

BERGHEM MORAIS RIBEIRO

**Resistência de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) a
Inseticidas: Detecção e Mecanismos**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001**

BERGHEM MORAIS RIBEIRO

**Resistência de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) a
Inseticidas: Detecção e Mecanismos**

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

Dr. Jamilton Pereira dos Santos
(Conselheiro)

Prof^a Lêda Rita D'Antonino Faroni
(Conselheira)

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

Prof^a Terezinha M. C. Della Lucia

Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes
(Orientador)

ÍNDICE

	Páginas
RESUMO	iii
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1 Populações de <i>S. zeamais</i>	9
2.2 Inseticidas, sinergistas e solventes	9
2.3 Bioensaios	12
2.4 Análise estatística.....	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4. CONCLUSÕES	32
5. BIBLIOGRAFIA.....	34

RESUMO

RIBEIRO, Berghem Moraes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. **Resistência de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) a Inseticidas: Detecção e Mecanismos.** Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Conselheiros: Jamilton Pereira dos Santos e Lêda Rita D'Antonino Faroni.

Este estudo foi conduzido com o objetivo de detectar a resistência a seis inseticidas e os prováveis mecanismos bioquímicos de resistência em populações de *Sitophilus zeamais*, oriundas de seis estados brasileiros. Os bioensaios foram feitos em frascos de 20 ml que foram impregnados por toda a sua área interna, com inseticida ou sinergista. Os bioensaios de detecção de resistência foram feitos utilizando as concentrações letais para 95% dos indivíduos, CL_{95} , para a população padrão de susceptibilidade de cada inseticida, obtidas através de análise de próbite. Os resultados destes testes mostraram seis populações resistentes. A população de Cristalina-GO apresentou resistência apenas a cipermetrina, o mesmo acontecendo com a população de Nova Andradina-MS. Já a população de Jacarezinho-PR se mostrou resistente a todos os inseticidas piretróides testados: deltametrina, cipermetrina e permetrina. A população de Penápolis/Barbosa-SP apresentou

resistência à cipermetrina, ao clorpirifós metílico e ao pirimifós metílico. Na população de Fátima do Sul-MS foi detectada resistência apenas para clorpirifós metílico. A população de São José do Rio Preto-SP se mostrou resistente a cipermetrina e pirimifós metílico. Para os bioensaios com os sinergistas trifenil fosfato (TPP), butóxido de piperonila (PBO) e dietil maleato (DEM), foram aplicadas nas populações resistentes as CL_{95} para a população padrão de susceptibilidade dos inseticidas combinados com os sinergistas. Os resultados destes bioensaios mostraram que os compostos TPP e DEM bloquearam a resistência a cipermetrina nas populações de Cristalina-GO, Nova Andradina-MS, Penápolis/Barbosa-MS e São José do Rio Preto-SP. Estes compostos e o PBO também ocasionaram a perda da resistência a clorpirifós metílico nas populações de Fátima do Sul-MS e Penápolis/Barbosa-SP. Os resultados dos bioensaios com PBO também mostraram que este composto provocou um aumento na resistência a cipermetrina nas populações de Cristalina-GO e Nova Andradina-MS; o mesmo efeito foi constatado para o inseticida pirimifós metílico nas populações de Penápolis/Barbosa e São José do Rio Preto. Este estudo mostrou evidências de que os mecanismos bioquímicos de resistência baseados nas glutathione-S-transferase, inibidas pelo DEM, e esterases, inibidas pelo TPP, atuaram de forma mais frequente do que as monooxigenases dependentes do citocromo P-450, cuja ação é suprimida pelo PBO. Além do envolvimento destas enzimas na resistência de *S. zeamais* a inseticidas, é provável a ocorrência de insensibilidade ao sítio de ação na resistência da população de Jacarezinho-PR a piretróides.

ABSTRACT

RIBEIRO, Berghem Moraes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March of 2001. **Resistance of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) to Insecticides: Detection and Mechanisms.** Adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes. Committee members: Jamilton Pereira dos Santos and Lêda Rita D'Antonino Faroni.

This study was carried out with the objective of detecting the resistance to six insecticides and the possible biochemical mechanisms of resistance in populations of *Sitophilus zeamais*, from six Brazilian states. The bioassay was carried out in 20 mL vials which were impregnated with insecticide or synergist on their inner walls. The bioassay of resistance detection was carried out using the LC₉₅ for the susceptible standard population and each insecticide. The results of these tests showed six resistant populations. The Cristalina-GO population just showed resistance to the cypermethrin, like the population from Nova Andradina-MS. The Jacarezinho population showed resistance to all of the tested pyrethroids: deltamethrin, cypermethrin and permethrin. The population from Penápolis/Barbosa-SP showed resistance to cypermethrin, chlorpyrifos methyl and pirimiphos methyl. For the population of Fátima do Sul-MS, only resistance to chlorpyrifos methyl was detected. The São José do Rio

Preto-SP population showed resistance to cypermethrin and pirimiphos methyl. Bioassays with the synergists triphenyl phosphate (TPP), piperonyl butoxide (PBO) and diethyl maleate (DEM) were carried out using the LC_{95} of the standard susceptible population for the insecticides combined with the synergists. The results of these bioassays showed that TPP and DEM are able to suppress cypermethrin resistance in the population of Cristalina-GO, Nova Andradina-MS, Penápolis/Barbosa-MS and São José do Rio Preto-SP. All three synergists provided suppression of the resistance to chlorpyrifos methyl resistance in the population of Fátima do Sul-MS and Penápolis/Barbosa-SP. The results of the bioassays with PBO also showed that this synergist antagonizes the insecticide action increasing its resistance to cypermethrin in the populations of Cristalina-GO and Nova Andradina-MS. The same effect was observed for the insecticide pirimiphos methyl in the population from Penápolis/Barbosa-SP and São José do Rio Preto-SP. This study provided preliminary evidence of a major involvement of biochemical mechanisms of resistance based on enhanced detoxification activity of the glutathione-S-transferases enzyme group inhibited by DEM, and of the esterases, enzyme group inhibited by TPP, with a minor involvement of the cytochrome P-450 dependent monooxygenases, whose action is suppressed by PBO. Besides the likely involvement of these enzymes in *S. zeamais* resistance, there also seems to occur site of action insensitivity leading to pyrethroid resistance in the population from Jacarezinho-PR.

1. INTRODUÇÃO

O gorgulho *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 é uma das pragas mais importantes no cenário dos grãos armazenados em regiões tropicais. Tem o “status” de principal praga do milho no Brasil (Guedes, 1991). É considerado praga primária por atacar o grão intacto e sua ação é mais intensa em grãos de milho, afetando também sorgo, trigo, arroz e alguns produtos alimentícios industrializados secos como macarrão (Rees, 1996). É um coleóptero da família Curculionidae, pertencente ao gênero *Sitophilus* o qual abriga uma outra espécie bastante semelhante morfológicamente, *Sitophilus oryzae*. Essa semelhança foi responsável, até o início da década de 60, por inúmeros equívocos na identificação dessas espécies (Cajueiro, 1988) até que Kurschel (1961) descobriu características na genitália desses gorgulhos, mais especificamente na morfologia do aedeagus, que possibilitaram a discriminação e identificação segura das espécies em discussão. *S. zeamais* apresenta um ciclo de vida de 34 dias, em média. Tem aproximadamente 5mm de comprimento quando adulto. Apresenta quatro manchas de cor marrom no

élitro e toda a face dorsal e ventral do inseto possui pontuações (Rosseto, 1969). A fêmea, durante sua fase reprodutiva, oviposita em torno de 150 ovos. Com suas mandíbulas, ela abre um orifício no grão e deposita um ovo por orifício (Cotton *et al.*, 1982; Evans, 1981). Logo em seguida, fecha a abertura com uma substância produzida pelo órgão ovipositor. Geralmente ocorre canibalismo entre as larvas (Dobie, *et al.*, 1984 ; Evans, 1981). As formas jovens se desenvolvem no interior do grão utilizando-o como alimento e abrigo (Evans, 1981) e esse processo, aliado à ação dos indivíduos adultos que também se alimentam do grão, leva a perdas que podem alcançar 15% do total do peso do grão estocado (Santos *et al.*,1986). A longevidade de *S. zeamais* é, em média, de cinco meses e o número médio de gerações por ano é de sete (Teetes *et al.*, 1983). O ataque dessa praga é notadamente mais acentuado em regiões onde a temperatura é mais elevada, condição que otimiza o seu desenvolvimento. No entanto, sua ocorrência é observada em quase todo o mundo e em alguns locais de clima frio esse gorgulho não é considerado praga de grande importância devido o seu desenvolvimento não ser adequado em baixas temperaturas. As condições ambientais ótimas de desenvolvimento desse inseto são: 70% de umidade relativa do ar e 28° C de temperatura (Rees, 1996).

