



Caracterização e monitoramento da resistência de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) ao inseticida pirimifós-metílico

Thais Lopes Lima

São Paulo
2017

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio**

**Caracterização e monitoramento da resistência de *Sitophilus zeamais*
Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) ao inseticida pirimifós-metílico**

Thais Lopes Lima

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Prof. Dr. Mário Eidi Sato

São Paulo
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Lima, Thais Lopes.

Caracterização e monitoramento da resistência de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) ao inseticida pirimifós-metilico.
/ Thais Lopes Lima. - São Paulo, 2017.

46 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Mário Eidi Sato.

Versão do título para o inglês: Characterization and monitoring of pirimiphos-methyl insecticide resistance in *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae).

1. Gorgulho-do-milho 2. Praga de grãos armazenados 3. Controle químico
I. Lima, Thais Lopes II. Sato, Mário Eidi III. Instituto Biológico (São Paulo).
IV. Título.

IB/Bibl./2017/018



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252 CEP 04014-002 - São Paulo – SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Thais Lopes Lima

Título: Caracterização e monitoramento da resistência de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) ao inseticida pirimifós-metílico

Orientador: Prof. Dr. Mário Eidi Sato

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.
Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Aprovado em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Prof. Dr. Mario Eidi Sato
Instituição: Instituto Biológico, IB

Assinatura:

Prof. Dr. Valter Arthur
Instituição: CENA /USP

Assinatura:

Dr. Marcos Roberto Potenza
Instituição: Instituto Biológico, IB

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Maricelia por todas as batalhas que vencemos juntas, pelo apoio, incentivo e amor, por ser a minha torre forte. Ao meu pai Ezequiel, pelo apoio, paciência e amor oferecido em toda minha vida. Ao meu padrasto Marcos, por todo apoio e dedicação. Aos meus irmãos, Guilherme e Giuliana, pela forma simples de alegrar meus dias e mostrar o verdadeiro significado de união.

Aos meus Avós, Djalma, Nilma e Josué por todo amor, carinho e preocupação.

A minha Avó Aurelina (in memoriam), quando um adeus deixa tanta saudade, é sinal de que o que foi vivido será inesquecível, nossa última conversa foi exatamente sobre este trabalho e suas palavras ficarão guardadas eternamente, sua memória viverá sempre através de mim, do meu amor e da minha eterna saudade.

A vocês, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Mário Eidi Sato, pela oportunidade, orientação e todos os ensinamentos ao longo desses anos, o meu muitíssimo obrigada.

Ao Pesquisador Dr. Marcos Roberto Potenza, pela oportunidade e auxílio durante a realização deste trabalho no Laboratório de Pragas em Horticultura.

Ao Prof. Dr. Valter Arthur, pelas colaborações durante a banca de qualificação e por aceitar fazer parte desta banca.

Ao Prof. Dr. Raul Narciso Carvalho Guedes, pelas populações de *Sitophilus zeamais* doadas.

Ao Prof. Dr. Ricardo Harakava e a Msc. Amanda Aparecida de Oliveira, pelo auxílio na realização das PCRs e sequenciamento das populações coletadas.

A Fundação Mokiti Okada, pela doação de sementes de milho orgânica, para mantermos as populações de *Sitophilus zeamais* no laboratório.

Ao Instituto Biológico - IB/SP/APTA, por permitir a realização deste trabalho e a toda equipe do Programa de Pós Graduação.

Ao Msc. Fabrício Caldeira Reis, pela amizade desde os tempos da graduação, pela companhia, pelas palavras de apoio e pelos momentos de descontração ao longo desses anos.

Aos colegas do Laboratório de Pragas em Horticultura, Msc. Paulo Ricardo de Jesus, Jamile Icassatti Saud Romano e Márcia da Fonseca Valbuza, pela companhia durante a realização deste trabalho.

A Engenheira Agrônoma Teresa Jocys Kanashiro, pelos almoços e longas risadas durante esses eventos.

Ao Técnico Agrícola Edvaldo José de Almeida pelo auxílio durante a coleta de material, a Maria Emília pelo auxílio no período de criação das populações no Laboratório de Artrópodes e a Nádia pela disposição e boa vontade de ajudar sempre que precisei.

A Priscila Lemos Martins, por não permitir que eu pirasse de ansiedade durante o período de realização deste trabalho e por me incentivar a olhar as coisas sob uma nova perspectiva, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

LIMA, T.L. Caracterização e monitoramento da resistência de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) ao inseticida pirimifós-metílico. São Paulo-SP. 2017. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

O gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, é uma das principais pragas do milho armazenado. O uso indiscriminado de inseticidas tem levado à seleção de populações de insetos resistentes aos principais inseticidas utilizados para o seu controle. Este trabalho teve por objetivos: avaliar a suscetibilidade de diferentes populações de *S. zeamais*, coletadas principalmente no estado de São Paulo, ao inseticida pirimifós-metílico; conduzir estudos sobre caracterização da resistência ao inseticida com o uso de sinergistas (inibidores enzimáticos); e avaliar o comportamento de linhagens suscetíveis e resistentes de *S. zeamais* em grãos de milho. Foram avaliadas quatro populações de *S. zeamais* para a avaliação da suscetibilidade a pirimifós-metílico, com estimativa das concentrações letais 50% (CL₅₀) e 95% (CL₉₅), e para o estabelecimento de uma concentração diagnóstica para o monitoramento da resistência ao inseticida. Avaliou-se a frequência da resistência a pirimifós-metílicos em oito populações/linhagens de *S. zeamais*, procedentes dos seguintes municípios: Votuporanga, Assis, Piracicaba, Ribeirão Preto, Campinas, Morrinhos, Avaré e São Paulo. Foram conduzidos, também, testes de toxicidade com os sinergistas PBO (butóxido de piperonila), DEM (dietil maleato) e DEF (S,S,S tributilfosforotrioato), utilizando-se a linhagem mais resistente (São Paulo) de *S. zeamais* a pirimifós-metílico. Além disso, estudou-se o comportamento de linhagens resistente (R) (São Paulo) e suscetível (S) (Assis) a pirimifós-metílico em grãos de milho, avaliando-se o consumo de grãos e taxa reprodutiva dos insetos. Os resultados mostraram variabilidade entre as populações avaliadas de *S. zeamais*, quanto à suscetibilidade ao inseticida pirimifós-metílico, tendo sido detectada uma população procedente de São Paulo, com intensidade de resistência de aproximadamente cinco vezes e 69% de insetos resistentes ao inseticida. Os testes com sinergistas indicaram envolvimento de enzimas metabolizadoras, com destaque para as esterases, na resistência de *S. zeamais* a pirimifós-metílico. As linhagens de *S. zeamais* suscetível (Assis) e resistente a pirimifós-metílico (São Paulo) causaram danos semelhantes aos grãos de milho. A linhagem resistente a pirimifós-metílico (São Paulo) apresentou adultos de menor peso, porém, com maior taxa de crescimento populacional, em relação à suscetível (Assis), em grãos de milho.

Palavras-chave: gorgulho-do-milho, praga de grãos armazenados, controle químico

ABSTRACT

LIMA, T.L. Characterization and monitoring of pirimiphos-methyl insecticide resistance in *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). São Paulo-SP. 2016. Dissertation (Master in Health, Food Safety and Environmental Agribusiness) - Instituto Biológico.

The maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, is one of the main pests of stored maize. The indiscriminate use of insecticides has led to the selection of insect populations resistant to the main insecticides used for their control. The objectives of this research were: to evaluate the susceptibility of different populations of *S. zeamais*, collected mainly in the state of São Paulo, to the insecticide pirimiphos-methyl; conduct studies on the characterization of resistance to insecticides with the use of synergists (enzyme inhibitors); and evaluate the behavior of susceptible and resistant strains of *S. zeamais* in grains maize. Four populations of *S. zeamais* were evaluated for susceptibility to pirimiphos-methyl, with estimation of 50% (LC₅₀) and 95% (LC₉₅) lethal concentrations, and for the establishment of diagnostic concentration for the insecticide resistance monitoring. The frequencies of pirimiphos-methyl resistance were evaluated in eight populations of *S. zeamais* collected in the following municipalities: Votuporanga, Assis, Piracicaba, Ribeirão Preto, Campinas, Morrinhos, Avaré and São Paulo. Toxicity tests were conducted with the synergists PBO (piperonyl butoxide), DEM (diethyl maleate) and DEF (S, S, S tributylphosphorotriothioate) using the most resistant strain of *S. zeamais* to pirimiphos-methyl. In addition, the behavior of pirimiphos-methyl resistant (R) (São Paulo) and susceptible (S) (Assis) strains was studied in maize grains, evaluating the grain consumption and the reproductive rate of the insects. The results showed a variability among the populations of *S. zeamais*, for the susceptibility to the insecticide pirimiphos-methyl, and a population from São Paulo, with resistance intensity of approximately five times and 69% of resistant insects to the organophosphorus insecticide was detected. The tests with the synergists indicated the involvement of metabolizing enzymes, especially esterases, in the resistance of *S. zeamais* to pirimiphos-methyl. The *S. zeamais* susceptible (Assis) and pirimiphos-methyl (São Paulo) resistant strains caused similar damage to maize grains. The pirimiphos-methyl strain (São Paulo) presented adults with lower weight, but with a higher population growth rate, compared to the susceptible strain (Assis), in maize grains.

