores das  $CL_{50}$  e  $CL_{95}$  do inseticida para cada população como sugerido por Robertson and Preisler (1992).

Os resultados para o ensaio comportamental referente à arena completamente tratada foram submetidos à análise de variância multivariada (população x sexo x inseticida) (PROC GLM com MANOVA Statement; SAS Institute, 2000) e os parâmetros comportamentais avaliados foram submetidos à análise de correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ) (PROC CORR; SAS). Eventualmente o parâmetro comportamental “distância percorrida” (considerado um parâmetro de maior relevância) foi submetido a uma análise de variância univariada (PROC UNIVARIATE; SAS Institute, 2000) e posteriormente, para cada inseticida, as variáveis população e sexo foram submetidos ao teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) (Sistema de Análise Estatística e Genética – SAEG, 2000). Os dados referentes à arena parcialmente tratada (metade tratada e metade controle) foram submetidos a uma análise de variância univariada (PROC UNIVARIATE; SAS Institute, 2000) e subsequentemente, para cada inseticida, também foram submetidos ao teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) (Sistema de Análise Estatística e Genética – SAEG, 2000) com o intuito de classificar em grupos as variáveis população e sexo de acordo com o parâmetro comportamental avaliado. Foi realizada uma análise de correlação Pearson ( $p < 0,05$ ) (PROC CORR; SAS) entre a razão de resistência (CL<sub>50</sub>) e os parâmetros comportamentais distância percorrida e proporção de tempo de permanência na área não tratada da arena para cada inseticida.

Os dados referentes à taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ) e taxa de consumo de grão das populações de *S. zeamais* foram inicialmente submetidos à análise de variância univariada (PROC UNIVARIATE; SAS Institute, 2000). Enquanto, taxa respiratória, massa corpórea, atividade de amilase e atividade de lipase foram submetidos à análise de variância multivariada (população x sexo) (PROC GLM com MANOVA Statement; SAS Institute, 2000). Cada parâmetro foi também submetido e ao teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) (Sistema de Análise Estatística e Genética – SAEG, 2000).

Posteriormente foi realizada uma análise de correlação canônica (parcial), utilizando o procedimento PROC CANCORR (SAS Institute, 2000), com objeto de determinar se existe correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre a taxa instantânea de crescimento e as razões de resistência (RR<sub>CL<sub>50</sub></sub>), à distância percorrida e a proporção do tempo de permanência na área não tratada.



A análise de trilha foi utilizada para identificar e quantificar as interações diretas e indiretas entre a taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ) com a taxa de consumo de grão, a taxa respiratória, a massa corpórea, a atividade de amilase e a atividade de lipase. As interações são representadas por coeficientes de correlação, que quantifica as interações entre as variáveis independentes, e coeficientes de regressão, responsáveis por quantificar o efeito direto na variável resposta. As análises foram realizadas usando os procedimentos PROC REG e PROC CALIS (SAS Institute, 2000), seguindo os passos descritos por Mitchell (1993).

Os dados referentes à massa corpórea, à atividade de amilase e lipase não satisfizeram aos pressupostos de homogeneidade de variância e de normalidade sendo necessário recorrer às transformações LOG (x+1) para massa corpórea e LOG (x) para atividades de amilase e lipase.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Bioensaios de detecção de resistência

Os resultados dos bioensaios para detecção de resistência em populações de *S. zeamais* mostram baixos valores de  $\chi^2$  e altos  $p$  valores ( $<12$  e  $>0,06$  respectivamente), indicando adequação dos dados ao modelo probit para estimativa das curvas de mortalidade. Isto possibilitou as estimativas dos parâmetros de mortalidade  $CL_{50}$  e  $CL_{95}$  (Tabelas 1, 2 e 3).

As populações avaliadas mostraram, em sua maioria, baixa resistência ao inseticida esfenvalerato com a razão de resistência variando de 0,63 a 66,65 vezes em relação à população padrão de susceptibilidade (Tabela 1). A população que apresentou menor valor de  $CL_{50}$  foi a de Unaí, enquanto a que apresentou maior valor foi a de Juiz de Fora. As populações de Unaí, Piracicaba, Canarana, Dourados - Bororó, Maracaju e Guaxupé foram consideradas susceptíveis em relação à população de Sete Lagoas (padrão de susceptibilidade) de acordo com a razão de resistência (RR) e seus respectivos limites de confiança (Robertson and Preisler, 1992). Enquanto as populações de Espírito Santo do Pinhal, Jacarezinho e Juiz de Fora apresentam resistência moderada com razão de resistência variando entre 10 a 100 vezes. As inclinações das curvas de mortalidade variaram entre as populações, variação esta que esteve entre  $0,56 \pm 0,06$  (Espírito Santo do Pinhal) e  $0,91 \pm 0,08$  (Maracaju). Por causa desta variação, a ordem de suscetibilidade das populações baseada na  $CL_{50}$  foi diferente daquela baseada na  $CL_{95}$  (Tabela 1).

**Tabela 1** – Suscetibilidade de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) a esfenvalerato.

População	N <sup>1</sup>	Inclinação ± EPM <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (IF 95%) ηg/cm <sup>2</sup>	RR <sub>50</sub> (IC 95%)	CL <sub>95</sub> (IF 95%) ηg/cm <sup>2</sup>	RR <sub>95</sub> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	P
Sete Lagoas <sup>3</sup>	700	0,80 ± 0,06	6,42 (4,65 - 9,19)	1,00 (0,62 - 1,61)	711,69 (326,90 - 2001,00)	1,00 (0,28 - 3,51)	4,44	0,49
Piracicaba	700	0,64 ± 0,07	5,97 (4,10 - 8,62)	0,93 (0,40 - 0,97)	2273,00 (989,48 - 6831,00)	3,19 (0,16 - 1,52)	3,72	0,71
Unai	760	0,85 ± 0,05	4,02 (2,99 - 5,30)	0,63 (0,57 - 1,53)	347,49 (187,16 - 802,01)	0,49 (0,87 - 11,76)	2,70	0,75
Canarana	800	0,75 ± 0,05	7,43 (5,45 - 10,12)	1,16 (0,74 - 1,82)	1160,00 (593,22 - 2751,00)	1,63 (0,51 - 5,24)	1,03	0,98
Dourados - Bororó	700	0,81 ± 0,06	7,63 (5,60 - 10,50)	1,19 (0,75 - 1,88)	827,66 (405,37 - 2140,00)	1,16 (0,35 - 3,89)	4,03	0,55
Maracaju	800	0,91 ± 0,08	8,71 (6,38 - 11,59)	1,36 (0,87 - 2,12)	569,98 (308,24 - 1330,00)	0,80 (0,26 - 2,50)	3,82	0,70
Guaxupé	800	0,70 ± 0,06	9,85 (7,06 - 13,79)	1,54 (0,96 - 2,46)	2148,00 (961,22 - 6349,00)	3,02 (0,84 - 10,90)	4,39	0,62
Vicentina	800	0,75 ± 0,06	10,49 (7,53 - 14,54)	1,63 (1,03 - 2,61)	1617,00 (747,24 - 4658,00)	2,27 (0,64 - 8,02)	5,19	0,52
Pedro Juan Caballero	800	0,70 ± 0,05	10,63 (7,69 - 14,85)	1,66(1,04 - 2,64)	2340,00 (1081,00 - 6437,00)	3,29 (0,95 - 11,48)	5,17	0,52
Abre Campo	700	0,67 ± 0,06	11,90 (8,36 - 17,05)	1,85 (1,14 - 3,01)	3420,00 (1326,00 - 13160,00)	4,81 (1,16 - 20,03)	2,71	0,74
Dourados - Proterito	780	0,84 ± 0,07	12,79 (9,53 - 17,21)	1,99 (1,28 - 3,11)	1160,00 (582,33 - 2951,00)	1,63 (0,49 - 5,36)	8,09	0,23
Rio Verde	800	0,84 ± 0,07	12,97 (9,73 - 17,33)	2,02 (1,30 - 3,14)	1169,00 (597,62 - 2873,00)	1,64 (0,51 - 5,32)	1,92	0,93
Tunapolis	700	0,71 ± 0,07	13,60 (9,55 - 19,43)	2,12 (1,31 - 3,44)	2836,00 (1113,00 - 11076,00)	3,98 (0,96 - 16,55)	3,09	0,69
Amabay	800	0,76 ± 0,07	14,75 (10,57 - 20,71)	2,30 (1,43 - 3,68)	2128,00 (934,00 - 6745,00)	2,99 (0,81 - 11,08)	5,41	0,49
Jacuí	780	0,86 ± 0,08	18,63 (13,66 - 25,68)	2,90 (1,84 - 4,58)	1522,00 (692,90 - 4752,00)	2,14 (0,59 - 7,74)	6,75	0,34

<sup>1</sup>N = Número total de insetos por bioensaio; <sup>2</sup>EPM = Erro padrão da média; <sup>3</sup>População padrão de suscetibilidade, CL = Concentração letal; IC 95% = Intervalo de confiança a 95% de probabilidade; RR = Razão de Resistência: CL<sub>50</sub> da população resistente/CL<sub>50</sub> da população susceptível; χ<sup>2</sup> = Qui-quadrado; P = Probabilidade.

**Continuação Tabela 1**– Suscetibilidade de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) a esfenvalerato.

População	N <sup>1</sup>	Inclinação ± EPM <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (IF 95%) ng/cm <sup>2</sup>	RR <sub>50</sub> (IC 95%)	CL <sub>95</sub> (IF 95%) ng/cm <sup>2</sup>	RR <sub>95</sub> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	P
Sacramento	800	0,83 ± 0,06	19,90 (14,85 - 27,22)	3,10 (1,98 - 4,86)	1937,00 (944,18 - 5048,00)	2,72 (0,81 - 9,13)	4,05	0,67
Guarapuava	800	0,70 ± 0,07	20,64 (14,44 - 30,44)	3,22 (1,96 - 5,28)	4746,00 (1697,00 - 21765,00)	6,67 (1,47 - 30,46)	1,18	0,98
Machado	800	0,66 ± 0,06	24,54 (16,83 - 37,56)	3,82 (2,28 - 6,41)	7674,00 (2587,00 - 37301,00)	10,78 (2,26 - 51,81)	7,81	0,25
Viçosa	580	0,80 ± 0,10	24,56 (9,73 - 51,90)	3,83 (2,01 - 7,28)	2747,00 (784,65 - 31060,00)	3,86 (0,90 - 16,57)	8,80	0,07
São José do Rio Pardo	800	0,78 ± 0,08	25,70 (18,30 - 37,36)	4,00 (2,47 - 6,50)	3290,00 (1278,00 - 13421,00)	4,62 (1,10 - 19,49)	5,50	0,48
Dourados - Barreirinha	800	0,90 ± 0,10	32,61 (24,40 - 45,41)	5,08 (3,23 - 7,98)	2188,00 (926,59 - 8068,00)	3,07 (0,78 - 12,03)	5,16	0,52
Votuporanga	800	0,70 ± 0,07	35,54 (20,55 - 63,03)	5,54 (3,20 - 9,60)	7803,00 (2376,00 - 50855,00)	10,96 (2,54 - 47,52)	11,14	0,08
São João	800	0,70 ± 0,05	38,72 (27,82 - 54,17)	6,03 (3,77 - 9,65)	8364,00 (3800,00 - 23923,00)	11,75 (3,32 - 41,78)	5,87	0,44
Nova Era	700	0,58 ± 0,07	41,61 (25,53 - 75,25)	6,48 (3,48 - 12,08)	27621,00 (6465,00 - 269280,00)	38,81 (5,36 - 284,01)	8,13	0,15
Espirito Santo do Pinhal	800	0,56 ± 0,06	87,70 (52,23 - 176,60)	13,66 (6,94 - 26,90)	74752,00 (15543,00 - 821625,00)	105,03 (12,98 - 861,05)	1,99	0,92
Jacarezinho	800	0,65 ± 0,07	162,48 (90,31 - 306,51)	25,32 (14,17 - 45,23)	54146,00 (14179,00 - 470125,00)	76,08 (15,51 - 375,88)	11,58	0,07
Juiz de Fora	700	0,80 ± 0,08	427,76 (307,03 - 611,89)	66,65 (41,42 - 107,26)	48843,00 (19825,00 - 185096,00)	68,63 (17,00 - 277,13)	7,03	0,22

<sup>1</sup>N = Número total de insetos por bioensaio; <sup>2</sup>EPM = Erro padrão da média; <sup>3</sup>População padrão de suscetibilidade, CL = Concentração letal; IC 95% = Intervalo de confiança a 95% de probabilidade; RR = Razão de Resistência: CL<sub>50</sub> da população resistente/CL<sub>50</sub> da população susceptível; χ<sup>2</sup> = Qui-quadrado; P = Probabilidade.

