

**DANIEL DE BRITO FRAGOSO**

**RESISTÊNCIA E SINERGISMO A INSETICIDAS FOSFORADOS EM  
POPULAÇÕES DE *Leucoptera coffeella* (GUÈR-MÉNEV.)  
(LEPIDOPTERA: LYONETIIDAE)**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
JUNHO - 2000**

*A espiga cheia salta da haste  
o pendão falido vira ressecado, esmorecido no  
sagrado rito da fecundação.*

Cora Coralina

*Como as dificuldades, as impossibilidades, amo  
sobretudo a vida, e acredito que a produção,  
seja qual for, é sempre preferível ao repouso .*

Emile Zola

À minha noiva Cleuma.

Aos meus pais Irineu (“in memoriam”) e Emília.

**Aos** meus irmãos Albertino, Almir, Ubiratan, Marina e  
Rosa,

Dedico.

**Aos** cientistas e aos brasileiros,

Ofereço.

## AGRADECIMENTO

Primeiramente, a Deus, pois: “ Ele rega os montes desde as suas câmaras; a terra farta-se das suas obras. Faz crescer a erva para as bestas, e a verdura para o serviço do homem, para fazer sair da terra o pão, e o vinho que alegra o coração do homem”. (Salmo 104: 13-15)

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

**Ao** mestre, amigo e orientador, professor Raul Narciso Carvalho Guedes, pela orientação, pela amizade, pelos ensinamentos, pelo estímulo, pelas críticas e sugestões apresentados na elaboração deste trabalho.

**Aos** meus conselheiros Prof. Marcelo C. Picanço e Prof. Laércio Zambolim, pela valiosa colaboração.

**Aos** professores que acompanharam, incentivaram, sugeriram e que foram responsáveis pela minha formação, pelos valiosos conhecimentos adquiridos.

**Aos** professores Julcemar Didonet e Glauco Vieira, pelo incentivo e apoio.

**Aos** colegas do curso, pela grande amizade e pelo companheirismo, em especial aos do laboratório de Toxicologia, pelo apoio **nas** avaliações.

Aos amigos, Pedro e Rosemary, Aldeir e Beth, Ronaldo, Eduardo, Leonardo, Reginaldo, Eugênio, Rafael, Ivênio, Anderson, Stênio, Rodrigo, Alfredo, Nelsa, pela amizade e pelo convívio durante este período em Viçosa.

Aos meus pais Irineu Oliveira Fragoso (“in memoriam”) e Emília de Brito Fragoso e aos meus irmãos, pelo apoio e estímulo durante a minha caminhada pelo conhecimento, em especial à minha irmã Marina de Brito Fragoso.

Aos funcionários do Setor de Entomologia Agrícola, Ana Paula, Francisco e José Evaristo, pela amizade, pela acolhida e atenção.

À Bayer e Dow AgroSciences por terem fornecido os inseticidas em grau técnico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo.

Aos componentes da minha banca de tese, meus agradecimentos pela cordialidade ao convite e forma como participaram da mesma.

A todas pessoas que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Daniel de Brito Fragoso, filho de Irineu Oliveira Fragoso (“in memoriam”) e Emília de Brito Fragoso, nasceu em Formoso do Araguaia, Estado de Tocantins, aos 17 de outubro de 1970.

Obteve a sua formação em Técnico em Agropecuária na Escola Técnica da Fundação Bradesco Dr. Dante Pazzanese, Formoso do Araguaia, tendo concluído em dezembro 1990.

No período de 1993 a 1997, cursou Agronomia na Universidade do Tocantins - UNITINS, obtendo o grau de Engenheiro-Agrônomo em dezembro de 1997. Iniciou seus trabalhos na área de Entomologia no ano de 1994, na área de Manejo Integrado de Pragas, como bolsista do PIBIC/CNPq.

Ingressou no Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa em março de 1998, sob a orientação do Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes, defendendo tese em 10 de fevereiro de 2000.

## CONTEÚDO

	<b>Página</b>
EXTRATO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E METODOS.....	6
2.1. PADRÃO DE SUSCETIBILIDADE.....	6
2.2. POPULAÇÕES DE CAMPO ESTUDADAS.....	6
2.3. PRODUTOS QUIMICOS.....	10
2.4. BIOENSAIOS.....	10
2.5. ANALISE ESTATISTICA.....	11
3. RESULTADOS.....	13
4. DISCUSSÃO.....	23
5. RESUMOS E CONCLUSÕES.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

## EXTRATO

FRAGOSO, Daniel de Brito, M.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2000.  
**Resistência e sinergismo a inseticidas fosforados em populações de *Leucoptera coffeella* Guér.-Ménev. (Lepidoptera: Lyonetiidae).** Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Conselheiros: Marcelo Coutinho Picanço e Laércio Zambolim.

Os objetivos deste trabalho foram detectar e evidenciar preliminarmente os mecanismos bioquímicos de resistência a inseticidas fosforados em populações de *Leucoptera coffeella*. Na sua execução foi utilizado como material biológico dez populações de *L. coffeella* de diferentes regiões produtoras de café do Estado de Minas Gerais, que foram coletadas a campo e mantidas em gaiolas em casa de vegetação, além de uma população do cafezal adjacente ao viveiro de mudas de café da Universidade Federal de Viçosa, utilizada como padrão de susceptibilidade. Em cada local de coleta foi preenchido um questionário sobre uso de inseticidas e falhas de controle. Inicialmente foram feitos bioensaios com 3<sup>o</sup> instar larval do bicho-mineiro com o padrão de suscetibilidade (população de Viçosa) para obtenção de faixas de respostas, que serviram como parâmetro referencial na preparação das concentrações dos bioensaios definitivos de concentração-resposta. Os dados de

mortalidade obtidos foram submetidos à análise de próbite para estimação das concentrações letais para 99% de mortalidade ( $CL_{99}$ ) para cada inseticida, que foram então usadas como concentrações discriminatórias na detecção de resistência nas populações sob estudo. O estudo dos prováveis mecanismos bioquímicos de resistência desta praga aos inseticidas foi feito através do uso de concentrações letais discriminatórias de inseticidas em misturas com sinérgistas na população suscetível. Os resultados obtidos mostraram resistência na maioria das populações, com oito populações apresentando este fenômeno ao inseticida dissulfotom, cinco ao etiom, quatro ao paratiom-metílico e apenas uma população apresentou resistência ao inseticida clorpirifós. As populações de Araguari, Patrocínio, São Gotardo e Bambuí foram resistentes a maioria dos inseticidas sob estudo, destacando a população de Araguari que mostrou este fenômeno aos quatro inseticidas estudados. Dados obtidos dos questionários sobre uso de inseticidas, mostraram o largo uso de inseticidas nas regiões de cerrado, com algumas localidades atingindo um total de 20 aplicações por ano agrícola. Modelos de regressão múltipla mostraram associação entre grupos de inseticidas, que podem estar selecionando em favor da resistência aos inseticidas estudados, além da evidência de efeito de inseticidas ou grupos de inseticidas negativamente correlacionados aos compostos em estudo, que desfavorecem a seleção de populações resistentes a estes. Com relação ao estudo de sinérgismo, os sinérgistas butóxido de piperonila e dietil-maleato suprimiram significativamente a resistência, sugerindo que destoxificação metabólica por monooxigenases dependentes do citocromo P450 e glutations-S-transferases sejam os principais mecanismos de resistência de *L. coffeella* a estes inseticidas, com um menor envolvimento de esterases, o que indica também um possível desenvolvimento de resistência múltipla a inseticidas fosforados.