Keywords: maize weevil, stored grain pest, chemical control.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Populações de <i>Sitophilus</i> coletadas em Dezembro de 2015: origem e quantidade de amostras.....	10
Tabela 2. Testes de toxicidade de pirimifós-metílico em diferentes populações ou linhagens de <i>Sitophilus zeamais</i> : Número total de insetos utilizados para a obtenção das curvas de concentração-resposta (n); estimativa das concentrações letais 50% (CL_{50}) e 95% (CL_{95}) e intervalos de confiança (I.C.) a 95%; coeficiente angular e erro padrão da média (EP); Qui-quadrado (χ^2), grau de liberdade (g.l.) e razões de resistência (RR_{50} e RR_{95}).....	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Sitophilus zeamais</i> vista dorsal.	5
Figura 2. Populações de <i>Sitophilus zeamais</i> em milho.....	10
Figura 3. Linhagens de Assis (S) e de São Paulo (R) de <i>Sitophilus zeamais</i> em milho... 17	
Figura 4. Concentração diagnóstica de pirimifós-metilico para monitoramento da resistência de <i>Sitophilus zeamais</i> ao inseticida organofosforado, utilizando-se como parâmetro as concentrações necessárias para causar 100% de mortalidade em adultos da linhagem suscetível de referência (Votuporanga-SP). Área hachurada da figura corresponde ao intervalo da concentração diagnóstica para o monitoramento da resistência	21
Figura 5. Sobrevivência média (%) de adultos de diferentes populações ou linhagens de <i>Sitophilus zeamais</i> tratados com pirimifós-metilico, em sua concentração diagnóstica (9,40 ppm de i.a.). Colunas com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste t a 5% de significância.....	22
Figura 6. Efeito dos sinergistas DEF (S,S,S-tributilfosforotritioato), DEM (dietil maleato) e PBO (butóxido de piperonila), sobre a toxicidade de pirimifós-metilico em adultos da população São Paulo I de <i>Sitophilus zeamais</i> . Os insetos foram expostos aos sinergistas (contato residual, concentração de 1 mg/mL) por duas horas antes da exposição dos mesmos ao inseticida, aplicado (concentração de 9,40 ppm de i.a.) na superfície interna de tubos de vidro de 20 mL (contato residual por 24 horas). Colunas com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste t a 5% de significância.....	23
Figura 7. Consumo de grãos de milho para as linhagens de <i>S. zeamais</i> resistente a pirimifós-metilico (São Paulo) e suscetível (Assis), aos 42 e 62 dias após o início da infestação.....	24
Figura 8. Número de adultos emergidos em milho para as linhagens de <i>S. zeamais</i> resistente a pirimifós-metilico (São Paulo) e suscetível (Assis), aos 42 e 62 dias após o início da infestação.....	25
Figura 9. Peso de adultos emergidos em milho para as linhagens de <i>S. zeamais</i> resistente a pirimifós-metilico (São Paulo) e suscetível (Assis), aos 42 e 62 dias após o início da infestação.....	26

Figura 10. Relação entre número de adultos emergidos e peso dos adultos emergidos em milho, considerando-se as duas linhagens de *S. zeamais*, resistente a pirimifós-metílico (São Paulo) e suscetível (Assis), aos 62 dias após o início da infestação..... 26

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. Insetos-praga no ambiente de armazenamento e sua importância socioeconômica	3
3.2. Aspectos biológicos de <i>Sitophilus zeamais</i>	4
3.3. Mecanismos de resistência a inseticidas.	5
3.4. Resistência de <i>Sitophilus zeamais</i> a inseticidas.....	7
3.5. <i>Sitophilus zeamais</i> em milho e variedades resistentes	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1. Populações de <i>Sitophilus zeamais</i>	9
4.1.1. Coleta de populações de <i>Sitophilus</i>	10
4.2. Identificação molecular das espécies.....	11
4.2.1. Extração de DNA	11
4.2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	12
4.2.3. Purificação dos produtos de PCR	13
4.2.4. Sequenciamento de DNA.....	13
4.3. Inseticidas químicos e sinergistas.....	14
4.4. Resistência de <i>Sitophilus zeamais</i> a inseticidas.....	14
4.4.1. Bioensaios com inseticidas para obtenção das curvas de concentração-resposta.....	14
4.4.2. Estimativa da concentração diagnóstica para o monitoramento da resistência.....	15
4.4.3. Monitoramento da resistência a pirimifós-metílico	15
4.4.4. Seleção para resistência a inseticidas	16
4.4.5. Caracterização bioquímica da resistência	16
4.4.5.1. Estudos com sinergistas	16
4.6. Comportamento de linhagens resistente e suscetível a inseticida em milho	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1. Populações de <i>Sitophilus zeamais</i>	18
5.1.1. Identificação das espécies	18
5.2. Resistência de <i>Sitophilus zeamais</i> a inseticidas.....	18
5.2.1. Bioensaios com inseticidas	18
5.2.2. Concentração diagnóstica para o monitoramento da resistência	20
5.2.3. Caracterização bioquímica da resistência	22

5.2.3.1. Estudos com sinergistas	22
5.3. Comportamento de linhagens resistente e suscetível a inseticida em milho	24
6. CONCLUSÕES	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

O gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1885 (Coleoptera: Curculionidae), destaca-se como uma das principais pragas do milho armazenado. Os prejuízos oriundos de infestações de *S. zeamais* aos grãos em armazenamento podem ser causados tanto pelas larvas que se desenvolvem no interior dos grãos, como pelos adultos (SANTOS; FONTES, 1990; FARONI; SILVA, 2000).

Os principais prejuízos causados por *S. zeamais* são a perda de massa dos grãos, perda do poder germinativo, perda do valor nutritivo, redução do padrão comercial, perda da qualidade por contaminação da massa de grãos, alterando odor e sabor, além da perda por contaminação por fungos. Contaminações por fungos também podem estar associadas aos danos causados nos grãos por insetos, uma vez que a temperatura na massa de grãos se eleva favorecendo o crescimento de fungos. Grãos infestados por *S. zeamais* são comumente contaminados por *Aspergillus flavus* e aflatoxinas (CASTRO, 2011).

Em testes realizados por Campos e Bitran (1976), para avaliar o prejuízo ocasionado pelo gorgulho do milho, foram registradas perdas de 33% no peso de grãos e aproximadamente 95% de grãos atacados, após 180 dias da infestação, mostrando a importância do manejo adequado dessa praga, uma vez que os insetos causam grandes prejuízos econômicos (PEDOTTI-STRIQUER, 2006).

Para o controle dos insetos-praga são utilizadas grandes quantidades de inseticidas químicos. Porém, esses compostos quando mal utilizados, causam desequilíbrio biológico, além de apresentarem riscos aos aplicadores e ao meio ambiente (SAITO; LUCCHINI, 1998; GALLO et al., 2002). Além disso, o uso indiscriminado de inseticidas químicos pode levar à seleção de populações resistentes de insetos, conforme observado em diversas regiões brasileiras, evidenciando a necessidade de mais estudos sobre estratégias de manejo das pragas, visando preservar a vida útil dos inseticidas pelo maior tempo possível, uma vez que há grande dificuldade para a substituição desses produtos (LORINI, 1998).

Dessa forma, o manejo da resistência das pragas aos inseticidas no ambiente de armazenagem de grãos é uma prática essencial, uma vez que se torna mais difícil controlar essas pragas após o desenvolvimento da resistência aos principais inseticidas recomendados. O manejo da resistência visa reduzir a pressão de seleção e assim retardar o processo da evolução da resistência (LORINI, 1997).

O estudo da resistência de insetos de produtos armazenados a inseticidas é de suma importância, uma vez que, esses estudos podem trazer informações sobre a ocorrência de populações resistentes a determinados inseticidas, permitindo a escolha de estratégias mais adequadas para o controle químico dessas pragas. Nesse aspecto, a utilização de ingredientes ativos eficientes e concentrações adequadas para o controle de *S. zeamais* pode contribuir para a redução nas perdas provocadas por essas pragas, nos custos de controle e nos resíduos tóxicos de inseticidas nos alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

A pesquisa visa fornecer subsídios para o manejo integrado de *S. zeamais* em milho no Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar a suscetibilidade de diferentes populações de *S. zeamais*, coletadas principalmente no estado de São Paulo, ao inseticida pirimifós metílico.

Conduzir estudos com sinergistas para caracterização bioquímica da resistência de *S. zeamais* aos referidos inseticidas.

Avaliar o comportamento de linhagens *S. zeamais* suscetível e resistente a pirimifós metílico, em grãos milho (injúrias causadas em milho e taxa de crescimento populacional da praga).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Insetos-praga no ambiente de armazenamento e sua importância socioeconômica

O aumento na produção de grãos se deu devido ao aumento na demanda desses produtos juntamente com a modernização da agricultura e fatores mercadológicos, gerando maior necessidade de armazenamento (SOARES et al., 2009).

A estimativa para colheita da safra de grãos 2015/16 no Brasil foi de cerca de 186,4 milhões de toneladas. Desse total, o Brasil produziu 66.979,5 mil toneladas de grãos de milho (CONAB, 2016).

O surgimento de danos nos grãos causados por fungos ou carunchos ocorre devido às condições inadequadas e tempo prolongado de armazenamento (CARVALHO; ROSSETTO, 1968).

Os insetos-praga de grãos armazenados são os principais causadores de perdas de produtos estocados, sendo os responsáveis pela perda de quantidade e qualidade de grãos enviados para a comercialização. O grau de infestação e as condições ambientais do local de armazenamento estão diretamente associados com a redução na qualidade dos grãos durante o armazenamento (VIEIRA, 1983; LORINI, 2002). Sendo assim, todos os esforços para o aumento da produção de grãos podem não gerar benefícios à população, se não houver melhoria nas condições de armazenamento e controle das pragas desses produtos (FONTES et al., 2003).

Em países com clima tropical e subtropical, estes insetos apresentam um rápido aumento populacional, devido às condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Nos armazéns e silos, essas pragas encontram abrigo, proteção e farta quantidade de alimentos (BOTELHO, 2006; CAMPOS; ZORZENON, 2006).

Os insetos-praga de grãos armazenados podem ser classificados como pragas primárias, capazes de atacar os grãos inteiros e sadios; e secundárias, que se alimentam dos grãos previamente danificados (PACHECO; DE PAULA, 1995).

Pragas primárias internas caracterizam-se por insetos dotados de mandíbulas desenvolvidas, com as quais rompem as películas protetoras e penetram nos grãos, alimentando-se somente de seu conteúdo interno, completando seu ciclo de desenvolvimento no interior do grão, sendo que, além de mais prejudiciais, abrem

caminho para o ataque de outros insetos (GALLO et al., 2002; CAMPOS; ZORZENON, 2006).

Segundo Santos et al. (1988), aproximadamente 15% do peso total de grãos armazenados no Brasil é perdido devido às infestações por insetos. *S. zeamais*, popularmente conhecido como gorgulho-do-milho, é uma das principais pragas de grãos armazenados de milho no Brasil (GUEDES, 1991).

O uso de inseticidas é o principal método de controle de insetos-praga de produtos armazenados em países tropicais, dentre eles o Brasil. Porém, a utilização destes tem sido limitada, devido à evolução de resistência a esses compostos químicos em várias espécies de insetos associados a grãos armazenados (SUBRAMANYAM et al., 1989; ARTHUR, 2004).

Em virtude do uso indiscriminado de inseticidas para o controle de pragas de grãos armazenados, a resistência a inseticidas em populações do caruncho *S. zeamais* tem sido apontada como um dos principais fatores responsáveis pelo aparecimento de falhas no controle dessa praga (GUEDES; ZHU, 1998; RIBEIRO et al., 2003; FRAGOSO et al., 2003, 2005).

O fenômeno da resistência de pragas a inseticidas é um problema grave, apresentando sérias implicações socioeconômicas (GUEDES et al., 2006).

3.2. Aspectos biológicos de *Sitophilus zeamais*

A espécie *S. zeamais* (Figura 1) é uma praga primária interna e de profundidade. É um inseto polífono e cosmopolita, encontrado principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, atacando milho, trigo, arroz e sorgo. Também podem se desenvolver em produtos de cereais processados como o macarrão (DANHO et al., 2002; CAMPOS; ZORZENON, 2006; ANTUNES; DIONELLO, 2010).

