DAIANNA PEREIRA COSTA

RESISTÊNCIA A INSETICIDAS NEUROTÓXICOS E SEUS MECANISMOS EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Leucoptera coffeella*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa *campus* de Rio Paranaíba, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Rio Paranaíba - MG
2013

Ana Paula de Souza
Bibliotecária - Documentalista
Matrícula: 10840-5/UFV

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da Biblioteca UFV - Campus de Rio Paranaíba

C837r

Costa, Daianna Pereira, 1987-
Resistência a inseticidas neurotóxicos e seus mecanismos em população brasileira *leucoptera coffella* / Daianna Pereira Costa. – Rio Paranaíba, MG, 2013.
Viii, 36 f. : il. ; 29cm.

Orientador: Flávio Lemes Fernandes.
Dissertação (mestrado) em Agronomia - Universidade Federal de Viçosa.

1.Bicho mineiro do cafeeiro – Controle.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 635

DAIANNA PEREIRA COSTA

RESISTÊNCIA A INSETICIDAS NEUROTÓXICOS E SEUS MECANISMOS EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Leucoptera coffeella*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa *campus* Rio Paranaíba, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de *Magister Scientiae.*

APROVADA: 30 de julho de 2013

_____	_____
Liliane Evangelista Visôtto	Ézio Marques da Silva
(coorientadora)	(coorientador)

_____
Marco Aurélio Guerra Pimentel

_____
Flávio Lemes Fernandes
(orientador)

Aos meus pais, Silvanio Rodrigues Costa e Profira Pereira da Costa, e minha irmã Silwanna Pereira Costa, com carinho, por todo amor, companheirismo e apoio.

DEDICO.

"Será preciso, contudo, ser cauteloso com aquilo que fizer, e no que acreditar; é necessário que não tenha medo da própria sombra, e que aja com equilíbrio, prudência e humanidade, de modo que o excesso de confiança não o torne incauto, e a desconfiança excessiva não o faça intolerante." Nicolau Maquiavel

AGRADECIMENTOS

Aos meus país Silvanio Rodrigues Costa e Profira Pereira da Costa, pois foram grandes incentivadores, contribuindo com valiosos ensinamentos, motivação, apoio e amor.

À minha amada irmã Silwanna Pereira Costa por todo seu apoio, amizade, amor e conselhos de sabedoria. A amiga e irmã de coração Fabiola Rodrigues de Sena.

Aos colegas de mestrado Diego Sichocki, Diego Tolentino, Rafael Pereira, Roney Gotti, Urbano Guimarães e em especial as amigas Roxana Mendes, Larissa Melo e Juliana Martins por todo companheirismo.

Aos colegas do grupo manejo integrado de pragas e graduandos da UFV-crp Flavia Maria, Jéssica Gorri, Ítalo Silva, Ana Paula, Ana Vaz, Ana Cecília, Francisco Pinheiro, Pedro Luis, Paulo Roberto, Laís Pucci, Denise Cambraia, Jéssica Amaral por toda contribuição durante a pesquisa, em especial ao Juno Diniz pela dedicação, empenho e amizade.

À Fernanda Araújo, Laísa Ferreira, Denise e Andreia de Oliveira pelo convívio e companheirismo.

Aos docentes e servidores da Universidade Federal de Viçosa *campus* de Rio Paranaíba que contribuirão para a conclusão do curso.

Aos coorientadores Liliane Evangelista Visôtto e Ézio Marques da Silva juntamente com o orientador Flávio Lemes Fernandes.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de ensino superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS **vi**

RESUMO **vii**

ABSTRACT **viii**

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. MATERIAL E MÉTODOS.....4

2.1. Obtenção das populações.....4

2.2. Inseticidas.....5

2.3. Bioensaios.....7

2.3.1. Dose-mortalidade.....7

2.3.2. Tempo-mortalidade.....7

2.4. Ensaios Bioquímicos.....8

2.4.1. Obtenção do extrato.....8

2.4.2. Análise do teor de proteínas totais.....8

2.4.3. Determinação da atividade de fosfotriesterase.....9

2.4.4. Determinação da atividade de acetilcolinesterase.....9

2.4.5. Determinação da atividade de glutationa S-transferase.....10

2.5. Análise dos dados.....10

3. RESULTADOS.....12

3.1. Bioensaios de mortalidade.....12

3.2. Toxicidade relativa (CL_{50}) 14

3.3. Tempo Letal (TL_{50}).....18

3.4. Análises bioquímicas.....23

4. DISCUSSÃO.....24

5. CONCLUSÕES.....28

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....29

LISTA DE ABREVIATURAS

µL = microlitro (s)

µM = microMolar (s)

Ache = acetilcolinesterase

CE = concentrado emusionável

cm = centímetro (s)

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

g = grama (s)

GST = glutationa S-transferase

i.a = ingrediente ativo

L = litro (s)

M = Molar (s)

min = minuto (s)

mL = mililitro (s)

mm = milímetro (s)

mM = milimolar (es)

NaOH = hidróxido de sódio

nm = nanômetro (s)

ºC = graus Celsius

pH = potencial hidrogeniônico

rpm = rotações por minuto

WG = granulado dispersível

ΔA = variação da absorvância

RESUMO

COSTA, DAIANNA PEREIRA, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa *campus* de Rio Paranaíba, julho de 2013. **Resistência a inseticidas neurotóxicos e seus mecanismos em populações brasileiras de *Leucoptera coffeella*.** Orientador: Flávio Lemes Fernandes. Coorientadores: Ézio Marques da Silva e Liliane Evangelista Visôtto.

Dentre as pragas incidentes na cafeicultura o bicho-mineiro-do-cafeeiro, *Leucoptera coffeella*, é considerada uma praga-chave. O uso do controle químico tem sido o principal método empregado, a contínua utilização de inseticidas pode provocar a perda de eficácia e a seleção de populações de bicho-mineiro resistentes. Para diagnosticar a possível resistência a inseticidas de populações brasileiras do bicho-mineiro, avaliou-se as respostas de seis populações de *L. coffeella* expostas a inseticidas em distintas doses e tempos, e avaliação bioquímica das lagartas. Os inseticidas utilizados foram: abamectina (18 CE g de i.a./L), clorantraniliprole (350WG g de i.a./L), clorpirifós (480 CE g de i.a./L), deltametrina (25 CE g de i.a./L), profenofós (550 CE g de i.a./L), tiametoxam (250 WG g de i.a./L) e tiametoxam+ciproconazol (600 WG g de i.a./L). Os ensaios bioquímicos foram: avaliação de proteínas totais, atividade especifica enzimática de fostotriesterase, acetilcolinesterase e glutationa S-transferase. Todas as populações de *L. coffeella* apresentaram resistência a pelo menos um inseticida. indicando que o seu uso deve ser evitado. As populações resistentes aos respectivos inseticidas, são: Abaeté dos Mendes-MG: clorpirifós, clorantraniliprole e profenofós; Carmo do Paranaíba-MG: abamectina, clorantraniliprole e deltametrina; Franca-SP: tiametoxam; Guaranhuns-PE: abamectina e clorpirifós; Rio Paranaíba-MG: clorantraniliprole, deltametrina, profenofós, tiametoxam e tiametoxam+ciproconazol; Santa Tereza-ES: abamectina, clorpirifós, deltametrina e tiametoxam+ciproconazol. Clorpirifós e profenofós apresentaram no presente estudo resistência cruzada. Os inseticidas com maior tempo letal nas respectivas populações, são: Carmo do Paranaíba-MG: deltametrina; Rio Paranaíba-MG: deltametrina; Abaeté dos Mendes-MG: clorpirifós; Guaranhuns-PE: clorantraniliprole. A atividade específica da enzima fosfotriesterase esta envolvida na resistência do inseticida profenofós referente a população de Franca-SP.

ABSTRACT

COSTA, DAIANNA PEREIRA, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa *campus* de Rio Paranaíba, July 2013. **Neurotoxic insecticide resistance and its mechanisms in Brazilian populations of Leucoptera coffeella.** Adviser: Flávio Lemes Fernandes. Co-Adviser: Ézio Marques da Silva e Liliane Evangelista Visôtto.

Among the pests incidents in the coffee leaf miner, the coffee, *Leucoptera coffeella*, is considered a key pest. The use of chemical control has been the main method used the continued use of pesticides can result in loss of efficacy and selection of populations of leaf miner resistant. To diagnose possible insecticide resistance in populations of the Brazilian miner, evaluated the responses of six populations of *L. coffeella* exposed to insecticides in different doses and times, and biochemical evaluation of caterpillars. The insecticides used were: abamectin (18 CE g de i.a./L), chlorantraniliprole (350WG g de i.a./L), chlorpyrifós (480 CE g de i.a./L), deltamethrin (25 CE g de i.a./L), profenofos (550 CE g de i.a./L), thiamethoxam (250 WG g de i.a./L) e thiamethoxam+cyproconazole (600 WG g de i.a./L). Biochemical assays were: the evaluation of total proteins, specific activity of enzyme phosphotriesterase, acetylcholinesterase and glutathione S-transferase. All populations of *L. coffeella* showed resistance to at least one insecticide. indicating that its use should be avoided. Populations resistant to the respective insecticides are: Abaeté dos Mendes-MG: chlorpyrifos, chlorantraniliprole and profenofós; Carmo do Paranaíba-MG: abamectin, chlorantraniliprole e deltamethrin; Franca-SP: thiamethoxam; Guaranhuns-PE: abamectin e chlorpyrifos; Rio Paranaíba-MG: chlorantraniliprole, deltamethrin, profenofos, thiamethoxam e thiamethoxam+cyproconazole; Santa Tereza-ES: abamectin, chlorpyrifos, deltamethrin and thiamethoxam+cyproconazole. Chlorpyrifos and profenofos in the present study showed cross-resistance. Insecticides with longer lethal in their populations, are: Carmo do Paranaíba-MG: deltamethrin; Rio Paranaíba-MG: deltamethrin; Abaeté dos Mendes-MG: chlorpyrifos; Guaranhuns-PE: chlorantraniliprole. The specific activity of the enzyme is involved in resistance phosphotriessterase the insecticide profenofos linking population of Franca-SP.