Todas as populações de *S. zeamais* apresentaram baixos níveis de resistência à mistura esfenvalerato + fenitrotiona (Tabela 2). A magnitude ou razão de resistência (RR) com base na CL<sub>50</sub> variou de 1,00 a 5,02 vezes, sendo as populações de Sete Lagoas e Piracicaba as mais suscetíveis e a população de Unaí a mais resistente à mistura. Pelo critério adotado por Robertson and Preisler (1992), as populações de Piracicaba, Amambay, Rio Verde, Sacramento, Dourados – Bororó, Canarana, Maracaju, Guaxupé e Viçosa são susceptíveis em relação à população padrão de susceptibilidade. À semelhança do ocorrido para esfenvalerato, houve variação nas inclinações das curvas concentração-mortalidade, inclinação esta que se mostrou menor e maior, respectivamente, para as populações de Votuporanga ( $0,64 \pm 0,15$ ) e Piracicaba ( $3,61 \pm 0,30$ ). Como esperado, em razão das diferentes inclinações, a ordem de susceptibilidade das populações à mistura fenitrotiona + esfenvalerato baseada na CL<sub>50</sub> foi diferente daquela baseada na CL<sub>95</sub> (Tabela 2).

**Tabela 2** – Suscetibilidade de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) a mistura esfenvalerato + fenitrotiona.

População	N <sup>1</sup>	Inclinação ± EPM <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (IF 95%) ng/cm <sup>2</sup>	RR <sub>50</sub> (IC 95%)	CL <sub>95</sub> (IF 95%) ng/cm <sup>2</sup>	RR <sub>95</sub> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	P
Sete Lagoas <sup>3</sup>	600	2,21 ± 0,39	0,0052 (0,0032 - 0,0066)	1,00 (0,75 - 1,34)	0,029 (0,018 - 0,105)	1,00 (0,51 - 1,98)	7,85	0,10
Piracicaba	780	3,61 ± 0,30	0,0052 (0,0047 - 0,0055)	1,00 (0,80 - 1,24)	0,014 (0,012 - 0,017)	0,51 (0,31 - 0,85)	9,03	0,17
Amambay	780	1,93 ± 0,32	0,0053 (0,0037 - 0,0067)	1,03 (0,77 - 1,36)	0,038 (0,022 - 0,136)	1,32 (0,63 - 2,79)	10,42	0,06
Rio Verde	700	2,17 ± 0,19	0,0057 (0,0049 - 0,0064)	1,09 (0,86 - 1,39)	0,032 (0,025 - 0,045)	2,20 (0,64 - 1,96)	3,20	0,67
Sacramento	700	2,16 ± 0,22	0,0057 (0,0050 - 0,0063)	1,10 (0,87 - 1,39)	0,033 (0,025 - 0,049)	1,15 (0,64 - 2,05)	8,96	0,11
Dourados - Bororó	540	1,40 ± 0,36	0,0060 (0,0019 - 0,0086)	1,15 (0,79 - 1,68)	0,089 (0,032 - 40,46)	3,08 (0,83 - 11,59)	8,49	0,08
Canarana	680	1,93 ± 0,29	0,0062 (0,0043 - 0,0079)	1,20 (0,89 - 1,61)	0,044 (0,026 - 0,131)	1,53 (0,75 - 3,11)	10,92	0,05
Maracaju	740	2,20 ± 0,19	0,0063 (0,0055 - 0,0070)	1,21 (0,95 - 1,53)	0,035 (0,027 - 0,048)	1,21 (0,70 - 2,11)	8,66	0,19
Guaxupé	600	2,02 ± 0,23	0,0064 (0,0057 - 0,0073)	1,24 (0,98 - 1,58)	0,042 (0,029 - 0,072)	1,45 (0,76 - 2,77)	5,15	0,27
Viçosa	640	1,81 ± 0,21	0,0069 (0,0049 - 0,0091)	1,33 (0,98 - 1,81)	0,056 (0,035 - 0,123)	1,93 (1,01 - 3,71)	9,82	0,08
São José do Rio Pardo	600	1,63 ± 0,26	0,0071 (0,0045 - 0,0100)	1,38 (1,00 - 1,90)	0,073 (0,036 - 0,390)	2,53 (1,10 - 5,84)	9,09	0,06
São João	760	2,55 ± 0,21	0,0075 (0,0068 - 0,0082)	1,44 (1,15 - 1,81)	0,033 (0,026 - 0,044)	1,15 (0,67 - 1,97)	4,50	0,61
Nova Era	600	1,62 ± 0,25	0,0076 (0,0047 - 0,0105)	1,46 (1,05 - 2,03)	0,078 (0,040 - 0,395)	2,71 (1,19 - 6,17)	8,91	0,06
Espírito Santo do Pinhal	580	1,15 ± 0,16	0,0076 (0,0057 - 0,0095)	1,46 (1,07 - 2,01)	0,204 (0,108 - 0,590)	7,03 (2,80 - 17,90)	1,22	0,88
Jacuí	600	0,75 ± 0,15	0,0076 (0,0045 - 0,0105)	1,47 (0,96 - 2,24)	1,165 (0,309 - 25,45)	40,20 (5,97 - 277,15)	6,74	0,15

<sup>1</sup>N = Número total de insetos por bioensaio; <sup>2</sup>EPM = Erro padrão da média; <sup>3</sup>População padrão de suscetibilidade, CL = Concentração letal; IC 95% = Intervalo de confiança a 95% de probabilidade; RR = Razão de Resistência: CL<sub>50</sub> da população resistente/CL<sub>50</sub> da população susceptível; χ<sup>2</sup> = Qui-quadrado; P = Probabilidade.

**Continuação Tabela 2**– Suscetibilidade de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) a mistura esfenvalerato + fenitrotiona.

População	N <sup>1</sup>	Inclinação ± EPM <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (IF 95%) ηg/cm <sup>2</sup>	RR <sub>50</sub> (IC 95%)	CL <sub>95</sub> (IF 95%) ηg/cm <sup>2</sup>	RR <sub>95</sub> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	P
Vicentina	700	1,75 ± 0,20	0,0078 (0,0068 - 0,0089)	1,50 (1,18 - 1,91)	0,067 (0,044 - 0,131)	2,33 (1,15 - 4,74)	9,19	0,10
Machado	700	1,07 ± 0,14	0,0084 (0,0066 - 0,0103)	1,62 (1,20 - 2,18)	0,291 (0,142 - 0,978)	10,06 (3,65 - 28,13)	9,09	0,11
Abre Campo	700	1,56 ± 0,16	0,0085 (0,0072 - 0,0098)	1,64 (1,27 - 2,11)	0,096 (0,064 - 0,173)	3,32 (1,69 - 6,57)	8,18	0,15
Juiz de Fora	600	2,58 ± 0,20	0,0096 (0,0086 - 0,0106)	1,84 (1,46 - 2,33)	0,041 (0,033 - 0,055)	1,44 (0,84 - 2,48)	5,42	0,25
Tunapolis	660	1,36 ± 0,15	0,0121 (0,0102 - 0,0146)	2,33 (1,78 - 3,05)	0,195 (0,112 - 0,463)	6,75 (2,96 - 15,57)	8,75	0,12
Dourados - Barrerinha	580	1,05 ± 0,16	0,0127 (0,0100 - 0,0161)	2,45 (1,80 - 3,33)	0,468 (0,201 - 2,183)	16,14 (4,93 - 53,64)	5,26	0,26
Guarapuava	700	0,93 ± 0,14	0,0175 (0,0138 - 0,0242)	3,37 (2,40 - 4,73)	1,020 (0,364 - 6,506)	35,20 (8,66 - 145,56)	2,70	0,75
Pedro Juan Caballero	600	1,21 ± 0,16	0,0177 (0,0145 - 0,0226)	3,41 (2,53 - 4,60)	0,407 (0,197 - 1,367)	14,06 (5,06 - 39,50)	5,14	0,27
Votuporanga	600	0,64 ± 0,15	0,0185 (0,0128 - 0,0320)	3,55 (2,27 - 5,56)	6,751 (0,923 - 1402,00)	232,82 (12,47 - 4474,61)	5,99	0,20
Dourados - Proterito	780	1,36 ± 0,13	0,0204 (0,0170 - 0,0258)	3,93 (2,94 - 5,26)	0,331 (0,187 - 0,753)	11,41 (5,01 - 26,21)	2,58	0,86
Jacarezinho	560	1,18 ± 0,22	0,0211 (0,0128 - 0,0395)	4,06 (2,73 - 6,04)	0,519 (0,155 - 18,36)	17,91 (4,66 - 69,65)	9,44	0,05
Unai	760	1,40 ± 0,13	0,0261 (0,0214 - 0,0340)	5,02 (3,70 - 6,83)	0,395 (0,221 - 0,913)	13,63 (5,92 - 31,64)	6,48	0,37

<sup>1</sup>N = Número total de insetos por bioensaio; <sup>2</sup>EPM = Erro padrão da média; <sup>3</sup>População Padrão de suscetibilidade, CL = Concentração letal; IC 95% = Intervalo de confiança a 95% de probabilidade; RR = Razão de Resistência: CL<sub>50</sub> da população resistente/CL<sub>50</sub> da população susceptível; χ<sup>2</sup> = Qui-quadrado; P = Probabilidade.

Nos bioensaios para permetrina, a população que apresentou maior  $CL_{50}$  foi a Juiz de Fora sendo 69,59 vezes mais resistente que a população padrão de susceptibilidade (Tabela 3). As populações que apresentaram menores valores de  $CL_{50}$  foram as de Rio Verde, Sete Lagoas e Piracicaba respectivamente, sendo consideradas susceptíveis pelo critério adotado por Robertson and Preisler (1992). A inclinação das curvas variou entre  $0,70 \pm 0,05$  a  $1,56 \pm 0,14$  para Viçosa e Canarana respectivamente, fazendo com que a ordem de susceptibilidade das populações baseada na  $CL_{50}$  também seja diferente em relação à  $CL_{95}$  (Tabela 3).

Embora a  $CL_{95}$  sirva como parâmetro de controle efetivo das populações a campo, a magnitude de resistência para os três inseticidas testados foi calculada a partir da  $CL_{50}$ . Isto porque este é o ponto de melhor ajuste do modelo (menor amplitude dos desvios-padrão), o que confere uma maior credibilidade à estimativa da concentração letal e da razão de resistência (Robertson & Preisler, 1992; Eaton & Klaassen, 2003).