A forma mais eficiente de combater o gorgulho do milho e outras pragas de grãos armazenados é através de controle químico, pela rapidez de ação, baixo custo e fácil aplicação (Guedes *et al.*, 1995). Dentro dessa filosofia, essa forma de controle foi intensamente utilizada e, muitas vezes, sem o devido cuidado. Esse uso indiscriminado parece ter favorecido o aparecimento de casos de falhas no controle dessa praga causadas pelo surgimento de

populações resistentes aos produtos químicos utilizados contra elas (Guedes, 1999).

Desde a constatação do problema da resistência a inseticidas no início do século 20, o número de espécies de insetos e ácaros resistentes a estes compostos vem crescendo de forma acentuada (Guedes, 1990), o que vem ocasionando dificuldades de manejo do fenômeno da resistência.

O conceito de resistência, segundo a Organização Mundial de Saúde, é a capacidade de uma população de sobrepujar o efeito de doses de substâncias tóxicas que seriam letais para a maioria dos indivíduos de uma população normal da mesma espécie. Dentro desse conceito se enquadram centenas de espécies de artrópodes em diversos países (Tabashnik, 1990).

A resistência a inseticidas se traduz em mecanismos de resistência que são o resultado de alterações no genoma do indivíduo capacitando-o a sobreviver em uma situação desfavorável. Isso é confirmado pelo trabalho de Liu *et al.* (2000), que identificaram mutações em um gene que codifica as proteínas formadoras dos canais de sódio em baratas, conferindo resistência a inseticidas piretróides.

Os principais mecanismos de resistência, de acordo com a divisão proposta por Brattsten *et al.*, (1986), são agrupados em comportamentais, fisiológicos e bioquímicos. O primeiro grupo de mecanismos, comportamentais, se resume em alterações nos órgãos sensoriais e na capacidade de aprendizado do indivíduo que tem como consequência uma maior habilidade em evitar os efeitos letais de uma substância tóxica (Lockwood, 1984; Brattsten *et al.*, 1986). O segundo grupo de mecanismos, os fisiológicos, abrangem, basicamente, as seguintes possibilidades: a) aumento na excreção dos compostos tóxicos do organismo, b) o aumento da dificuldade de penetração do inseticida no

organismo que é dependente da estrutura do integumento, fase de desenvolvimento do inseto e de características químicas da molécula inseticida (Brattsten *et al.*, 1986; Oppenoorth & Welling, 1976) e c) o isolamento das moléculas inseticidas em estruturas inertes no interior do corpo do inseto (Brattsten *et al.* 1986). A presença desse tipo de estratégia foi detectada em trabalhos com linhagens de *Sitophilus granarius*, onde esse gorgulho excretava o inseticida lindane, inalterado (Le Patourel & Salama, 1986). Outro exemplo seria o de estudos a respeito de excreção ativa de fosfina em populações de *Rhyzopertha dominica* (Price, 1984, 1986).

O terceiro e mais importante grupo de mecanismos de resistência é o bioquímico, que ocorre através de dois processos. O primeiro que se baseia no aumento da destoxificação metabólica por meio da ação de grupos enzimáticos. Segundo Sawicki (1979), esse é o mecanismo mais comum de resistência. Esses grupos enzimáticos têm a função de aumentar a polaridade da molécula inseticida, o que acarreta uma maior excreção dessa pelo organismo. Os principais grupos enzimáticos destoxificadores são as esterases, as glutathione-S-transferases e o complexo das oxidases microssomais (Scott, 1999). Em estudos de resistência são utilizados compostos que neutralizam a ação desses grupos enzimáticos, aumentando o efeito do inseticida. Tais compostos recebem o nome de sinergistas. Estes inativam um determinado grupo enzimático ligando-se a sua estrutura e desta forma impedem que estas enzimas atuem na sua função destoxificadora. Este fato pode dar indícios de qual mecanismo de resistência está atuando no inseto. Como exemplo destas substâncias podemos citar o butóxido de piperonila (PPB), o trifenil fosfato (TPP) e o dietil maleato (DEM). As monoxigenases são bloqueadas pelo sinergista butóxido de piperonila, já as

esterases têm sua ação anulada pelo composto trifenil fosfato. O sinergista dietil maleato age bloqueando as glutathionas-S-transferases (Scott, 1990).

O outro processo que compõe o grupo de mecanismos bioquímicos de resistência é a alteração no sítio de ação da molécula inseticida. Um exemplo deste são alterações na enzima acetilcolinesterase (AChE). Estas alterações podem ser responsáveis pela redução de sensibilidade da AChE às substâncias inibidoras da sua ação, conferindo resistência aos inseticidas organofosforados e carbamatos (Guedes *et al.*, 1995). Mutero *et al.* (1994) mostraram os efeitos combinados de mutações no gene responsável pela codificação da AChE acarretando o desenvolvimento de resistência a inseticidas organofosforados em *Drosophila melanogaster*, o mesmo acontecendo em *Aedes aegypti* (Vaughan *et al.*, 1997). No caso do afídio *Nasonovia ribisnigri*, ocorreu resistência a inseticidas do grupo dos carbamatos pela modificação no sítio da AChE (Rufingier, 1999).

Um outro padrão de alteração no sítio de ação acontece nos canais de sódio voltagem-dependentes na membrana do neurônio. Essa alteração recebe o nome de “knock-down resistance” (kdr), que confere resistência aos inseticidas piretróides e aos organoclorados do grupo do DDT (Liu *et al.*, 2000). Vais *et al.* (2000) mostraram que a alteração em um aminoácido na cadeia protéica do canal de sódio em mosca doméstica ocasiona o aparecimento da resistência do tipo kdr a piretróides. Williamson *et al.* (1996) mostraram a existência de um mecanismo conhecido como super kdr, que confere altos níveis de resistência a inseticidas piretróides, associados a mutações específicas nos canais de sódio, em mosca branca. Uma outra modificação promove a insensibilidade de receptores GABA nos canais de cloro, também no neurônio, a organoclorados do grupo dos ciclodienos. Esse mecanismo é

conhecido como kdl (French-Constant, 1999). Ainda existem as alterações nos receptores do hormônio juvenil e nos receptores das proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis*, ambos usados como inseticidas alternativos (Mullin & Scott, 1992).

Existem dois fenômenos dentro do tópico resistência que merecem ser comentados, que são a resistência cruzada e a resistência múltipla. A resistência cruzada ocorre quando o organismo apresenta um único mecanismo de resistência que anula a ação de dois ou mais inseticidas (Campanola, 1990). Um exemplo desse tipo de resistência foi documentado por Gammon (1980) e Riskallah *et al.*, (1983) onde se constatou a resistência cruzada para piretróides e DDT em *Spodoptera littoralis*. No caso da resistência múltipla o que ocorre é a presença de vários mecanismos de resistência no organismo, tornando-o resistente a vários grupos inseticidas (Campanola, 1990). Esses conceitos são de grande importância na determinação de possíveis mecanismos de resistência e na escolha de inseticidas adequados para o controle de populações resistentes (Guedes *et al.*, 1995).

A rápida evolução no quadro de resistência de artrópodes ao controle químico é, basicamente, fruto da grande frequência de uso e dos constantes aumentos nas doses aplicadas dos produtos inseticidas (Campanola, 1990). Uma alternativa para minimizar e talvez reverter essa situação, seria a aplicação adequada de inseticidas químicos aliados a formas alternativas de controle de pragas dentro de táticas de manejo integrado. Estas ações podem levar a uma redução na pressão de seleção para a resistência (Guedes *et al.*, 1996). Inseticidas menos persistentes, diminuição na frequência de aplicação de inseticidas, aumento da imigração de insetos susceptíveis e refúgio disponível são exemplos de medidas aplicáveis para aumentar o número de

indivíduos susceptíveis na população resistente (Subramanyam & Hagstrum, 1995).

A ocorrência de resistência a inseticidas em pragas de grãos armazenados tem sido reportada em vários países do mundo como Estados Unidos, Canadá, Brasil, Índia, Ruanda, Austrália, Indonésia e Filipinas (Subramanyam & Hagstrum, 1996). Subramanyam & Hagstrum (1996) apresentam uma coletânea de trabalhos científicos sobre resistência em insetos de grãos armazenados ocorridas no Brasil. Eles citam trabalhos com *S. oryzae* resistente a lindane e malatim; *Tribolium castaneum* e *Rhyzopertha dominica* resistentes a organofosforados, e *Cryptolestes* spp. apresentando resistência a fosfina.