Os adultos possuem coloração castanha escura, com quatro manchas claras nos élitros. Medem de 3 a 5 mm. Possuem cabeça prolongada com rostro recurvado. As antenas são genículo-clavadas, com o primeiro segmento alongado em ângulo reto com os demais segmentos, terminando em uma forma de clava. Possuem asas posteriores bem desenvolvidas (PACHECO; PAULA, 1995; CAMPOS, 2005).

As fêmeas ovipositam individualmente seus ovos nos grãos. Elas abrem orifícios no tegumento do grão e, depois de depositar o ovo, fecham o orifício com uma

substância glandular serosa. As fêmeas podem ovipositar 282 ovos durante sua vida. O número de ovos postos é influenciado pelo tipo de grão e sua umidade, assim como, pela temperatura do ambiente. Elas não ovipositam em grãos que tenham teor de umidade relativa interior abaixo de 12,5% (PACHECO; PAULA, 1995; CAMPOS, 2005; PEREIRA; SALVADORI, 2006).

As larvas são do tipo curculioniformes, apresentam coloração amarela clara, com a cabeça mais escura; e presença de pregas transversais no dorso nos três primeiros segmentos abdominais. Passam por quatro instares larvais antes de atingir o estágio de pupa. O período de desenvolvimento (ovo a adulto) é de aproximadamente 34 dias e a longevidade de adultos pode chegar a 140 dias (PACHECO; PAULA, 1995).



Figura 1. *Sitophilus zeamais* vista dorsal. Foto: Thais L. Lima

3.3. Mecanismos de resistência a inseticidas

O controle químico é a forma mais eficiente de se combater insetos-praga de produtos armazenados, devido à sua rapidez de ação, baixo custo e fácil aplicação. Essa forma de controle vem sendo muito utilizada, em diversos casos, de maneira indiscriminada, favorecendo o aparecimento de falhas no controle dessas pragas, em consequência da seleção de populações resistentes aos produtos químicos utilizados (GUEDES, 1999).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a resistência é uma habilidade de uma população de uma espécie de suportar doses de substâncias tóxicas que seriam letais para a maioria dos indivíduos de uma população normal da mesma espécie.

De acordo com Smith (1970), o termo resistência é aplicado para caracterizar espécies de insetos anteriormente suscetíveis, cuja população não pode mais ser controlada por um dado inseticida, na dose normalmente utilizada ou em nenhuma dose (CERUTI, 2000).

A resistência deve ser vista como um fenômeno pré-adaptativo, sendo assim, o inseticida não induz as mudanças hereditárias, mas somente seleciona em cada geração os genes responsáveis pela resistência, encontrados em poucos indivíduos (BROWN, 1958; CERUTI, 2000).

Segundo Brattsten et al. (1986), a resistência pode ocorrer de maneiras diferentes, sendo que os principais mecanismos de resistência são agrupados em comportamentais, fisiológicos e bioquímicos (RIBEIRO, 2001).

No grupo dos mecanismos comportamentais, podem ser citadas alterações nos órgãos sensoriais e na capacidade de aprendizado dos indivíduos, tendo como consequência, melhoria na habilidade para evitar os efeitos letais de uma substância tóxica (LOCKWOOD, 1984; BRATTSTEN et al., 1986; RIBEIRO, 2001).

No caso dos mecanismos fisiológicos, pode ocorrer o aumento na excreção dos compostos tóxicos do organismo ou, aumento da dificuldade de penetração do inseticida no organismo, ou isolamento das moléculas inseticidas em estruturas inertes no interior do corpo do inseto (BRATTSTEN et al., 2006; OPPENOORTH; WELLING, 1976; RIBEIRO, 2001).

Entre os mecanismos bioquímicos, a detoxificação realizada por enzimas é um dos mais importantes associados à evolução da resistência. Os inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides podem ser detoxificados pela ação de monooxigenases, esterases, hidrolases e/ou glutatona S-transferases. Nesse caso, esses grupos enzimáticos aumentam a polaridade da molécula inseticida, resultando no aumento da excreção desses compostos pelo organismo (GEORGHIOU, 1972; CERUTI, 2000; SCOTT, 1999).

Segundo Guedes et al. (1995), estudos de resistência cruzada e resistência múltipla são de suma importância para determinar possíveis mecanismos de resistência e

auxiliar na escolha de inseticidas adequados para o controle de populações resistentes. O termo resistência cruzada é utilizado quando o organismo apresenta um único mecanismo de resistência que afeta a eficiência de dois ou mais inseticidas, e na resistência múltipla ocorre a presença de vários mecanismos de resistência no organismo, fazendo com que o inseto seja resistente a diversos grupos de inseticidas (CAMPANHOLA, 1990).

O aumento no número de casos de resistência de insetos-praga a inseticidas está associado ao aumento nas frequências de uso e nas doses utilizadas desses compostos (CAMPANHOLA, 1990).

3.4. Resistência de *Sitophilus zeamais* a inseticidas

Segundo o IRAC-MSU (2016), há relatos de populações de *S. zeamais* resistentes a inseticidas, em pelo menos 15 países. No Brasil, foram registrados casos de resistência em oito estados brasileiros, incluindo São Paulo. Foram registrados casos de resistência a dez ingredientes ativos, incluindo DDT, lindane (organoclorados); carbaril (carbamatos); clorpirifós metil, malation (organofosforados); cipermetrina, deltametrina, permetrina (piretroides); indoxacarb (oxadiazinas) e fosfina (inorgânico).

Ribeiro (2001), em testes realizados com 12 populações de *S. zeamais* de diferentes estados brasileiros, constatou que seis dessas populações eram resistentes a cipermetrina, podendo haver falha no controle para esse piretroide. Bioensaios combinando inseticidas com sinergistas sugeriram o envolvimento de esterases na resistência de *S. zeamais* a cipermetrina (RIBEIRO et al., 2003).

Testes realizados por Ceruti e Lázari (2003) indicaram a ocorrência de populações de *Sitophilus oryzae* (Linnaeus), *S. zeamais* e *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera, Bostrichidae) com intensidades de resistência que poderiam afetar a efetividade de deltametrina.

A constatação de populações de *S. zeamais* resistentes a DDT e piretroides foi relatada no Brasil, no início da década de 1990 (GUEDES, 1993; GUEDES et al., 1994). Naquela época, estudos de herança da resistência já indicavam a possibilidade de existência de resistência múltipla e/ou cruzada em populações da praga com elevadas magnitudes de resistência a piretroides. Essa informação foi recentemente confirmada em trabalhos conduzidos por Ribeiro et al. (2003) e Fragoso et al. (2003), tendo sido

evidenciado o aumento da atividade detoxificativa (esterases, glutathione S-transferases) como mecanismo de resistência de *S. zeamais* a piretroides.

Na maioria dos casos de resistência de artrópodes-praga a pesticidas, há algum custo adaptativo associado à população resistente (BOURGUET et al., 2004; NICASTRO et al., 2011), favorecendo o restabelecimento da suscetibilidade na ausência de pressão de seleção. Entretanto, Fragoso et al. (2005), reportaram que o crescimento populacional de uma das populações de *S. zeamais* resistentes a piretroides foi semelhante ao apresentado pela população padrão de susceptibilidade, demonstrando que a resistência a inseticidas em populações dessa praga pode não significar custo fisiológico capaz de modificar sua performance reprodutiva, evidenciando-se a importância da adoção de estratégias visando evitar a evolução da resistência em populações do inseto-praga.

3.5. *Sitophilus zeamais* em milho e variedades resistentes

A elevada incidência de insetos-praga tanto na safrinha como na safra normal tem acarretado o uso intensivo de inseticidas, com elevação dos custos de produção, aumento de resíduos tóxicos em grãos e ocorrência de intoxicações de homens e animais (SENÔ et al., 2005), além do aumento na pressão de seleção para resistência a inseticidas em populações de campo (RIBEIRO et al., 2003; GUEDES et al., 2006). Para minimizar esses problemas, deve-se buscar a introdução de outros métodos de controle, como por exemplo, o uso de variedades resistentes às pragas (ROSSETO, 1972).

Para o desenvolvimento de variedades resistentes às pragas são necessários estudos sobre a detecção de genótipos que sirvam como fonte de resistência (LARA, 1991). Miranda et al. (1995) observaram que as populações híbridas Bonfinópolis, Caiano (Sobralia), Dente de Rato, Bico de Ouro, Sabugo Pino, Brancão, Palha Roxa (Celso Sul de Minas) e BR 451 foram bastante afetadas por insetos-praga no campo, apresentando, entretanto, grãos pouco preferidos pelo caruncho.

Segundo SENÔ et al. (2009), os híbridos de milho que melhor se destacaram quanto à resistência foram o C 701 (Cargill) e o AG3050 (Agromen), sendo os mais resistentes e indicados para plantio em locais com grande pressão de infestação. De acordo com Boiça Júnior et al. (1997), o genótipo C 701 apresenta baixa atratividade a *S. zeamais*, quando comparado com outros genótipos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Populações de *Sitophilus zeamais*

Foram avaliadas populações de *S. zeamais* provenientes de diferentes estados brasileiros, mantidas no Laboratório de Pragas em Horticultura do Instituto Biológico (Figura 2), em sala climatizada a 27 ± 2 °C e umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas, usando grãos de milho (isentos de resíduos de inseticidas) como substrato alimentar. As populações foram coletadas em unidades armazenadoras e lojas agropecuárias que comercializam ração a granel.

A linhagem suscetível de referência (Votuporanga-SP) foi encaminhada pelo Prof. Dr. Raul Narciso Guedes, do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG. Esta linhagem de *S. zeamais* é considerada padrão de suscetibilidade e vem sendo mantida há vários anos em condições de laboratório, livre de qualquer tratamento químico.

Também foram recebidas outras três populações de *S. zeamais*, encaminhadas pelo Dr. Raul Guedes da UFV, provenientes dos municípios de Morrinhos (GO), Votuporanga (SP) e Piracicaba (SP).



Figura 2. Populações de *Sitophilus zeamais* em milho

4.1.1. Coleta de populações de *Sitophilus*

Coletas de amostras de trigo foram realizadas a partir de dezembro de 2015, em unidade de armazenamento do CEAGESP (Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo), localizado no bairro de Jaguaré no município de São Paulo, que recebe grãos de trigo provenientes de diferentes locais da América do Sul.

As amostras foram levadas para o laboratório e após triagem para identificação de presença de insetos, as amostras com maior número de insetos do gênero *Sitophilus* foram acondicionadas em potes plásticos para o crescimento das populações (Tabela 1).

Tabela 1. Populações de *Sitophilus* sp. coletadas em Dezembro de 2015: origem e quantidade de amostras

Origem	Quantidade de Amostras
Paraná	2
São Paulo	2
Argentina	5
Uruguai	1

Foi realizada uma coleta de amostra em São Paulo, SP, em loja agropecuária que vende ração animal a granel, sendo obtida uma população de *Sitophilus* sp.