**Tabela 3** – Suscetibilidade de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) a permetrina.

População	N <sup>1</sup>	Inclinação ± EPM <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (IF 95%) ng/cm <sup>2</sup>	RR <sub>50</sub> (IC 95%)	CL <sub>95</sub> (IF 95%) ng/cm <sup>2</sup>	RR <sub>95</sub> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	P
Sete Lagoas <sup>3</sup>	800	1,43 ± 0,09	1,58 (1,29 - 1,95)	1,00 (0,75 - 1,34)	22,25 (15,26 - 35,68)	1,00 (0,55 - 1,81)	4,45	0,62
Rio Verde	800	0,82 ± 0,05	1,25 (0,89 - 1,70)	0,79 (0,54 - 1,16)	129,94 (78,32 - 244,93)	5,88 (2,91 - 11,86)	10,44	0,11
Piracicaba	600	1,13 ± 0,13	1,81 (0,97 - 3,14)	1,14 (0,73 - 1,78)	52,29 (21,60 - 256,68)	2,36 (0,96 - 5,78)	9,39	0,05
Pedro Juan Caballero	600	1,29 ± 0,16	2,66 (1,41 - 4,23)	1,68 (1,11 - 2,54)	50,17 (24,31 - 196,25)	2,26 (1,03 - 4,93)	9,13	0,06
Tunapolis	600	1,16 ± 0,10	2,70 (2,11 - 3,38)	1,71 (1,25 - 2,33)	70,09 (44,86 - 127,78)	3,16 (1,63 - 6,12)	2,69	0,61
Vicentina	600	0,80 ± 0,07	2,84 (1,97 - 3,95)	1,80 (1,21 - 2,68)	324,98 (163,87 - 836,68)	14,71 (5,99 - 36,11)	3,35	0,50
Abre Campo	600	0,97 ± 0,07	2,89 (2,15 - 3,97)	1,83 (1,26 - 2,63)	140,53 (76,52 - 307,98)	6,34 (2,84 - 14,16)	5,89	0,21
Dourados - Bororó	800	1,31 ± 0,10	3,69 (2,92 - 4,54)	2,33 (1,73 - 3,15)	66,96 (47,51 - 104,05)	3,01 (1,70 - 5,33)	7,19	0,30
Guaxupé	700	0,84 ± 0,07	4,20 (3,12 - 5,66)	2,65 (1,85 - 3,80)	373,47 (187,30 - 953,20)	16,89 (6,87 - 41,50)	5,91	0,31
Amambay	800	0,77 ± 0,06	4,43 (3,25 - 5,96)	2,80 (1,95 - 4,02)	596,35 (301,81 - 1476,00)	27,00 (11,15 - 65,37)	4,83	0,57
São José do Rio Pardo	800	0,86 ± 0,06	4,43 (3,36 - 5,80)	2,80 (2,00 - 3,93)	365,63 (206,14 - 766,26)	16,53 (7,65 - 35,72)	9,55	0,15
Jacuí	700	0,96 ± 0,08	4,62 (3,44 - 6,10)	2,92 (2,06 - 4,14)	236,56 (133,26 - 514,73)	10,68 (4,88 - 23,35)	2,06	0,84
Dourados - Proterito	800	1,11 ± 0,09	5,23 (4,09 - 6,55)	3,31 (2,43 - 4,51)	158,73 (99,13 - 299,62)	7,15 (3,61 - 14,18)	8,87	0,18
Dourados - Barrerinha	700	0,94 ± 0,08	5,28 (3,91 - 6,99)	3,34 (2,35 - 4,74)	301,25 (168,96 - 654,42)	13,60 (6,21 - 29,80)	7,20	0,21
Guarapuava	600	1,19 ± 0,10	5,55 (4,33 - 7,00)	3,51 (2,56 - 4,80)	134,24 (85,87 - 242,27)	6,04 (3,13 - 11,68)	7,21	0,13

<sup>1</sup>N = Número total de insetos por bioensaio; <sup>2</sup>EPM = Erro padrão da média; <sup>3</sup>População padrão de suscetibilidade, CL = Concentração letal; IC 95% = Intervalo de confiança a 95% de probabilidade; RR = Razão de Resistência: CL<sub>50</sub> da população resistente/CL<sub>50</sub> da população susceptível; χ<sup>2</sup> = Qui-quadrado; P = Probabilidade.

**Continuação Tabela 3** – Suscetibilidade de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) a permetrina.

População	N <sup>1</sup>	Inclinação ± EPM <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (IF 95%) ng/cm <sup>2</sup>	RR <sub>50</sub> (IC 95%)	CL <sub>95</sub> (IF 95%) ng/cm <sup>2</sup>	RR <sub>95</sub> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	P
Sacramento	600	1,08 ± 0,11	5,64 (4,29 - 7,48)	3,56 (2,53 - 5,01)	189,82 (100,68 - 471,54)	8,56 (3,63 - 20,16)	4,10	0,39
Canarana	600	1,56 ± 0,14	5,70 (4,39 - 7,17)	3,60 (2,62 - 4,94)	64,27 (44,36 - 106,59)	2,89 (1,59 - 5,25)	7,06	0,13
Nova Era	800	1,09 ± 0,09	6,09 (4,80 - 7,62)	3,85 (2,38 - 6,23)	196,20 (120,79 - 375,95)	8,84 (2,43 - 32,22)	2,00	0,92
Unai	600	1,07 ± 0,12	7,12 (5,43 - 9,24)	4,50 (3,23 - 6,26)	242,22 (126,36 - 649,17)	10,92 (4,49 - 26,57)	3,90	0,42
Espírito Santo do Pinhal	800	1,01 ± 0,10	8,25 (6,30 - 10,65)	5,21 (3,75 - 7,24)	354,36 (189,60 - 872,72)	15,99 (6,84 - 37,38)	7,09	0,31
Machado	700	0,85 ± 0,09	9,50 (6,90 - 12,87)	6,00 (4,16 - 8,67)	815,47 (365,15 - 2749,00)	36,87 (12,84 - 105,86)	5,17	0,40
Maracaju	600	0,94 ± 0,15	9,86 (4,71 - 20,04)	6,23 (3,76 - 10,31)	543,44 (146,63 - 12250,00)	24,53 (6,33 - 95,16)	8,66	0,07
São João	800	0,82 ± 0,06	13,63 (10,18 - 18,40)	8,62 (6,03 - 12,32)	1419,00 (710,71 - 3560,00)	64,17 (26,23 - 156,99)	9,38	0,15
Viçosa	800	0,70 ± 0,05	24,42 (17,45 - 34,91)	15,44 (10,35 - 23,02)	5384,00 (2446,00 - 14961,00)	244,13 (91,15 - 653,86)	9,79	0,13
Votuporanga	800	1,24 ± 0,08	25,18 (20,18 - 31,36)	15,91 (11,80 - 21,47)	529,91 (352,48 - 887,65)	23,85 (12,84 - 44,30)	5,98	0,42
Jacarezinho	780	1,02 ± 0,10	88,89 (57,52 - 138,57)	56,18 (37,69 - 83,64)	3658,00 (1625,00 - 12653,00)	165,01 (67,82 - 401,46)	11,95	0,06
Juiz de Fora	660	1,23 ± 0,13	110,12 (68,30 - 186,40)	69,59 (45,67 - 106,05)	2407,00 (1041,00 - 9492,00)	108,34 (44,33 - 264,75)	10,75	0,06

<sup>1</sup>N = Número total de insetos por bioensaio; <sup>2</sup>EPM = Erro padrão da média; <sup>3</sup>População padrão de suscetibilidade, CL = Concentração letal; IC 95% = Intervalo de confiança a 95% de probabilidade; RR = Razão de Resistência: CL<sub>50</sub> da população resistente/CL<sub>50</sub> da população susceptível; χ<sup>2</sup> = Qui-quadrado; P = Probabilidade.

## 3.2 Bioensaios Comportamentais

### 3.2.1 Caminhamento em arena completamente tratada

As características comportamentais avaliadas nas populações de *S. zeamais* para as arenas completamente tratadas com resíduo seco de inseticidas diferiram significativamente para os inseticidas ( $df_{\text{num/den}} = 15/8279,3$ ; Wilks' lambda = 0,9073;  $F = 19,79$ ;  $p < 0,0001$ ), populações ( $df_{\text{num/den}} = 130/14781$ ; Wilks' lambda = 0,8353;  $F = 4,23$ ;  $p < 0,001$ ), sexo ( $df_{\text{num/den}} = 5/2999$ ; Wilks' lambda = 0,9948;  $F = 3,14$ ;  $p < 0,0078$ ) e para a interação inseticida x população x sexo ( $df_{\text{num/den}} = 390/14976$ ; Wilks' lambda = 0,8491;  $F = 1,28$ ;  $p < 0,0002$ ) quando submetidas à análise de variância multivariada.

Os resultados referentes ao tempo em movimento variaram de  $339,9 \pm 6,7s$  a  $432,4 \pm 9,7s$ , enquanto a velocidade média de caminhada variou entre  $0,61 \pm 0,007\text{cm/s}$  e  $0,70 \pm 0,11\text{cm/s}$  e o número de paradas na arena variou de  $752 \pm 28$  a  $992 \pm 24$ .

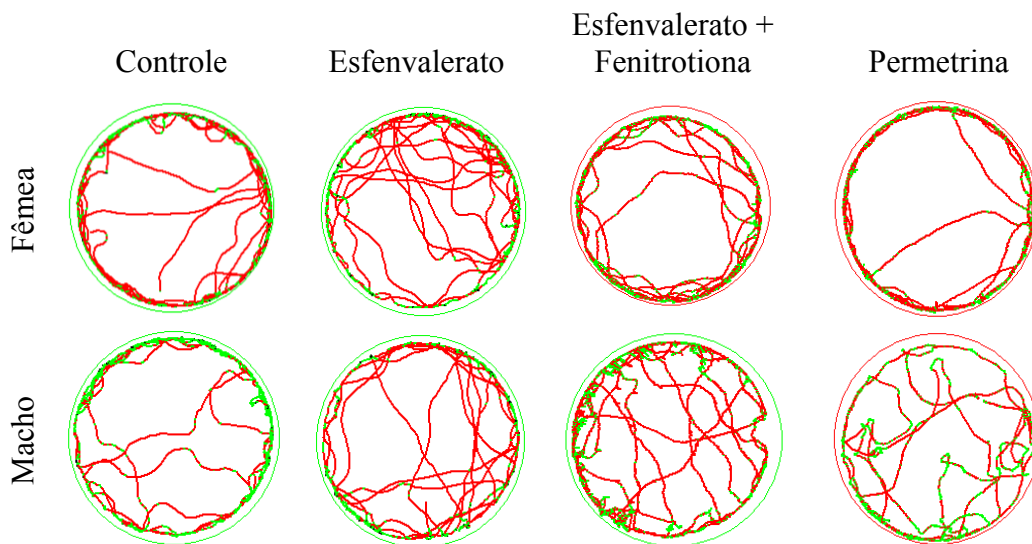
A análise de correlação mostra alta correlação entre distância percorrida e as demais características avaliadas. A característica distância percorrida mostrou correlação positiva com o tempo em movimento e com a velocidade média de caminhada, no entanto apresentou correlação negativa com o número de paradas na arena (Tabela 4). Assim, apenas distância percorrida foi considerada nas análises subsequentes, cuja tendência e diferenças são representativas dos demais parâmetros avaliados nestes bioensaios.

**Tabela 4.** Correlação de Pearson entre distância percorrida (cm), tempo em movimento (s), velocidade média de caminhada (cm/s) e número de paradas na arena de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) resultantes de ensaios comportamentais de caminhada comparando arenas completamente tratadas, individualmente, com três inseticidas (esfenvalerato, permetrina e fenitrotiona + esfenvalerato).

Correlação	Distância Percorrida (cm)	
	r	P
Tempo em Movimento (s)	0,84	< 0,0001
Velocidade média de caminhada (cm/s)	0,66	< 0,0001
Número de paradas na arena	-0,43	< 0,0001

A característica comportamental distância percorrida quando analisado isoladamente também mostrou significativa contribuição no comportamento das populações de *S. zeamais*, e seus respectivos sexos, frente às arenas totalmente tratadas com inseticida ( $F_{(215; 3003)} = 3,46; p < 0,0001$ ). A interação inseticida x população x sexo também foi significativa para o parâmetro avaliado ( $F_{(78)} = 1,35; p = 0,02$ ).