Existem trabalhos mais recentes na literatura sobre resistência em insetos de grãos armazenados como o de Guedes & Zhu (1998) que caracterizaram a resistência de populações mexicanas de *Rhyzopertha dominica* a malation. Guedes *et al.*, (1997a, 1998) também detectaram resistência a organofosforados em populações brasileiras e americanas de *Rhyzopertha dominica* e determinaram a variabilidade genética entre essas populações por meio de ensaios com aloenzimas. Lorini e Galley (1999) apresentaram resultados que indicam resistência a deltametrina em populações brasileiras de *Rhyzopertha dominica*.

Existem poucos trabalhos científicos contemplando resistência a inseticidas em populações de *S. zeamais*. Mendonza (1999), avaliando a resistência a inseticidas fosforados, clorados e piretróides em populações mexicanas de *S. zeamais*, concluiu que estas populações apresentam variados níveis de resistência a estes produtos. Takematsu (1983) estudou a susceptibilidade de populações de *S. zeamais* a vários inseticidas e constatou

a possibilidade do surgimento de falhas no seu controle. Santos (1988) verificou falhas no controle dessa praga utilizando deltametrina. Guedes *et al.* (1994, 1995) detectaram a existência de resistência a DDT e a piretróides e a herança desse fenômeno em populações de *S.zeamais*. Diante da constatação da existência de casos do fenômeno da resistência em *S.zeamais* e também da diminuta quantidade de trabalhos científicos que contemplam de maneira mais profunda o problema da resistência nesse organismo, este estudo teve como objetivos o levantamento de populações de *S.zeamais* resistentes a inseticidas organofosforados e piretróides e a determinação preliminar dos prováveis mecanismos de resistência envolvidos. Desta forma, esse trabalho pode contribuir para um melhor entendimento do fenômeno da resistência, gerando conhecimentos que servirão de base para a elaboração de estratégias de controle dessa praga, para reduzir os grandes prejuízos causados por ela.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Populações de *S. zeamais*

Foram utilizadas, nessa investigação, 11 populações distintas de *S. zeamais*: uma, proveniente do Centro Nacional de Pesquisa do Milho e Sorgo (CNPMS) em Sete Lagoas-MG, onde era mantida em laboratório sem exposição a inseticidas, foi usada como padrão de susceptibilidade para esse estudo. A população oriunda de Jacarezinho-PR, foi escolhida como padrão de resistência aos inseticidas piretróides baseado nos trabalhos de Guedes *et al.*, (1994, 1995). As demais foram coletadas em municípios dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul e Goiás (Quadro 1 e Figura 1). Estas populações foram estabelecidas a partir de pelo menos 500 indivíduos, mantidas em laboratório, sob condições constantes de temperatura (25 ± 1 °C) e umidade relativa do ar (70 ± 5 %), usando-se como substrato alimentar grãos de milho expurgados previamente e mantidos, sob baixa temperatura (-20°C) para evitar reinfestação.

2.2 Inseticidas, sinergistas e solventes

Os inseticidas, em grau técnico, utilizados para os bioensaios são pertencentes a dois grupos: os fosforados, onde foram utilizados os produtos inseticidas clorpirifós metílico (96%), malatim (98%) e pirimifós metílico (98%)

Quadro 1 - Populações de *Sitophilus zeamais*.

Município	Código	Local de coleta	Data de recebimento	Estado
Sete Lagoas	Sl*	Laboratório	Fevereiro/1999	MG
Uberlândia	Ub	Silo	Abril/1999	MG
Bragança paulista	Bp	PaioI	Fevereiro/1999	SP
São José do Rio Preto	Sj	Silo	Fevereiro/1999	SP
Penápolis/Barbosa	Pb	Silo	Fevereiro/1999	SP
Ivinhema	Iv	Silo	Fevereiro/1999	MS
Nova Andradina	Na	PaioI	Fevereiro/1999	MS
Fátima do Sul	Fs	Silo	Fevereiro/1999	MS
Jacarezinho	Jc**	Laboratório	Março/1999	PR
Cristalina	Cr	PaioI	Março/1999	GO
Campos dos Goitacazes	Cg	Armazém	Abril/1999	RJ

*População padrão de susceptibilidade mantida em laboratório desde 1985,

**População padrão de resistência a piretróides mantida em laboratório desde 1987.

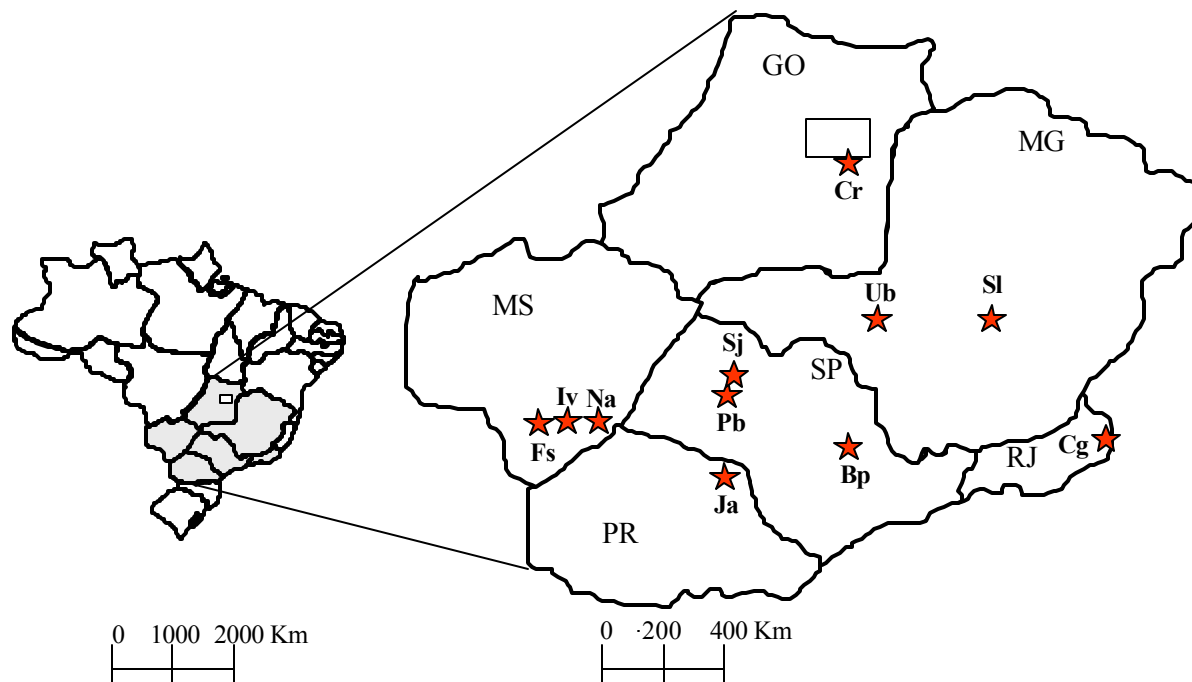


Figura 1: Esquema mostrando regiões onde foram coletadas as populações de *Sitophilus zeamais*. As siglas representam os estados e municípios listados no Quadro 1.

e dos piretróides, utilizados nos bioensaios, os inseticidas cipermetrina (92,4%), deltametrina (99%) e permetrina (96%). Os sinergistas utilizados, também em grau técnico, foram o butóxido de piperonila (90%), dietil maleato (97%) e trifenil fosfato (99%). Como solvente na elaboração de concentrações dessas substâncias, foi utilizada acetona em grau analítico.

2.3 Bioensaios

Bioensaios *in vivo* foram conduzidos seguindo a metodologia adaptada por Guedes *et al.*, (1996). Todos os testes foram efetuados utilizando frasco cilíndrico de vidro transparente de 20ml de volume, com área interna equivalente a 35,4 cm². Foram feitos testes de ajuste com o propósito de determinar os padrões ideais dos seguintes fatores: tempo de exposição dos insetos aos produtos químicos, volume de produto químico a ser utilizado e o número de insetos por frasco. Os valores adotados como ideais foram: tempo de exposição de 24 horas, 0,4 ml de produto aplicado e 20 indivíduos por frasco.