1. INTRODUÇÃO

O controle de insetos pragas na agricultura moderna tem encontrado desafios, como perdas de eficiência e seletividade de inseticidas, dificuldades na tecnologia de aplicação, não direcionamento do princípio ativo ao alvo e resistência dos insetos pragas (APRD, 2013; IRAC, 2013).

A resistência aos inseticidas é consequência da seleção de indivíduos que estão predispostos geneticamente em sobreviver as doses que são letais para a maioria da população suscetível (Li et al., 2007). O primeiro relato de resistência constatado ocorreu em 1914, para cochonilha *Quadraspidiotus perniciosus* (Comstock, 1881) (Hemiptera: Diaspididae), exposta a doses repetidas de enxofre em pó (Messing & Croft, 1982).

Os relatos dos casos de resistência aumentaram a partir de 1940 após o surgimento dos inseticidas e acaricidas organossintéticos. Existem mais de 7740 casos de resistência registrados a 331 compostos, envolvendo mais de 540 espécies de insetos e ácaros pragas (Whalon et al., 2008). Estes estudos também relatam que no período de 1914/2007 a grande maioria dos casos de resistência vêm ocorrendo na ordem Diptera, com 2265 casos, seguida da ordem Lepidoptera com 1799 casos confirmados. Em relação a resistência de lepidópteros a inseticidas, há vários trabalhos relevantes como Silva et al. (2011a) que verificaram a resistência da traça do tomateiro, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) aos inseticidas dos grupos benzoiluréias e benzoilfeniluréia; Silva et al. (2011b) detectaram resistência do curuquerê do algodoeiro, *Alabama argilacea* (Lepidopter: Noctuidae) a piretróide, e Oliveira et al. (2011) e Silva et al. (2012) observaram a resistência da traça das brássicas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) a oxadiazinas, benzoilureias e piretróides.

Dentre os lepidópteros pragas, o bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) é considerado praga chave da cafeicultura com relatos de resistência aos organofosforados na Tanzânia, África e em diversas regiões de Minas Gerais (Bardner & Mcharo, 1988; Fragoso et al., 2003). Esse problema aumenta o risco do sucesso da cafeicultura nacional, visto que,

o Brasil é o maior produtor mundial, com destaque para os estados de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo (CONAB, 2013).

O bicho-mineiro (*L. coffeella*) é um microlepidóptero com ciclo biológico entre 19 a 87 dias, sendo ovo: 5-10 dias, larva: 9-40 dias e pupa: 4-26 dias (Vega et al., 2006; Michereff et al., 2007). Após a eclosão dos ovos, as lagartas penetram na folha através da epiderme e se dirigem ao parênquima paliçádico, iniciando sua alimentação e formação de galerias (Ramiro et al., 2004). A confecção das galerias reduzem a taxa fotossintética das plantas reduzindo a produção e a longevidade do cafeeiro (Michereff et al., 2007).

Apesar do conhecimento das características biológicas de *L. coffeella*, pouco se conhece sobre os mecanismos de resistência envolvidos a essa praga aos inseticidas. Em geral, os mecanismos de resistência aos inseticidas estão relacionados a redução na penetração do inseticida na cutícula, a alteração no sítio de ação do composto e fatores bioquímicos como aumento da taxa metabólica do inseticida devido atividade de esterases, monoxigenases dependentes do citocromo P450 e glutathiona S-transferases (Kostaropoulos et al., 2001; Baffi et al., 2008; Brooke, 2008).

Diante dos distintos fatores ligados a resistência de isentos praga a inseticidas o mecanismo bioquímico é mais frequente, devido principalmente ao aumento da destoxificação metabólica diante da ação do inseticida (Scott, 1999). Os mecanismos de detoxificação dos inseticidas podem acionar processos de biotransformação, os quais são responsáveis pela transformação enzimática do inseticida em uma outra substância, por meio de alterações bioquímicas (Fukuto & Mallipudi, 1983).

As reações de biotransformação são catalisadas por um sistema multi-enzimático. Neste processo, ocorre a modificação química da molécula exógena ao inseto no, qual participam as enzimas esterases e monoxigenases. Apartir deste momento ocorre a conjugação, mediada principalmente pela glutationa S-transferases, e a compartimentalização e/ou excreção dos metabólitos não tóxicos gerados (Frova, 2006). Essas enzimas agem de maneira integrada, minimizando a quantidade e o tempo de permanência do inseticida no organismo do inseto, levando ao aumento da atividade das enzimas detoxificadoras podendo resultar na resistência bioquímica (Sheehan et al., 2001).

Apesar da importância da resistência dessa praga aos inseticidas, os trabalhos realizados são poucos, e envolvem pequenos grupos de inseticidas, e populações

locais sem uma maior abrangência. Ainda há carência de informações do tempo letal de ação dos inseticidas e quais as causas envolvidas na resistência. Assim objetivou-se neste estudo identificar as populações brasileiras de *L. coffeella* resistentes aos inseticidas neurotóxicos, assim como determinar o tempo letal de sua ação e os possíveis mecanismos envolvidos com a resistência envolvidos.

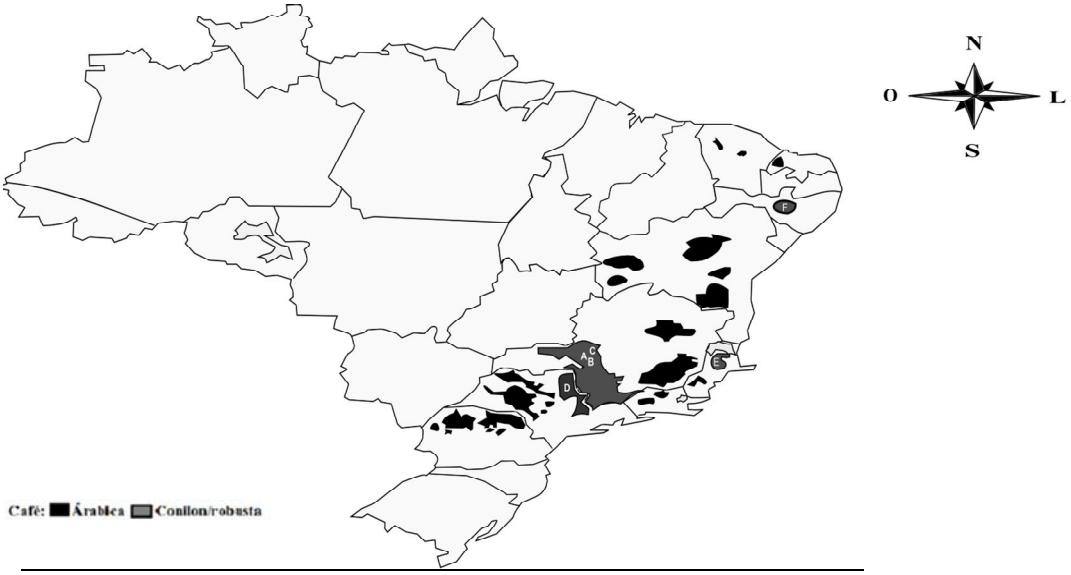
2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das populações

Este estudo foi conduzido em seis municípios produtores de café das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, localizados em regiões produtoras dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Pernambuco (Figura 1). Para tanto, coletou-se folhas do terço médio de plantas, aleatoriamente em lavouras comerciais durante as safras agrícolas 2011/2012 e 2012/2013, com minas ativas (lagartas vivas) de *L. coffeella*. Essas lavouras foram georreferenciadas com auxílio de um GPS portátil Garmin E-trex Summit Hc (Figura 1).

As folhas coletadas foram transportadas em sacos plásticos para o Laboratório de Manejo Integrado de Pragas da Universidade Federal de Viçosa *campus* de Rio Paranaíba-MG, para a seleção visual de minas que não apresentassem nenhum dano (abertas ou com sinal de parasitismo/predação). As folhas com minas selecionadas foram utilizadas para iniciarem as criações em casa de vegetação.

As folhas coletadas foram acondicionadas no interior de gaiolas de madeira (90 x 90 x 90 cm), revestidas com tecido de organza, em frascos com água, para a manter a turgescência das mesmas e desta forma possibilitar a formação de insetos adultos. Em seguida, os adultos foram transferidos para uma gaiola de oviposição com mudas de café da variedade Catuaí vermelho, cultivadas em saquinhos plásticos no interior da casa de vegetação. Após a oviposição, as mudas com os ovos de *L. coffeella* foram transferidas para outra gaiola para a criação das lagartas.



Ref.	Local	Coordenadas[€]	Temperatura (ºC) e precipitação pluviométrica [mm] anuais	Altitude (m)
A	Rio Paranaíba-MG	-19,21; -46,14	21,30 [1478]	1071
B	Abaeté dos Mendes-MG[€€]	-19,17; -46,09	21,30 [1478]	849
C	Carmo do Paranaíba-MG	-19,04; -46,22	21,25 [1478]	1120
D	Franca-SP	-20,58; -47,43	21,05 [1644]	907
E	Santa Tereza-ES	-19,93; -40,59	21,50 [1162]	174
F	Guaranhuns-PE	-8,89; -36,49	22,05 [857]	900

[€] Graus decimais, valores positivos são para o Norte (latitude) e o Leste (longitude) os valores negativos são para o Sul (latitude) e o Oeste (longitude). [€€] Município de Rio Paranaíba- MG.