## ABSTRACT

FRAGOSO, Daniel de Brito, M.S., Universidade Federal de Viçosa, June of 2000.  
**Resistance and synergism to organophosphates insecticides in populations of *Leucoptera coffeella* Guér.-Ménev. (Lepidoptera: Lyonetiidae).** Adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes. Committee members: Marcelo Coutinho Picanço and Laércio Zambolim.

The objectives of this study were to detect resistance of *Leucoptera coffeella* to the insecticides chlorpyrifos, disulfoton, ethion and methyl-parathion and to preliminarily identify the probable resistance mechanisms involved. The biological material used encompassed ten populations of *L. coffeella* from the counties of Araguari, Bambuí, Cambuquira, Capelinha, Caparaó, Guiricema, Ponte Nova, São Gotardo, Simonésia and Patrocínio, State of Minas Gerais, that were field-collected and reared in cages within a greenhouse. An additional population from an area adjacent to the coffee nursery of the Federal University of Viçosa was used as susceptibility standard. At first, preliminary bioassays were carried out using 3<sup>rd</sup> instar larvae of *L. coffeella* of the susceptible population to obtain the range of concentrations to be used in the concentration-response bioassays aiming the determination of the LC<sub>99</sub>. The data obtained from the concentration-response

bioassays were subjected to probit analysis to estimate the  $CL_{99}$  for each insecticide, which were used as discriminatory concentrations to recognize the resistance populations. Multiple regression analysis, was used to evidence the association between the frequency of resistant individuals with the insecticide use and occurrence of cross-selection, leading to development of insecticide resistance to organophosphates. In the study of the probable resistance mechanisms of *L. coffeella* to these insecticides, bioassays with insecticide plus synergist were carried out for the susceptible population using the same methodology referred above with the goal of obtaining the  $LC_{99}$  to be used to identify the probable main detoxification enzymes involved in the resistance. The results showed resistance in the majority the insect populations studied, being eight populations resistant to disulfoton, five to ethion, four to methyl-parathion, and just one showed resistance to chlorpyrifos. The Araguari population showed this phenomenon to the four insecticides in study. Data collected about insecticides use showed the large use of insecticides in the savana region, with some localities reaching twenty sprays per year. Models of multiple regression showed association between insecticides classes, which might be contributing positively as well as negatively to cross-selection. The synergist piperonyl-butoxid and diethyl-maleate significantly supplanted the resistance, suggesting that detoxification by cytochrome P450-dependent monooxygenases and glutathion-S-transferases be the main resistance mechanisms to organophosphates insecticides in *L. coffeella*; detoxification by esterases seem to play a minor role on organophosphate resistance in this insect-pest, suggesting a possible case of multiple resistance.

## 1. INTRODUÇÃO

No contexto do mundo globalizado a cafeicultura moderna contribui com o Brasil na geração de divisas, ocupando posição de destaque na agricultura brasileira, sendo cultivado praticamente em todo o território nacional. Evidenciada a importância econômica e social desta cultura para o Brasil, vale salientar que a sua produção é limitada por problemas fitossanitários, dentre estes, o bicho-mineiro do cafeeiro que, em função dos sérios prejuízos econômicos que causa sob determinadas condições, é considerada praga-chave da cultura (SOUZA et al., 1981; GREEN, 1984; INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ, 1986; THOMAZIELLO, 1987; SOUZA et al., 1998).

O bicho-mineiro do cafeeiro, *Leucoptera coffeella* Guérin-Méneville (Lepidoptera: Lyonetiidae), é uma das mais importantes pragas do café nos principais países produtores, especialmente no Brasil (SOUZA et al., 1981; INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ, 1986; SOUZA et al., 1998), em alguns países da América Central e no Continente Africano (GREEN, 1984; THOMAZIELLO, 1987). Vários fatores influem na intensidade de infestação desta praga, principalmente os climáticos, sendo favorecida pelo aumento de temperatura associado a condições de baixa umidade relativa e desfavorecida por altos índices de precipitação pluviométrica (SOUZA et al., 1998). Os danos causados são devidos à diminuição da área

fotossintética, decorrente da necrose na superfície foliar lesionada, e sobretudo pela queda prematura das folhas, notavelmente intensificada quando as galerias se encontram próximas ao pecíolo (SOUZA et al., 1998). Sob condições favoráveis, principalmente no período seco do ano, com temperaturas superiores a 25 °C e umidade relativa inferior a 50 %, em decorrência de picos populacionais que acontecem normalmente em abril-maio e setembro-outubro, têm sido reportados prejuízos superiores a 50 % na produção, dependendo do nível de desfolha provocado nas plantas do (SOUZA et al., 1981). Estudos realizados mais recentemente, relatam perdas na produção variando de 34,3 a 41,5 % (REIS e SOUZA, 1996).

*L. coffeella* foi descrita em 1842 por Guérin-Méneville como *Elachista coffeella*, através de espécimens coletados em Guadalupe e Martinica no Caribe. Posteriormente essa espécie foi relatada como pertencente aos gêneros *Bocculatrix* e *Cemiosoma*, este último válido até 1895, época em que Meyrick substituiu-o por *Leucoptera* (FONSECA, 1944).