Além disso, foram obtidas, em abril de 2017, outras quatro populações de *Sitophilus*, procedentes de milho dos municípios de Assis (SP), Ribeirão Preto (SP), Campinas (SP) e Avaré (SP).

4.2. Identificação molecular das espécies

A semelhança morfológica entre os coleópteros do gênero *Sitophilus* dificulta a identificação dessas espécies, principalmente *S. zeamais* e *S. oryzae*, ambas responsáveis por infestações em grãos de trigo, milho, sorgo e também em produtos industrializados secos, como macarrão. A diferença morfológica entre essas espécies,

segundo Kurschel (1961), se encontra principalmente em características na genitália dos insetos.

Dessa forma, para a correta identificação dos insetos coletados, indivíduos das diversas amostras foram submetidos a análise molecular.

4.2.1. Extração de DNA

Cada espécime de inseto (mantido em álcool absoluto) foi colocado sobre papel de filtro a fim de retirar o excesso de álcool, após seco, o espécime foi congelado em nitrogênio líquido e triturado com o auxílio de pistilo de plástico, a fim de fragmentar o exoesqueleto e triturar os órgãos internos.

Foram acrescentados 200 µL de solução de lise, 50 µL de EDTA, 20 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e 5 µL de RNase em cada amostra. Os microtubos foram incubados a 55°C em banho seco com agitação por um período de 3 horas. Foram adicionados 250 µL de Lysisbuffer, seguido de agitação em vortex. O lisado foi transferido para minicoluna e centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos. O filtrado foi descartado e foram adicionados 650 µL de Column Wash solution e centrifugado a 12.000 rpm por 1 minuto, descartando-se o filtrado; esse procedimento foi repetido 4 vezes. A minicoluna foi centrifugada a 12.000 rpm por 3 minutos, foram adicionados 100 µL de Water Nuclease Free, incubando-se por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 12.000 rpm por 1 minuto. O DNA purificado foi armazenado em freezer a -20°C.

4.2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 460 pb do gene COI, foi desenhado o par de iniciadores COI-F (5'-GATTTTTTGGKCA YCCMGAAG-3') e COI-R (5'- CRAATACRGCTCCTATWGATAAWAC-3'), baseado em regiões conservadas do gene de diversas espécies de artrópodes (desenvolvido no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico).

Para a reação de PCR, foram utilizados 1 µL do DNA, 1 µL de cada iniciador a 10 µM, 5 µL de tampão 5X para PCR, 0,5 µL de dNTPs a 10 mM, 0,2 µL de GoTaq DNA polimerase 5U/µL (Promega) e 16,3 µL de água MilliQ estéril, volume total de 25 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (BIORAD-T100™ Thermal Cycler) com o seguinte programa:

- 94 °C por 2 minutos – desnaturação inicial
 - 94 °C por 15 segundos – desnaturação
 - 50 °C por 30 segundos – anelamento
 - 72 °C por 30 segundos – extensão
 - 72 °C por 4 minutos – extensão final
 - 12 °C por tempo indeterminado
- } 40 ciclos

Para verificação da amplificação do produto esperado foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE, adicionando-se brometo de etídeo na concentração final de 0,1 µg/mL. Para cada amostra, foram aplicados 3 µL do produto amplificado adicionado de 1 µL de tampão de carregamento BlueJuice™ 10X (Life Technologies). O marcador de tamanho molecular 1 Kb DNA ladder (Life Technologies) foi utilizado para estimar o tamanho do produto amplificado. A eletroforese foi realizada a 90 V por 30 min. A imagem do gel sobre transiluminador de luz ultravioleta foi capturada em equipamento fotodocumentador digital (Alpha Innotech).

4.2.3. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos da PCR foram purificados seguindo-se o protocolo descrito por Schmitz e Riesner (2006). Foi adicionado ao produto da PCR (46 µL), 1,6 µL de EDTA 0,5 M; 21,0 µL de PEG a 50% e 8,1 µL de NaCl 5 M. Após incubação a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugou-se durante 10 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 125 µL de etanol 70%, centrifugado a 14.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi seco em uma centrífuga a vácuo por 10 minutos. O DNA foi suspenso em 30 µL água de MilliQ esterilizada.

4.2.4. Sequenciamento de DNA

Os produtos purificados foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). A reação de sequenciamento foi realizada em placas de 96 poços de 200 μL e constituiu de 5 μL do produto da PCR purificado, 1,5 μL de tampão de diluição 5X, 1 μL de Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e 0,32 μL de iniciador a 10 μM e 2,18 μL de H_2O . O programa utilizado no termociclador T100 (BioRad) constituiu de:

- 96 °C por 60 segundo
 - 96 °C por 5 segundos
 - 50 °C por 30 segundos
 - 60 °C por 4 minutos
 - 12 °C por tempo indeterminado
- } 40 ciclos

A reação de sequenciamento foi precipitada pela adição de 40 μL de isopropanol 75% em cada amostra e centrifugação a 4.000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa foi centrifugada invertida sobre papel toalha a 1.000 g por 1 minuto. Foram adicionados 100 μL de isopropanol 75% por amostra, o qual foi descartado em seguida. Após nova centrifugação com a placa invertida sobre papel toalha a 1.000 g por 1 minuto, a mesma foi mantida em estufa a 37°C por 30 minutos para secar. As amostras foram retomadas em 10 μL de formamida HiDi (Applied Biosystems) e desnaturadas em termociclador por 2 minutos a 95°C. As amostras foram analisadas em sequenciador capilar 3500 XL (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas com o uso do programa BioEdit versão 7.2.5 (HALL, 2013).

4.3. Inseticida químico e sinergistas

Para a condução dos bioensaios em laboratório, foi adquirido o inseticida: pirimifós-metílico (Actellic[®] 500 EC, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. – São Paulo, organofosforado), registrado no Brasil, para o controle de *S. zeamais* em produtos armazenados.

Os sinergistas PBO (butóxido de piperonila, 98%); DEM (dietil maleato, 98%); DEF (S,S,S – tributilfosforotrioato, 98%), foram adquiridos da Chem Service Inc. (PA, EUA).

4.4. Resistência de *Sitophilus zeamais* a inseticidas

4.4.1. Bioensaios com inseticidas para obtenção das curvas de concentração-resposta

As populações de *S. zeamais* utilizadas neste estudo foram provenientes dos seguintes municípios: São Paulo, Votuporanga, Piracicaba e Morrinhos.

Os bioensaios (por contato residual) foram conduzidos seguindo-se a metodologia descrita por Guedes et al. (1996). O inseticida, diluídos em acetona (150 µL), foi distribuído uniformemente na área interna de frascos cilíndricos de vidro transparente de 20 mL de volume (OLIVEIRA et al., 2005). Para a obtenção das curvas de concentração-resposta, foram utilizadas 5 a 7 concentrações de pirimifós-metílico, para cada população de *S. zeamais* avaliada. O tratamento testemunha foi constituído por recipientes impregnados somente por acetona.

Após o tratamento dos frascos e secagem dos inseticidas aplicados, foram confinados em cada frasco, 20 indivíduos adultos não sexados de *S. zeamais*, que ficaram expostos ao inseticida, por 24 horas. Ao término desse período, realizou-se a avaliação da mortalidade do inseto-praga. O inseto foi considerado morto quando não apresentou habilidade suficiente para coordenar suas atividades locomotoras e não conseguiu caminhar por uma distância mínima equivalente ao seu comprimento do corpo (OLIVEIRA et al., 2005).

O experimento foi inteiramente casualizado com pelo menos quatro repetições, totalizando 80 insetos por concentração do inseticida, para cada população avaliada.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit (FINNEY, 1971), utilizando-se o programa Polo Plus (LEORA SOFTWARE, 2003), para a estimativa das concentrações letais 50% (CL₅₀) de cada inseticida, para as diferentes populações avaliadas.

4.4.2. Estimativa da concentração diagnóstica para o monitoramento da resistência

Para a estimativa da diagnóstica, foi realizado bioensaio de sensibilidade ao inseticida pirimifós-metílico, utilizando-se a linhagem de Votuporanga-SP, considerada suscetível de referência a inseticidas.

A definição de uma concentração diagnóstica (ou discriminatória) facilitaria o monitoramento da resistência de *S. zeamais* a inseticidas, podendo-se estimar a porcentagem de insetos resistentes em cada população coletada, utilizando-se apenas uma única concentração do inseticida avaliado.

A concentração diagnóstica (ou discriminatória) seria aquela capaz de matar 100% dos indivíduos suscetíveis, sem afetar os resistentes. De acordo com Halliday e Burnham (1990), o uso dessa concentração para o monitoramento da resistência é mais eficiente que o estudo baseado na estimativa da CL_{50} , podendo-se detectar a resistência em populações em que a frequência de indivíduos resistentes ainda se mostra baixa.

4.4.3. Monitoramento da resistência a pirimifós-metílico

As populações avaliadas neste estudo foram obtidas de milho nos municípios de Assis, Piracicaba, Ribeirão Preto, Campinas, Morrinhos e Avaré, e de ração animal em São Paulo. Utilizou-se a linhagem de Votuporanga como padrão de suscetibilidade.

Após o recebimento dos insetos, eles foram criados em milho isento de resíduos de inseticidas, por pelo menos uma geração, em condições de laboratório (25°C), antes da realização dos testes toxicológicos.

Os testes toxicológicos foram realizados seguindo-se a mesma metodologia descrita no item 4.4.1, utilizando-se a concentração discriminatória estimada para pirimifós-metílico.

Foram utilizados pelo menos 100 adultos (4 repetições de 20 insetos), para a obtenção da frequência de resistência de *S. zeamais*, para cada população avaliada.

As percentagens de mortalidade para cada população de *S. zeamais* foram corrigidas através da fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925), transformadas para $\arcsen\sqrt{x/100}$. As médias de sobrevivência foram comparadas pelo teste *t* a 5% de significância.

4.4.4. Seleção para resistência a inseticidas

Foram realizadas seleções para resistência a pirimifós-metílico, utilizando-se a população de *S. zeamais* (São Paulo) mais resistente encontrada para o referido inseticida. A concentração inicial utilizada foi a que causou aproximadamente 60% de mortalidade na população estudada.

4.4.5. Caracterização bioquímica da resistência

4.4.5.1. Estudos com sinergistas

Foram iniciados testes com os sinergistas: PBO (butóxido de piperonila), DEM (dietil maleato), DEF (S,S,S-tributilfosforotritioato)], seguindo-se a metodologia descrita por Ribeiro et al. (2003).

O PBO é um inibidor de monoxigenases dependentes do citocromo P-450; DEM é inibidor de glutationa-S-transferases; e DEF é inibidor de esterases (FOURNIER et al., 1987).