Após os testes de ajuste metodológico foram conduzidos os bioensaios de concentração-resposta onde se utilizou uma bateria de cinco a seis concentrações do inseticida em teste, 1mg/ml, 10⁻¹mg/ml, 10⁻² mg/ml, 10⁻³mg/ml, 10⁻⁴mg/ml, 10⁻⁵ mg/ml e 10⁻⁶ mg/ml, utilizando-se dois frascos por concentração. Estas concentrações foram aplicadas nos frascos e submetidas a rotação no tambor rotatório para promover a volatilização da acetona e a impregnação uniforme do inseticida por toda a área interna do frasco. Em seguida, foram confinados em cada frasco, 20 indivíduos adultos não sexados, e submetidos a 24 h de exposição ao inseticida, no fim da qual foi observado o número de mortos por concentração. *S. zeamais* e vários outros insetos apresentam o comportamento de imobilidade quando são perturbados e para se evitar algum erro de avaliação de mortalidade, o inseto foi considerado morto quando não apresentava mais habilidade para andar. Feita a avaliação, discriminaram-se a menor concentração onde ocorreu um número maior de mortes (extremo superior), e a maior concentração onde não ocorreram mortes (extremo inferior). Em seguida, foram traçadas novas concentrações intermediárias a esses dois extremos. Por exemplo, se a concentração dada

10^{-2} mg/ml fosse considerada o extremo superior e a concentração 10^{-4} fosse considerada o extremo inferior, seriam escolhidas algumas concentrações intermediárias: $0,8 \times 10^{-2}$ mg/ml , $0,6 \times 10^{-2}$ mg/ml , $0,4 \times 10^{-2}$ mg/ml , $0,6 \times 10^{-3}$ mg/ml e $0,4 \times 10^{-3}$ mg/ml (Figura 2). A partir daí foram feitos os testes definitivos de concentração-resposta, utilizando nessa etapa, quatro frascos para cada concentração avaliada, além das consideradas extremas. O processo foi idêntico ao do ensaio preliminar. Através da avaliação dos resultados foi estimada a curva de concentração-resposta para cada inseticida (Figura 3). No caso dos bioensaios com sinergistas, os indivíduos, antes da exposição ao inseticida, foram submetidos por uma hora ao sinergista numa concentração de 1mg/ml, seguindo a mesma metodologia para os testes com inseticidas (Figuras 4 e 5). Para proceder os testes discriminatórios que indicam quais populações avaliadas são resistentes e a que inseticida, foi utilizada a concentração letal para 95%(CL₉₅) de mortalidade em relação a população padrão de susceptibilidade. Para esse teste foram utilizados cinco frascos contendo 20 indivíduos, submetidos a CL₉₅ para a população susceptível, seguindo o mesmo procedimento para os bioensaios preliminares (Figura 6).

2.4 Análise estatística

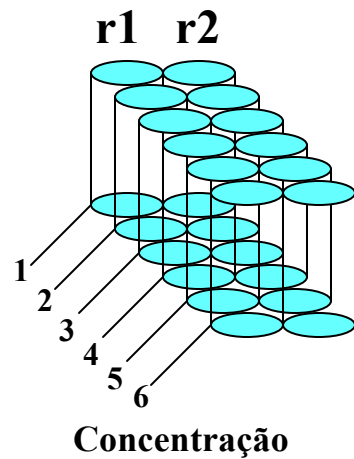
Os resultados de mortalidade obtidos por meio dos bioensaios de concentração-resposta foram submetidos a análise de próbite, segundo Finney (1971), por intermédio do procedimento PROC PROBIT do programa SAS (SAS INSTITUTE, 1997), gerando, assim, as curvas de concentração-resposta. Os resultados dos ensaios discriminatórios foram submetidos ao teste de Z unilateral com correção de continuidade com a finalidade de estimar a diferença mínima significativa entre as populações testadas e a população padrão de susceptibilidade (Roush & Muller, 1986).

Foi aplicado o teste de Dunnett a 5% de probabilidade para determinação da ocorrência de diferença significativa entre a mortalidade

causada em *S. zeamais* nos bioensaios que utilizavam só inseticida e os que utilizavam a combinação inseticida-sinergista.

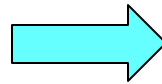
Bioensaios:

Preliminar: 20 indivíduos por repetição; 2 repetições para cada concentração



Mortalidade

	r1	r2
1-	20	20
*2-	20	20
3-	16	14
4-	09	10
*5-	00	00
6-	00	00



Definitivo

testemunha

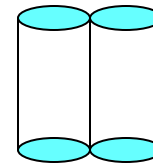


FIGURA 2: Esquema mostrando metodologia dos bioensaios preliminar de concentração-resposta para população padrão de susceptibilidade r_1 e r_2 representam as repetições para cada concentração* Faixa de resposta a ser utilizada nos bioensaios definitivos

Bioensaios

Definitivo: 20 indivíduos por repetição: 4 repetições para cada concentração

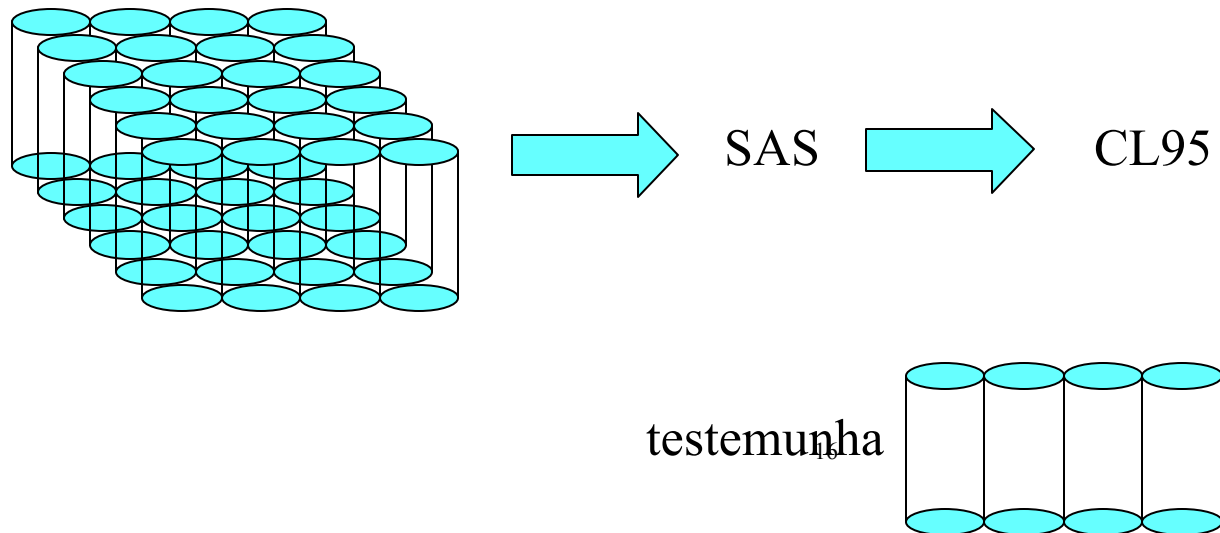


FIGURA 3: Esquema mostrando metodologia dos bioensaios definitivos de concentração-resposta para determinar a concentração letal para 95% da população padrão de susceptibilidade (CL₉₅) utilizando programa SAS.

Bioensaios:

Discriminatório: 20 indivíduos por repetição : 5 repetições para CL₉₅

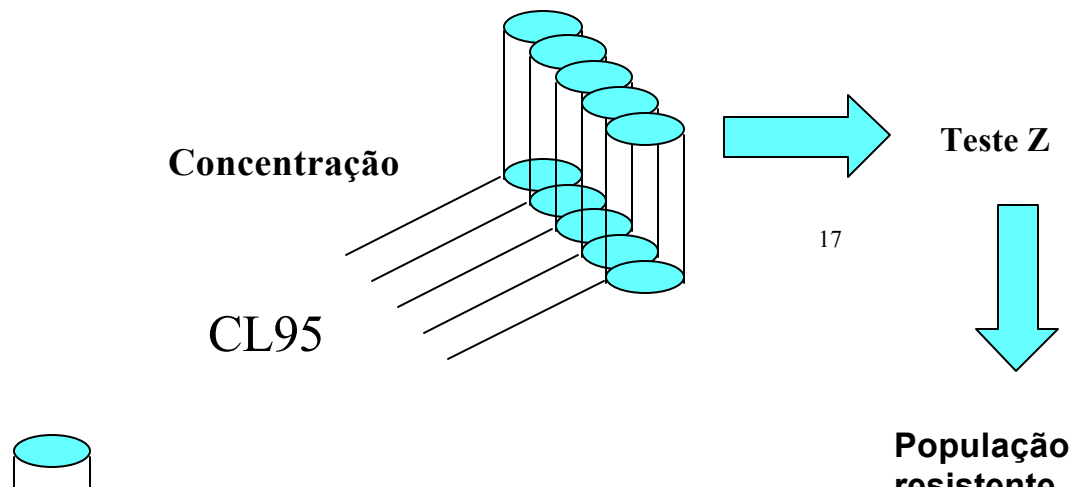
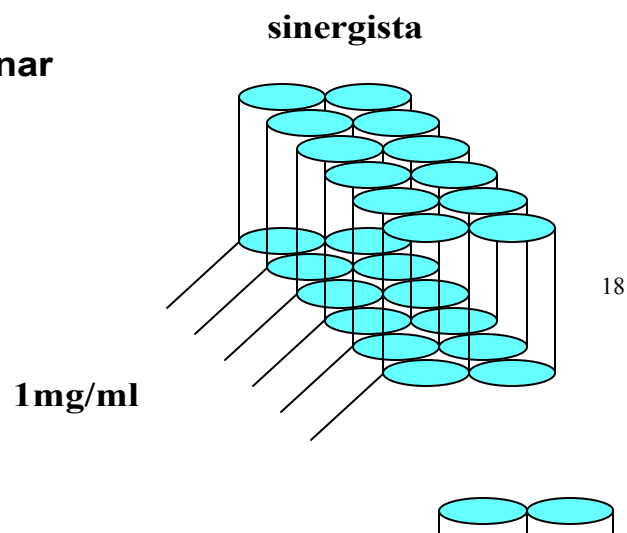


FIGURA 4: Esquema mostrando metodologia dos bioensaios discriminatórios de concentração-resposta para população padrão de susceptibilidade e para as demais a serem investigadas.