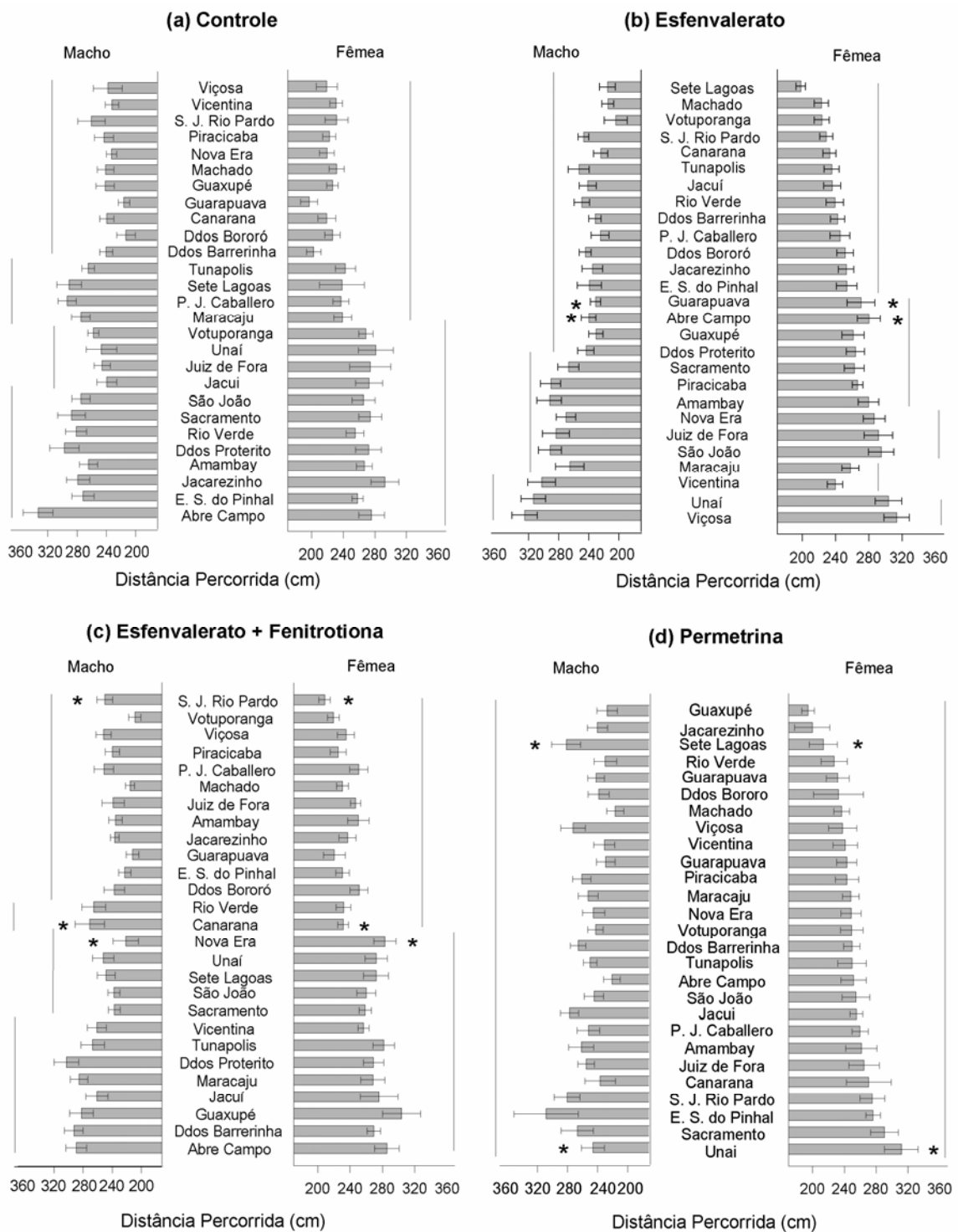
Padrões característicos do caminhamento de *S. zeamais* em arena completamente tratada é mostrado na Figura 3.



**Figura 3.** Arena representando o caminhamento de indivíduos de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidade) submetidas a arenas totalmente impregnadas com resíduo seco de inseticidas por um período de 10 min.

Os resultados da distância percorrida pelas fêmeas e pelos machos nas arenas sem inseticida (controle), com esfenvalerato e com a mistura esfenvalerato + fenitrotiona mostraram diferença significativa entre as populações pelo teste de Scott-knott ( $p = 0,05$ ), o que não ocorreu para os testes referentes à permetrina (Figura 4).

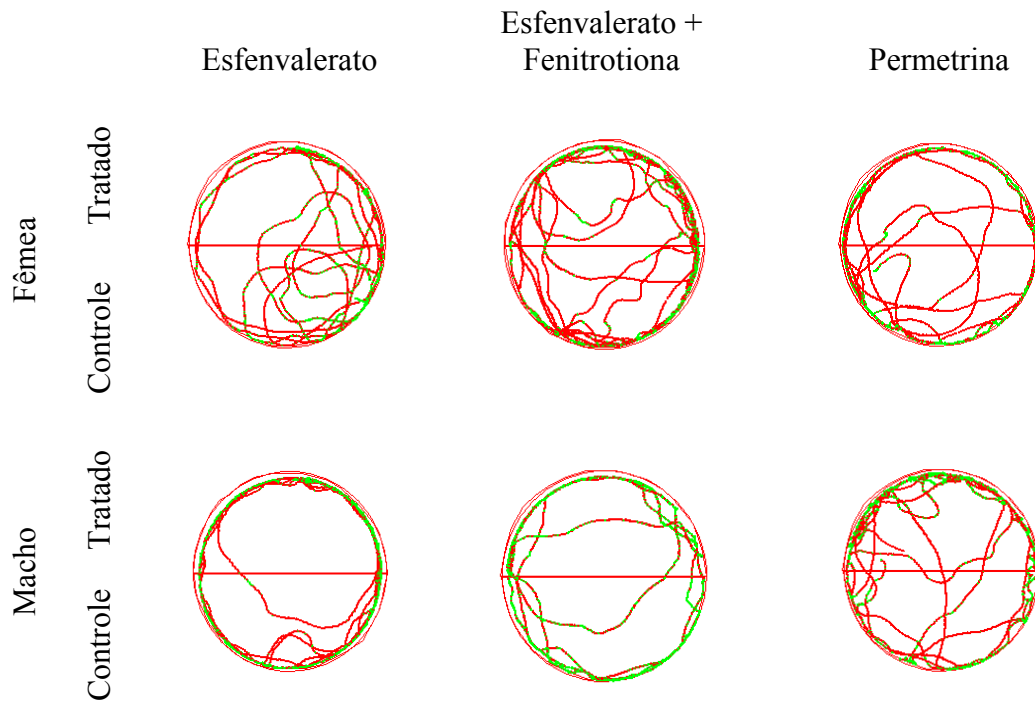
Na arena correspondente ao controle não se verificou diferença entre a distância percorrida por machos e fêmeas da mesma população (Figura 4a). Os machos percorreram maiores distâncias que as fêmeas em arenas com esfenvalerato para as populações de Guarapuava e Abre Campo (Figura 4b); em arenas com esfenvalerato + fenitrotiona para as populações de São José do Rio Pardo e Canarana (Figura 4c) e em arenas com permetrina para as populações de Sete Lagoas (Figura 4d). o inverso ocorreu para as populações de Nova Era em arenas com esfenvalerato + fenitrotiona (Figura 4c) e Unai para a arena com permetrina (Figura 4d).



**Figura 4.** Distância percorrida em 10 min (cm) ( $\pm$  erro padrão) por machos e fêmeas de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) em superfície: (a) controle, (b) esfenvalerato, (c) esfenvalerato + fenitrotiona e (d) permetrina. Médias agrupadas com barras na mesma altura não diferem entre as populações e médias que apresentam asteriscos diferem entre sexo na mesma população pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 3.2.2 Caminhamento em arena parcialmente (metade) tratada

Os mapas do comportamento das populações de *S. zeamais* em arenas metade tratada com inseticida são mostrados na Figura 5.



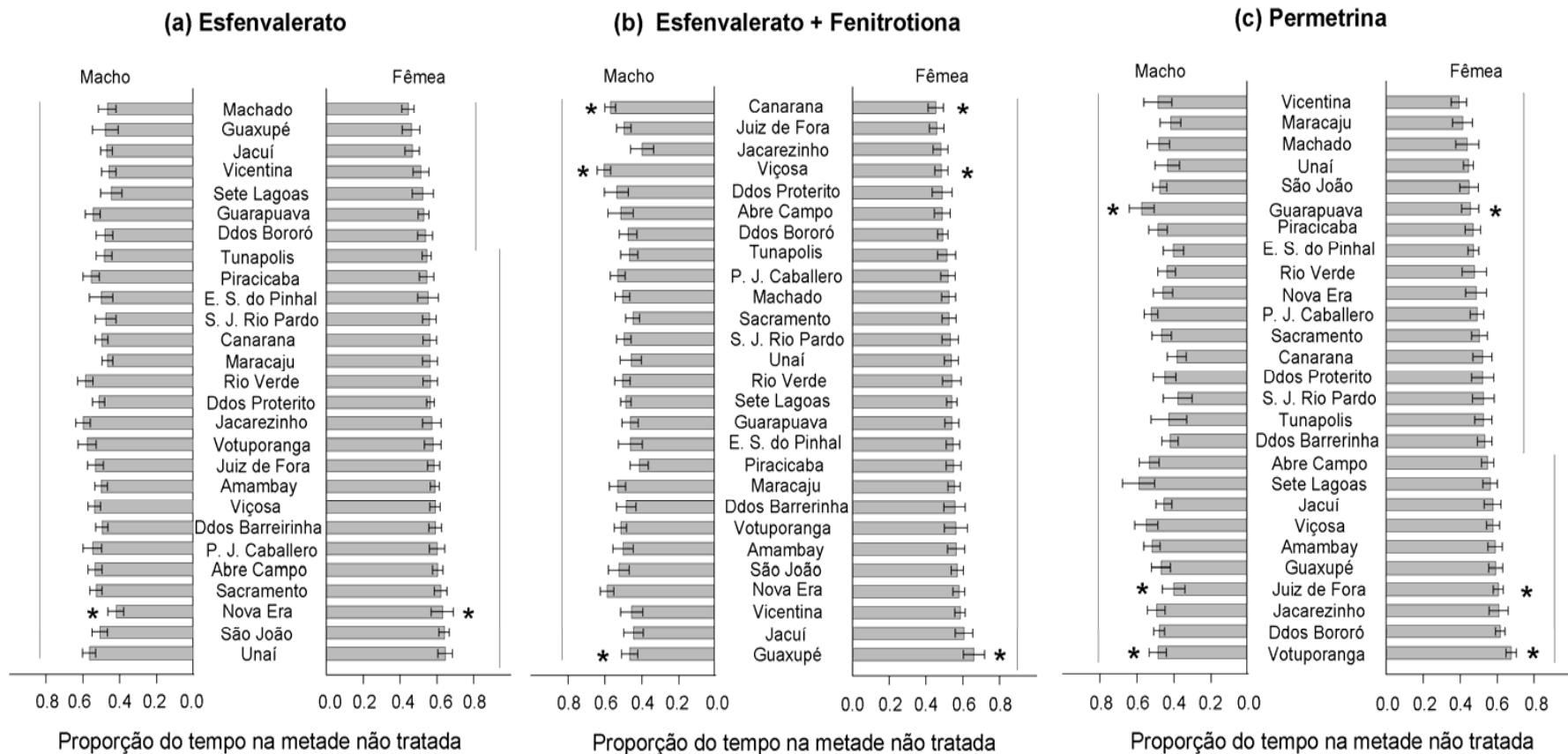
**Figura 5.** Arena representando o caminhamento por 10 min de indivíduos de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) em metade de arenas com resíduo seco de inseticidas.

A proporção do tempo de permanência do indivíduo na metade não tratada da arena diferiu significativamente pela análise de variância univariada ( $F_{(161; 2237)} = 1,48; p < 0,0001$ ). A interação inseticida x população x sexo também foi significativa a 5% de probabilidade ( $F_{(52)} = 1,41; p = 0,03$ ).