Os sinergistas, na concentração 1 mg/mL (RIBEIRO et al., 2003), foram impregnados na parede interna de frascos de vidro de 20mL, conforme descrito anteriormente. Foram colocados 20 insetos adultos em cada frasco, mantendo-se os mesmos em contato com os sinergistas por um período de duas horas. Após esse período, os insetos foram transferidos para novos frascos de vidro previamente tratados com diferentes concentrações do inseticida organofosforado pirimifós-metílico.

O experimento foi inteiramente casualizado com quatro repetições. As percentagens de mortalidade para cada população ou linhagem de *S. zeamais* foram corrigidas através da fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925).

Para fins de análise estatística, os dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$. As médias de sobrevivência foram comparadas pelo teste *t* a 5% de significância. As análises foram realizadas utilizando-se o programa Bio Estat 5.0 (AYRES et al., 2007).

4.6. Comportamento de linhagens resistente e suscetível a inseticida em milho

Avaliou-se o comportamento de duas linhagens de *S. zeamais*: uma resistente ao organofosforado pirimifós-metílico (São Paulo, selecionada para resistência ao inseticida) e uma suscetível ao inseticida (Assis) em grãos de milho.

A metodologia do estudo foi baseada em SENÔ et al. (2009). Para avaliar o efeito da infestação de *S. zeamais* sobre os grãos de milho, foram pesados 90,0 gramas de milho, os quais foram acondicionados em potes plásticos, liberando-se em seu interior 20 insetos adultos (não sexados). Posteriormente, os potes foram fechados para evitar a fuga dos insetos. Para cada linhagem foram utilizadas 5 repetições, submetidas à ambiente controlado, em sala climatizada com temperaturas entre 26 e 28°C (Figura 3), por um período de 62 dias. Aos 42 e 62 dias após o início da infestação dos insetos em milho, foi realizada a contagem de insetos emergidos e a pesagem dos grãos. Na avaliação final, também foi feita a pesagem dos adultos emergidos em cada pote.



Figura 3. Linhagens de Assis (S) e de São Paulo (R) de *Sitophilus zeamais* em milho.

Para fins de análise estatística, os dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$. O consumo de grãos, o número e o peso dos insetos emergidos por parcela foram comparados pelo teste *t* a 5% de significância. As análises foram realizadas utilizando-se o programa Bio Estat 5.0 (AYRES et al., 2007).

Realizou-se, também, análise de correlação entre o peso dos adultos e o número de insetos emergidos em cada parcela, estimando-se o coeficiente de correlação de Pearson (AYRES et al., 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Populações de *Sitophilus zeamais*

5.1.1. Identificação das espécies

As análises moleculares mostraram que todas as populações coletadas em trigo no CEAGESP pertenciam à espécie *S. oryzae*. A população coletada de ração animal no município de São Paulo (População São Paulo) e as demais populações (Assis, Ribeirão Preto, Campinas, Avaré), procedentes de milho, foram identificadas como sendo da espécie *S. zeamais*.

Rosseto (1969) reportou que a distribuição geográfica de *S. zeamais* e *S. oryzae* poderia ser influenciada pela temperatura e umidade, sendo a primeira espécie encontrada com maior frequência em milho e distribuída de maneira generalizada no estado de São Paulo e a segunda espécie encontrada com maior frequência na região tritícola, com clima mais frio e úmido no sul do estado. Esse relato corrobora os resultados obtidos através das análises moleculares, pelas quais houve a confirmação da presença de apenas *S. oryzae* nas amostras de trigo coletadas no CEAGESP, não tendo sido detectada a presença de *S. zeamais* no referido material.

5.2. Resistência de *Sitophilus zeamais* a inseticidas

5.2.1. Bioensaios com inseticidas

Os resultados indicam variabilidade quanto à suscetibilidade ao inseticida pirimifós-metílico nas diferentes populações avaliadas de *S. zeamais*. Com relação à CL_{50} , o maior contraste foi observado entre a população de São Paulo (coletada de ração animal) e a de Morrinhos (GO), sendo que, a população de São Paulo mostrou-se 4,6 vezes mais resistente que a de Morrinhos.

Considerando-se a CL_{95} , a população de São Paulo mostrou-se 5,1 vezes mais resistente que a linhagem de Votuporanga, considerada suscetível de referência a inseticidas (Tabela 2).

A população de São Paulo apresentou a menor suscetibilidade ao inseticida organofosforado, entre todas as populações avaliadas no presente trabalho (Tabela 2).

Não foram observadas diferenças significativas entre a população de Morrinhos e as de Piracicaba e Votuporanga, havendo sobreposição dos intervalos de confiança (a 95%) das concentrações letais 50% (CL_{50}) de pirimifós-metílico (Tabela 2).

A resistência de *S. zeamais* a DDT e piretroides foi reportada por diversos autores (GUEDES et al., 1994, 1995; RIBEIRO et al., 2003), porém, a resistência ao organofosforado pirimifós-metílico não foi observada em populações desta espécie em um estudo realizado por Ribeiro et al. (2003), que envolveu a coleta de amostras de milho, em diferentes localidades brasileiras (Bragança Paulista, SP; Campos dos Goytacazes, RJ; Cristalina, GO; Fatima do Sul, MS; Ivinhema, MS; Jacarezinho, PR; Nova Andradina, MS; Penápolis, SP; São José do Rio Preto, SP; Sete Lagoas; MG; Uberlândia, MG).

Baixas magnitudes de resistência ($RR < 14,1$ vezes) a inseticidas organofosforados (fenitrotion) também foram observadas por Corrêa et al. (2011), em populações de *S. zeamais* coletadas em diferentes regiões (Sul, Sudeste, Centro Oeste) brasileiras.

Tabela 2. Testes de toxicidade de pirimifós-metílico em diferentes populações ou linhagens de *Sitophilus zeamais*: Número total de insetos utilizados para a obtenção das curvas de concentração-resposta (n); estimativa das concentrações letais 50% (CL_{50}) e 95% (CL_{95}) e intervalos de confiança (I.C.) a 95%; coeficiente angular e erro padrão da média (EP); Qui-quadrado (χ^2), grau de liberdade (g.l.) e razões de resistência (RR_{50} e RR_{95}).

População/ Linhagem	n	CL_{50} (ppm) (I.C. 50%)	CL_{95} (ppm) (I.C. 95%)	Coeficiente Angular \pm EP	χ^2	g.l.	RR_{50}^*	RR_{95}^{**}
São Paulo	400	15,04 (13,49 – 18,11)	28,68 (22,38 – 45,67)	5,86 \pm 0,93	4,89	3	3,40	5,13
Votuporanga	400	4,43 (4,31 – 4,54)	5,59 (5,31 – 6,05)	16,30 \pm 2,05	0,45	2	1	1
Piracicaba	400	3,71 (3,19 – 4,11)	9,41 (8,28 – 11,44)	4,07 \pm 0,50	0,91	3	0,83	1,68
Morrinhos	400	3,28 (0,61 – 4,37)	8,72 (6,54 – 18,50)	3,87 \pm 0,93	0,65	3	0,74	1,55

* $RR_{50} = CL_{50} R$ dividido pela $CL_{50} S$

** $RR_{95} = CL_{95}$ dividido pela $CL_{95} S$

5.2.2. Concentração diagnóstica para o monitoramento da resistência

Os testes utilizando pirimifós-metílico indicaram mortalidade de 100% de adultos da linhagem de *Votuporanga-SP*, a partir das concentrações de 6,25 ppm de i.a., como pode ser observado na Figura 4.

A concentração diagnóstica escolhida para os estudos de monitoramento da resistência de *S. zeamais* a pirimifós-metílico foi de 9,40 ppm de i.a., equivalente à $CL_{99,9}$ de pirimifós-metílico para a linhagem de *Votuporanga*, que apresentou os mais baixos valores de CL_{95} , entre as linhagens avaliadas, não diferindo estatisticamente das populações de *Morrinhos* e *Piracicaba*, com relação à CL_{50} .

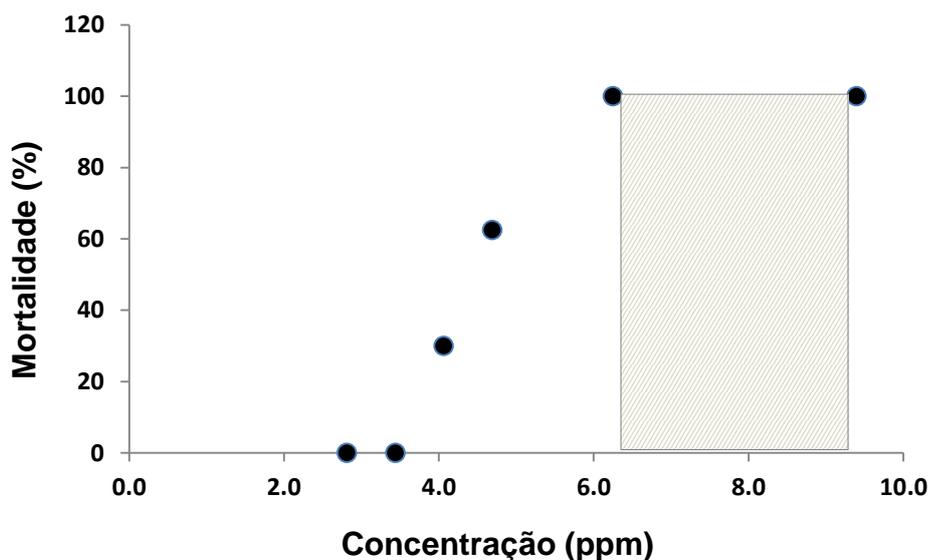


Figura 4. Concentração diagnóstica de pirifós-metilico para monitoramento da resistência de *Sitophilus zeamais* ao inseticida organofosforado, utilizando-se como parâmetro as concentrações necessárias para causar 100% de mortalidade em adultos da linhagem suscetível de referência (Votuporanga-SP). Área hachurada da figura corresponde ao intervalo da concentração diagnóstica para o monitoramento da resistência.

Utilizando-se a concentração diagnóstica de 9,40 ppm de i.a., foi possível observar uma elevada porcentagem (68,8%) de insetos resistentes na população São Paulo, diferindo estatisticamente das demais populações avaliadas (Figura 5).

As linhagens/populações de Votuporanga, Piracicaba, Assis e Ribeirão Preto apresentaram as mais baixas frequências de resistência ($\leq 1,25\%$). Frequências intermediárias de resistência (16,2 a 23,8%) foram observadas para as populações de Campinas, Avaré e Morrinhos (Figura 5).

Elevadas porcentagens de insetos resistentes (até 100%) a piretroides (cipermetrina, deltametrina, permetrina) também foram detectadas em algumas populações brasileiras (ex.: Jacarezinho) de *S. zeamais* (RIBEIRO et al., 2003).