A princípio *L. coffeella* foi relatada como sendo a mesma espécie que ocorre no oeste da África, que agora encontra-se descrita como *Leucoptera Meyrick* e *Leucoptera coffeina* (BOX, 1923; NOTLEY, 1948; BRADLEY, 1958), além de uma outra espécie *Leucoptera coma* (CROWE, 1964). Com relação a taxonomia dessa espécie, têm ocorrido certas confusões, principalmente em função da similaridade entre gêneros. O nome genérico *Perileucoptera* em substituição a *Leucoptera* foi proposto por SILVESTRI (1943), que estudou material proveniente de Trinidad, sendo adotado apenas no Brasil (BRADLEY, 1958; GREEN, 1984). Todavia, procurando conhecer e esclarecer taxonomicamente as populações de bicho-mineiro do cafeeiro que existem nestas regiões sob estudo, foi enviado material para identificação ao Dr. Wolfram Mey, especialista do Instituto de Sistemática Zoológica da Universidade de Humboldt, na Alemanha, que fez a mais recente revisão taxonômica do gênero *Leucoptera*. Em seu trabalho de revisão, *Perileucoptera* é colocado como sinônimo júnior de *Leucoptera* (MEY, 1994). O material enviado foi confirmado como sendo *Leucoptera coffeella*, motivo pelo qual não se usou o gênero *Perileucoptera* neste trabalho.

*L. coffeella* é uma praga exótica e sua primeira ocorrência no Brasil foi constatada em 1851, provavelmente introduzida através de mudas advindas das Antilhas e da Ilha de Bourbon, no Caribe. As primeiras referências de *L. coffeella* como praga no Brasil datam de 1860-61, época de explosão populacional desta praga nos cafezais do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (MANN, 1872; FONSECA, 1944; GREEN, 1984). Até 1970 essa praga se manifestava através de surtos esporádicos como os de 1860, 1912 e 1944. A partir de 1970, o bicho-mineiro do cafeeiro agravou-se por meio de ataques intensos e severos, constituindo-se em uma das pragas sérias para a cultura do café nas principais regiões produtoras do país (SPEER, 1949; SOUZA et al., 1981; INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ, 1986; SOUZA et al., 1998).

O ciclo de vida desta espécie é variável, principalmente em função de fatores climáticos como temperatura, umidade relativa e precipitação pluviométrica, podendo variar de 19 a 87 dias (SOUZA et al., 1998). Desta forma, por apresentar um curto ciclo biológico associado à sobreposição de gerações, além do potencial biótico desta espécie, há ocorrência de um grande número de gerações por ano, principalmente nas regiões de cerrado, que apresentam condições mais favoráveis ao seu desenvolvimento biológico, o que contribuiu para o grande uso de inseticidas para o seu controle. Normalmente a época de maior ocorrência de *L. coffeella* é durante o período seco do ano. Contudo, tem-se constatado seu ataque mesmo na estação chuvosa, em determinadas regiões produtoras de café. Quando a sua ocorrência acontece ainda no período chuvoso, os danos causados como perdas na produção, são verificados na própria safra (SOUZA et al., 1981; TOLEDO FILHO, 1982; INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ, 1986; SOUZA et al., 1998).

O principal método de controle é o emprego de inseticidas, que tem se mostrado eficaz. Todavia, a contínua utilização do controle químico com praguicidas não seletivos, sem a rotação de produtos, pode causar desequilíbrios mediante a eliminação de insetos benéficos, explosões populacionais da praga, e principalmente, a perda de eficácia de inseticidas mediante a seleção de populações resistentes a estes

químicos (MERVILLE, 1959; GRAVENA, 1984, KAY e COLLINS, 1987; CAMPANHOLA, 1990; GUEDES, 1999; GUEDES e FRAGOSO, 1999).

O fenômeno da resistência de artrópodes a pesticidas vem sendo comumente verificado e relatado em diversas regiões do planeta, constituindo-se em um sério problema para a agricultura e saúde pública (TABASHNIK e ROUSH, 1990). O primeiro caso de resistência foi constatado em 1914, na cochonilha *Quadraspidotus perniciosus* Comstock (Homoptera: Diaspididae), selecionada com enxofre em pó (METCALF, 1982). Posteriormente, com o amplo uso de inseticidas organo-sintéticos a partir da década de 40, o número de casos de populações de insetos e ácaros resistentes a pesticidas aumentou vertiginosamente, sendo que na década de 80, o número de casos registrados de artrópodes resistentes a uma ou mais classes de inseticidas chegava a mais de 400 espécies (BRATTSTEN et al., 1986; GEORGHIOU, 1986). GEORGHIOU e LAGUNES-TEJEDA (1991) relatam este fenômeno afetando mais de 500 espécies de insetos e ácaros. Atualmente é de se esperar que tenha ocorrido um aumento progressivo com relação a esses dados (GUEDES, 1999; GUEDES e FRAGOSO, 1999).

Populações de bicho-mineiro do cafeeiro resistentes aos inseticidas fosforados fenitrotiom, fentiom, diazinom e clorpirifós, foram constatadas na Tanzânia (BARDNER e MCHARO, 1988). No Brasil, ALVES et al. (1992) através de estudos de detecção, encontraram populações de *L. coffeella* resistentes a inseticidas em alguns municípios produtores de café no Estado de Minas Gerais.

O uso de sinergistas, compostos que usados em doses ou concentrações subletais aumentam a letalidade de inseticidas (BRINDLEY e SELIM, 1984), tem tido importância na evidenciação preliminar dos mecanismos de resistência em artrópodes (BRINDLEY e SELIM, 1984; BRATTSTEN et al., 1986; SCOTT, 1990; ISHAAYA, 1993; B-BERNARD e PHILOGÈNE, 1993). Esses compostos atuam inibindo ou neutralizando complexos enzimáticos envolvidos na destoxificação metabólica de inseticidas, resultando em aumento da toxicidade dos inseticidas quando usados em misturas com sinergistas (PRICE, 1991; WILSON et al., 1999). Desta forma, sob o ponto de vista fisiológico e bioquímico, sinergistas são úteis como ferramenta para o

diagnóstico de mecanismos e manejo de resistência (BRINDLEY e SELIM, 1984; TABASHNIK e ROUSH, 1990; ISHAAYA, 1993; B-BERNARD e PHILOGÈNE, 1993).

Conhecimentos toxicológicos sobre o efeito de praguicidas em organismos pragas são importantes para o manejo da resistência, primordialmente na identificação, escolha e adoção de táticas adequadas de uso de praguicidas, que buscam retardar a ocorrência desse fenômeno e, principalmente prolongar a vida útil dos compostos. Muitos são os fatores que podem influenciar a velocidade de evolução da resistência. Estes fatores podem ser agrupados em genéticos, bioecológicos e operacionais (GEORGHIOU e TAYLOR, 1986; BRATTSTEN et al., 1986). A frequência inicial de alelos que conferem resistência a um inseticida, o número de gerações da praga por ano, o isolamento, a mobilidade, a migração, a existência de refúgio para as populações da praga, a persistência dos resíduos de inseticidas sobre a cultura e a frequência de aplicações são alguns fatores que podem influenciar a evolução da resistência de insetos a inseticidas (GEORGHIOU e TAYLOR, 1986; BRATTSTEN et al., 1986; CAMPANHOLA, 1990). Neste contexto, o conhecimento dos mecanismos de resistência é de suma importância para o manejo deste fenômeno.