Figura 1. Localização e caracterização dos locais de coleta de *Leucoptera coffeella* nas regiões produtoras de café. As letras maiúsculas de A a F indicam os locais de coleta das populações no mapa.

2.2. Inseticidas

Os inseticidas selecionados para os bioensaios de resistência de *L. coffeella* foram: abamectina (18 CE g de i.a./L), clorantraniliprole (350 WG g de i.a./L), clorpirifós (480 CE g de i.a./L), deltametrina (25 CE g de i.a./L), profenofós (550 CE g de i.a./L), tiametoxam (250 WG g de i.a./L) e tiametoxam + ciproconazol (600 WG g de i.a./L) assim escolhidos por enquadrarem nos principais grupos químicos utilizados em cafeeiro para controle de *L. Coffeella* (MAPA 2013) (Tabela 1).

Tabela 1. Inseticidas, grupos químicos e doses utilizadas nos bioensaios.

Inseticida	Grupo químico	Dose*	Mecanismo de ação	Fabricante
Abamectina 18CE	Avermectina	0,026	Ativador dos canais de cloro	Syngenta LTDA
Clorantraniliprole 350WG	Antranilamida	0,078	Modulador de receptores de rianodina	Du Pont do Brasil S.A
Clorpirifós 480CE	Organofosforado	4,800	Inibidores de acetilcolinesterase	Dow Agrosciences LTDA
Deltametrina 25CE	Piretróide	0,013	Modulador dos canais de Na^{++}	Bayer S.A
Profenofós 550CE	Organofosforado	1,100	Inibidores de acetilcolinesterase	Syngenta LTDA
Tiametoxam 250WG	Neonicotinóide	2,000	Agonista de acetilcolina (AA)	Syngenta LTDA
Tiametoxam+ciproconazol 600WG	Neonicotinóide+Triazol	1,500	AA e bloqueio na biossíntese de Ergosterol	Syngenta LTDA

***** Dose (mg de i.a/mL) recomendada no controle de *Leucoptera coffeella*.

2.3. Bioensaios

2.3.1. Dose-mortalidade

Para a análise da dose-mortalidade, discos circulares (Φ 90 mm) de papel-filtro foram imersos nas soluções de inseticidas diluídas em água destilada até a completa embebição do papel, utilizando as concentrações recomendadas pelos fabricantes e MAPA para o controle de *L. coffeella* (Tabela 2). Como controle foram utilizados discos embebidos com água destilada. Os discos contendo os inseticidas e a água foram pendurados em um varal, para secagem à sombra, posteriormente, os discos foram acondicionados separadamente em placas de Petri (9,0 x 1,5 cm). Em seguida, dez lagartas de *L. coffeella* provindas da criação foram transferidas para cada placa com auxílio de um pincel de ponta fina. As placas com as lagartas foram mantidas em câmara incubadora do tipo B.O.D (modelo SP-500) à temperatura de 25 ± 1ºC, até o momento da avaliação da mortalidade. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com oito tratamentos e quatro repetições (Método adaptado de Fragoso, 2002).

Teste preliminares utilizando apenas discos embebidos em água, foram realizados afim de observar a mortalidade de lagartas em um período de 48 horas. Isso foi necessário para se estimar o tempo máximo de avaliação após a montagem dos bioensaios que causasse uma mortalidade inferior a 20% na testemunha (Szendrei et al., 2012). Os insetos foram reconhecidos como mortos quando incapazes de locomoverem mediante o toque com pincel de ponta fina. Os testes preliminares demonstraram que o tempo máximo de exposição aos inseticidas deveria ser de 48 horas para a avaliação da mortalidade das lagartas. Para detectar as faixas de concentrações que causam mortalidade superior a zero e inferior a 100%, foram realizados testes com a dose recomendada, subdose e uma acima da dose recomendada. Após o estabelecimento do índice de mortalidade destas três doses, foram efetuados testes com concentrações crescentes, no intervalo das faixas de concentrações que causam mortalidade superior a zero e inferior a 100% (Método adaptado de Fragoso, 2002)

2.3.2. Tempo-mortalidade

A instalação e o delineamento experimental foram os mesmos utilizados para o bioensaio dose-mortalidade. As concentrações dos inseticidas utilizados foram as doses recomendadas para o controle de *L. coffeella* (MAPA, 2013).

As avaliações da mortalidade foram efetuadas a 2, 6, 12, 16, 24, 32 e 48 horas após a montagem do bioensaio, sendo considerados mortos os insetos incapazes de locomoverem-se mediante toque com pincel de ponta fina.

2.4. Ensaios Bioquímicos

Os ensaios bioquímicos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, Bioquímica e Genética Molecular da Universidade Federal de Viçosa campus de Rio Paranaíba. Foram determinadas atividades de fosfotriesterase, acetilcolinesterase, glutationa S-transferase e a concentração proteica dos extratos de lagartas de *L. coffeella* referente a Abaeté dos Mendes, Carmo do Paranaíba, Rio Paranaíba e Franca.

2.4.1. Obtenção do extrato enzimático

Um total de sessenta lagartas de *L. coffeella* foram retiradas de folhas com minas ativas e subdivididas em dois tubos de falcon de 14 mL. Os trinta insetos destinados a análise de fosfotriesterase foram acondicionados em 3 mL de solução tampão glicina - NaOH 0,05 M, pH 8,0 e os outros trinta, destinados para as análises de acetilcolinesterase e glutationa S-transferase foram colocados em 3 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,5 contendo 0,3% de triton X100. Os tubos contendo os insetos com seus respectivos tampões foram armazenados a -20º C em freezer tipo vertical até sua utilização nos ensaios. Esse procedimento foi realizado em triplicada para cada população testada.

No momento das análises os extratos foram descongelados em banho de gelo e macerados em almofariz de porcelana com auxílio de um pistilo. Em seguida, os extratos foram centrifugados em uma centrífuga de bancada digital (Cientec) a 10.000 rpm, durante 5 minutos para as análises de fosfotriesterase e 15 minutos para os ensaios de acetilcolinesterase e glutationa S-transferase. O material obtido foi mantido em banho de gelo até o final das análises.

2.4.2. Análise do teor de proteínas totais

As concentrações de proteínas totais dos extratos dos insetos foram determinadas de acordo o método de Bradford (1976), usando soro albumina bovina (Sigma-Aldrich) como proteína padrão.

2.4.3. Determinação da atividade de fosfotriesterase

Um volume de 100 µL do sobrenadante dos extratos de cada amostra de *L. coffeella* foram colocados em seis tubos de ensaio previamente numerados. Em seguida foram adicionados a cada tubo 700 µL de solução tampão NaOH-glicina 0,05 M, pH 8,0 e 500 µL de solução de paroxom 3 mM (Sigma-Aldrich). Como controle da reação foram acrescentados em três tubos 100 µL de solução tampão NaOH-glicina 0,05 M, pH 8,0, contendo ácido etilenodiaminotetracético 60 mM (Sigma-Aldrich) inibindo assim a atividade da fosfotriesterase. Todos os tubos foram incubados em banho maria (Hydrosan) à 37º C por 24 horas. Após este período, mensurou-se a absorvância das amostras em espectrofotômetro (Modelo SP22), utilizando o comprimento de onda de 405 nm (Guedes et al., 1997). O ensaio foi realizado em três repetições e em triplicata.

A atividade específica da fosfotriesterase, foi calculada através da fórmula descrita abaixo:

$$\text{Atividade total} = \Delta A \frac{(\text{sem EDTA - com EDTA})}{\frac{24 \text{ horas} \times 1000}{17000\text{M} \times 1{,}0 \text{ cm}}} = \mu\text{M/h/mL}$$

$$\text{Atividade específica} = \frac{\Delta A \text{ total } (\mu\text{M/h/ml})}{\text{proteína total (mg/mL)}} = \mu\text{M /h/mg de proteína}$$

2.4.4. Determinação da atividade de acetilcolinesterase

Para a determinação da atividade de acetilcolinestarase foram utilizados 500 µL de solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5, 300 µL de ácido 5,5'-ditiobis [2-nitrobenzóico] (Sigma-Aldrich) e 100 µL do extrato dos insetos. O conteúdo de cada tubo foi homogeneizado em agitador de tubos tipo vórtex e transferido para uma cubeta na qual foi acrescentado 100 µL de acetilcolina. Em seguida, foi efetuada a leitura da absorvância no espectrofotômetro (modelo SP22) a 405 nm em intervalos de 30 segundos durante sete minutos (método adaptado de Karunaratne & Plapp, 1993). O ensaio foi realizado em três repetições e em triplicata.

A atividade específica da acetilcolinesterase foi calculada através da fórmula descrita abaixo:

Atividade total AChe = $\frac{(\Delta A/min) \times 1000 \times (\text{fator de diluição})}{0{,}000136}$ = µM/min/mL

Atividade específica AChe = $\frac{\text{Atividade total AChe (µM/min/mL)}}{\text{proteína total (mg/mL)}}$ = µM/min/mL

2.4.5. Determinação da atividade de glutationa S-transferase

No ensaio da determinação da atividade da enzima glutationa S-transferase foram utilizados 1000 µL de glutationa 15 mM (Sigma-Aldrich) e 20 µL de 3,4-dicloro-2,4-nitrobenzeno (DCNB)150 mM (Sigma-Aldrich). Os reagentes foram homogeneizados e mantidos em repouso por três minutos, a temperatura ambiente Posteriormente, 250 µL do extrato dos insetos foram adicionados ao tubo de ensaio e todo o conteúdo foi transferido para uma cubeta, onde efetuou-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro (modelo SP22) a 340 nm durante cinco minutos em intervalo de 30 segundos (Método adaptado de Yu,1982, 1984). O ensaio foi realizado em três repetições e em triplicata.