Os machos de todas as populações permaneceram o mesmo tempo na metade tratada da arena do que na não tratada com os inseticidas. O mesmo ocorrendo com as fêmeas quando a metade da arena foi tratada com esfenvalerato + fenitrotiona. Já para as arenas com metade tratada com esfenvalerato ou permetrina as fêmeas das populações de *S. zeamais* se dividiram em dois grupos: um com maior número de fêmeas na superfície tratada e outro grupo com maior número de fêmeas na superfície não tratada (Figura 6).

Os testes realizados com o intuito de observar as características comportamentais entre fêmeas e machos da mesma população na arena parcialmente tratada com inseticida mostraram que proporção do tempo de permanência na metade não tratada é significativamente maior nas fêmeas em relação aos machos para a população de Nova Era quando submetidas ao inseticida esfenvalerato (Figura 6a). Para a mistura esfenvalerato + fenitrotiona as fêmeas oriundas da população de Guaxupé apresentaram maior proporção do tempo de permanência na metade não tratada, o oposto ocorrendo para as populações de Canarana e Viçosa onde os machos apresentaram os maiores valores (Figura 6b). Os machos de Guarapuava e as fêmeas de Votuporanga e Juiz de Fora também apresentaram maior proporção do tempo de permanência na metade não tratada em relação aos machos quando submetidos à permetrina (Figura 6c).





**Figura 6.** Proporção do tempo de permanência na metade não tratada da arena ( $\pm$  erro padrão) em 10 min por machos e fêmeas de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae): (a) esfenvalerato, (b) esfenvalerato + fenitrotiona e (c) permetrina. Médias agrupadas com barras na mesma altura não diferem entre as populações e médias que apresentam asteriscos diferem entre sexo na mesma população pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As RR<sub>50</sub> de permetrina e de esfenvalerato das populações testadas mostraram correlação positiva e significativa ( $p < 0,0001$ ), o mesmo não acontecendo para a mistura esfenvalerato + fenitrotiona. Não detectou-se correlação significativa entre as razões de resistência e as características comportamentais avaliadas para os inseticidas. Entretanto, foi detectada correlação positiva e significativa entre as características comportamentais distancia percorrida e proporção do tempo na área tratada para o inseticida esfenvalerato (Tabela 5).

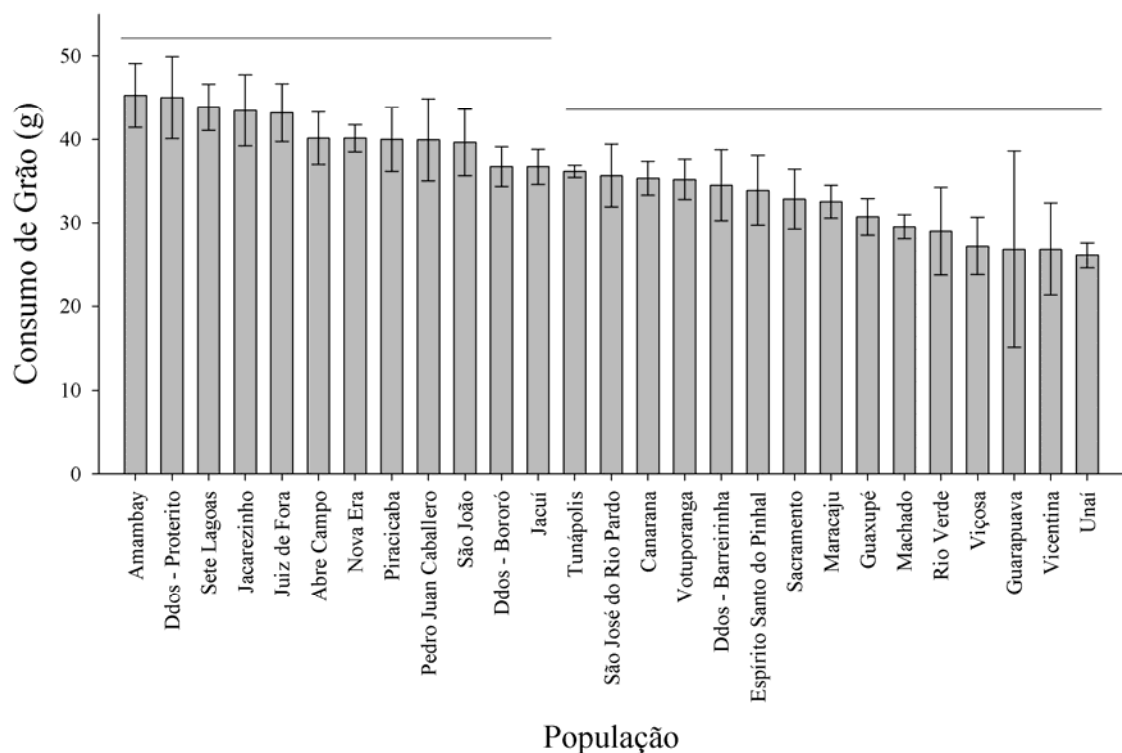
**Tabela 5.** Correlação de Pearson entre razão de resistência (CL50), distância percorrida (cm) e proporção do tempo na área não tratada de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) submetidas a esfenvalerato, esfenvalerato + fenitrotiona e permetrina.

		Razão de resistência (CL50)			Proporção do tempo na área não tratada		
		Permetrina	Esfenvalerato + Fenitrotiona	Esfenvalerato	Permetrina	Esfenvalerato + Fenitrotiona	Esfenvalerato
Razão de resistência (CL50)	Esfenvalerato	0,91*	0,09	-	-	-	0,19
	Esfenvalerato + Fenitrotiona	0,25	-	-	-	-0,29	-
	Permetrina	-	-	-	0,25	-	-
Distância Percorrida (cm)	Esfenvalerato	-	-	0,19	-	-	0,43*
	Esfenvalerato + Fenitrotiona	-	-0,03	-	-	0,22	-
	Permetrina	-0,09	-	-	-0,27	-	-

\*significativo a 5% de probabilidade

### 3.3 Bioensaios de taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ), taxa respiratória e enzimáticos

A análise de variância univariada não detectou diferença significativa para a taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ) entre as populações ( $0,0213 \pm 0,0004/\text{dia}$ ) ( $F_{(26; 54)} = 0,73$ ;  $p = 0,80$ ). No entanto, para a taxa de consumo de grão verificou-se diferença significativa ( $F_{(26; 54)} = 2,11$ ;  $p = 0,01$ ) entre as populações. Os dados referentes ao consumo de grão submetidos ao teste de Scott-Knott ( $p = 0,05$ ) estão apresentadas na Figura 7.



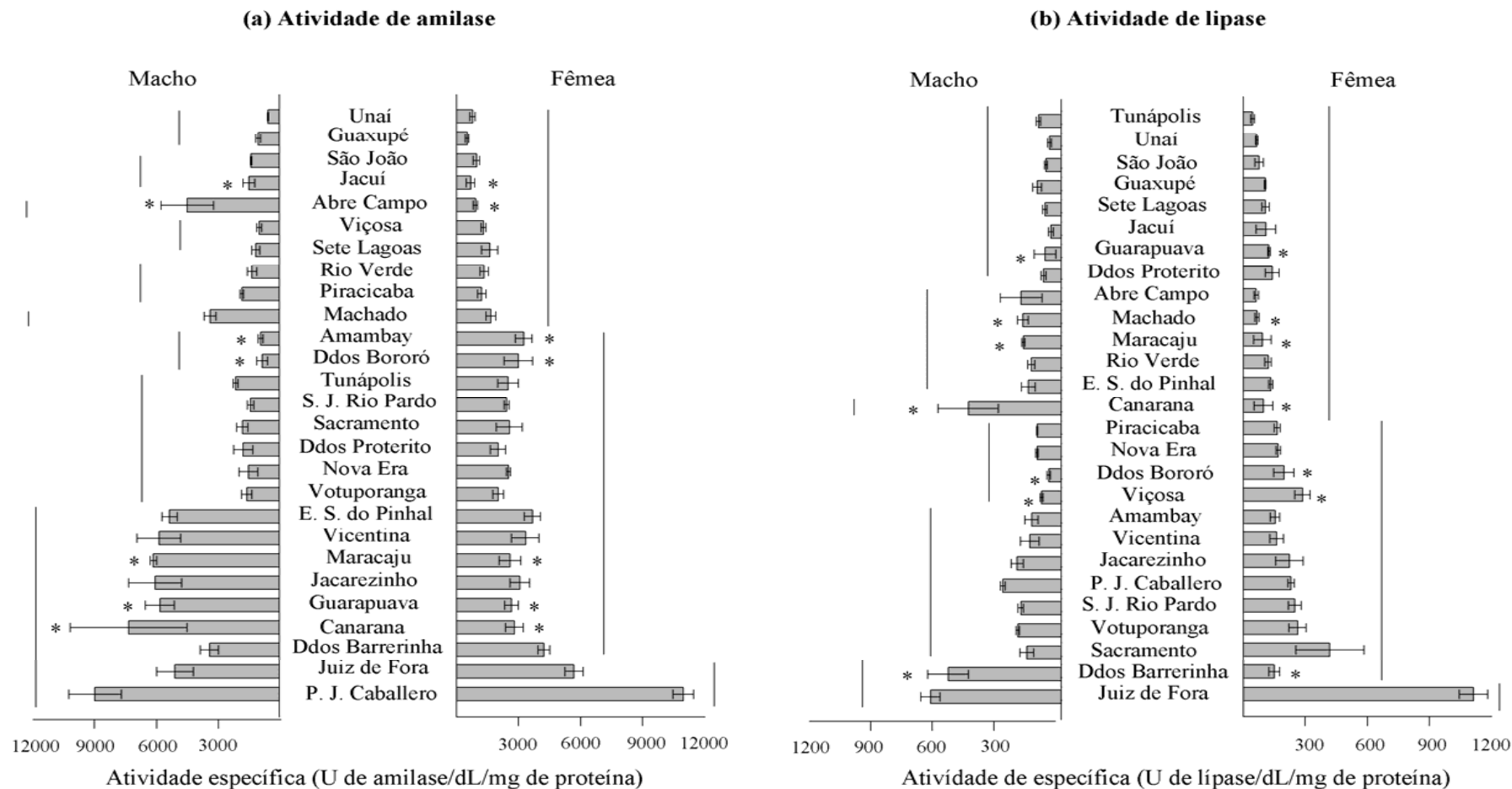
**Figura 7.** Consumo de grão (g) ( $\pm$  erro padrão) de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidade). Médias seguidas pelas mesmas barra não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Foi detectado diferença significativa na taxa respiratória, massa corpórea, atividade de amilase e atividade de lipase entre as populações de *S. zeamais* ( $df_{\text{num}/\text{den}} = 104/419,1$ ; Wilks' lambda = 0,0335;  $F = 5,46$ ;  $p < 0,001$ ) e para a interação população x sexo ( $df_{\text{num}/\text{den}} = 104/419,1$ ; Wilks' lambda = 0,1425;  $F = 2,56$ ;  $p < 0,0001$ ) quando submetidas a análise de variância multivariada. As variáveis taxa

respiratória ( $1,75 \pm 0,03 \mu\text{L de CO}_2 \text{ h}^{-1} / \text{inseto}$ ) ( $F_{(53; 108)} = 0,99; p < 0,50$ ) e massa corpórea ( $2,96 \pm 0,018 \text{ mg} / \text{inseto}$ ) ( $F_{(53; 108)} = 0,94; p < 0,60$ ) não foram significativas para população e sexo quando avaliadas isoladamente. Interação significativa entre população x sexo foi encontrada para a atividade de amilase ( $F_{(215; 3003)} = 3,46; p < 0,0001$ ) e atividade de lipase ( $F_{(215; 3003)} = 3,46; p < 0,0001$ ), que foram então submetidas ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Figura 8).