Diante da evidência de populações de *L. coffeella* resistentes a inseticidas fosforados, associada a grande importância deste grupo químico para o controle desta séria praga do cafeeiro, além da não existência de trabalhos sobre mecanismos de resistência, este trabalho objetivou detectar populações resistentes do bicho-mineiro do cafeeiro e determinar os prováveis mecanismos bioquímicos de resistência aos inseticidas clorpirifós, dissulfotom, etiom e paratiom-metílico.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Padrão de suscetibilidade**

Para detecção de populações de *L. coffeella* resistentes aos inseticidas clorpirifós, dissulfotom, etiom e paratiom-metílico, foi usada como padrão de suscetibilidade uma população coletada periodicamente no cafezal adjacente ao viveiro de mudas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Nessa plantação de café nunca se utilizou o controle químico.

### **2.2. Populações de campo estudadas**

Para a detecção de populações resistentes, foram coletadas dez populações de *L. coffeella* provenientes das regiões produtoras do Triângulo Mineiro, Alto do Jequitinhonha, oeste (Alto do São Francisco) e sul do Estado de Minas Gerais (Quadro 1, Figura 1). Todas as populações eram provenientes de plantações de café catuaí e mundo novo, com idade igual ou superior a cinco anos de idade. Nestes locais foram coletadas folhas minadas e pupas que resultaram em número inicial superior a 200 insetos adultos por local de coleta. As populações foram criadas em gaiolas em casas



de vegetação, alimentadas com mudas de café catuaí e mundo novo durante o período de 1998 e 1999, exceto o padrão de suscetibilidade, que por situar-se próximo ao laboratório, as coletas para os bioensaios foram feitas periodicamente no campo. Em cada local de coleta foi preenchido questionário para obtenção de informações a respeito do uso de inseticidas, do número de aplicações e das falhas de controle por ano agrícola. Também foram coletados dados climatológicos, altimétricos e topográficos destes locais (Quadro 2)

Quadro 1- Origem e época de coleta das populações de *Leucoptera coffeella*

Nº Código	Município	Região	Mês/Ano de Coleta
1	Araguari	Triângulo Mineiro	08/1998
2	Bambuí	Oeste de Minas	04/1999
3	Cambuquira	Sul de Minas	02/1999
4	Caparaó	Zona da Mata	08/1999
5	Capelinha	Alto do Jequetinhonha	08/1998
6	Guiricema	Zona da Mata	09/1998
7	Patrocínio	Triângulo Mineiro	03/1999
8	Ponte Nova	Zona da Mata	10/1999
9	São Gotardo	Triângulo Mineiro	05/1999
10	Simonésia	Zona da Mata	09/1999
11	Viçosa*	Zona da Mata	periodicamente

\*Padrão de suscetibilidade

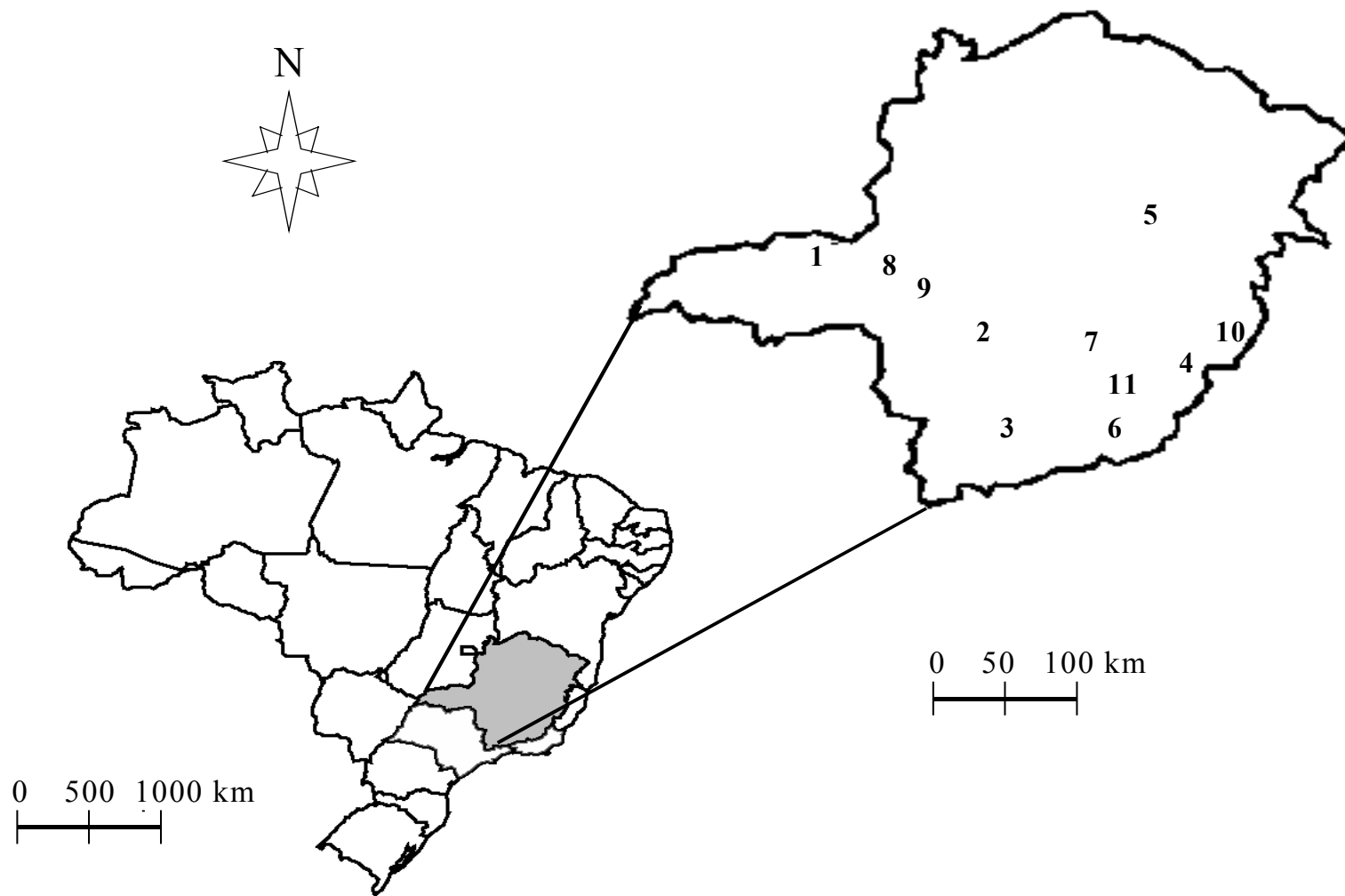


Figura 1- Locais de coleta de populações de bicho-mineiro do cafeeiro no Estado de Minas Gerais. Os números correspondem aos municípios que estão indicados na Quadro 1.