A atividade específica da glutationa S-transferase foi calculada através da fórmula descrita abaixo:

Atividade total GST = $\frac{(\Delta A/min) \times 100 \times (\text{fator de diluição})}{10 M^{-1} cm^{-1}}$ = µM/min/mL

Atividade específica GST = $\frac{\Delta A \text{ total GST (µM/min/mL)}}{\text{proteína total (mg/mL)}}$ = µM/min/mL

2.5. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos dos bioensaios de dose-mortalidade e tempo-mortalidade, referente a cada população, foram corrigidos pelo número de insetos mortos na testemunha, usando a fórmula de Abbott (1925). As mortalidades corrigidas de cada inseticida e população foram submetidas à análise de probit ($p > 0{,}05$) (Finney, 1971), utilizando-se o procedimento PROC PROBIT do SAEG. Foram determinadas as concentrações letais (CL_{50}) de cada população testada, e posteriormente calculou-se as razões de resistência (RR_{CL50}), onde RR_{CL50} = Maior CL_{50} do inseticida testado / menor CL_{50} do mesmo inseticida. A RR_{CL50} indica quantas vezes uma população é mais resistente em comparação a outra, quando o limite de confiança não é igual a um.

No bioensaio tempo-mortalidade após obter o tempo letal para matar 50% da população (TL_{50}), foi possível obter a razão do tempo letal (RR_{TL50}), onde RR_{TL50} =

menor TL_{50} para o inseto / TL_{50} do inseticida testado. Realizou-se a correlação de Pearson ($p < 0,05$) entre a CL_{50} de todos inseticidas com todas as populações testadas.

Para os ensaios bioquímicos realizou-se ANOVA para avaliar as possíveis diferenças nas atividades enzimáticas entre as populações de insetos obtidas das regiões de Abaeté dos Mendes, Carmo do Paranaíba, Franca e Rio Paranaíba. Também foi realizada a correlações de Pearson ($p < 0,05$) entre a atividade enzimática específica com RR_{CL50} e RR_{TL50}.

3. RESULTADOS

3.1. Bioensaios de mortalidade

Com os resultados obtidos foi possível estabelecer uma linha básica de suscetibilidade para as populações brasileiras de *L. coffeella* a todos os inseticidas testados, a partir do uso da dose recomendada, pelos fabricantes e pelo MAPA, dos inseticidas em estudo (Figura 2).

Foram considerados suscetíveis as populações cuja mortalidade foi superior a a 80%, quando submetidas aos diferentes inseticidas. Dessa forma, todas as populações de *L. coffeella* avaliadas foram suscetíveis (mortalidade superior a 80%) aos inseticidas clorpirifós e deltametrina. A partir deste parâmetro de eficiência foi possível estabelecer um padrão de suscetibilidade e possíveis falhas de controle para outras regiões. As populações de Abaeté dos Mendes, Carmo do Paranaíba e Franca foram suscetíveis ao inseticida profénofós. Esta última população foi suscetível também ao inseticida abamectina (Figura 2).

Apesar da suscetibilidade destas populações, falhas de controle (mortalidade < 80%) dos inseticidas abamectina, clorantraniliprole, tiametoxam e tiametoxam + ciproconazol foram observadas para a maioria das populações avaliadas. O destaque ficou para as populações de Rio Paranaíba, Abaeté dos Mendes e Carmo do Paranaíba que apresentaram mortalidade abaixo de 80%. O inseticida tiametoxam + ciproconazol apresentou falha no controle à todas as populações de *L. cofeella* testadas (Figura 2).

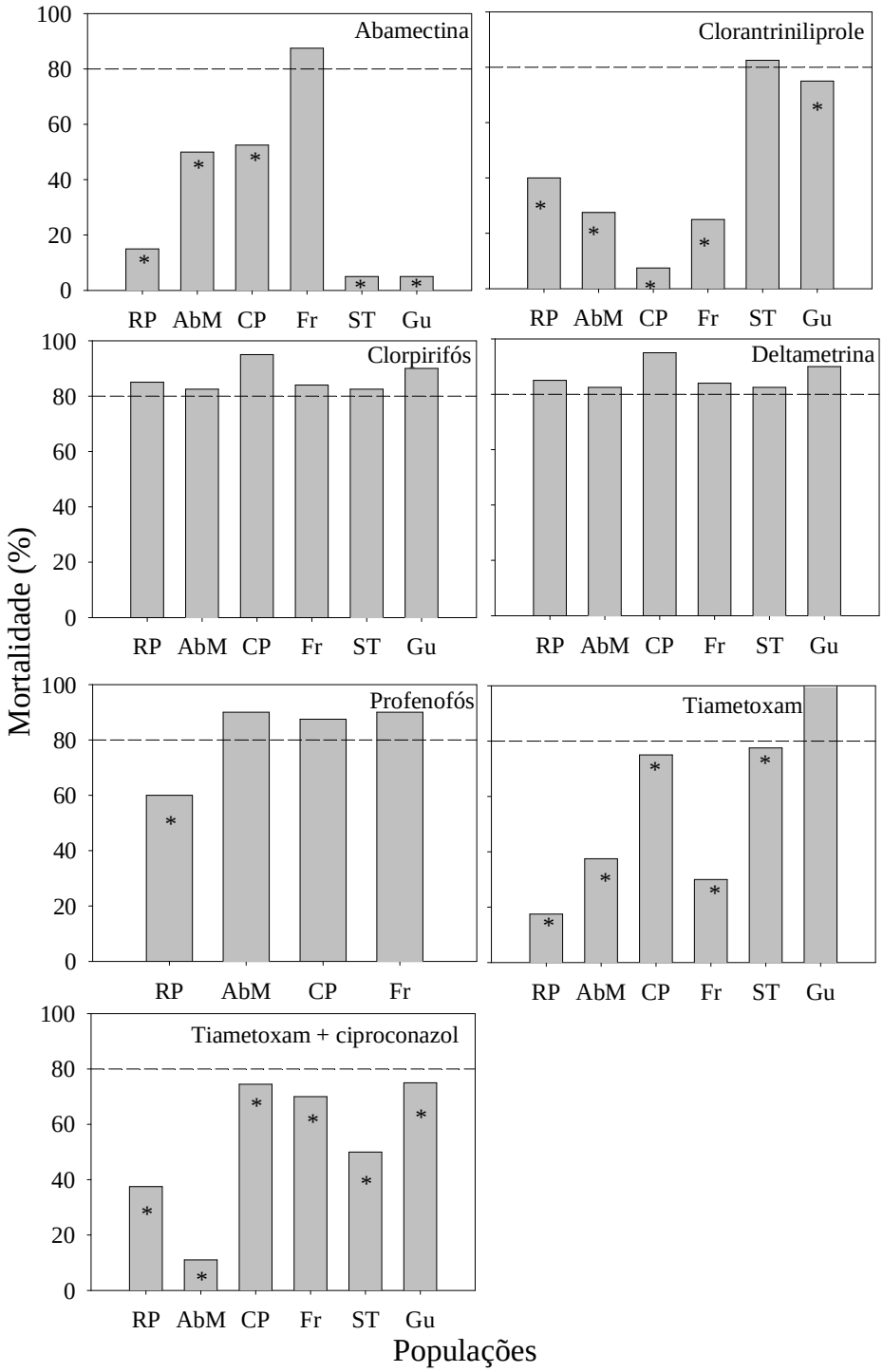


Figura 2. Mortalidade estimada (%) de populações brasileiras de *Leucoptera coffeella* causadas por sete inseticidas neurotóxicos. Regiões: RP = Rio Paranaíba - MG, AbM = Abaeté dos Mendes - MG distrito de Rio Paranaíba - MG, CP = Carmo do Paranaíba - MG, Fr = Franca - SP, ST = Santa Tereza - ES, Gu = Guaranhuns - PE. *Mortalidade menor que 80%. ----- Mortalidade mínima para eficácia e comercialização.

3.2. Toxicidade relativa (CL_{50})

Verificou-se relações não significativas ($p > 0,05$) entre as concentrações crescentes dos inseticidas e a mortalidade de larvas de *L. coffeella*, mostrando ajuste à curva de próbite (dose-mortalidade). Os inseticidas com maior toxidade a população de Guaranhuns - PE foram clorantraniliprole (CL_{50} = 32,37), tiametoxam (CL_{50} = 116,05) e tiametoxam + ciproconazol (CL_{50} = 188,06). Já para a população de Carmo do Paranaíba - MG as menores concentrações letais foram proporcionadas pelos inseticidas clorpirifós (CL_{50} = 0,40) e profenofós (CL_{50} = 2,96). Na população de Abaeté dos Mendes - MG a baixa concentração letal foi observada para o inseticida abamectina (CL_{50} = 0,03) e para a população de Franca - SP pelo inseticida deltametrina (CL_{50} = 0,06) (Tabela 2).

As maiores concentrações letais obtidas dos inseticidas testados por população foram abamectina (Guaranhuns), clorantraniliprole, clorpirifós e profenofós (Abaeté dos Mendes), tiametoxam (Franca) e tiametoxam + ciproconazol (Rio Paranaíba), com as seguintes CL_{50}: 794,36; 2022,49; 726,59; 91,09; 16709,55 e 3262,70, respectivamente (Tabela 2).

A magnitude ou razão da resistência (RR_{CL50}) entre os inseticidas testados obteve variação de 1,20 a 27603,83 vezes demonstrando assim quantas vezes o inseticidas é mais resistente ao comparado com a população suscetível, sendo a menor para o inseticida tiametoxam + ciproconazol e a maior para o inseticida deltametrina. A população de Abaeté dos Mendes obteve maior razão de resistência para os inseticidas clorpirifós (1816,47). Já a população de Santa Tereza apresentou alta resistência ao inseticida deltametrina com RR_{50} = 27603,83 vezes. E a população de Guaranhuns a abamectina com RR_{50} = 26478,67 vezes. A população de Franca foi 143,99 vezes mais resistente ao inseticida tiametoxam do que a população suscetível. O inseticida tiametoxam + ciproconazol foi o que proporcionou maior homogeneidade entre as RR_{CL50} variando de 1,20 a 17,35 vezes maior do que a população suscetível, sendo que a maior RR_{CL50} foi observada para a população de Rio Paranaíba (Tabela 2).