Bioensaios:

Sinergistas preliminar



inseticida

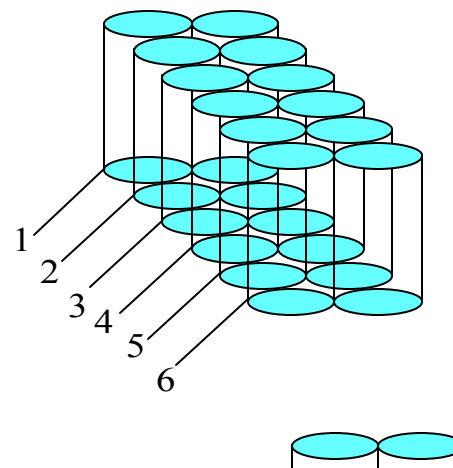


FIGURA 5: Esquema mostrando metodologia dos bioensaios preliminares com sinergista mais inseticida de concentração-resposta para população padrão de susceptibilidade.

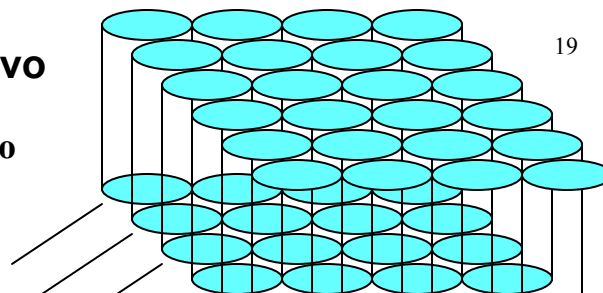
Bioensaios:

Sinergistas:

sinergista

Definitivo

Concentração



19

inseticida

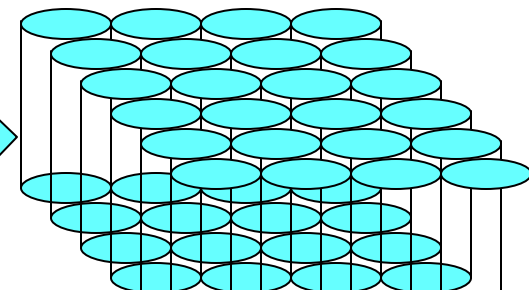


FIGURA 6: Esquema mostrando metodologia dos bioensaios definitivos com sinergista mais inseticida de concentração-resposta para população padrão de susceptibilidade

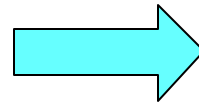
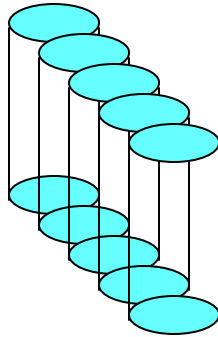
Bioensaios:

Ação dos sinergistas:

Concentração

CL95

inseticida + sinergista



Teste de Dunnet

**Prováveis mecanismos
de resistência**

testemunha

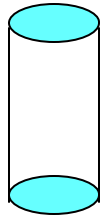


FIGURA 7: Esquema mostrando metodologia dos bioensaios discriminatório com sinergista mais inseticida de concentração-resposta para as populações consideradas resistentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram feitos, neste estudo, bioensaios para detecção de possíveis populações resistentes a três inseticidas piretróides e três organofosforados em 11 populações de *S. zeamais*. Também foram investigados os possíveis mecanismos de resistência presentes nas populações discriminadas como resistentes. Segundo os resultados obtidos através dos bioensaios de concentração-resposta utilizando a população padrão de susceptibilidade (Quadro 2), foram determinadas as CL_{95} de todos os inseticidas em estudo, para esta população (Quadro 2). Estas CL_{95} foram usadas para discriminar as populações como susceptíveis ou resistentes, através de novos bioensaios de concentração-resposta. O resultado obtido dessa primeira etapa foi a detecção de seis populações resistentes aos inseticidas avaliados (Quadro 3). A segunda etapa foi efetuar os bioensaios de sinergismo com as populações consideradas resistentes. Estas foram submetidas a ação das CL_{95} para a população padrão de susceptibilidade dos seis inseticidas combinados com os

três compostos sinergistas, que teve como objetivo inibir a ação dos possíveis grupos enzimáticos destoxificadores envolvidos na resistência a inseticidas. Foram obtidas as CL_{95} dos inseticidas utilizados nos bioensaios de concentração-resposta para a população padrão de susceptibilidade (Quadro 2). As CL_{50} dos inseticidas piretróides são de 10 a 100 vezes maiores que as dos organofosforados (Quadro 2). Isto revela o maior poder letal dos organofosforados em relação aos piretróides para a população padrão de susceptibilidade já que as CL_{50} apresentam uma grande representatividade dentro de uma população estudada. As CL_{95} obtidas foram aplicadas nas populações em estudo, discriminando as resistentes (Quadro 3). Os dados obtidos pelo teste discriminatório mostraram sete casos de resistência aos inseticidas do grupo dos piretróides e quatro casos aos dos fosforados. A população de Jacarezinho-PR foi considerada resistente a todos os piretróides testados. Já aos organofosforados, ela se mostrou susceptível (Quadro 2). As populações de Cristalina-GO e Nova Andradina-MS se mostraram resistentes somente ao inseticida cipermetrina (Quadro 2). A população de Fátima do sul – MS apresentou resistência unicamente ao clorpirifós metílico (Quadro 2). No caso da população de Penápolis/Barbosa, houve resistência a um inseticida piretróide (cipermetrina) e a dois organofosforados (clorpirifós metílico e pirimifós metílico) (Quadro 2). Foi detectada resistência na população de São José do Rio Preto-SP aos inseticidas cipermetrina e pirimifós metílico (Quadro 2). Não foram detectadas populações resistentes ao inseticida malatim. Constatou-se que a ação deste composto resultou em uma taxa de mortalidade de 100% em quase todas as populações avaliadas (Quadro 2).

Os bioensaios de concentração resposta com inseticidas combinados com sinergistas (TPP, PBO e DEM) geraram as CL_{95} para a população padrão de susceptibilidade (Quadro 4). Estas foram utilizadas como concentrações

Quadro 2: Toxicidade relativa de seis inseticidas para população padrão de susceptibilidade (Sete lagoas) de *Sitophilus zeamais*.

Inseticida	N ¹	Inclinação ± EPM ²	CL ₅₀ (IC95%) µg i.a / cm ²	CL ₉₅ (IC(95%) µg i.a / cm ²	χ ²	Prob.
Cipermetrina	560	0,64 ± 0,03	0,115(0,099-0,134)	0,440(0,344-0,609)	6,02	0,20
Deltametrina	560	0,48 ± 0,03	0,080(0,065-0,096)	0,648(0,479-0,972)	4,17	0,38
Permetrina	640	0,46 ± 0,04	0,490(0,407-0,576)	3,028(2,379-4,147)	3,43	0,63
Clorpirifos metílico	560	0,63 ± 0,07	0,007(0,006-0,007)	0,012(0,011-0,015)	3,74	0,40
Malation	400	1,33± 0,08	0,031(0,018-0,041)	0,057(0,042-0,167)	4,76	0,09
Pirimifós metílico	640	0,58±0,05	0,008(0,007-0,010)	0,017(0,014-0,036)	10,16	0,07

¹ N= número total de insetos por bioensaio; ²EPM = Erro padrão da média; CL = Concentração letal; IC95 = Intervalo de confiança a 95% de probabilidade; χ²= Qui-quadrado; Prob = Probabilidade

Quadro 3: Mortalidade das populações de *Sitophilus zeamais* pelas concentrações discriminatórias dos inseticidas.