Quadro 2- Dados de temperatura, precipitação pluviométrica, altitude e relevo dos locais de coletas de *L. coffeella*

Local	Temperatura média anual (°C)		Índice médio pluviométrico anual (mm)	Altitude (m)		Relevo (%)		
	Mínima	Máxima		Mínima	Máxima	Plano	Ondulado	Montanhoso
Araguari	16,0	26,3	1484	505	1087	50	30	20
Bambuí	14,6	28,4	1448	637	918	40	30	30
Cambuquira	14,6	26,3	1346	860	1392	10	50	40
Caparaó	14,4	26,5	1600	846	2897	10	40	50
Capelinha	17,2	29,4	1300	712	1244	35	40	25
Guiricema	14,0	26,0	1200	363	1159	8	77	15
Patrocínio	16,0	28,0	1700	750	1258	60	30	10
Ponte Nova	14,0	26,0	1060	330	862	20	60	20
São Gotardo	16,0	28,0	1300	838	1199	10	50	40
Simonésia	14,4	26,5	1140	598	1647	10	20	70
Viçosa	14,0	26,0	1203	610	895	3	12	85

### 2.3. Produtos químicos

Os compostos químicos usados em grau técnico foram os inseticidas fosforados clorpirifós (96%), dissulfotom (97,1%), etiom (97,8%) e paratiom-metílico (80,7%), mais os sinergistas dietil-maleato (97%), um inibidor de glutaciona-S-transferases; trifenil-fosfato (99%), um inibidor de esterases; e butóxido de piperonila (90%), um inibidor de monooxigenases dependentes do citocromo P-450. Estes compostos foram diluídos em acetona em grau analítico.

### 2.4. Bioensaios

Inicialmente foram feitos bioensaios com 3º instar larval do bicho-mineiro, com tamanho padronizado de  $0,29 \pm 0,09$  cm, mesmo estágio larval utilizado por ALVES et al. (1992), com a população de Viçosa (padrão de suscetibilidade) para determinação do tempo de exposição e obtenção de faixas de respostas com e sem sinergista para cada inseticida. O tempo de exposição foi determinado pelo tempo de sobrevivência da testemunha exposta apenas ao solvente acetona.

Foram avaliados os intervalos de tempos de exposição de 6, 12, 18 e 24 horas, utilizando-se o tempo de exposição de 6 horas como o mais adequado para a realização dos bioensaios definitivos. Para a determinação de faixas de respostas, foram preparadas soluções-estoque de 100 mg/ml para cada inseticida, que posteriormente foram diluídas na proporção de 1:10 até obter a menor concentração que foi de  $10^{-5}$  mg/ml, com uma relação entre a maior (10 mg/ml) e menor ( $10^{-5}$  mg/ml) foi de  $10^6$  vezes. Desta forma, dentro desta ampla faixa testada nos bioensaios iniciais, foram obtidas faixas mais estreita de respostas. Por exemplo a faixa de resposta, um intervalo de concentrações com baixa ( $\approx 0\%$ ) e com alta ( $\approx 100\%$ ) mortalidade dos indivíduos expostos, encontrada para o inseticida dissulfotom foi de  $10^{-2}$  a  $10^{-1}$  mg/ml. Dentro deste intervalo foram estabelecidas entre cinco a sete concentrações além de um controle com apenas o solvente e usadas na realização dos bioensaios definitivos de concentração-resposta para a estimativa das concentrações

letais para 99% de mortalidade ( $CL_{99}$ ) para cada inseticida e inseticida em mistura com sinergista (MATHEWS, 1984).

Os bioensaios *in vivo* foram feitos usando-se placas de Petri (9,0 x 1,5 cm) e papel-filtro impregnado com o composto veiculado em acetona. Após a evaporação do solvente, os papéis-filtro foram colocados nas placas de Petri, que em seguida receberam 20 larvas/placa, com três repetições para cada concentração. As placas de Petri foram mantidas a temperatura de  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa de  $70 \pm 5$  %, até o momento da avaliação da mortalidade dos indivíduos. A mortalidade foi avaliada após um período de exposição de seis horas. Posteriormente, foi efetuado um teste de confirmação das  $CL_{99}$  obtidas, por meio de exposição de 20 larvas/placa da população suscetível em cinco repetições. Estas concentrações foram usadas para detecção de populações resistentes e evidenciação de sinergismo para cada inseticida.

## **2.5. Análise estatística**

Os dados de mortalidade obtidos dos bioensaios de concentração-resposta foram submetidos a análise de próbite, segundo FINNEY (1971), utilizando-se o procedimento PROC PROBIT do SAS (SAS INSTITUTE, 1997). Quanto aos resultados de mortalidade obtidos pelas concentrações discriminatórias, estes foram corrigidos pela mortalidade da testemunha, utilizando-se a fórmula de ABBOTT (1925) e, para determinar a diferença mínima significativa entre as populações resistentes e o padrão de suscetibilidade, aplicou-se o teste Z com correção para continuidade (SNEDECOR e COCHRAN, 1967; ROUSH e MULLER, 1986). Para verificar se a mortalidade provocada por cada inseticida em mistura com sinergista era significativamente diferente da mortalidade provocada por apenas pelo o inseticida, aplicou-se o teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Análise de regressão múltipla utilizando o procedimento PROC REG do SAS (SAS INSTITUTE, 1997), foi feita para verificar uma possível associação entre inseticidas ou grupos de inseticidas usados para o controle do bicho-mineiro do

cafeeiro e determinar se o uso dos diferentes compostos contribuem para a seleção de indivíduos resistentes de *L. coffeella* aos inseticidas estudados.

### 3. RESULTADOS

Os dados de toxicidade dos inseticidas clorpirifós, dissulfotom, etiom e paratiom-metílico, obtidos pelas curvas de concentração-resposta para o padrão de suscetibilidade, com suas respectivas concentrações discriminatórias estão no Quadro 3. Os valores das  $CL_{99}$  dos inseticidas, foram usados na detecção de populações resistentes durante o monitoramento. Estes valores variaram para os diferentes inseticidas e sinergistas empregados neste estudo, com os inseticidas clorpirifós e etiom apresentando menor e maior valor, respectivamente (Quadro 3). Além disso, com relação aos valores das inclinações das curvas de concentração-resposta para os quatro inseticidas, o maior valor foi verificado para o inseticida clorpirifós, o que indica maior homogeneidade de resposta a este produto em *L. coffeella* (Quadro 3).