A atividade específica de amilase em fêmeas variou de 10956,16 ( $\pm 498$ ) (U de amilase/dL/mg de proteína) a 521,18 ( $\pm 76$ ) (U de amilase/dL/mg de proteína) para Pedro Juan Caballero e Guaxupé respectivamente, enquanto para os machos a variação foi de 8892,56 ( $\pm 1266$ ) (U de amilase/dL/mg de proteína) para Pedro Juan Caballero a 821,98 ( $\pm 266$ ) (U de amilase/dL/mg de proteína) para Dourados-Bororó. Os machos das populações de Canarana, Guarapuava, Maracaju, Abre Campo e Jacuí apresentaram maior da atividade de amilase que às fêmeas. Já as fêmeas das populações de Amambay e Dourados-Bororó apresentaram maior atividade de amilase do que os machos (Figura 8a).

Para atividade específica de lipase a população de Juiz de Fora apresentou maior valor entre as fêmeas ( $1112,73 \pm 69$  U de lipase/dL/mg de proteína) e a população de Tunápolis o menor valor ( $45,72 \pm 9$  U de lipase/dL/mg de proteína). Para os machos, as populações de Juiz de Fora ( $636,52 \pm 47$  U de lipase/dL/mg de proteína), Dourados-Barrerinha ( $549,94 \pm 99$  U de lipase/dL/mg de proteína) e Canarana ( $452,23 \pm 146$  U de lipase/dL/mg de proteína) foram superiores, enquanto a população de Unaí ( $55,75 \pm 10$  U de lipase/dL/mg de proteína) apresentou a menor atividade de lipase. As fêmeas oriundas das populações de Dourados-Bororó, Viçosa e Guarapuava apresentaram maior atividade de lipase em relação aos respectivos machos, enquanto nas populações de Dourados-Barrerinha, Canarana, Maracaju e Machado os machos apresentaram maior atividade (Figura 8b).



**Figura 8.** (a) Atividade específica de amilase (U de amilase/dL/mg de proteína) ( $\pm$  Erro Padrão) (b) Atividade específica de lipase (U de lipase/dL/mg de proteína) ( $\pm$  erro padrão) de machos e fêmeas de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). Médias agrupadas com barras na mesma altura não diferem entre as populações e médias que apresentam asteriscos diferem entre sexo na mesma população pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ) não apresentou correlação canônica (parcial) significativa com a razão de resistência ( $RR_{CL_{50}}$ ), distância caminhada e proporção do tempo de permanência na área não tratada da arena para os inseticidas testados (Tabela 6).

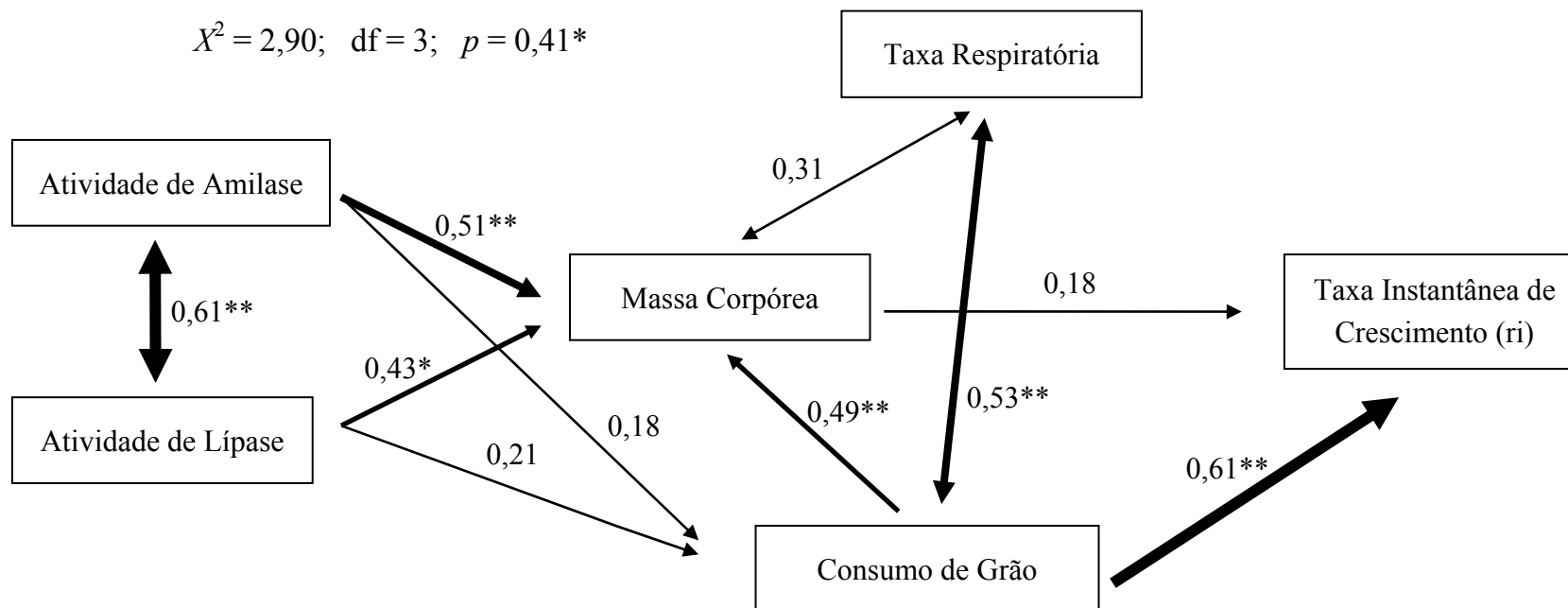
Os fatores potencialmente determinantes da taxa instantânea de crescimento foram subseqüentemente avaliados mediante análise de trilha. Assim, os efeitos direto, indireto e total de cada característica avaliada (taxa de consumo de grão, taxa respiratória, massa corpórea, atividade de amilase e atividade de lipase) na taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ) das populações de *S. zeamais* foram avaliados através do digrama de trilha como descrito no modelo da Figura 9. Na confecção do modelo não foi considerado o efeito de sexo devido ao baixo efeito encontrado desta variável nas características avaliadas. O modelo mostrou-se significativo pelo teste de Qui-quadrado a 5% de probabilidade ( $X^2 = 2,90$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,41$ ). As correlações e regressões e seus respectivos coeficientes e significância estão representados no diagrama de trilha (Figura 9).

O diagrama de trilha mostra correlação significativa e positiva entre a atividade de amilase e lipase das populações de caruncho do milho, no entanto as mesmas não apresentaram efeitos significativos no consumo de grão (Figura 9). Correlação positiva e significativa foi encontrada entre a taxa respiratória e o consumo de grão, no entanto a correlação entre taxa respiratória e massa corpórea não foi significativa (Figura 9). Consumo de grão, atividade de amilase e atividade de lipase tiveram efeito significativo sobre a massa corpórea dos insetos (Figura 9). Os efeitos positivos e significativos ( $R^2 = 0,43$ ;  $p = 0,004$ ) mostraram relação das variáveis consumo de grão, atividade de amilase e atividade de lipase na massa corpórea dos indivíduos (Tabela 7). A taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ) foi significativamente afetada pelo consumo de grão, mas não pela massa corpórea (Figura 9). Os efeitos diretos, indiretos e totais entre o  $r_i$  e as variáveis testadas não foram significativos ( $R^2 = 0,05$ ;  $p = 0,56$ ) (Tabela 7).

**Tabela 6.** Correlação canônica (parcial) entre taxa instantânea de crescimento e a razão de resistência; taxa instantânea de crescimento e distância caminhada (cm); e taxa instantânea de crescimento e proporção do tempo na área não tratada da arena de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae).

		Taxa Instantânea de crescimento (ri)	Correlação Canônica	r	F aproximado	gl (num/den)	p
		Correlação					
Razão de resistência (CL50)	Esfenvalerato	0,24	0,27	0,93	0,59	3; 23	0,62
	Fenitrotiona + Esfenvalerato	0,11					
	Permetrina	0,26					
Distância percorrida (cm)	Esfenvalerato	-0,17	0,30	0,90	0,81	3; 23	0,50
	Fenitrotiona + Esfenvalerato	-0,27					
	Permetrina	0,02					
Proporção do tempo na área não tratada	Esfenvalerato	0,13	0,31	0,90	0,82	3; 23	0,50
	Fenitrotiona + Esfenvalerato	-0,13					
	Permetrina	0,28					





**Figura 9.** Diagrama de trilha sobre a influência da massa corpórea (mg / inseto), taxa respiratória ( $\mu\text{ml}$  de  $\text{CO}_2$  / hora / inseto), taxa de consumo de grão (g) e atividade de amilase (U de lípase/dL/mg de proteína) e atividade de lipase (U de lípase/dL/mg de proteína) na taxa instantânea de crescimento (ri) de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) criados em grãos de milho isento de inseticidas. Setas unidirecionais indicam interação casual (regressão) enquanto setas bidirecionais indicam correlação entre as variáveis. Linhas contínuas representam correlações positivas e o nível de significância é representado por asteriscos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). A maior espessura da linha informa maior correlação entre as variáveis.

**Tabela 7.** Efeito direto (ED), indireto (EI) e total (ET) para o diagrama de trilha apresentado na Fig. 9 para o modelo de efeitos sobre a taxa instantânea de crescimento de 27 populações de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae).

Variável	Consumo de Grão (g)			Massa Corpórea (mg/inseto)			Taxa Instantânea de Crescimento (ri)		
	ED	EI	ET	ED	EI	ET	ED	EI	ET
Atividade de Amilase (U de amilase/dL/mg de proteína)	0,084	-	0,084	0,361	0,034	0,395	-	-0,002	-0,002
Atividade de Lípase (U de lípase/dL/mg de proteína)	0,154	-	0,154	0,123	0,062	0,185	-	0,077	0,077
Consumo de Grão (g)	-	-	-	0,404	-	0,404	0,675	-0,060	0,615
Massa Corpórea (mg/inseto)	-	-	-	-	-	-	-0,015	-	-0,015
$R^2$		0,03			0,43			0,05	
$P$		0,35			0,004**			0,56	

#### 4. DISCUSSÃO

Os bioensaios de mortalidade para os inseticidas esfenvalerato e permetrina mostram claramente uma redução da resistência a piretróides em populações brasileiras de caruncho do milho, considerando os levantamentos realizados por Guedes *et al.* (1995) e Ribeiro *et al.* (2003) com níveis de resistência superior a 1000 vezes. As populações que apresentaram os maiores níveis de resistência a esfenvalerato e permetrina foram Juiz de Fora e Jacarezinho respectivamente. Essas populações já foram alvos de intensos estudos envolvendo resistência a inseticidas e são mantidas em laboratório, na ausência de inseticidas, por um período superior a 15 anos (Ribeiro *et al.*, 2003, 2007; Fragoso *et al.*, 2005, 2007; Guedes *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007; Araujo *et al.*, 2008ab; Corrêa *et al.*, 2008; Guedes *et al.*, 2009ab), o que culminou na redução da resistência a piretróides nestas populações em relação aos níveis encontrados quando coletadas no campo.

Possivelmente os altos níveis encontrados de resistência a piretróides em populações brasileiras de *S. zeamais* no final da década de 80 são advindos da resistência cruzada com DDT (Guedes *et al.*, 1994, 1995; Fragoso *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003). A proibição da utilização deste composto em 1985 e substituição deste por novos inseticidas no mercado, somado ao uso de métodos alternativos eficientes de controle, promoveram uma menor pressão de seleção sob essas populações, atenuando o problema da resistência a piretróides em populações brasileiras de *S. zeamais*.

O inseticida esfenvalerato registrado recentemente para o tratamento de grãos armazenados no território brasileiro é recomendado apenas em mistura com fenitrotiona (AGROFIT, 2008). No entanto, o nível de resistência das populações de *S. zeamais* a esse inseticida é semelhante àquele encontrado para permetrina (recomendado no Brasil para grãos armazenados). Desta forma, resistência a esfenvalerato no país é provavelmente resultado de resistência cruzada a piretróides, o que tem sido reportado no Brasil em outros levantamentos (Guedes *et al.*, 1995; Fragoso *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003). Isto é reforçado em nosso estudo pela correlação positiva e significativa entre resistência a permetrina e esfenvalerato.