As inclinações das curvas de doses-mortalidade variaram de 0,28 a 3,87 para os inseticidas clorpirifós e clorantraniliprole, referentes às populações de Carmo do Paranaíba e Santa Tereza, respectivamente, demonstrando assim maior homogeneidade de resposta a dose, com baixa variação de mortalidade entre as distintas doses, para o inseticida clorpirifós a população de Santa Tereza.

Tabela 2. Toxicidade relativa de inseticidas neurotóxicos à populações brasileiras de lagartas de *Leucoptera coffeella* após 48 horas de exposição.

Inseticida	População	n	Inclinação (± EPM)	CL_{50} ($IC_{95\%}$)	RR_{CL50}	χ^2 (G.L.)	P
Abamectina	Rio Paranaíba - MG	240	1,07 ± 0,01	5,25 (3,76 - 7,17)	175,00	7,20 (4)	0,12
	Abaeté dos Mendes - MG	280	1,00 ± 0,00	0,03 (0,02 - 0,04)	1,00	5,97 (5)	0,31
	Carmo do Paranaíba - MG	280	1,23 ± 0,00	84,36 (69,07 - 102,94)	2812,00	5,73 (5)	0,33
	Franca - SP	200	0,82 ± 0,00	25,38 (16,01 - 36,22)	846,00	2,55 (3)	0,53
	Santa Tereza - ES	200	2,70 ± 0,00	403,07 (351,52 - 451,31)	13435,67	5,10 (3)	0,16
	Guaranhuns - PE	200	1,03 ± 0,00	794,36 (612,16 - 1048,20)	26478,67	2,32 (3)	0,51
Clorpirifós	Rio Paranaíba - MG	240	0,54 ± 0,00	17,67 (7,99 - 32,97)	44,18	0,24 (4)	0,99
	Abaeté dos Mendes - MG	240	1,54 ± 0,00	726,59 (599,76 - 878,22)	1816,47	8,46 (4)	0,08
	Carmo do Paranaíba - MG	280	0,28 ± 0,00	0,40 (0,00 - 6,33)	1,00	5,76 (5)	0,33
	Franca - SP	200	0,62 ± 0,00	38,02 (6,93 - 77,36)	95,05	2,61 (3)	0,54
	Santa Tereza - ES	240	0,63 ± 0,00	67,81 (39,95 - 106,57)	169,53	9,13 (4)	0,06
	Guaranhuns - PE	200	0,44 ± 0,00	142,32 (67,28 - 259,44)	355,80	1,34 (3)	0,72

n = número total de insetos por bioensaio; EPM = Erro padrão da média; CL_{50} = Concentração letal para matar 50% da população; IC = intervalo de confiança a 95%; RR_{CL50} = Razão de resistência, obtida pela divisão do valor da CL_{50} de cada população pelo valor da CL_{50} da suscetível; $\chi 2$ = Qui-quadrado calculado; (G.L.) graus de liberdade e P = probabilidade.

Continuação da Tabela 2

Inseticida	População	n	Inclinação (± EPM)	CL_{50} ($IC_{95\%}$)	RR_{CL50}	χ^2 (G.L.)	P
Clorantraniliprole	Rio Paranaíba - MG	200	1,69 ± 0,00	1238,19 (1038,81 - 1523,16)	38,25	7,52 (3)	0,06
	Abaeté dos Mendes - MG	200	0,97 ± 0,00	2022,49 (1486,68 - 2911,62)	62,48	3,02 (3)	0,39
	Carmo do Paranaíba - MG	320	0,52 ± 0,00	1763,59 (1174,02 - 2685,21)	54,48	2,31 (6)	0,89
	Santa Tereza - ES	200	3,87 ± 0,00	43,07 (38,65 - 47,11)	1,33	7,03 (3)	0,07
	Guaranhuns - PE	200	2,58 ± 0,00	32,37 (28,43 - 36,44)	1,00	0,90 (3)	0,83
Deltametrina	Rio Paranaíba - MG	360	0,88 ± 0,00	3,65 (2,66 - 4,81)	60,83	12,84 (7)	0,08
	Abaeté dos Mendes - MG	280	0,71 ± 0,00	2,71 (1,21 - 4,69)	45,17	2,59 (5)	0,77
	Carmo do Paranaíba- MG	160	1,13 ± 0,00	33,34 (24,55 - 45,20)	555,67	4,56 (2)	0,10
	Franca - SP	200	0,44 ± 0,00	0,06 (0,00 - 0,80)	1,00	1,44 (3)	0,70
	Santa Tereza - ES	160	0,61 ± 0,00	1656,23 (931,33 - 4540,07)	27603,83	5,83 (2)	0,05
Profenofós	Rio Paranaíba - MG	200	1,79 ± 0,00	41,16 (34,83 - 49,05)	13,91	5,01 (3)	0,17
	Abaeté dos Mendes - MG	200	0,95 ± 0,00	91,09 (65,37 - 136,94)	30,77	2,52 (3)	0.53
	Carmo do Paranaíba - MG	200	0,46 ± 0,00	2,96 (0,60 - 7,39)	1,00	4,08 (3)	0,25

n = número total de insetos por bioensaio; EPM = Erro padrão da média; CL_{50} = Concentração letal para matar 50% da população; IC = intervalo de confiança a 95%; RR_{CL50} = Razão de resistência, obtida pela divisão do valor da CL_{50} de cada população pelo valor da CL_{50} da suscetível; $\chi 2$ = Qui-quadrado calculado; (G.L.) graus de liberdade e P = probabilidade.

Continuação da Tabela 2

Inseticida	População	n	Inclinação (± EPM)	CL_{50} ($IC_{95\%}$)	RR_{CL50}	χ^2 (G.L.)	P
Tiametoxam	Rio Paranaíba - MG	240	1,60 ± 0,00	1692,51 (1356,70 - 2047,65)	14,58	5,11 (4)	0,28
	Abaeté dos Mendes - MG	240	1,61 ± 0,00	4026,08 (3381,70 - 4744,34)	34,90	7,09 (4)	0,13
	Carmo do Paranaíba - MG	240	0,84 ± 0,00	1002,52 (583,70 - 1465,18)	8,64	3,28 (4)	0,51
	Franca - SP	120	2,28 ± 0,00	16709,55 (13926,61 - 21712,46)	143,99	0,20 (1)	0,66
	Santa Tereza - ES	240	0,77 ± 0,00	183,31 (129,35 - 256,11)	1,58	3,90 (4)	0,58
	Guaranhuns - PE	200	1,04 ± 0,00	116,05 (87,74 - 151,25)	1,00	6,67 (3)	0,08
Tiametoxa + Ciproconazol	Rio Paranaíba - MG	200	1,38 ± 0,00	3262,70 (2352,73 - 5506,98)	17,35	7,67 (3)	0,05
	Abaeté dos Mendes - MG	200	0,96 ± 0,00	226,32 (127.84 - 321.40)	1,20	1,67 (3)	0,65
	Carmo do Paranaíba - MG	200	1,07 ± 0,00	355,32 (194,55 - 505,45)	1,89	2,91 (3)	0,59
	Franca - SP	200	1,38 ± 0,00	563,69 (453,99 - 685,73)	3,00	5,85 (3)	0,12
	Santa Tereza - ES	160	2,00 ± 0,00	753,50 (582,02 - 923,50)	4,01	5,41 (2)	0,06
	Guaranhuns - PE	200	0,69 ± 0,00	188,06 (116,97 - 278,48)	1,00	5,62 (3)	0,13

n = número total de insetos por bioensaio; EPM = Erro padrão da média; CL_{50} = Concentração letal para matar 50% da população; IC = intervalo de confiança a 95%; RR_{CL50} = Razão de resistência, obtida pela divisão do valor da CL_{50} de cada população pelo valor da CL_{50} da suscetível; $\chi 2$ = Qui-quadrado calculado; (G.L.) graus de liberdade e P = probabilidade.

A resistência a distintas moléculas inseticidas é um fator limitante no manejo de *L. coffella*. Assim efetuou a correlação de Pearson entre as CL_{50} dos inseticidas, possibilitando diagnosticar possíveis resistências cruzadas. Verificou-se correlação positiva e significativa ($p < 0,05$) entre os inseticidas clorpirifós e profenofós (r = 0,85) indicando assim resistência cruzada. Não houve correlação entre os inseticidas clorantriniliprole e clorpirifós (r = 0,50), profenofós e tiametoxam + ciproconazol (r = 0,16), clorpirifós e tiametoxam (r = 0,01) e abamectina e deltametrina (r = 0,28) (Tabela 3).

Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson ($p < 0,05$) entre CL_{50} dos inseticidas utilizados no controle de *Leucoptera coffeella*.

Correlação Pearson						
Inseticidas	Clorantraniliprole	Clorpirifós	Deltametrina	Profenofós	Tiametoxam	Tiametoxam +ciproconazol
Abamectina	-0,61	-0,17	0,28	-0,49	-0,47	-0,35
Clorantraniliprole	-	0,50	-0,41	0,72	-0,23	0,11
Clorpirifós	-	-	-0,18	0,85*	0,01	-0,34
Deltametrina	-	-	-	-0,30	-0,31	-0,06
Profenofós	-	-	-	-	-0,03	0,16
Tiametoxam	-	-	-	-	-	-0,12

*Significativo a $p < 0,05$.