Com relação aos resultados da varredura das  $CL_{99}$  dos inseticidas, oito populações de *L. coffeella* apresentaram resistência ao inseticida dissulfotom, cinco ao etiom, quatro ao paratiom-metílico e apenas uma ao inseticida clorpirifós (Quadro 4). As populações de Araguari, Patrocínio e São Gotardo, situadas na região do Triângulo Mineiro, mais a população de Bambuí, região oeste do Estado de Minas Gerais, apresentaram maiores problemas quanto a ocorrência deste fenômeno, principalmente a população de Araguari, a qual foi resistente aos quatro inseticidas investigados. Os

inseticidas dissulfotom, etiom e paratiom-metílico apresentaram problema de resistência a *L. coffeela* na maioria das regiões produtoras de café do Estado de Minas Gerais. Por outro lado, o inseticida clorpirifós mostrou-se menos problemático, apresentando resistência a apenas a população de Araguari (Quadro 4).



Quadro 3 - Toxicidade de inseticidas ao 3º instar larval de *Leucoptera coffeella* para o padrão de suscetibilidade

Inseticida	N*	Inclinação ± EPM*	CL <sub>50</sub> (IC* 95%) µg i.a./cm <sup>2</sup>	CL <sub>99</sub> (IC 95%) µg i.a./cm <sup>2</sup>	χ <sup>2</sup>	Prob.
Clorpirifós	300	0,77 ± 0,08	0,013 (0,12-0,15)	0,071 (0,05-0,11)	4,79	0,18
Dissulfotom	360	0,65 ± 0,07	0,011 (0,097-0,013)	0,082 (0,057-0,139)	2,63	0,62
Etiom	360	0,52 ± 0,02	3,083 (2,367-3,859)	83,946 (47,43-201,91)	0,81	0,93
Paratiom-metílico	300	0,57 ± 0,05	0,023 (0,024-0,029)	0,428 (0,265-0,867)	4,87	0,18

\* N = número de insetos usados no teste, EPM = erro-padrão da média , IC = intervalo de confiança, CL = concentração letal, χ<sup>2</sup> = Qui-quadrado e Prob. = probabilidade

Quadro 4 - Mortalidade de larvas de *Leucoptera coffeella* de dez populações pelas concentrações discriminatórias de inseticidas estabelecidas para o padrão de suscetibilidade (Viçosa)

População	N <sup>1</sup>	Mortalidade (%)			
		Clorpirifós	Dissulfotom	Etiom	Paratiom-metílico
Araguari	100	65,30*	7,14*	21,00*	10,20*
Bambuí	100	95,00	17,52*	15,00*	14,00*
Cambuquira	100	95,95	59,00*	87,00	100,00
Caparaó	100	95,95	90,00*	98,00	95,95
Capelinha	100	95,95	81,00*	29,29*	90,00
Guiricema	100	100,00	20,20*	98,00	99,00
Patrocínio	100	92,90	55,10*	29,29*	76,76*
Ponte nova	100	100,00	98,00	98,00	99,00
São Gotardo	100	100,00	21,21*	47,47*	70,70*
Simonésia	100	100,00	98,00	98,00	99,00
Viçosa	100	96,00	99,00	85,00	95,00

\*Mortalidade significativamente diferente da mortalidade na população-padrão de suscetibilidade pelo teste Z a 95% de probabilidade, com correção para a continuidade e N<sup>1</sup>= número de insetos usados para o teste

Os dados de uso de inseticidas ou grupos de inseticidas para o controle do bicho-mineiro do cafeeiro nos diferentes locais de coleta estão apresentados na Quadro 5. Estes dados demonstram baixo ou não uso de inseticidas para as populações situadas na região da Zona da Mata mineira, contrapondo-se com o grande uso nas regiões de cerrado, principalmente a região, Araguari e Patrocínio, que atingem um total de 10 aplicações de inseticidas fosforados por ano agrícola, além de piretróides e outros grupos de inseticidas (Quadro 5). O sumário de falhas de controle encontra-se no Quadro 5. Os resultados da análise de regressão estão apresentados no Quadro 6. Estes dados mostraram correlação positiva e modelos altamente significativos entre alguns inseticidas ou grupos de inseticidas, que pode estar contribuindo tanto positivamente ou negativamente para a seleção cruzada, conseqüentemente levando à resistência cruzada ou múltipla.

Quadro 5 - Sumário de uso de inseticidas, grupos de inseticidas e relatos de falhas de controle nos locais de coletas *L. coffeella* relacionados na Quadro 1 e Figura 1

Local	<sup>1</sup> Número médio de aplicações (número de falhas de controle) por ano agrícola (1998/1999 e 1999/2000)								
	Clorpirifós	Dissulfotom	Etiom	Paratiom- Metílico	Outros* Fosforado	Total de Fosforados	Piretróides	Carbarmatos	Cartap
Araguari	0	0	0	5 (1)	5 (1)	10 (2)	7	0	3
Bambuí	2 (1)	1 (1)	1 (1)	0	3 (2)	7 (5)	4 (2)	1 (1)	6 (4)
Cambuquira	0	1 (0)	0	0	0	1 (0)	0	0	0
Caparaó	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Capelinha	1 (0)	1 (0,5)	0	0	1 (0)	2 (0,5)	0	0	0
Guiricema	0	0	1 (0)	3,5 (0)	0	4,5 (0)	0	0	0
Ponte Nova	0	0	0,5 (0)	0	0	0,5 (0)	0	0	0
Patrocínio	2 (--)	0	2,5 (--)	0	5,5 (--)	10 (--)	4,5 (--)	5,5 (--)	2 (--)
São Gotardo	1 (--)	1 (--)	0	0	0	2 (--)	4 (--)	3 (--)	1 (--)
Simonésia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Viçosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* Forate, profenofós, terbufós, triazofós.

<sup>1</sup> Dados de uma propriedade de cada município e (--) dados não disponíveis pelos os responsáveis técnicos dos locais de coleta.