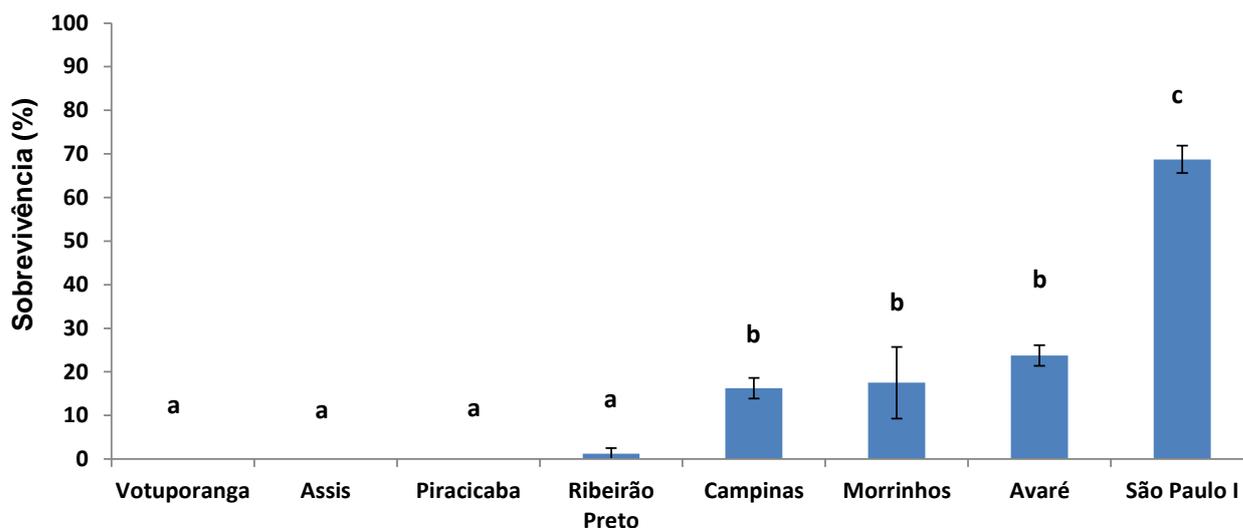


Figura 5. Sobrevivência média (%) de adultos de diferentes populações ou linhagens de *Sitophilus zeamais* tratados com pirimifós-metílico, em sua concentração diagnóstica (9,40 ppm de i.a.). Colunas com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste *t* a 5% de significância.

5.2.3. Caracterização bioquímica da resistência

5.2.3.1. Estudos com sinergistas

Os estudos com sinergistas indicam que um aumento no metabolismo enzimático estaria envolvido na resistência de *S. zeamais* a pirimifós-metílico, com destaque para as esterases, devido ao maior efeito sinérgico obtido com o uso de DEF (S,S,S-tributilfosforotrioato), que seria um inibidor inespecífico de esterases. Nesse caso, observou-se um aumento significativo ($F = 144,8$; g.l. = 7, 24; $p < 0,0001$) na mortalidade de adultos de *S. zeamais*, que passou de 31,2%, quando tratados apenas com pirimifós-metílico, para 82,2%, quando os insetos foram tratados previamente com DEF (Figura 6).

As esterases são enzimas hidrolíticas que podem mediar a clivagem hidrolítica de ésteres em ácido e álcool. Tem sido reportado que inseticidas de diferentes grupos químicos, tais como organofosforados, carbamatos e piretroides, seriam metabolizados pela ação de enzimas esterases (BARATA et al. 2004; HUANG; OTTEA, 2004; KONUŞ, 2015).

Os outros sinergistas (PBO e DEM) também induziram aumentos na mortalidade causada pelo inseticida, porém, em uma proporção menor que a verificada para DEF (Figura 6).

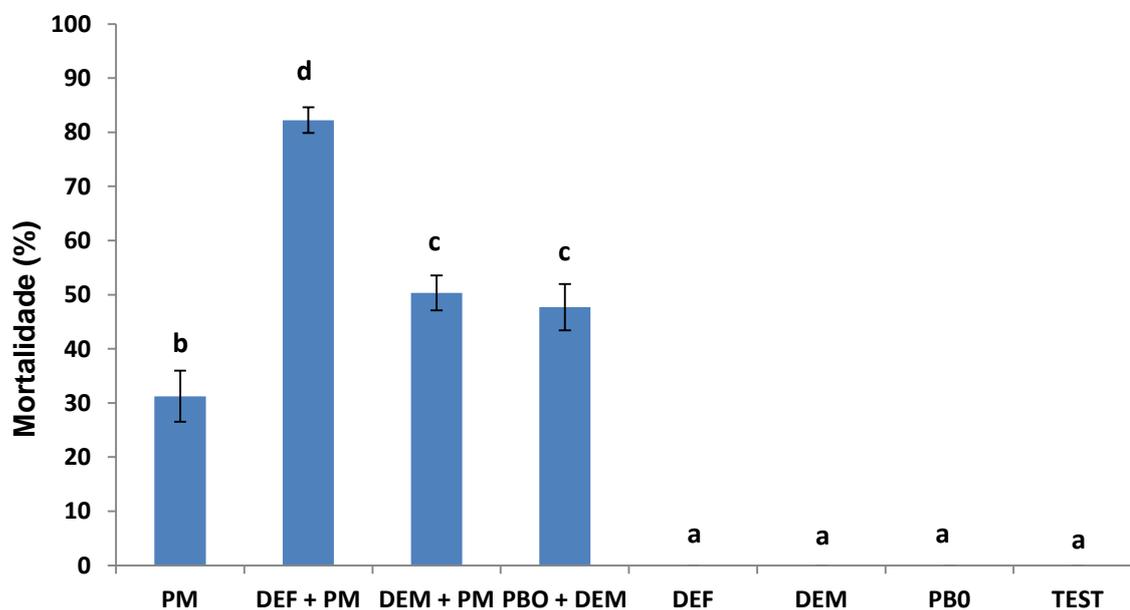


Figura 6. Efeito dos sinergistas DEF (S,S,S-tributilfosforotrioato), DEM (dietil maleato) e PBO (butóxido de piperonila), sobre a toxicidade de pirimifós-metílico em adultos da população São Paulo de *Sitophilus zeamais*. Os insetos foram expostos aos sinergistas (contato residual, concentração de 1 mg/mL) por duas horas antes da exposição dos mesmos ao inseticida, aplicado (concentração de 9,40 ppm de i.a.) na superfície interna de tubos de vidro de 20 mL (contato residual por 24 horas). Colunas com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste *t* a 5% de significância.

O envolvimento de esterases na resistência de pragas a inseticidas também foi reportado para diversas espécies de importância econômica (ex.: *Plutella xylostella*; *Culex* spp., *Myzus persicae*) incluindo *S. zeamais* (DOICHUANNGAM et al., 1989; MONTELLA et al., 2012; GORDON; OTTEA, 2012; BASS et al., 2014; KONUŞ, 2015).

5.3. Comportamento de linhagens resistente e suscetível a inseticida em milho

Os estudos de comportamento de *S. zeamais* mostraram um consumo de grãos de milho semelhante para as linhagens suscetível (Assis) e resistente a pirimifós-metílico (São Paulo), nas avaliações realizadas aos 42 dias ($t = 0,86$; g.l. = 8; $p = 0,475$) e 62 dias ($t = 0,15$; g.l. = 8; $p = 0,878$) após o início da infestação dos insetos em milho (Figura 7). Os resultados indicam que os insetos das duas linhagens causariam danos semelhantes aos grãos.

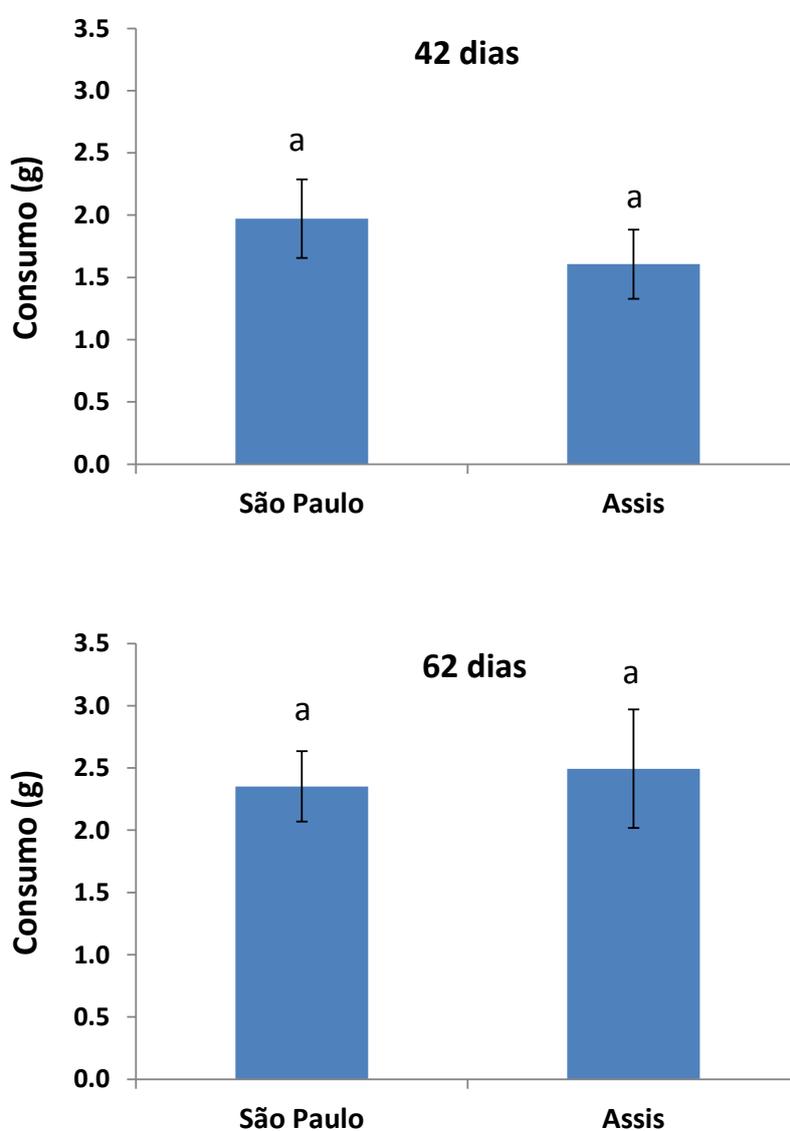


Figura 7. Consumo de grãos de milho para as linhagens de *S. zeamais* resistente a pirimifós-metílico (São Paulo) e suscetível (Assis), aos 42 e 62 dias após o início da infestação.

No caso da taxa de crescimento populacional de *S. zeamais* em milho, observou-se maior número de adultos emergidos para a linhagem resistente (São Paulo) a pirimifós-metílico, em relação à suscetível (Assis), nas avaliações realizadas aos 42 dias ($t = 7,13$; g.l. = 8; $p < 0,0001$) e 62 dias ($t = 7,98$; g.l. = 8; $p < 0,0001$) após o início da infestação (Figura 8).