3.3. Tempo Letal (TL_{50})

Atráves dos resultados obtidos dos bioensaios tempo-mortalidade, verificou-se que todos os inseticidas testados, as TL_{50} foram não significativas ($p > 0,05$) indicando relações entre os tempos e a resposta das mortalidades. A população de Santa Tereza mostrou menor tempo letal para os inseticidas abamectina (TL_{50} = 9,11), clopirifós (TL_{50} = 4,58), clorantraniliprole (TL_{50} = 14,0), deltametrina (TL_{50} = 5,82) e tiametoxam (TL_{50} = 10,49). O menor tempo letal para o inseticida profenofós,

entre os testados, foi referente a população de Carmo do Paranaíba (TL_{50} = 6,96; IC95% = 4,28 - 9,00) (Tabela 4).

As maiores TL_{50} foram atribuídas aos inseticidas tiametoxam (TL_{50} = 89,93) e abamectina (TL_{50} = 36,75) ambos referente a população de Carmo do Paranaíba. Os maiores tempos letais dos inseticidas deltametrina (TL_{50} = 31,12) e profenofós (TL_{50} = 15,66), foram referente a população do Rio Paranaíba e para os inseticidas clorpirifós (TL_{50} = 17,18) e tiametoxam + ciproconazol (TL_{50} = 23,10) a população de Abaeté dos Mendes. Os tempos letais variaram de 4,58 horas a 89,93 horas, sendo o menor tempo referente ao inseticida clorpirifós para a população de Santa Tereza e o maior ao tiametoxam para a população de Carmo do Paranaíba (Tabela 4).

Os inseticidas testados na população de Santa Tereza expressaram maior eficiência de toxicidade, exceto para o inseticida tiametoxam + ciproconazol. As maiores RR_{TL50}, consequentemente eficiência de toxicidade, foram encontradas nas populações de Carmo do Paranaíba para tiametoxam (8,57 vezes menos) e o inseticida deltametrina nas populações de Rio Paranaíba (5,35 vezes menos), Carmo do Paranaíba (4,84 vezes menos), Abaeté dos Mendes (4,42 vezes menos). As maiores razões obtidas para abamectina, clorpirifós e tiametoxam foram nas populações de Carmo do Parnaíba (4,03 vezes menos), Abaeté dos Mendes (3,75 vezes menos) e Rio Paranaíba (3,55 vezes menos), respectivamente. E para profenofós (2,25 vezes menos) a população de Rio Paranaíba e para clorantraniliprole (2,25 vezes menos) a de Guaranhuns com menor eficiência de toxicidade (Tabela 4).

Para as razões de tempos letais houve sincronismos entre as maiores razões e as razões de resistência para todas as populações, exceto Franca, ou seja, quanto maior o tempo letal, também maior a dose necessária para matar 50% da população. Este sincronismo entre RR_{TL50} e RR_{CL50} foi observado na população de Abaeté dos Mendes para os inseticidas clorantraniliprole, profenófos e tiametoxam. Na população do Carmo do Paranaíba para abamectina, clorantraniliprole e deltametrina. A de Guaranhuns para abamectina e clorpirifós. Já a de Santa Tereza para abamectina e tiametoxam + ciproconazol. E na de Rio Paranaíba para deltametrina, profenofós, tiametoxam e tiametoxam + ciproconazol.

Tabela 4. Curvas tempo-mortalidade de populações de *Leucoptera coffeella* sob o efeito da dose recomendada de sete inseticidas utilizados no controle desta praga.

Inseticida	População	n	Inclinação (± EPM)	TL_{50} ($IC_{95\%}$)	RR_{TL50}	χ^2 (G.L.)	P
Abamectina	Rio Paranaíba - MG	40	1,84 ± 0,00	13,29 (11,29 - 15,34)	1,46	2,87 (3)	0,59
	Abaeté dos Mendes - MG	40	2,71 ± 0,00	14,70 (12,59 - 16,53)	1,61	6,95 (3)	0,07
	Carmo do Paranaíba - MG	40	3,69 ± 0,00	36,75 (33,63 - 40,97)	4,03	4,05 (3)	0,26
	Santa Tereza - ES	40	2,01 ± 0,00	9,11 (6,03 - 11,52)	1,00	2,89 (3)	0,59
	Guaranhuns - PE	40	2,84 ± 0,00	17,85 (15,87 - 19,71)	1,96	4,97 (3)	0,17
Clorpirifós	Rio Paranaíba - MG	40	2,96 ± 0,00	8,16 (7,02 - 9,20)	1,78	7,35 (4)	0,12
	Abaeté dos Mendes - MG	40	3,00 ± 0,00	17,18 (15,68 - 18,75)	3,75	9,07 (4)	0,06
	Carmo do Paranaíba - MG	40	3,65 ± 0,00	16,39 (15,12 - 17,76)	3,58	1,66 (3)	0,65
	Santa Tereza - ES	40	1,60 ± 0,00	4,58 (3,62 - 5,54)	1,00	7,56 (5)	0,18
	Guaranhuns - PE	40	1,83 ± 0,00	8,59 (6,70 - 10,21)	1,88	2,39 (3)	0,50

n = número total de insetos por bioensaio; EPM = Erro padrão da média; TL_{50} = tempo (hora) letal para matar 50% da população; IC = intervalo de confiança a 95%; RR_{TL50} = Razão entre os tempos letais para matar 50% da população; χ^2 = Qui-quadrado calculado; G.L. = graus de liberdade e P = probabilidade.

Continuação da Tabela 4

Inseticida	População	n	Inclinação (± EPM)	TL_{50} ($IC_{95\%}$)	RR_{TL50}	χ^2 (G.L.)	P
Clorantraniliprole	Abaeté dos Mendes - MG	40	2,60 ± 0,00	27,70 (24,70 - 31,56)	1,98	3,66 (3)	0,30
	Carmo do Paranaíba - MG	40	2,52 ± 0,00	26,30 (22,15 - 34,79)	1,88	1,57 (2)	0,54
	Santa Tereza - ES	40	1,42 ± 0,00	14,01 (11,87 - 16,47)	1,00	7,51 (5)	0,18
	Guaranhuns - PE	40	2,75 ± 0,01	31,53 (28,44 - 35,74)	2,25	5,50 (3)	0,14
Deltametrina	Rio Paranaíba - MG	40	2,29 ± 0,00	31,12 (27,59 - 36,20)	5,35	4,96 (4)	0,17
	Abaeté dos Mendes - MG	40	2,77 ± 0,00	25,73 (23,34 - 28,56)	4,42	3,83 (3)	0,28
	Carmo do Paranaíba - MG	40	2,33 ± 0,00	28,18 (24,46 - 34,29)	4,84	2,22 (3)	0,53
	Franca - SP	40	4,17 ± 0,01	18,82 (17,54 - 20,15)	3,23	8,20 (4)	0,08
	Santa Tereza - ES	40	1,08 ± 0,01	5,82 (4,23 - 7,65)	1,00	5,99 (4)	0,05
	Guaranhuns - PE	40	2,00 ± 0,00	20,38 (17,53 - 23,23)	3,50	6,04 (3)	0,11

n = número total de insetos por bioensaio; EPM = Erro padrão da média; TL_{50} = tempo (hora) letal para matar 50% da população; IC = intervalo de confiança a 95%; RR_{TL50} = Razão entre os tempos letais para matar 50% da população; $\chi 2$ = Qui-quadrado calculado; G.L. = graus de liberdade e P = probabilidade.

Continuação da Tabela 4

Inseticida	População	n	Inclinação (± EPM)	TL_{50} ($IC_{95\%}$)	RR_{TL50}	χ^2 (G.L.)	P
Profenofós	Rio Paranaíba - MG	40	3,38 ± 0,00	15,66 (13,96 - 17,17)	2,25	0,85 (2)	0,66
	Abaeté dos Mendes - MG	40	5,81 ± 0,01	12,25 (11,10 - 13,19)	1,76	1,35 (2)	0,51
	Carmo do Paranaíba - MG	40	2,85 ± 0,01	6,96 (4,28 - 9,00)	1,00	3,85 (3)	0,28
Tiametoxam	Rio Paranaíba - MG	40	2,83 ± 0,00	37,29 (33,32 - 43,21)	3,55	2,54 (3)	0,53
	Abaeté dos Mendes - MG	40	3,10 ± 0,00	23,10 (21,11 - 25,27)	2,20	0,43 (3)	0,93
	Carmo do Paranaíba - MG	40	1,41 ± 0,00	89,93(61,70 - 180,00)	8,57	6,54 (4)	0,16
	Santa Tereza - ES	40	2,57 ± 0,00	10,49 (9,13 - 11,78)	1,00	8,65 (4)	0,07
	Guaranhuns - PE	40	3,94 ± 0,01	13,57 (12,07 - 14,87)	1,29	7,69 (3)	0,05
Tiametoxam +	Rio Paranaíba - MG	40	3,84 ± 0,00	9,28 (8,22 - 10,32)	1,00	1,82 (3)	0,62
Ciproconazol	Abaeté dos Mendes - MG	40	3,10 ± 0,00	23,10 (21,11 - 25,27)	2,49	0,43(3)	0,93
	Carmo do Paranaíba - MG	40	2,26 ± 0,00	20,17 (17,41 - 24,96)	2,17	3,37 (3)	0,18
	Santa Tereza - ES	40	1,70 ± 0,00	11,75 (9,67 - 13,72)	1,27	7,57 (4)	0.11
	Guaranhuns - PE	40	2,26 ± 0,00	19,42 (17,36 - 21,72)	2,09	5,78 (4)	0,21

n = número total de insetos por bioensaio; EPM = Erro padrão da média; TL_{50} = tempo (hora) letal para matar 50% da população; IC = intervalo de confiança a 95%; RR_{TL50} = Razão entre os tempos letais para matar 50% da população; $\chi 2$ = Qui-quadrado calculado; G.L. = graus de liberdade e P = probabilidade.