Estudos recentes realizados com populações de *S. zeamais* resistentes a piretróides e DDT confirmaram a suspeita de alteração do sítio de ação como principal mecanismo de resistência a estes compostos (R.A. Araújo, comunicação pessoal). Essa alteração é ocasionada por uma mutação estrutural nas proteínas dos canais de sódio localizados no sistema nervoso dos insetos e é denominada “knock-down resistance” (Kdr) (Feyereisen, 1995; ffrench-Constant, 1999; Soderlund & Knipple, 2003).

Os resultados para os bioensaios de resistência à mistura esfenvalerato + fenitrotriona sugerem a existência de resistência múltipla a piretróides e organofosforados e resistência cruzada a piretróides em populações brasileiras de caruncho do milho (Ribeiro *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2009). Entretanto, os baixos níveis de resistência encontrados à mistura estão diretamente relacionados com a recente utilização em conjunto destes compostos para o controle de insetos-praga de grãos armazenados, proporcionando maior eficiência de controle. O baixo valor de inclinação das curvas de mortalidade para os inseticidas testados reforça esta hipótese, pois evidencia ampla variabilidade de resposta das populações de *S. zeamais* às dosagens aplicadas dos inseticidas, o que possibilita uma alta capacidade de seleção para resistência à mistura.

Aumento da atividade de enzimas detoxificativas, mecanismo secundário de resistência para piretróides e organofosforados, possibilita a resistência cruzada para estes inseticidas em vários insetos-praga (Brattsten *et al.*, 1986). Huang & Han (2007) constataram que resistência cruzada em *Spodoptera litura* (Frabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) entre piretróides e inseticidas inibidores de acetilcolinesterase (organofosforados e carbamatos) é exclusivamente devido ao aumento da atividade de esterases e das monooxigenases dependentes de citocromo P450.

Grandes diferenças entre as populações de caruncho do milho são resultado do manejo destes insetos-praga e da natureza descontínua do processo de armazenamento de grãos. Unidades armazenadoras de grãos provavelmente acentuam os ciclos sazonais destas populações o que possibilita o estabelecimento rápido de novas populações a partir de um número reduzido de indivíduos (Tran & Credland, 1995).

Os padrões comportamentais de caminhada dos insetos em ambas as arenas utilizadas apresentam variação para sexo e principalmente para população. Também foi constatada repelência das fêmeas aos inseticidas esfenvalerato e permetrina em algumas populações de *S. zeamais* testadas. Os diferentes padrões de caminhada das populações e de sexo possivelmente esta relacionada com as diferenças existentes entre o metabolismo das populações levando a produção de diferentes intermediários capazes de influenciar no comportamento dos insetos (Guedes *et al.*, 2006; Guedes *et al.*, 2009a).

Essa variação interpopulacional deve ser causada por diferenças nos processos sensoriais dos insetos levando à evolução de resistência comportamental a inseticidas (Haynes, 1988; Hoy *et al.*, 1998; Desneux, 2007), se tais diferenças forem herdáveis. Resultados encontrados por Beckel *et al.* (2004) demonstraram que adultos de *Rhyzoperta dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) resistentes a deltametrina reduziram a velocidade sobre a superfície tratada com esse inseticida evitando ou diminuindo o contato.

Vários estudos sobre resistência comportamental culminaram com a hipótese teórica de Georghiou (1972) que relata correlação negativa entre resistência comportamental e resistência fisiológica a inseticidas (Kongmee *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Jallow & Hoy, 2005). Esta hipótese é sustentada devido ao fato de que a resistência comportamental leva à redução da exposição aos inseticidas e desta forma minimiza a pressão de seleção para os mecanismos fisiológicos de resistência (Gould, 1984; Jallow & Hoy, 2005).

Lockwood *et al.* (1984) ofereceram uma visão alternativa à hipótese de Georghiou (1972) e propuseram que existiria a possibilidade de uma coevolução entre resistência comportamental e fisiológica, sendo sua idéia alavancada por duas principais relações. Primeiramente, todo comportamento tem uma base fisiológica, sendo uma manifestação física das características fisiológicas do organismo, e também a ocorrência simultânea da resistência comportamental e fisiológica pode existir se um único mecanismo fisiológico ou comportamental não provê nível suficiente de resistência a um determinado inseticida.

Neste trabalho não foi observada correlação positiva ou negativa entre a resistência comportamental e fisiológica. Assim, podemos sugerir uma terceira

hipótese de independência entre a resistência fisiológica e comportamental (Chareonviriyaphao *et al.*, 1997), provavelmente resultado da baixa pressão de seleção a inseticidas nestas populações de caruncho do milho como demonstrado nos bioensaios de mortalidade. Guedes *et al.* (2009b) observou maior repelência por grãos tratados com deltametrina em populações resistentes de caruncho do milho em relação à população susceptível a este inseticida. A repelência aos grãos tratados está possivelmente relacionada com o uso abusivo de inseticidas em produtos armazenados nas décadas de 80 e início da década de 90, o que possivelmente contribuiu para a evolução conjunta da resistência comportamental e fisiológica nestas populações de *S. zeamais* (Lockwood *et al.*, 1984; Guedes *et al.*, 2009b).

O desempenho demográfico, avaliado através da taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ), não mostrou diferença significativa entre as populações testadas, indicando ausência de custo adaptativo associado à resistência a inseticidas nas populações estudadas de *S. zeamais*. Este resultado é condizente com a baixa razão de resistência das populações, o que não acarreta em efeitos negativos mensuráveis no desempenho reprodutivo dos indivíduos (Freitas *et al.*, 2009). As correlações não significativas da taxa instantânea de crescimento com as razões de resistência e com os padrões comportamentais avaliados acentuam a baixa influência dos níveis de resistência encontrados no desempenho demográfico das populações de caruncho do milho.

O diagrama de trilha demonstra alto efeito da atividade de amilase, da atividade de lipase e do consumo de grão sobre a massa corpórea dos insetos. O aumento da massa corpórea, diretamente relacionado como o incremento energético propiciado por enzimas digestivas (Araújo *et al.*, 2008a), tem sido identificado como uma característica de alta influência no  $r_i$  de populações de caruncho do milho (Fragoso *et al.*, 2005; Guedes *et al.*, 2006) e conseqüentemente, uma forte relação com a mitigação do custo adaptativo em populações resistentes a inseticidas (Fragoso *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005, 2007; Guedes *et al.*, 2006; Corrêa *et al.*, 2008). No presente trabalho esta relação entre a massa corporal e o  $r_i$  não foi detectada, provavelmente devido à baixa variação destas características nas populações estudadas e os níveis baixo a moderado de resistência a inseticidas, não incorrendo em custos adaptativos significativos.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As populações de *S. zeamais* avaliadas em sua maioria apresentaram baixos a moderados níveis de resistência a inseticidas piretróides e à mistura piretróide + organofosforado. No entanto, existem fortes indícios de resistência cruzada entre piretróides e resistência múltipla para piretróides e organofosforados em algumas populações. Variações na inclinação das curvas de mortalidade indicam grande variabilidade genética nas populações testadas e potencial de seleção adicional para resistência a inseticidas organofosforados e piretróides, mesmo em misturas.

O comportamento de caminhamento em arenas tratadas com resíduo seco de inseticidas é variável entre as populações e entre os sexos, confirmando a suspeitas de resistência comportamental em populações de caruncho do milho. No entanto, a resistência comportamental nas populações de caruncho do milho testadas não está associada à resistência fisiológica aos inseticidas.

A taxa instantânea de crescimento das populações foi semelhante, indicando ausência de custo adaptativo para resistência a piretróides nessas populações de caruncho do milho. A resistência fisiológica, nos níveis encontrados, não está influenciando no desempenho reprodutivo das populações.

## 6. Referências Bibliográficas

Adda, C.; Borgemeister, C.; Meikle, W.G.; Markhaam, R.H.; Poehling, H. M. Integrated pest management in post-harvest maize: a case study from the Republic of Togo (West Africa). *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 93, p. 305-321, 2002.

AGROFIT. Desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008. Apresenta informações sobre produtos fitossanitários usados na agricultura. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/agrofit>>. Acesso em: 20 jan. 2008.

Araújo, R.A.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, M.G.A.; Ferreira, G.H. Enhanced proteolytic and cellulolytic activity in insecticide-resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research*, v.44, p.354– 359, 2008 (a).

Araújo, R.A.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, M.G.A.; Ferreira, G.H. Enhanced activity of carbohydrate- and lipid-metabolizing enzymes in insecticide-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Bulletin of Entomological Research* v.98, p.417–424. 2008(b).

Beckel, H.; Lorini, I.; Lázari, S.M.N. Comportamento de adultos de diferentes raças de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) em superfície tratada com deltamethrin. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 48, p. 115-118, 2004.

Beeman, R.W.; Nanis, S.M. Malathion resistance alleles and their fitness in the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 79, 580-587, 1986.

Berticat, C.; Bonnet, J.; Duchon, S.; Agnew, P.; Weill, M.; Corbel, V. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC Evolutionary Biology*, v.8, p.1-9, 2008.



Berticat, C.; Boquien, G.; Raymond, M.; Chevillon, C. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical Research*, v. 72, p. 41-47, 2002.

Bourguet, D.; Guillemaud, T.; Chevillon, C.; Raymond, M. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution*, v.58, p.128–135, 2004.

Braga, G.C.; Guedes, R.N.C.; Silva, F.A.P.D.; Castro, L.H.D. Avaliação da eficiência de inseticidas, isolados e em misturas, no controle de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. *Revista Ceres*. v.38, p.522-528, 1991.

Brattsten, L.B.; Holyoke Jr., C.W.; Leeper, J.R.; Raffa, K.F. Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research. *Science*, v. 231, p. 1255-1260. 1986.

Brown, S.L.; Lee, R.D. Effect of planting date, variety and degree of ear maturation on the colonization of field corn by maize weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomological Science*. v. 37, p. 137-142, 2002.

Caraway, W.T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. *American Journal of Clinical Pathology*, v.32, p.97-99, 1959.

Champ, B.R.; Dyte, C.E. Global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests. Rome, FAO/UN, p. 356, 1976.

Chareonviriyaphap, T.; Roberts, D.R.; Andre, R.G.; Harlan, H.; Bangs, M.J. Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus* Wiedmann. *Journal of the American Mosquito Control Association*. v.13, p.171–183, 1997.

Collins, D.A.; Cook, D.A. Laboratory studies evaluating the efficacy of diatomaceous earths, on treated surfaces, against stored-product insect and mite pests. *Journal of Stored Products Research*, v.42, p.51–60, 2006.

Corrêa, A.S.; Santos, C.T.; Oliveira, E.E.; Tolledo, J.S.; Cordeiro, E.M.G.; Guedes, R.N.C. Custo Adaptativo da Resistência através da competição entre populações susceptíveis de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) e resistentes a Piretróides. *Revista Brasileira de Armazenamento*, v.33, p.19-28, 2008.

Coustau, C.; Chevillon, C.; ffrench-Constant, R. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends Ecology Evolution*.v.15, p.378-383, 2000.

Danho, M.; Haubruge, E. Comportement de ponte et stratégie reproductive de *Sitophilus zeamais* [Coleoptera : Curculionidae ]. *Phytoprotection*, v.84, p.59-67, 2003.

Danho, M.; Gaspar, C.; Haubruge, E. The impact of grain quality on the biology of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): oviposition, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. *Journal of Stored Products Research*, v. 38, p. 259-266, 2002.

de Oliveira, C.R.F.; Faroni, L.R.A.; Guedes, R.N.C.; Gonçalves, J.R.; Garcia, F.M. Biologia de *Acarophenax lacunatus* (Cross & Krantz) (Prostigmata: Acarophenacidae) sobre *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Cucujidae). *Neotropical Entomology*, v.36, p.459-464, 2007.

Desneux, N.; Decourtye, A.; Delpuech, J.M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* v. 52, p.81–206.2007.