População	%Mortalidade						
	N ¹	Deltametrina	Cipermetrina	Permetrina	Clorpirifós Metílico	Pirimifós Metílico	Malatión
Bragança Paulista -SP	100	91	87	100	87	100	100
Cristalina-GO	100	97	75*	97	100	100	100
Ivinhema-MS	100	86	86	96	100	100	100
Fatima do Sul-MS	100	97	81	95	77*	100	100
Jacarezinho-PR	100	00*	00*	00*	96	100	100
Nova Andradina-MS	100	98	64*	95	100	100	100
Campos dos Goitacazes -RJ	100	100	95	98	100	100	100
Penapolis/Barbosa-SP	100	100	77*	100	76*	98*	100
São José do Rio Preto-SP	100	98	71*	96	97	95*	100
Uberlândia-MG	100	100	94	89	99	100	100
Sete Lagoas-MG	100	80	85	94	89	100	100

* = Mortalidade significativamente diferente da mortalidade na população-padrão de susceptibilidade pelo teste Z a 95% de probabilidade; N¹ = Número de insetos por bioensaio

discriminatórias nos testes de concentração-resposta para as populações consideradas resistentes. Os resultados de mortalidade utilizando inseticidas combinados com sinergistas foram comparados através da aplicação do teste de Dunnett, com os resultados de mortalidade dos testes onde foi utilizado apenas o inseticida (Quadro 2). As comparações mostraram a existência de diferenças significativas entre as médias das mortalidades dos dois tratamentos. Esta diferença foi interpretada como ação antagonista quando ocorreu diminuição significativa na mortalidade e, como ação sinérgica, quando houve aumento significativo na mortalidade das populações avaliadas (Quadro 4). No Quadro 5 pode-se observar os resultados da supressão ou não da resistência nas populações testadas com inseticidas mais sinergistas. A população de Cristalina-GO sofreu uma diminuição significativa na mortalidade quando o inseticida cipermetrina foi combinado com o PBO, mas houve um aumento na mortalidade tanto na combinação cipermetrina-TPP e cipermetrina-DEM quando comparada com os bioensaios sem sinergistas. Os resultados dos testes com a população de Nova Andradina-MS mostraram os mesmos efeitos na mortalidade ocorridos com a população de Cristalina-GO. Os testes com a população de Jacarezinho-PR mostraram diferença significativa apenas no tratamento de cipermetrina associada ao TPP, ocorrendo um aumento na mortalidade em relação a mortalidade obtida apenas com o uso do inseticida. Ainda nesta população, os testes de mortalidade com os inseticidas deltametrina e permetrina combinados com os sinergistas não apresentaram diferenças significativas em relação aos testes usando apenas os inseticidas. A ação da cipermetrina mais TPP e cipermetrina mais DEM na população de Penápolis/Barbosa ocasionou aumento significativo na mortalidade,

Quadro 4: Toxicidade relativa de cinco inseticidas combinados com três sinergistas para população padrão de susceptibilidade (Sete Lagoas).

Inseticida + sinergista	N ¹	Inclinação ± EPM	CL ₅₀ (LC ₉₅) µg i.a / cm ²	CL ₉₅ (LC ₉₅) µg i.a / cm ²	RS ²	χ ²	Prob
Cipermetrina +PBO ³	560	0,349 ± 0,025	0,003 (0,002 – 0,004)	0,023 (0,013 – 0,054)	44,04	1,66	0,80
Cipermetrina + TFF ⁴	640	0,483 ± 0,028	0,060 (0,051 – 0,069)	0,389 (0,292 – 0,570)	1,92	3,28	0,76
Cipermetrina + DEM ⁵	560	0,385 ± 0,040	0,435 (0,350 – 0,564)	4,881 (2,960 – 9,840)	0,26	4,81	0,31
Deltametrina +PBO	480	0,469 ± 0,051	0,003 (0,002 – 0,003)	0,015 (0,012 – 0,021)	30,73	0,34	0,95
Deltametrina +TFF	456	0,399 ± 0,034	0,004 (0,003 – 0,006)	0,044 (0,031 – 0,071)	18,58	2,40	0,49
Deltametrina + DEM	540	0,407 ± 0,022	0,027 (0,021 – 0,033)	0,233 (0,163 – 0,372)	3,01	6,45	0,17
Permetrina + PBO	380	0,460 ± 0,055	0,004 (0,003 – 0,004)	0,010 (0,008 – 0,015)	132,30	3,34	0,19
Permetrina + TFF	360	0,482 ± 0,049	1,568 (1,282 – 2,147)	5,158 (3,307 – 12,534)	0,31	2,95	0,23
Permetrina + DEM	360	0,647 ± 0,067	0,671 (0,513 – 0,769)	1,823 (1,347 – 4,577)	0,73	3,88	0,14
Clorpirifós + PBO	540	1,115 ± 0,081	0,034 (0,031 – 0,366)	0,068 (0,061 – 0,078)	0,19	2,30	0,68
Clorpirifós + TFF	469	0,697 ± 0,081	0,007 (0,007 – 0,008)	0,022 (0,018 – 0,030)	0,90	5,42	0,14
Clorpirifós + DEM	442	1,343 ± 0,123	0,006 (0,006 – 0,007)	0,0130 (0,011 – 0,015)	1,05	5,25	0,15
Pirimifós + PBO	400	0,719 ± 0,082	0,008 (0,006 – 0,010)	0,018 (0,013 – 0,046)	1,11	8,65	0,07
Pirimifós + TFF	560	1,070 ± 0,058	0,003 (0,002 – 0,003)	0,007 (0,006 – 0,008)	2,86	3,25	0,52
Pirimifós + DEM	560	1,117 ± 0,061	0,003 (0,003 – 0,004)	0,007 (0,006 – 0,008)	2,51	1,71	0,79

¹ N = Número total de insetos por bioensaio; ² RS = Razão de sinergismo (razão entre a CL₅₀ do inseticida não sinergizado e a CL₅₀ do inseticida sinergizado); ³ PBO = Butóxido de piperonila; ⁴ TFF = Trifenil fosfato; ⁵ DEM = Dietil maleato.

Quadro 5: Mortalidade de populações de *Sitophilus zeamais* pelas concentrações discriminatórias dos inseticidas mais sinergistas (PBO= butóxido de piperonila; TPP= trifenil fosfato e DEM= dietil maleato).

População	%Mortos		
	Cipermetrina		
	PBO	TPP	DEM
Cristalina-GO	56*	<u>98*</u>	<u>99*</u>
Jacarezinho-PR	00	<u>09*</u>	01
Nova Andradina-MS	49*	<u>98*</u>	<u>99*</u>
Penápolis/Barbosa-SP	83	<u>98*</u>	<u>100*</u>
São José do Rio Preto-SP	70	<u>100*</u>	<u>100*</u>
	Deltametrina		
	PBO	TPP	DEM
Jacarezinho-PR	01	02	01
	Permetrina		
	PBO	TPP	DEM
Jacarezinho-PR	00	01	02
	Clorpirifós Metílico		
	PBO	TPP	DEM
Fátima do Sul-MS	<u>100*</u>	<u>100*</u>	<u>100*</u>
Penápolis/Barbosa-SP	<u>99*</u>	<u>99*</u>	<u>98*</u>
	Pirimifós Metílico		
	PBO	TPP	DEM
Penápolis/Barbosa-SP	23*	100	98
São José do Rio Preto-SP	23*	100	98

*Mortalidade significativamente diferente da mortalidade causada por inseticida não sinergizado (Quadro 3). Sublinhado indica supressão de resistência pelo sinergista.

o que se repetiu quando foi aplicado clorpirifós metílico para os três sinergistas. Já para o tratamento com pirimifós metílico, houve um efeito antagonista do inseticida mais PBO, refletido na diminuição da mortalidade para esse bioensaio. Os mesmos efeitos constatados nesta população, para este último inseticida, também foram observados nos testes com a população de São José do Rio Preto –SP. Para a população de Fátima do Sul foram encontrados valores significativos no aumento da mortalidade para os três sinergistas (Quadro 5). Os resultados obtidos destes bioensaios mostraram a existência de diferença significativa na média das mortalidades para a população de Cristalina-GO, o que sugere a ação de mecanismos de resistência de destoxificação enzimática (Quadro 5). Os sinergistas TPP e DEM possivelmente são os agentes causadores do bloqueio dos complexos enzimáticos destoxificadores esterase e glutathione-S-transferase, respectivamente. No caso da população de Jacarezinho-PR, o efeito dos sinergistas foi apenas significativo para o TPP, mostrando um leve aumento na mortalidade, o que levou a supor a presença de outro mecanismo de resistência mais atuante do que o de destoxificação enzimática (Quadro 5). Possivelmente o mecanismo de insensibilidade do sítio de ação seja o responsável pelo alto índice de resistência mostrado por essa população. Guedes *et al.*, (1994, 1995) sugeriram que o kdr seria o mecanismo responsável pela resistência de uma população oriunda de Jacarezinho mas mantida em laboratório do CNPMS desde 1988. Este mecanismo surge quando ocorre mutação nos canais de sódio, os quais interferem com o acoplamento da molécula inseticida. Esta por sua vez tem dificultada sua ligação ao seu sítio de ação. Eles também reiteram a hipótese levantada anteriormente de que o uso constante do inseticida organoclorado DDT,

ocasionou uma pressão de seleção intensa que propiciou a evolução do fenômeno de resistência cruzada aos inseticidas piretróides. Estes inseticidas e o DDT possuem o mesmo modo de ação: complexam-se com os canais de sódio voltagem-dependentes situados nos neurônios, interferindo com o funcionamento deles (Soderlund & Bloomquist, 1990).