3.4. Análises bioquímicas

O levantamento das atividades específicas das enzimas acetilcolinesterase ($F_{(3;8)}$ = 1,06; p = 1,059) e glutationa S-transferase ($F_{(3;8)}$ = 1,61; p = 1,608) para as populações de *L. coffeella* das regiões de Minas Gerais e São Paulo não obtiveram diferença significativa ao aplicar o teste de. A atividade da enzima também não apresentaram diferença siginficativa para estas populações. Já a atividade de fosfotriesterase ($F_{(3;4)}$ = 24,99; p < 0,01) apresentou diferença significativa quando comparado entre as populações testadas.

Pelo teste de média, Tukey ao nível de 5% de probabilidade, observou-se que a população de Franca difere estatisticamente das demais em relação a atividade específica da fosfotriesterase (Tabela 5).

Tabela 5. Atividades específicas de acetilcolinesterase, glutationa S-transferase e fosfotriesterase obtidas das populações de *Leucoptera coffeella* coletadas de diferentes regiões brasileiras

Populações de *Leucoptera Coffeella*	Atividades enzimáticas específicas*		
	Acetilcolinesterase[1]	Glutationa S-transferase[1]	Fosfotriesterase[2]
Abaeté dos Mendes - MG	1703,8 ± 983,7 a	0,01 ± 0,01 a	0,02 ± 0,01 b
Carmo do Paraníba - MG	4081,5 ± 2356,4 a	0,02 ± 0,00 a	0,02 ± 0,01 b
Franca - SP	3978,3 ± 2296,8 a	0,02 ± 0,001 a	0,03 ± 0,02 a
Rio Paranaíba - MG	3579,4 ± 2066,5 a	0,03 ± 0,02 a	0,027 ± 0,01 b

Médias das atividades ± Erro padrão. *As médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. [1](µM/min/mg de proteína). [2](nmol/h/mg).

4. DISCUSSÃO

Para que programas de manejo da resistência sejam mais eficientes é necessário sua detecção no início de sua evolução, propiciando assim maior chance de reestabelecimento da suscetibilidade dos insetos-praga ao inseticida. A resistência aos inseticidas é um dos casos mais rápidos e relatados de adaptação às mudanças ambientais, oriundo em resposta às aplicações recorrentes de inseticidas químicos e até mesmo biológicos. O surgimento e aumento dos casos de resistência, além de reduzir o tempo de vida útil dos inseticidas, compromete a eficácia de novas moléculas devido à resistência cruzada e aos mecanismos de resistência múltipla (Gullan & Cranston, 2007).

Ao utilizar a dose recomendada, os inseticidas clorpirifós e deltametrina não apresentaram falhas de controle nas populações de *L. coffeella*, ou seja, ambos causaram mortalidade superior a 80%. Os inseticidas abamectina, clorantriniliprole e tiametoxam apresentaram suscetibilidade apenas a uma população de *L. coffella*, e falha no controle para a maioria das populações. Já o inseticida tiametoxam + ciproconazol apresentou falha no controle para todas as populações testadas. Fatores estes relevantes, pois a primeira evidência do desenvolvimento de resistência são as falhas no controle de uma praga devido à diminuição da suscetibilidade as doses normalmente utilizadas para o controle da praga (Fragoso et al., 2002).

A variabilidade da CL_{50} entre os inseticidas testados pode ser explicada devido aos diferentes modos de ação, destes produtos. Como observado para a menor CL_{50} ao inseticida abamectina, referente ao grupo químico das avermectinas cujo mecanismo de ação de ativador dos canais de cloro é maior para tiametoxam um neonicotinóide, agonista dos receptores nicotínicos.

A razão de resistência que obteve maior valor foi referente ao inseticida deltametrina, demonstrando assim maior discrepância entre a população suscetível e resistente, sendo este um inseticida comumente utilizados na agricultura pertencendo ao grupo químico dos piretróides. A resistência aos piretróides já foi observada no Brasil para traça das brássicas *Plutella xylostella* como relatado por Oliveira et al. (2011) e a outros piretróides (cipermetrina, β-cipermetrina, deltametrina e

fenvalerato) no Paquistão, Índia, China e Coréia (Kwon et al., 2004; Kahaliq et al., 2007; Balasubramani et al., 2008; Zhou et al., 2010).

O inseticida tiametoxam + ciproconazol obteve menor discrepância entre as razões de resistência das populações de *L. coffeella* testadas quando comparado aos demais inseticidas. Este fato não despreza uma possível evolução nos casos de resistência, visto que a população de Rio Paranaíba apresentou uma razão de resistência significativa de 17,35 vezes superior à população suscetível de Guaranhuns.

A população de Abaeté dos Mendes apresentou resistência aos inseticidas do grupo dos organafosforados e antranilamida. Possivelmente a consequência para tal fato é o aumento do uso de doses em frequência e quantidade buscando obter resultados semelhantes as populações suscetíveis (Picanço & Guedes, 1999). Podendo também ser associado a resistência a profenofós observada para a população de Rio Paranaíba, a resistência apresentada a clorpirifós a população de Abaeté dos Mendes, sendo ambas populações oriundas de regiões próximas, visto que ambos inseticidas apresentaram correlação entre as CL_{50} demonstrando uma resistência cruzada, sendo estes organofosforados agindo como inibidor da acetilcolinesterase, responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (Eldefrawi et al., 1982). A resistência cruzada observada aos inseticidas profenofós e clorpirifós é atribuída quando há um único mecanismo de resistência a dois ou mais compostos tóxicos (Silva et al., 2011b).

Não foi confirmado a resistência múltipla no presente estudo, porém, este tipo de resistência não é descartado, sendo necessário o incremento de mais ensaios incluindo testes comportamentais.

O aumento da atividade de enzimas de dessintoxicação é um mecanismo bioquímico comum de resistência a inseticidas. Os insetos usam enzimas, não somente para manter a homeostase, mas também para proteger a si próprio contra xenobióticos (Fragoso et al., 2003). Evidências bioquímicas de resistência a inseticidas podem ser obtidas através de análises espectrofotometricas, utilizando extratos brutos de insetos (Scott, 1999; Fragoso et al., 2003)

Para o inseticida deltametrina que é um piretróide, o mecanismo de resistência que confere insensibilidade nervosa é denominado de resistência knockdown (KdR) este tipo de resistência foi relatado pela primeira vez em *Musca domestica* (L.), (Diptera: Muscidae), (Busvine,1951). Tal resistência também foi

encontrada em outras pragas agrícolas com base em padrões de resistência cruzada e ausência de sinergismo de compostos que inibem as atividades das enzimas esterases e citocromo P450 (Soderlund, 1997; Soderlund & Knipple, 1999).

Os maiores índices de resistência para o inseticida deltametrina foram para as populações de Santa Tereza (RR_{CL50} = 27603,83), Carmo do Paranaíba (RR_{CL50} = 555,67) e Rio Paranaíba (RR_{CL50} = 60,83), visto que a resistências a piretróides acima de 500 vezes já foram relatados como consequência da substituição do aminoácido metionina por uma treonina, evento denominado de super "kdr" (Williamson et al., 1996).

A resistência a clorpirifós para as populações de Abaeté dos Mendes e Rio Paranaíba pode estar associada a atividade enzimáticas de acetilcolinesterase com 13604,9 e 11931,2 µM/min/mg de proteína, respectivamente. A acetilcolinesterase (ACE) é da superfamília das Serino-esterases, exibindo em seu sítio catalítico uma tríade formada por resíduos de serina, histidina e glutamato. A maior parte das ACEs é ativa na forma de dímeros e possui reação rápida: uma única enzima hidrolisa cerca de 104 moléculas de substrato por segundo (Soreq & Seidman, 2001).

A acetilcolinesterase é uma enzima essencial no sistema nervoso de todos os animais, estando presente nas membranas pós-sinápticas, e seu principal papel é interromper a transmissão nervosa, diminuindo a concentração de acetilcolina na fenda sináptica, hidrolisando-a em colina e acetato, produtos que não mais estimulam o neurônio pós-sináptico (Villate & Bachmann, 2002). Para a resistência a inseticidas referente aos grupos químicos dos organofosforados e carbamatos verifica-se uma alteração ou diminuição à sensibilidade da acetilcolinesterase (Villate & Bachmann, 2002). Assim esses inseticidas tornam-se incapazes de inibir à acetilcolinesterase permitindo a interrupção normal do estímulo.

No bioensaio de dose-mortalidade encontrou-se menor inclinação da curva para o inseticida clorpirifós referente a populações de Carmo do Paranaíba. A variabilidade entre indivíduos de uma mesma população pode ser indicada pela inclinação da curva de dose-mortalidade (Kerns & Gaylor, 1992). Curvas com inclinações menores apontam uma maior variabilidade genética, sugerindo a ausência da predominância de um genótipo na população, indicando uma maior heterogeneidade de resposta diante o uso de inseticidas (Siqueira et al., 2000).

Foi diagnosticada uma diferença estatística em relação aos níveis da enzima fosfotriesterase na população de *L. coffeella* de Franca, podendo assim correlacionar

a resistência de 95,05 vezes superior à população de insetos suscetíveis desta região. A resistência metabólica é frequentemente consequência do excesso de enzimas de desintoxicação, que são capazes de metabolizar os inseticidas, sendo por uma alta expressão dos genes que codificam as três principais enzimas envolvidas no metabolismo: monooxigenase dependente do citocromo P450, glutationa transferases (GSTs) e esterases (Kostaropoulos et al., 2001, Baffi et al., 2008). Fragoso et al., (2002) sugere um complexo destoxificador de monooxigenases dependentes do citocromo P450 como o principal mecanismo de resistência a organofosforados em populações de *L. coffeella* em Minas Gerais.