Eaton, D.L.; Klaasen, C.D. Principles of toxicology, p. 6-20. In C.D. Klaasen & J.B. Watkins III (eds.), *Casarett & Doull's essentials of toxicology*. New York, McGraw-Hill, 533p. 2003.

Faroni, L.R.D'A.; Guedes, R.N.C.; Matioli, A.L. Effect of temperature on development and population growth of *Acarophenax lacunatus* (Cross & Krantz) (Prostigmata: Acarophenacidae) on *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). *Biocontrol Sci. Technol.* v. 11, p. 7-14, 2001.

Finney, D.J. Probit analysis. 3<sup>rd</sup> Edition. Cambridge University Press, UK. 333p, 1971.

Feyereisen, R. Molecular biology of insecticide resistance. Toxicology letters, v. 82, n. 83, p. 83-90. 1995.

ffrench-Constant, R.H. Target site mediated insecticide resistance: what questions remain? Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 29, p.397–403, 1999.

ffrench-Constant, R.H. The molecular and population genetics of cyclodiene resistance. Insect Biochemical Molecular Biology, v. 4, p. 275-288, 1994.

Fragoso, D.B.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, M.G.A. Partial characterization of glutathione S-transferases in pyrethroid-resistance and –susceptible populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. Journal of Stored Products Research, v. 43, p. 167-170, 2007.

Fragoso, D.B.; Guedes, R.N.C.; Peternelli, L.A. Developmental rates and population growth of insecticide-resistant and susceptible populations of *Sitophilus zeamais*. Journal of Stored Products Research, v. 41, p. 271-281, 2005.

Fragoso, D.B.; Guedes, R.N.C.; Rezende, S.T. Glutathione S-transferase detoxification as a potential pyrethroid resistance mechanism in the weevil, *Sitophilus zeamais*. Entomologia Experimentalis et Applicata, v. 109, p. 21-29, 2003.

Freitas, C.J.P.; Pereira, E.J.G.; Cordeiro, E.M.G.; Della Lucia, T.M.C.; Tótola, M.R.; Guedes, R.N.C. Organophosphate resistance in the maize weevil *Sitophilus zeamais*: magnitude, costs and behavior. Crop Protection, v.28 p.168-173, 2009.

Georghiou, G.P. The evolution of resistance to pesticides. Annual Review of Ecology and Systematics v. 3, p.133-168. 1972

Gould, F. Role of behavior in the evolution of insect adaptation to insecticides and resistant host plants. Bulletin of the Entomological Society of America v.30, p.34-41. 1984.

Gudrups, I.; Floyd, S.; Klinge, J.G.; Bosque-Perez, A. N.; Orchard, J.E. A comparison of two methods of assessment of maize varietal resistance to the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, and the influence of kernel hardness and size on susceptibility. *Journal of Stored Products Research*, v.37, p.287-302, 2001.

Guedes, N.M.P.; Guedes, R.N.C.; Ferreira, G.H.; Silva, L.B. Flight take-off and walking behavior of insecticide-susceptible and -resistant strains of *Sitophilus zeamais* exposed to deltamethrin. *Agricultural and Forest Entomology*, 2009(a) (aceito).

Guedes, N.M.P.; Guedes, R.N.C.; Silva, L. B.; Cordeiro, E.M.G. Deltamethrin-induced feeding plasticity in pyrethroid susceptible and -resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Applied Entomology*, 2009(b) (no prelo).

Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Guedes, N.M.P.; Ribeiro, B.M.; Serrão, J.E. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology*, v. 31, p. 30-38, 2006.

Guedes, R.N.C.; Lima, J.O.G.; Cruz, C.D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, v. 31, p. 145-150, 1995.

Guedes, R.N.C.; Lima, J.O.G.; Cruz, C.D. Inheritance of deltamethrin resistance in a Brazilian strain of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Mots) (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Pest Management*, v. 40, p. 103-106, 1994.

Guedes, R.N.C. Manejo integrado para a proteção de grãos armazenados contra insetos. *Revista Brasileira de Armazenamento*, v. 15, p. 39-48, 1991.

Guedes, R.N.C. Resistência a inseticidas: desafio para o controle de pragas de grãos armazenados. *Seiva*, v. 50, p. 24-29, 1990.

Hagstrum, D. W.; Flinn, P.W. (Eds.) *Integrated management of insects in stored products*. New York: Marcel Dekker, p. 71-134, 1996.

- Haubruge, E.; Arnaud, L. Fitness consequences of malathion-specific resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae), and selection for resistance in the absence of insecticide. *Journal of Economic Entomology*, v. 94, p. 552-557, 2001.
- Haynes, K.F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annual Review of Entomology*, v. 33, p. 149-168, 1988.
- Hoy, C.W.; Head, G.P.; Hall, F.R. Spatial heterogeneity and insect adaptation to toxins. *Annual Review of Entomology*, v. 43, p. 571-594, 1998.
- Huang, S.; Han, Z. Mechanisms for multiple resistances in field populations of common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 87, p.14–22, 2007.
- Jallow, M. F. A.; Hoy, C. W. Phenotypic Variation in Adult Behavioral Response and Offspring Fitness in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in Response to Permethrin. *Journal of Economic Entomology*. v. 98. p. 2195-2202. 2005.
- Kence, M.; Kdeidi, T. Effect of malathion on larval competition in house fly (Diptera: Muscidae) populations. *Journal of Economic Entomology* v.90, p.59-65, 1997.
- Kongmee, M.; Prabaripai, A.; Akratanakul, P.; Bangs, M.J.; Chareonviriyaphap, T.; Behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposed to deltamethrin and possible implications for disease control. *Journal of Medical Entomology* v.41, p.1055-1063. 2004.
- Lockwood, J.A.; Sparks, T.C.; Story, R.N. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. *Bulletin of the Entomological Society of America* v.30, p.41-51. 1984.
- Lorini, I. Decrição, biologia e danos das principais pragas de grãos armazenados. In: Lorini, L. H. Miike & U. M. scussel (Eds) *Armazenagem de grãos*. Biofereziz, Campinas, p. 381-398. 983p. 2002.

Lorini, I.; Galley, D.J. Relative effectiveness of topical, filter paper and grain applications of deltamethrin, and associated behavior of *Rhyzopertha dominica* (F.) strains. *Journal of Stored Products Research*, v. 34, p. 377-383, 1998.

Marais, E.; Chown, S.L. Repeatability of standard metabolic rate and gas exchange characteristics in a highly variable cockroach, *Perisphaeria* sp. *Journal Experimentalis Biology*. v.206, p.4565-4574, 2003.

McKenzie, J.A. The biochemical and molecular bases of resistance: applications to ecological and evolutionary questions. In: McKenzie, J.A (ed). *Ecological and Evolutionary Aspects of Insecticide Resistance*. Academic, Austin, p. 123-147, 1996.

McKenzie, J.A.; Batterham, P. The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for an insecticide resistance. *Trends in Ecology Evolution*, v. 9, p. 166-169, 1994.

Mitchell, R.J. Path analysis: pollination. in Scheiner, S.M. & Gurevitch, J. (Eds) *Design and analysis of ecological experiments*. New York, Chapman & Hall. p. 211–231, 1993.

Mullin, C. A.; Scott, J. B. Biomolecular basis for insecticide resistance: classification and comparisons. In: Mullin, C. A., Scott, J. G. (eds.). *Molecular mechanism of insecticide resistance- diversity among insects*. Washington: ACS, p. 1-15, 1992.

Oliveira, E.E.; Guedes, R.N.C.; Tótola, M.R.; de Marco P. Competition between insecticide-susceptible and resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Chemosphere*, v.69, p.17-24, 2007.

Oliveira, E.E.; Guedes, R.N.C.; Corrêa, A.S.; Damasceno, B.L.; Santos, C.T. Resistência vs suscetibilidade a piretróides em *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): há vencedor? *Neotropical Entomology*, v. 34, p. 981-990, 2005.

Raymond, B.; Sayyed, A.H.; Wright, D.J. Genes and environment interact to determine the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the Royal Society*, v.272, p.1519-1524, 2005.

Raymond, M.; Berticat, C.; Weill, M.; Pasteur, N.; Chevillon, C. Insecticide resistance in mosquitoes *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genética*, v. 112-113, p. 287-296, 2001.

Rees, D.P. Coleoptera. In Subramanyam, B.H. & D. W. Hagstrum. Integrated mangement of insects in stored products. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 1-39

Ribeiro, B.; Guedes, R.N.C.; Corrêa, A.S.; Santos, C.T. Fluctuating asymmetry in insecticide-resistant and insecticide-susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Archives of Environmental Contamination Toxicology*. v.53, p.77-83, 2007.

Ribeiro, B.M.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Santos, J.P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, v.39, p. 21-31, 2003.

Robertson, J.L.; Preisler, H.K. Pesticide bioassays with arthropods. Boca Raton, CRC, 127p. 1992.

Santos, J.P.; Cajueiro, I. V. M.; Fontes, R. A.. Controle de pragas no milho armazenado em paióis. In: EMBRAPA, Relatório técnico anual do Centro Nacional de pesquisa de Milho e Sorgo 1980/1984. Sete Lagoas: CNPMS/EMBRAPA, p.66-67. 1986.

Santos, J.P.; Montovani, E.C. Avaliação de perdas quantitativas no milho armazenado a nível de fazenda. Sete Lagoas : CNPMS/EMBRAPA, 24p. 1997.

SAS Institute. SAS/STAT User's Guide. SAS, Cary, NC, USA, 2000.

Scott, J.G. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* v.29, p.757-77, 1999.

Soderlund, D.M.; Knipple, D.C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* v.33, p.563–577, 2003.

- Sonderlund, D.M.; Bloomquist, J.R. Molecular mechanism of insecticide resistance. In: Roush, T.T., Tabashnik, B.E. (eds). Pesticide resistance in arthropods, New York, Chapman e Hall, p. 58-96, 1990.
- Sousa, A.H.; Faroni, L.R.D'A.; Guedes, R.N.C.; Totola, M.R.; Urruchi, W.I. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect pests of stored products. *Journal of Stored Products Research*, v.44, p.379– 385, 2008.
- Stark, J.D.; Banks, J.E.. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annual Review Entomology*, v.48, p.505–519, 2003.
- Subramanyan, B.H.; Hagstrum, D.W. Resistance measurement and management. In: Subramanyan, B.H.; Hagstrum, D.W. (eds). *Integrated Management of Insects in Stored Products*. New York: Marcel Dekker, p. 331-397, 1996.
- Tran, B.N.D.; Credland, P.F. Consequences of inbreeding for the cowpea seed beetle, *Callosobruchus chinensis* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, v.56, 483-503, 1995.
- Taylor, M.; Feyereisen, R. Molecular biology and evolution of resistance of toxicants. *Molecular Biology Evolution*. v.13, p.719-34, 1996.
- Tolpo, N.C.; Morrison, E.O. Sex determination by snout characteristics of *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *The Texas Journal Science*, v.7, p. 122-124, 1965.
- Velten, G.; Rott, A.S.; Petit, B.J.C.; Cardona, C.; Dorn, S. Improved bruchid management through favorable host plant traits and natural enemies. *Biological Control*, v.47, p.133–140, 2008.
- Warburg, O.; Christian, W. Isohierung und kristallisation des garungsferments enolase. *Biochemische Zeitschrift*, v.310, p.384-421, 1941.
- Wang, C.; Scharf, M.E.; Bennett, G.W. Behavioral and physiological resistance of the German cockroach to gel baits (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology* v.97, p.2067-2072, 2004.



White, N.D.G.; Leesch, J.G. Chemical control. In: Subramayam BH, Hagstrum DW, eds. Integrated Management of Insects in Stored Products. New York: Marcel Dekker. p.287-330, 1996.

Wondji, C.S.; De Silva, W.A.P.P.; Hemingway, J.; Ranson, H.; Karunaratne, P.S.H.P. Characterization of knockdown resistance in DDT- and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* populations from Sri Lanka. Tropical Medicine and International Health, v.13, p.548–555, 2008.