Quadro 5 - Modelos de regressão múltipla relacionando a freqüência de indivíduos resistentes a clorpirifós, dissulfotom, etiom e paratiom-metílico com o uso de inseticidas ou grupos de inseticidas

y	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Equação	g.l res	QMres	F	P
Freqüência de indivíduos resistentes ao clorpirifós	Clorpirifós	Etiom	Outros fosforados	$Y = 95,99* + 5,41X_1* + 6,90X_2* - 5,92X_3*$	7	4,44	71,57	0,001
Freqüência de indivíduos resistentes ao Dissulfotom	Piretróides	Outros fosforados	Total dos fosforados	$Y = 93,10 * - 9,86X_1* + 31,30X_2* - 17,28X_3*$	7	110,43	38,25	0,0001
Freqüência de indivíduos resistentes ao etiom	Dissulfotom	Outros fosforados	-----	$Y = 96,04 * - 37,52X_1* - 13,82X_2*$	8	179,59	30,85	0,0002
Freqüência de indivíduos resistentes ao paratiom-metílico	Carbamatos	Cartap	Piretróides	$Y = 96,48* + 8,96X_1* - 9,14X_2* - 8,77X_3*$	7	25,74	176,91	0,0001

\*Parâmetros significativos pelo teste t a 1% de probabilidade, g.l.res = grau de liberdade do resíduo, QMres = quadrado médio do resíduo, F = valor de F calculado pelo teste t e P = probabilidade

Os dados de toxicidade dos inseticidas clorpirifós, dissulfotom, etiom e paratiom-metílico em mistura com sinergista para as populações resistentes, exceto a de São Gotardo, estão apresentados no Quadro 7. A população de São Gotardo não pode ser testada devido ao seu afinamento durante a condução deste trabalho de investigação. Com relação a alguns, valores obtidos para as CL<sub>99</sub>, principalmente para o inseticida etiom, houve um aumento destas concentrações, evidenciando antagonismo dos sinergistas butóxido de piperonila e trifenil-fosfato a este inseticida (Quadro 7).

Os dados de varreduras dessas concentrações estão apresentados no Quadro 8. De maneira geral, os sinergistas butóxido de piperonila e dietil-maleato apresentaram maior percentagem de mortalidade, sugerindo o envolvimento de monooxigenases e glutatona-S-transferases como principais mecanismos de resistência de *L. coffeela* a inseticidas fosforados. Trifenil-fosfato, em função de sua menor supressão, sugere uma menor participação de esterases na destoxificação metabólica de inseticidas fosforados em *L. coffeela*.

Quadro 7. Toxicidade de inseticidas em mistura sinergista a o 3º instar larval de *Leucoptera coffeella* para a população suscetível

Inseticida + sinergista	N	Inclinação ± EPM	CL <sub>50</sub> (IC 95%) µg i.a./cm <sup>2</sup>	CL <sub>99</sub> (IC 95%) µg i.a./cm <sup>2</sup>	RS**	χ <sup>2</sup>	Prob.
Clorpirifós + DEM*	360	0,69 ± 0,07	0,004 (0,003-0,005)	0,020 (0,016-0,029)	3,25	0,79	0,93
Clorpirifós + PBO*	280	1,03 ± 0,08	0,005 (0,004-0,006)	0,016 (0,013-0,022)	2,60	5,02	0,16
Clorpirifós + TFF*	300	1,00 ± 0,09	0,003 (0,003-0,004)	0,011 (0,009-0,014)	4,33	1,55	0,67
Dissulfotom + DEM	360	0,89 ± 0,04	0,023 (0,017-0,031)	0,140 (0,079-0,458)	0,47	8,95	0,06
Dissulfotom + PBO	300	0,85 ± 0,11	0,036 (0,031-0,043)	0,206 (0,146-0,338)	0,30	5,70	0,12
Dissulfotom + TFF	360	0,83 ± 0,05	0,028 (0,020-0,038)	0,142 (0,085-0,424)	0,39	8,91	0,06
Etiom + DEM	300	0,86 ± 0,07	0,820 (0,718-0,921)	3,757 (2,825-5,737)	3,75	2,36	0,50
Etiom + PBO	300	0,81 ± 0,11	77,562 (70,141-84,920)	239,190 (184,032-386,095)	0,03	5,53	0,13
Etiom + TFF	420	0,38 ± 0,02	4,342 (3,209-5,679)	293,287 (163,837-651,600)	0,71	3,20	0,66
Paratiom + DEM	300	0,88 ± 0,07	0,013 (0,011-0,015)	0,076 (0,053-0,131)	1,76	4,42	0,21
Paratiom + PBO	360	0,70 ± 0,06	0,014 (0,012-0,016)	0,071 (0,053-0,1070)	1,64	5,60	0,23
Paratiom + TFF	360	0,81 ± 0,05	0,011 (0,009-0,012)	0,081 (0,058-0,132)	2,09	2,74	0,60

\* DEM = dietil-maleato, PBO = butóxido de piperonila, TFF = trifenil-fosfato

\*\*RS = Razão de sinergismo (CL<sub>50</sub> inseticida não-sinergizado ÷ CL<sub>50</sub> inseticida sinergizado)

Quadro 8 - Mortalidade de larvas de *Leucoptera coffeella* pelas concentrações discriminatórias de inseticidas com e sem adição de sinergistas para populações resistentes

População	% Mortalidade			
	Dissulfotom			
	Dissulfotom	Butóxido de piperonila	Trifenil-fosfato	Dietil-maleato
Araguari	7,00	93,00*	23,00	36,00*
Bambuí	17,50	88,00*	52,00*	63,00*
Cambuquira	59,00	79,00*	51,00	95,00*
Caparaó	90,00	100,00	92,00	73,00*
Capelinha	81,00	86,73	69,14	76,84
Guiricema	20,20	96,00*	50,00*	61,00*
Patrocínio	55,10	89,00*	20,00*	29,00*
	Etiom			
	Etiom	Butóxido de piperonila	Trifenil-fosfato	Dietil-maleato
Araguari	21,00	41,00*	0,00*	25,00
Bambuí	15,00	76,76*	57,57*	8,00
Capelinha	29,25	90,91*	51,51*	89,89*
Patrocínio	29,25	35,00	12,00	42,00
	Paratiom-metílico			
	Paratiom-metílico	Butóxido de piperonila	Trifenil-fosfato	Dietil-maleato
Araguari	10,02	22,00	24,00	26,00
Patrocínio	76,75	44,00*	54,00*	45,00*
Bambuí	14,00	40,00*	11,00	24,00
	Clorpirifós			
	Clorpirifós	Butóxido de piperonila	Trifenil-fosfato	Dietil-maleato
Araguari	65,30	52,00	48,00	50,00

\*Mortalidade significativamente diferente da mortalidade causada na mesma população, pelo inseticida utilizado isoladamente baseado no teste Dunnett a 1% de probabilidade



## 4. DISCUSSÃO

Como exposto na introdução, poucos trabalhos foram realizados com relação à resistência de *L. coffeela* a inseticidas, principalmente abordando mecanismos de resistência. Como trabalho pioneiro para esta espécie nesta linha de pesquisa, buscou elucidar os principais complexos enzimáticos envolvidos na destoxificação metabólica de inseticidas organofosforados com discussão embasada em estudos e trabalhos correlacionados.