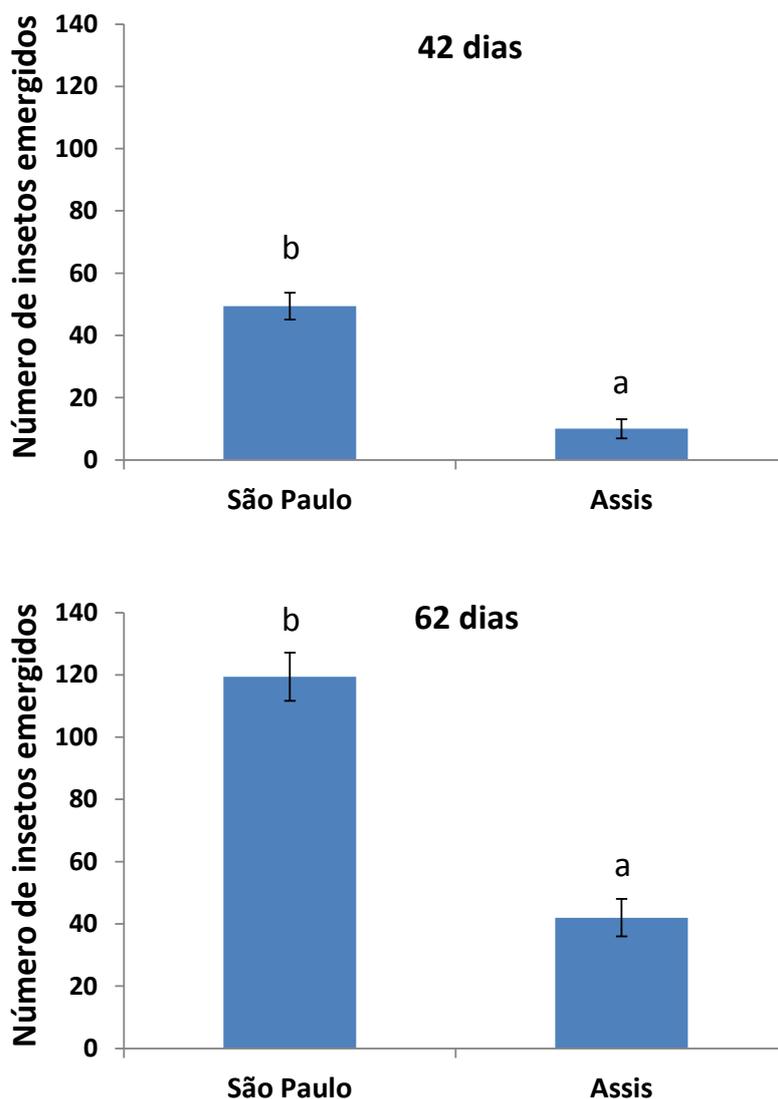


Figura 8. Número de adultos emergidos em milho para as linhagens de *S. zeamais* resistente a pirimifós-metílico (São Paulo) e suscetível (Assis), aos 42 e 62 dias após o início da infestação.

Considerando-se, porém, o porte dos insetos emergidos, observou-se que o peso dos adultos da linhagem suscetível (Assis) foi 2,3 vezes maior que o dos adultos da linhagem resistente (São Paulo) (Figura 9).

Nesse caso, o peso dos adultos (Figura 9) foi inversamente proporcional ao número de adultos emergidos, que foi em média 2,8 vezes maior para a linhagem resistente (Figura 8), aos 62 dias após o início da infestação, observando-se uma correlação negativa e significativa ($t = 7,179$; $r = - 0,938$, g.l. = 7, $p = 0,0002$) entre número de insetos e o peso dos insetos emergidos (Figura 10).

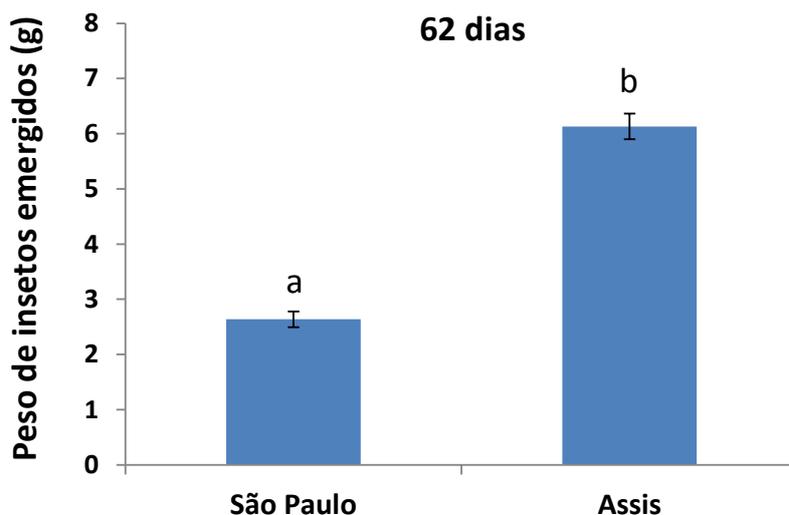


Figura 9. Peso de adultos emergidos em milho para as linhagens de *S. zeamais* resistente a pirimifós-metílico (São Paulo) e suscetível (Assis), aos 42 e 62 dias após o início da infestação.

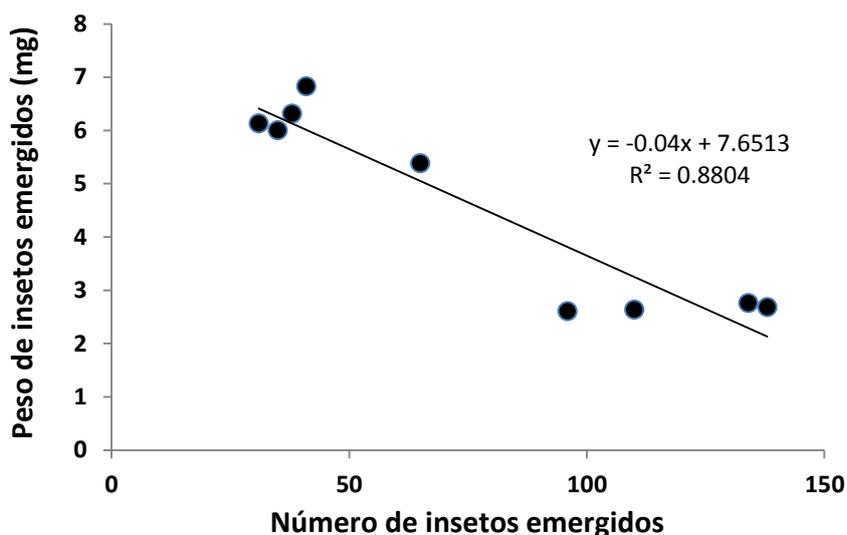


Figura 10. Relação entre número de adultos emergidos e peso dos adultos emergidos em milho, considerando-se as duas linhagens de *S. zeamais*, resistente a pirimifós-metílico (São Paulo) e suscetível (Assis), aos 62 dias após o início da infestação.

Os resultados indicam ausência de custo adaptativo significativo na linhagem de *S. zeamais* resistente ao inseticida organofosforado. Apesar do menor porte dos insetos da linhagem resistente, eles apresentaram maior taxa de crescimento populacional, mostrando-se até mais bem adaptados e competitivos que os da linhagem suscetível, mesmo em condições de ausência de resíduos de inseticidas químicos nos grãos.

Essa maior taxa de crescimento populacional, observada para a linhagem São Paulo de *S. zeamais*, representa uma característica favorável à evolução da resistência a inseticidas, devido à maior possibilidade de variabilidade genética para resistência entre os descendentes, que ocorreriam em maior número em cada geração (ROUSH; MCKENZIE, 1987).

Na maioria dos casos, há algum custo adaptativo associado à resistência de artrópodes a inseticidas, geralmente em função da alocação de recursos para metabolizar os inseticidas nas linhagens resistentes, levando a reduções nas taxas de reprodução e/ou aumento no ciclo de vida dos insetos resistentes (BERTICAT et al., 2002; COUSTAU et al., 2000).

No entanto, processos de seleção para resistência em longo prazo podem levar a mudanças ou seleções de genes que servem para mitigar os custos adaptativos da resistência a inseticidas (MCKENZIE; BATTERHAM, 1994; MCKENZIE; O'FARRELL, 1993).

Este parece ser o caso da linhagem São Paulo de *S. zeamais* que apresentou maior potencial reprodutivo em grãos de milho que a linhagem suscetível (Assis). Uma das possíveis explicações para o fenômeno seria um aumento na competitividade por acasalamento dos machos da linhagem R, favorecendo o aumento na taxa de reprodução dos insetos resistentes. Esse comportamento já foi reportado por outros autores para *S. zeamais* (RIBEIRO et al. 2007).

Um melhor desempenho da linhagem resistente da praga em comparação com a linhagem suscetível, como observado no presente estudo, representa uma séria preocupação para o manejo da resistência da praga a inseticidas, devido à tendência de não restabelecimento da suscetibilidade (mesmo na ausência de pressão de seleção), com potencial para aumento na proporção dos indivíduos resistentes a inseticidas nos depósitos de grãos armazenados no Brasil (RIBEIRO et al., 2007).

6. CONCLUSÕES

Há variabilidade entre as populações brasileiras de *S. zeamais*, quanto à suscetibilidade ao inseticida pirimifós-metílico, tendo sido detectada uma população procedente de São Paulo, com intensidade de resistência de aproximadamente cinco vezes e 69% de insetos resistentes.

Há envolvimento de enzimas metabolizadoras, com destaque para as esterases, na resistência de *S. zeamais* a pirimifós-metílico.

As linhagens de *S. zeamais* suscetível (Assis) e resistente a pirimifós-metílico (São Paulo) causam danos semelhantes aos grãos de milho.