A avaliação dos resultados obtidos com a população de Nova Andradina-MS mostra uma ação sinérgica nas combinações cipermetrina mais TPP e cipermetrina mais DEM , dando evidências, mais uma vez, da presença de pelo menos dois mecanismos destoxificativos baseados nos grupos enzimáticos glutathione-S-transferases e esterases (Quadro 5). Foram observadas diferenças significativas nas taxas de mortalidade na população de Fátima do Sul-MS nos testes utilizando o inseticida clorpirifós metílico combinado com os compostos sinergistas. Evidências da presença de três grupos enzimáticos atuando no processo de destoxificação foram detectadas levando em consideração o aumento significativo na mortalidade dessa população (Quadro 5). As monooxigenases dependentes do citocromo P-450, as glutathione-S-transferases e as esterases, possivelmente, sofreram bloqueio pela ação dos sinergistas. O mecanismo bioquímico de destoxificação enzimática é bastante comum entre os insetos de grãos armazenados. Guedes *et al.*, (1998) determinaram a destacada atuação das esterases na destoxificação do inseticida malathion em populações americanas e brasileiras de *Rhyzopertha dominica*. Determinaram também que os grupos enzimáticos das monooxigenases dependentes de citocromo P-450 e das glutathione-S-transferase não contribuíam para a resistência dessas populações ao malathion.

Testes com os inseticidas pirimifós metílico e cipermetrina aplicados em combinação com os sinergistas na população de São José do Rio Preto-SP, mostraram que no tratamento com cipermetrina mais TPP e DEM, há supressão da resistência sugerindo o envolvimento de esterases e glutathione-S-transferases como mecanismos importantes de resistência a cipermetrina nesta população. No entanto, não houve efeito sinergista na ação do composto cipermetrina por parte do PBO, sugerindo a pequena participação das monoxigenases no processo de destoxificação (Quadro 5). Para o inseticida pirimifós metílico não foi detectado nenhum indício de ação sinergista ou antagonista para os compostos TPP e DEM. Por outro lado, foi observada uma diminuição na mortalidade dessa população no tratamento combinando clorpirifós metílico e PBO (Quadro 5). Este fato pode ter explicação na necessidade de ativação deste inseticida pelo complexo enzimático das monoxigenases dependentes do citocromo P-450 (Scott, 1990). Com o aparente bloqueio dessas enzimas pelo PBO, o inseticida talvez não tenha sofrido ativação da sua molécula e conseqüentemente não tenha exercido o efeito esperado. Esta mesma explicação pode ser aplicada na avaliação dos resultados dos testes com a população de Penápolis/Barbosa-SP (Quadro 5). Houve o mesmo efeito redutor da mortalidade desta população no tratamento com o inseticida pirimifós metílico combinado com o PBO. A mesma ausência de efeito sinergista ou antagonista também foi observada para os compostos TPP e DEM associados a esse inseticida (Quadro 5). Nos testes com o inseticida clorpirifós metílico em combinação com TPP, PBO e DEM, foram detectadas ações sinergistas para os três compostos, o que sugere o envolvimento de todos os principais grupos enzimáticos destoxificadores (Quadro 5).

As informações geradas por esse estudo são de grande importância prática, justificando sua implementação e corroborando sua importância. Estas informações podem ser usadas como base para elaboração de táticas de manejo da resistência a inseticidas que, se bem sucedidas, poderão diminuir os grandes prejuízos advindos da falha de controle das pragas agrícolas, em especial, de grãos armazenados. Apesar da existência de evidências da atuação de mecanismos bioquímicos de destoxificação enzimática e de insensibilidade do sítio de ação nas populações de *S. zeamais* consideradas resistentes aos inseticidas avaliados, é necessário dar sequência a esta investigação, através de investimentos em estudos metabólicos *in vitro* que proporcionam resultados mais conclusivos sobre qual mecanismo bioquímico de resistência e consequentemente a possível causa desse fenômeno.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho e considerando os objetivos propostos nessa investigação científica, pode-se concluir que:

- 1- O fenômeno da resistência a inseticidas piretróides e organofosforados foi detectado em seis, das 12 populações de *S. zeamais* testadas neste trabalho, quando comparadas com a população padrão de susceptibilidade, sendo que três foram resistentes apenas a piretróides; uma apenas a organofosforados e duas resistentes tanto a piretróides quanto organofosforados.
- 2- Os resultados dos bioensaios destacaram dois inseticidas nos testes de detecção de resistência: Os testes com o piretróide cipermetrina apontaram a presença de resistência a este composto em seis populações de *S. zeamais*, ao passo que os resultados dos testes com o organofosforado malatiom revelaram que nenhuma população se mostrou resistente a este inseticida. De acordo com o exposto talvez haja problemas, no futuro, de falha no controle de *S. zeamais* quando utilizado o inseticida cipermetrina já que este apresentou o maior número de populações resistentes a sua ação. No caso do inseticida

organofosforado malation este apresenta potencial de uso no controle do *S. zeamais*.

- 3- A população de Jacarezinho-PR, se mostrou resistente aos inseticidas piretróides testados , onde a taxa de mortalidade foi a mais baixa dentre todas as populações. No entanto não houve detecção de resistência dessa população aos inseticidas organofosforados.
- 4- Os testes com sinergistas evidenciaram uma possível atuação de mecanismos de destoxificação através dos grupos enzimáticos glutathione-S-transferase, esterases e monoxigenases dependentes do citocromo P450, sendo que os dois primeiros grupos parecem ser mais atuantes nas populações testadas neste trabalho.
- 5- No caso da população de Jacarezinho-PR, os bioensaios com sinergistas não detectaram uma possível ação de mecanismos de resistência ligados aos principais grupos enzimáticos destoxificadores. Possivelmente esteja presente nesta população outro mecanismo de resistência. Pela constatação de resistência cruzada a organoclorados e piretróides em populações de *S. zeamais* dessa mesma região, é provável que o mecanismo de resistência presente nesta população seja o de insensibilidade do sítio de ação nos canais de sódio voltagem dependentes, kdr.

5. BIBLIOGRAFIA

- BRATTSTEN, L. B.; HOLYOKE, J. R.; L. W.; LEEPER, J. R.; RAFFIA, K. F.,
Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research.
Science, v. 231, p. 1255- 1260, 1986.
- CAJUEIRO, I. V. DE M. **Controle químico de *Sitophilus zeamais*** Motschulsky
1855 (Coleoptera: Curculionidae), **em grãos de sorgo**, *sorghum bicolor* (L.)
Moench, **em laboratório**. Piracicaba, ESALQ, 1988. 99p. (Tese M. S.).
- CAMPANHOLA, C. **Resistência de insetos a inseticidas: Importância
características e manejo**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1990. 45 p.
- DOBIE, P., HAINES , C. P., HODGES, R. J., PREVETT, P.F. **Insects and
arachnids of tropical Stored products, their biology and identification: a
training manual**. UK, Tropical Development and Research Institute, 1984.
273p.

COTTON, R.T., WILBUR, D. A. Insects. In: CHRISTENSEN C. M. **Stored of cereal grains and their products**. St. Paul. Minnesota, A. O. C. S., 1982, cap. 9 p. 281-318.

EVANS, D. E. The biology of stored products Coleoptera. In: Proc. Aust. Dev. Asst. **Course on Preservation of Stored cereals** , 1981, p. 145-85.

FFRENCH-CONSTANT, R.H. Target site mediated insecticide resistance: what questions remain. Mini-review. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 29, p. 397-403, 1999.