5. CONCLUSÕES

- Todas as populações são resistentes e suscetíveis a pelo menos um inseticida.
- A resistência detectada aos inseticidas testados, indica que deve ser evitado o uso destes produtos de acordo com o esquema a seguir:

    1. Abaeté dos Mendes: clorpirifós, clorantraniliprole e profenofós.
    2. Carmo do Paranaíba: abamectina, clorantraniliprole e deltametrina.
    3. Franca: tiametoxam.
    4. Guaranhuns: abamectina e clorpirifós.
    5. Rio Paranaíba: clorantraniliprole, deltametrina, profenofós, tiametoxam e tiametoxam+ciproconazol.
    6. Santa Tereza: abamectina, clorpirifós, deltametrina e tiametoxam+ciproconazol.

- Os inseticidas com maiores tempo letal nas respectivas populações, são: Carmo do Paranaíba: deltametrina, abamectina, tiametoxam; Rio Paranaíba: deltametrina, tiametoxam, profenofós; Abaeté dos Mendes: clorpirifós, deltametrina; Guaranhuns: clorantraniliprole.
- Clorpirifós e profenofós apresentaram no presente estudo resistência cruzada.
- A atividade específica da enzima fosfotriesterase esta envolvida na resistência do inseticida profenofós referente a população de Franca.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abbott, W.S. A method of computing the effctiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267. 1925.

APRD. **Artrophod pesticide resistance database**. Disponível em <http://www.pesticideresistance.com/> Acesso em 20 de junho de 2013.

Baffi, M.A.; Souza, G.R.L.D.; Sousa, C.S.D.; Ceronb, C.R.; Bonetti, A.M. Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Riphicephallus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Molecular and Biochemical Parasitology,** v.160, p.70-73. 2008.

Balasubramani, V.; Sayyed, A.H.; Crickmore, N. Genetic characterization of resistance to deltamethrin in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from India. **Journal of Economic Entomology**, v.101, p.1911-1918. 2008.

Bardner, R.; Mcharo, E.Y. Confirmation of resistance of the coffee leafminer *Leucoptera meyricki* Ghesquière (Lepidoptera: Lyonetidae) to organophosphate insecticide sprays in Tanzania. **Tropical Pest Management**, v.34, p.52-54. 1988.

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

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-554. 1976.

Brooke, B.D. KdR: can a single mutation produce an entire insecticide resistance phenotype? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p.524-525. 2008.

Busvine, J.R. Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. **Nature** v.168, p.193–195. 1951.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira café**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Brasília. 2013. 7p.

Eldefrawi, A.T.; Miller, E.R.; Murphy, D.L.; Eldefrawi, M.W. [3H]Phencyclidine interactions with the nicotonic acetylcholine receptor channel and its inhibition by psychotropic , antipsychotic , opiate, antide- pressant, antibiotic and viral and antiarrythmic drugs. **Molecular Pharmacology**, v.22, p.72-81. 1982.

Finney, D.J. **Probit analysis**. London: Cambridge University. 1971. 333p.

Fragoso, D.B.; Guedes, R.N.C.; Picanço, M.C; Zambolim, L. Insecticide use and organophosphate resistance in the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetidae). **Bulletim Entomological Research**, v.92, p.203-212. 2002.

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

Frova, C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. **Biomolecular Engineering.** v. 23, p. 69-149. 2006.

Fukuto, T.R.; Mallipudi, N.M. Supression of metabolic resistance through chemical structure modification. In: Georghiou, G.P.; Saito, T. (ed.). **Pest resistance to pesticides: challenges and prospects**. Plenum Press, New York: United States of America. 1983. pp.557-578.

Guedes, R.N.C; Zhu, K.Y; Douver, B.A; Kambhampati, S. Partial characterization of phosphotriesterases from organophosphate-susceptible and resistant populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology.** v.57, p.156-164. 1997.

Gullan, P.J.; Cranston, P.S. The Insects: An outline of entomology. **Chapman and Hall**, London, 2007. 491p.

IRAC-BR. **Comitê Brasileiro de Ação a Resistência a Inseticidas**. Disponível em: <http://www.irac-br.org.br/>. Acesso em: 2 de maio de 2013.

Kahaliq, A.; Antique, M.N.R.; Sayyed, A.H. Evidence for resistance to pyrethoids and organophosphates in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Pakistan. **Bulletin of Entomological Research**, v.97, p.191-200. 2007.

Karunaratne, K.M.; Plapp, F.W. Biochemistry and genetics of thiodicarb resistance in the house fly (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology,** v. 86, p.258-264. 1993.

Kerns, D.L.; Gaylor, M.J. Sublethal effects of insecticides on cotton aphid reproduction and color morph development. **Southwestern Entomologist**, v.17, p.245-250. 1992.

Kostaropoulos, I.; Papadopoulos, A.I.; Metaxakis, A.; Boukouvala, E.; Papadopoulou-Mourkidou, E. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.313-319. 2001.

Kwon, D.H.; Choi, B.R.; Park, H.M.; Lee, S.H.; Miyata, T.; Clark, J.M.; Lee, S.H. Knockdown resistance allele frequency in field populations of *Plutella xylostella* in Korea. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.80, p.21-30. 2004.

Li, X.; Schuler, M.A.; Berenbaum, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, v.52, p.231-253. 2007.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Agrofit. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 10 julho 2013.

Messing, R.; Croft, B.A. Insecticide in pest management. In: Metcalf, R.L.; Luckman, W.H. (Eds.). **Introduction to insect pest management**. New York: John Wiley & Sons, 1982. p.217-277.

Michereff, M.F.F.; Michereff-Filho, M.; Vilela, E.F. Comportamento de Acasalamento do Bicho-Mineiro-do-Cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**, v.36, p.376-382. 2007.

Oliveira, A.C.; Siqueira, H.A.; Oliveira, J.V.; Silva, J.E.; Michereff-Filho, M. Resistance of Brasilian diamondback moth populations to insecticides. **Scientia Agricola**, v.68, p.154-159. 2011.

Picanço, M.C.; Guedes, R.N.C. Manejo integrado de pragas no Brasil: situação atual, problemas e perspectivas. **Ação Ambiental**, v.2, p.23-27. 1999.

Ramiro, D.A.; Guerreiro-Filho, O.; Queiroz-Voltan, R.B.; Matthiesen, S.C. Caracterização anatômica de folhas de cafeeiros resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro. **Bragantia**, v.63, p.363-372. 2004.

Santos, V.C.; Siqueira, H.Á.A.; Silva, J.E.; Farias, M.J.D.C. Insecticide resistance in populations of diamondback moth, *Plutella xylostella (*L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from State of Pernambuco (Brazil). **Neotropical Entomology**, v.40, p.264-270. 2011.

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

Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, V.M. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implication for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfmily. **Biochemical Journal** v. 360, p.1-16. 2001.

Silva, G.A.; Picanço, M.C.; Bacci, L.; Crespo, A.L.; Rosado, J.F.; Guedes, R.N.C. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science,** v.67, p.913-920. 2011a.

Silva, T.B.M.; Siqueira, H.A.A.; Oliveira, A.C.; Torres, J.B., Oliveira, J.V.; Montarroyos, P.A.V.; Farias, M. Insecticide resistance in brazilian populations of the cotton leaf worm, *Alabama argillacea*. **Crop Protection,** v.30, p.1156-1161. 2011b.

Silva, E.J.; Siqueira, H.A.A.; Silva, T.B.M.; Campos, R.M. Baseline suspeceptibily to chlorantraniliprole of Brazilian populations of *Plutella xylostella*. **Crop Protection,** v. 35, p.97-101. 2012.

Siqueira, H.A.A.; Guedes, R.N.C.; Picanço, M.C. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepdoptera: Gelechiidae). **Agricultural and Forest Entomology**, v.2, p.147-153. 2000.

Soderlund, D.M. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Sjut, V. (Ed.). **Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals**. Springer: Berlin, 1997. p.21-56.

Soderlund, D.M.; Knipple, D.C. Knockdown resistance to DDT and pyrethroids in the house fly (Diptera: Muscidae): from genetic trait to molecular mechanism. **Annals of the Entomological Society of America**, v.92, p.909–915.1999.

Soreq, H.; Seidman, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience.** v. 2, p.294-302. 2001.

Szendrei, Z.; Grafius, E.; Byrne, A.; Ziegler, A. Resistance to neonicotinoid insecticides in field populations of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Pest Management Science,** v.68, p.941-946. 2012.

Vega, F.E.; Posada, F.; Infante, F. Coffe insect: ecology and control. In: PIMENTEL, D. (Ed.) **Encyclopedia of pest management**. London: Taylor & Francis, 2006. p.1-4.

Villate, F. Bachmann, T.T. How many genes encode cholinesterase in artropods? **Pestic Biochem Physiol.** v.73, p.122 – 129. 2002.

Whalon, M.; Mota-Sanchez, D.; Hollingworth, R.M. **Global pesticide rersistance in arthropods**. London: CABI, Oxfordhire. 2008. 208p.

Williamson, M.S.; Martinez-Torres, D.; Hick, C.A. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knock-down resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. **Mololecular & General Genetics.** v.252, p.51-60. 1996.

Yu, S.J. Host plant induction of glutathione S-transferases in the fall armyworm. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.18, p.101-106. 1982.

Yu, S.J. Interactions of allelochemicals with detoxification enzymes of insecticide-susceptible and resistant fall armyworms. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.22, p.60-68. 1984.

Zhou, L.; Huang, J.; Xu, H. Monitoring resistance of field populations of diamondback moth *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) to five insecticides in South China: A ten-year case study. **Crop Protection**, v.30, p.272-278. 2010.