A linhagem de *S. zeamais* resistente a pirimifós-metílico (São Paulo) apresenta adultos de menor peso, porém, com maior taxa de crescimento populacional, em relação à suscetível (Assis), em grãos de milho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W.S. A method for computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p. 265-267, 1925.
- ARTHUR, F. H. Evaluation of a new insecticide formulation (F2) as a protectant of stored wheat, maize and rice. **Journal of Stored Product Research**, v. 40, p. 317-330, 2004.
- AYRES, M.; AYRES JUNIOR., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá/CNPq, 2007. 324p.
- BARATA, C., SOLAYAN, A.; PORTE, C. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p.125-139, 2004.
- BASS, C.; PUINEAN, A.M.; ZIMMER, C.T.; DENHOLM, I. et al. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.51, p.41-51, 2014.
- BERTICAT, C.; BOQUIEN, G.; RAYMOND, M.; CHEVILLON, C. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. **Gen Res**, v.79, p.41-47, 2002.
- BOIÇA, A.L.; LARA, F.M.; GUIDI, F.P. Resistência de genótipos de milho ao ataque de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, n.3, p.481-485, 1997.
- BOTELHO, A. C. G. Efeito da radiação gama (^{60}Co) sobre a proteína arcelina e avaliação de linhagens de feijoeiro a *Acanthoscelides obtectus* (Say) e *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Col.: Bruchidae) 2006. 115f. Tese (Doutorado em Ciências – Área: Entomologia) - FFCLRP – Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- 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, n.1, p.128-135, 2004.
- 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.
- BROWN, A. W. A. 1958. **Insecticide resistance in arthropods**. Geneva, World Health Organization, 148p.
- CAMPANHOLA, C. Resistência de insetos a inseticidas: importância características e manejo. Jaguariuna: Embrapa-CNPDA, 1990. 45p.
- CAMPOS, T.B. Pragas dos grãos armazenados. In: XII Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico: Pragas Agroindustriais. Ribeirão Preto, SP. p.7-19, 2005.
- CAMPOS, T.B.; BITRAN E.A. Avaliação experimental de prejuízos causados por *Sitophilus zeamais* Motschulsky em milho ensacado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15., Maceió, 1976. Resumos... Maceió: SEB. p.121. 1976
- CAMPOS, T.B.; ZORZENON, F.J. Pragas dos grãos e produtos armazenados. Instituto Biológico: São Paulo, 47p., 2006. (Boletim técnico n. 17)

CARVALHO, R.P.L.; ROSSETO, C.J. Biologia de *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera: Bruchidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.13, p.105-107, 1968.

CASTRO, F.L.F. Interação entre fungos toxigênicos (*Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*) e carunchos (*Sitophilus zeamais*) em amostras de grãos de milho. Tese. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2011. 111p.

CERUTI, F.C. Detecção da resistência de coleópteros de produtos armazenados a inseticidas através de bioensaios e marcadores moleculares. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná. 2000. 32p.

CERUTI, F.C.; LÁZARRI, S.M.N. Utilização de bioensaios e marcadores moleculares para detecção da resistência de coleópteros de produtos armazenados a inseticidas. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.47, n.3, p.447-453, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_09_15_18_32_boletim_12_setembro.pdf Acesso em: 27/09/2016.

CORRÊA, A.S.; PEREIRA, E.J.G.; CORDEIRO, E.M.G.; BRAGA, L.S.; GUEDES, R.N.C. Insecticide resistance, mixture potentiation and fitness in populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). **Crop Protection**, v. 30, p. 1655-1666, 2011.

COUSTAU, C.; CHEVILLON, C.; FRENCH-CONSTANT, R. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost?. **Trends Ecol Evol**, v.15, p.378-383, 2000.

DOICHUANGAM, K.; THORNHILL, R.A.; MYERS, M.S. The role of non-specific esterases in insecticide resistance to malathion in the diamondback moth *Plutella xylostella*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v.93, n.1, p. 81-85, 1989.

FARONI, L.R.D'A.; SILVA, J.S. Manejo de pragas no ecossistema de grãos armazenados. In: Silva, J.S. (Ed.) Secagem e armazenagem de produtos agrícolas. Viçosa, Aprenda Fácil, 2000. P.345-383.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge Univ. Press, London, 1971.

FOURNIER, D.; CUANY, A.; PRALAVORIO, M.; BRIDE, J.M.; BERGE, J.B. Analysis of methidathion resistance mechanism in *Phytoseiulus persimilis* A.H. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.28, n.2, p.271-278, 1987.

FRAGOSO, D.B.; GUEDES, R.N.C.; REZENDE, S.B. Glutathione Stransferase detoxification as a potential pyrethroid resistance mechanism in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.109, p.21-29, 2003.

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.

FONTES, L.S.; ALMEIDA FILHO, A.J. de; ARTHUR, V. Danos causados por *Sitophilus oryzae* (Linné, 1763) e *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.3, p.303-307, 2003.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES J.R.S.; OMOTO, C. **Manual de Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 920p. 2002.

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

GORDON, J.R.; OTTEA, J. Association of esterases with insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Economic Entomology**, v.105, n.3, p.971-978, 2012.

GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, E.E.; GUEDES, N.M.P.; RIBEIRO, B.; 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., SANTOS, J.P., 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. Resistência a inseticidas: desafio para o controle de pragas de grãos armazenados. **Seiva**, v. 50, p24-29, 1991

GUEDES R.N.C. *et al*; Altered acetylcholinesterase associate with organophosphate resistance in **Rhyzoperta dominica** (F) (Col., Bostrichidae) populations from Brazil and United States. **Journal of Applied Entomology**, v. 58, p. 269-273, 1998.

GUEDES, R.N.C.; FERREIRA, G. H.; CORRÊA, A. S. Resistência a inseticidas em pragas de produtos armazenados: situação atual e perspectivas. In: *Pragas dos grãos e produtos armazenados*. São Paulo Instituto Biológico, p. 31-34. (Boletim Técnico 16). 2005.

GUEDES, R. N. C. Detecção e herança de resistência ao DDT e piretróides em *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1993. 67 p.

GUEDES, R.N.C., LIMA J.O.L., SANTOS J.P.; CRUZ C.D. Inheritance of deltamethrin resistance in a Brazilian strain of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Mots.). *Int. J. Pest Manag.* 40: 103-106. 1994.

HALL, T. A. BioEdit v 7.2. 3. Biological sequence alignment editor for Win 95/98/NT/2K/XP7Ibis Biosciences Carlsbad, California, 2013.

HALLIDAY, W.R.; BURNHAM, K.P. Choosing the optimal diagnostic dose for monitoring insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 83, p. 1151-1159, 1990.

HUANG, H. AND OTTEA, J.A. Development of pyrethroid substrates for esterases associated with pyrethroid resistance in the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (F.). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.52, p.6539-6545, 2004.

IRAC-MSU - Insecticide Resistance Action Committee – Michigan State University. Arthropod Pesticide Resistance Database. Disponível em: <http://www.pesticideresistance.org>. Acesso em: 04 Dez 2016.

KONUŞ, M. Malathion resistance mediated by detoxification enzymes in *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae). **Fresenius Environmental Bulletin**, v.24, n.6, p. 2146-2151, 2015.

LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. 2. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1991. 336p.

LEORA SOFTWARE. In: ROBERTSON, J.L.; PREISLER, H.K.; RUSSEL, R.M. (eds). **A user's guide to probit or logit analysis**. LeOra software, Berkeley, p.7-11, 2003.

LORINI, I et al. Detection and characterisation of strong resistance to phosphine in Brazilian *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *Pest Management Sci* 63: 358-364. 2007.

LORINI, I.; MIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. (Ed.) **Armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Bio Geneziz, Seção 7, p. 378-397, 2002.

McKENZIE, J.A.; BATTERHAM, P. The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. **Trends Ecol Evol**, v.9, p.166-169, 1994.

McKENZIE, J.A.; O'FARRELL, K. Modification of developmental instability and fitness: malathion-resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Genetica**, v.89, p.67-76, 1993.

MIRANDA, M. M. M. et al. Detecção de não-preferência a *Sitophilus zeamais* Mots. em espigas e grãos de 49 populações de milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 20, n.1/2, p. 21-25, 1995.

MONTELLA, I.R.; SCHAMA, R.; VALLE, D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n.4, p.437-49, 2012

NICASTRO, R.L.; SATO, M.E.; SILVA, M.Z. Fitness costs associated with milbemectin resistance in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. **International Journal of Pest Management**, v.57, n.3, p.223-228, 2011.

OPPENORTH, 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.

PACHECO, I.A.; PAULA, D.C. **Insetos de grãos armazenados** – Identificação e biologia. Fundação Cargill. Campinas, 228p, 1995.

PEDOTTI-STRIQUER, L. et al. Ação repelente de plantas medicinais e aromáticas sobre *Sitophilus zeamais* (coleoptera: curculionidae). *Ensaio e ciência: ciências biológicas, agrárias e da saúde*, vol. 10, núm. 1, abril, 2006, pp. 55-62 Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=26012756006> Acesso em: 08/01/2015.

PEREIRA, P.R.V.S.; SALVADORI, J.R. 2006. Identificação dos principais Coleoptera (Insecta) associados a produtos armazenados. Embrapa – Empresa Brasileira de Agropecuária. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/852530/1/pdo75.pdf>. Acesso em: 07/01/2015.

ROUSH, R.T.; McKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, v.32, p.361-380, 1987.

RIBEIRO, B. M. Resistência de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) a Inseticidas: Detecção e Mecanismos. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais. 2001. 51p.

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 Environmental Contamination and 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.35, p.21-31, 2003.

ROSSETO, C. J. O Complexo de *Sitophilus* spp (Coleoptera: Curculionidae) no estado de São Paulo, **Bragantia**, v. 28, n. 10, p. 127-148, 1969.

SAITO, M. L.; LUCCHINI, F. **Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente**. 46p. Jaguariúna: Embrapa, 1998.

SANTOS, J.P.; FONTES, R.A. Armazenamento e controle de insetos no milho estocado na propriedade agrícola. **Informe Agropecuário**, v.14, n.165, p.40-45, 1990.

SANTOS, J.P.; FONTES, R.S.; CAJUEIRO, I.V.M.; BIANCO, R.; SEPULCRI, O.; LAZZARINI, W.; BEDANI, J.L. Determinação de perdas por insetos no milho armazenado em pequenas propriedades do estado do Paraná. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 16, Belo Horizonte, 1986. Anais. Sete Lagoas, EMBRAPA-CNPMS, 1988. p.254-75.

SATO, M.E. Resistência de insetos pragas em grãos armazenados. **O Biológico**, v.70, n.2, p.93-95, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical biochemistry*, v. 354, n. 2, p. 311–313, 2006.

SCOTT, J. G. Cytochromes p450 and insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.29, p.757-777, 1999.

SENÔ, K.C.A.; SEGATELLI, E.K.; PEREIRA, F.A.C.; MINE, É.T.; NEVES, M.C.T.; SILVA, P.T. Resistência de sete genótipos de milho (*Zea mays*, L.) ao ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855. **Nucleus**, v.6, n.2, p. 167-180, 2009.

SMITH, R.F. 1970. Pesticides: their use and limitations in pest management, p.103-113. In: **Concepts of pest management**. Raleigh, North Carolina State University.

SOARES, M.A.; ZANUNCIO, J.C.; LEITE, G.L.D.; REIS, T.C.; SILVA, M.A. Controle biológico de pragas em armazenamento: uma alternativa para reduzir o uso de agrotóxicos no Brasil? **Unimontes Científica**, v.11, n.1/2, 2009

SUBRAMANYAM, BH.; HAREIN, P.K.; CUTKOMP, L. Organophosphate resistance in adults of red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and Sawtoothed grain beetle (Coleoptera: Cucujidae)

infesting barley stored on farms in Minnesota. **Journal of Economic Entomology**, v.82, p.989-995, 1989.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, Imprensa Universitária, 1983. 231p.