GAMMON, D.W. Pyrethroid resistance in a strain of *Spodoptera littoralis* is correlated with decreased sensitivity of the CNS in vitro. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 13, p. 53-62, 1980.

GUEDES, R. N. C.; Resistência de insetos a inseticidas. In: ZAMBOLIM, L. I **Encontro de sobre manejo integrado de doenças e pragas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 101-107.

GUEDES, R. N. C.; ZHU, K. Y.; KAMBHAMPATI, S.; Altered acetylcholinesterase associate with organophosphate resistance in *Rhyzoperta dominica* (F) (Col., Bostrichidae) populations from Brasil and United States. **J Appl. Entomol.**, v. 58, p. 269-273, 1998.

- GUEDES, R. N. C.; ZHU, K. Y.; KAMBHAMPATI, S.; DOVER, B.A.; Na altered acetylcholinesterase conferring negative cross-insensitivity to different insecticidal inhibitors in organophosphate-resistant lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.58, p. 55-62, 1997a
- GUEDES, R.N.C.; ZHU, K.Y.; DOVER, B.A.; KAMBHAMPATI, S. Partial characterization of phosphotriesterases from organophosphate-susceptible and resistant populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 57, p. 156-164, 1997b.
- GUEDES, R.N.C.; DOVER, B.A.; KAMBHAMPATI, S. Resistance to chlorpyrifos-methyl, pirimiphos-methyl, and malathion in Brazilian and U.S. populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 89, p. 27-32, 1996.
- GUEDES, R.N.C.; LIMA, J.O.L.; SANTOS, J.P.; CRUZ, C.D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **J. Stored Prod. Res.**, v. 31, p. 145-150, 1995.
- GUEDES, R.N.C.; LIMA, J.O.G.; SANTOS, J.P.; CRUZ, C.D. Inheritance of deltamethrin resistance in a Brazilian strain of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motsch.). **Int. J. Pest Manag.**, v. 40, p. 103-106, 1994.
- GUEDES, R.N.C. Resistência a inseticidas: desafio para o controle de pragas de grãos armazenados. **Seiva**, v. 50, p. 24-29, 1991.
- GUEDES, R.N.C. Manejo integrado para a proteção de grãos armazenados contra insetos. **Rev. Bras. Armaz.**, v. 15, p. 3-48, 1990.

- KUSCHEL, G. On problems of synonymy in the *Sitophilus oryzae* complex (30 th contribution. Coleoptera, Curculionidae). **Ann. Mag. Nat. Hist., London.**v.13, p. 241-244, 1961.
- LE PATOUREL, G.N.J. & SALAMA, M.A. Mechanism of gamma-HCH resistance in a strain of granary weevil *Sitophilus granarius* L. **Pestic. Sci.**, v. 17. p 503-510, 1986.
- LIU, Z., VALLES, S.M., DONG, K. Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v 30, p. 991-997, 2000.
- LOCKWOOD, J.A., SPARKS, T.C.; STORY, R.N. Evolution of insect resistance to insecticides: a revolution of roles of phyliology and behavior. **Bull. Entomol. Soc. Amer.**, v. 30 (4). p. 41-51, 1984.
- LORINI, I.; GALLEY, D. J. Deltamethrin resistance in *Rhyzoperta dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae), a pest of stored grain in Brazil. **J Stored Prod. Res.**, v. 35, p. 37-45, 1999.
- MENDOZA, P. J. , Survey of inseticide resistance in Mexican populations of maize weevil, *Sitophilus zeamais* M. (Coleoptera; Curculionidae). **J Stored Prod. Res.**, v. 35, p. 107-115, 1999.

- MULLIN, C.A., SCOTT, J.G. Biomolecular basis for insecticide resistance: classification and comparisons. In: C. A Mullin & J.G. Scott (eds.) **Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance: Diversity among insects**,. ACS, Washington. p. 1-13,1992.
- MUTERO, A, PRALAVORIO, M., BRIDE, J.M., FOURNIER, D., Resistance-associated point mutations in isecticide-insensitive acetylcholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 91, p. 5922-5926, 1994.
- OPPENOORTH, F.J. & WELLING, W. Biochemistry and physiology of resistance. In: WILKINSON, C.F. (ed.). **Insecticide biochemistry and physiology**. New York, Plenum, p. 507-551, 1976.
- PRICE, N.R. Active exclusion of phosphine as mechanism of resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) . **J. Stored Prod. Res.**, v. 20 (3), p. 163-168, 1984.
- PRICE, N.R. The biochemical action of phosphine in insects and mechanisms of resistance. In: **GASGA SEMINAR ON FUMIGATION TECHNOLOGY IN DEVELOPING COUNTRIES**, Slough, GASGA Seminar. Slough, England, TDRI, p. 99-104, 1986.
- REES, D.P. Coleoptera. In SUBRAMANYAM, B.H.; HAGSTRUM, D.W., EDS. **Integrated mangement of insects in stored products**. New York: Marcel Dekker, p. 1-39, 1996.

- RISKALLAH, M.R., ABD-ELGHAFAR, S.F., ABO-EKGGAR, M.R., NASSAR, M.E.
Development of resistance and cross-resistance in fenvalerate and
deltamethrin selected strains of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). **Pestic. Sci.**, v.
14, p. 508-512, 1983.
- ROSSETO, C. J. O complexo de *Sitophilus* spp. (Coleoptera: Curculionidae) no
Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, 28 (10): 127-48, 1969.
- ROUSH, R.T., MILLER, G.L. Considerations for design of insecticide resistance
monitoring programs. **J. Econ Entomol.**, v.79, p.293-298, 1986.
- RUFINGIER, C., PASTEUR, N., LAGNEL, J., MARTIN, C., NAVAJAS, M.
Mechanisms of insecticide resistance in the aphid *Nasonovia ribisnigri*
(Mosley) (Homoptera: Aphididae) from France. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.
29, p. 385-391, 1999.
- SANTOS, J.P. Comparação entre populações de *Sitophilus zeamais* quanto a
resistência a inseticidas piretróides e fosforados. In: **CONGRESSO
NACIONAL DE MILHO E SORGO**, Piracicaba, Resumos.Campinas, v. 17, p.
71, 1988.
- 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.

SAS INSTITUTE, SAS. **User's guide: statistics**. Version 6.12. SAS Institute, Cary, N.C., USA, p.1128, 1997.

SAWICKI, R.M. Resistance of insects to insecticides. **Span**, v. 20 (2), p. 50-52, 1979.

SCOTT, J.G. Cytochromes p450 and insecticide resistance. Review, **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v. 29, p. 757-777, 1999.

SCOTT, J.G. Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies, and pitfalls. In: ROUSH, R.T., TABASHNIK, B.E. **Pesticide resistance in Arthropods**. New York: Chapman & Hall. p.39-57, 1990.

SONDERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R.; Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Roush, R. T.; TABASHINK, B. E.; **Pesticide Resistance in Arthropods**. New York, Chapman & Hall. p. 58-96, 1990.

SUBRAMANYAM, B.H.; HAGSTRUM, D.W. Resistance measurement and management. In: SUBRAMANYAM, B.H.; HAGSTRUM, D.W., eds. **Integrated management of insects in stored products**. New York: Marcel Dekker. p. 331-397, 1996.

TABASHNIK, B. E.; Implications of gene amplification for evolution and management of insecticide resistance. **J. Econ. Entomol.**, v. 83 (4), p.1170-1176, 1990.

- TAKEMATSU, P.A. **Suscetibilidade de *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) de diferentes regiões do Estado de São Paulo, a inseticidas fosforados e piretróides em condições de laboratório.** Piracicaba: ESALQ, 1983. 77p. (Tese M.S.).
- TEETES, G. L.; SESHU REDDY, K. W.; LEUSCHENER, K. and HOUSE, L.R. Sorghum Insect Identification Hand book. Icrisat Information Bulletin, Patancheru, 12: 106-107. 1983
- VAIS, H., ATKINSON, S., ELDURSI, N., DEVONSHIRE, A.L., WILLIAMSON, M.S. A single amino acid change makes a rat neuronal sodium channel highly sensitive to pyrethroid insecticides. **FEBS Letters**, v. 470, p 135-138, 2000.
- VAUGHAN, A, ROCHELEAU, T, FRENCH-CONSTANT, R., Site-directed mutagenesis of Na acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. **Exp. Parasitol.**, v 87, p. 237-244, 1997.
- WILLIAMSON, M.S., MATINEZ-TORRES, D., HICK, C.A, DEVONSHIRE, A.L. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. **Mol. Gen. Genet.**, v. 252, p. 51-60, 1996.