Os resultados obtidos mostraram resistência de bicho-mineiro do cafeeiro aos inseticidas organofosforados sob estudo na maioria das regiões produtoras de café do Estado de Minas Gerais onde estes ou outros produtos são aplicados (Quadro 4). Este fato vem de encontro ao grande uso e reclamações de falhas de controle desses e de outros inseticidas para estas localidades, principalmente na região do Triângulo Mineiro (Quadro 5). Registro de populações desta praga resistentes a inseticidas organofosforados foi constatado anteriormente por ALVES et al. (1992) para alguns municípios mineiros. Na Tanzânia, BARDNER e MCHARO (1988), encontraram populações resistentes aos inseticidas fenitrotiom, fentiom, diazinom e clorpirifós. Das dez populações monitoradas, apenas Ponte Nova, Viçosa e Simonésia, localizadas na região da Zona da Mata mineira, não apresentaram resistência aos inseticidas (Quadro 4), fato que pode

ser atribuído a pouca ou nenhuma utilização de inseticidas nestas localidades (Quadro 4).

ALVES et al. (1992) através de varreduras com concentrações discriminatórias, constataram resistência de bicho-mineiro do cafeeiro aos inseticidas clorpirifós, etiom e fentiom, destacando-se os inseticidas etiom e fentiom que apresentaram este fenômeno nas populações desta praga nos municípios de Luz, de Patrocínio, de São Gotardo, de São Tomaz de Aquino e de São Sebastião do Paraíso, Estado de Minas Gerais. Estes autores atribuíram a ocorrência deste fato como sendo conseqüência do uso contínuo do inseticida fentiom, que poderia estar proporcionando resistência cruzada ao clorpirifós e etiom, alertando também para o risco de resistência cruzada a outros organofosforados. O alerta e a preocupação destes autores, sobre o possível desenvolvimento de resistência cruzada, são refletidas nos resultados obtidos neste trabalho, que constataram resistência a outros organofosforados como dissulfotom e paratiom-metilico, além do próprio etiom e clorpirifós, provavelmente devido, em grande parte, à seleção por outros compostos (Quadro 5).

O uso de inseticidas mostrou-se variável para as diferentes localidades, principalmente Sul de Minas e Zona da Mata mineira em relação à região de cerrado (Triângulo Mineiro). As classes de inseticidas com maior número de aplicações por ano agrícola foram fosforados, piretróides, carbamatos e cartap, um derivado da nereistoxina (toxina de um verme marinho *Lumbriconereis heteropoda*).

Regressões simples de mortalidade de indivíduos com o uso dos inseticidas-teste nas diferentes regiões não foram significativas ( $n = 11$ ,  $p > 0,05$ ), o que sugere que a seleção para resistência a eles esteja sendo intensificada pelo uso de outros inseticidas que possuam o mesmo mecanismo primário de ação ou os mesmos mecanismos de destoxificação, o que já tem sido relatado para outras espécies de insetos como *Leucoptera meyrick* Ghesquière (Lepidoptera: Lyonetiidae) por BARDNER e MCHARO (1988), *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) por GUEDES et al. (1995) e

*Rhyzopertha dominica* Fabricius (Coleoptera: Brostrichidae) por GUEDES et al. (1996, 1997, 1998). Por outro lado, análises de regressão múltipla relacionando frequência de indivíduos resistentes com o uso de inseticidas ou grupos de inseticidas (Quadro 4) possibilitaram a obtenção de modelos altamente significativos (Quadro 6). Baseados nesses, a resistência ao inseticida clorpirifós parece ter sua evolução favorecida pelo uso de etiom e desfavorecida por outros fosforados.

A resistência ao inseticida dissulfotom parece ser favorecida pelo uso de outros inseticidas fosforados e desfavorecida por clorpirifós, etiom, paratiom-metílico e piretróides, uma vez que a utilização de dissulfotom tem sido pequena nos últimos anos. Quanto ao inseticida etiom a resistência parece ser desfavorecida por outros fosforados como forate, profenofós, terbufós e triazofós, inclusive pelo uso de dissulfotom, enquanto que a resistência a paratiom-metílico parece estar sendo favorecida pelo uso de carbamatos e desfavorecida por outros compostos (Quadro 6). Essa análise exploratória dos dados de uso de inseticidas e frequência de indivíduos resistentes sugere a existência de resistência cruzada, um mesmo mecanismo levando à resistência a dois ou mais inseticidas, em populações de bicho-mineiro do cafeeiro e também o efeito negativo de outros inseticidas sobre essas populações favorecendo o seu controle.

Resistência cruzada a inseticidas organosforados ocorreu na Tanzânia com o uso contínuo de fenitrotiom, utilizado no controle de bicho-mineiro do cafeeiro *L. meyrick*, que levou ao desenvolvimento de resistência a outros inseticidas (BARDNER e MCHARO, 1988) e no Brasil com as espécies *S. zeamais* (GUEDES et al., 1995) e *R. dominica* (GUEDES et al., 1996, 1997, 1998). O efeito negativo de alguns inseticidas sobre populações de insetos-praga resistentes tem sido observado em algumas espécies, principalmente em insetos-praga de produtos armazenados como *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae), *Plodia interpunctella* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae) e *Cadra cautella* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) (ZETTLER, 1982) e *R. dominica*

(GUEDES et al., 1998) e o uso sugerido como tática de manejo de resistência a inseticidas (BROWN, 1971; OPPENOORTH, 1976).

Os resultados de varredura com concentrações discriminatórias com a mistura de inseticida mais sinergista (Quadro 8), sugerem haver o envolvimento de mais de um mecanismo bioquímico na metabolização de inseticidas em *L. coffeela*, com possível caso de resistência múltipla, em que mais de um mecanismo de destoxificação conferindo resistência a diferentes compostos coexistem na mesma população. Dentre estes, evidenciou-se o envolvimento de monooxigenases dependentes do citocromo P-450 e glutathione-S-transferases como principais mecanismos de resistência de *L. coffeela* a inseticidas organofosforados, evidenciados pelo o sinergismo de butóxido de piperonila e dietil-maleato (Quadro 8). Trifenil-fosfato em função de sua menor supressão e em menos instâncias, sugere um menor envolvimento de esterases na destoxificação metabólica desses inseticidas. Portanto, além da possível ocorrência de resistência múltipla, há também a possibilidade de estar ocorrendo resistência cruzada a outros inseticidas organofosforados ou até mesmo a outras classes que apresentam o mesmo modo de ação e que são metabolizados por estes mesmos mecanismos bioquímicos de resistência.

O complexo enzimático formado por monooxigenases dependentes do citocromo P-450, possuem um grande número de substratos, catalizando vários tipos de reações, principalmente de oxidação (BRATTSTEN et al., 1986; CAMPANHOLA, 1990; SONDERLUND e BROOMQUIST, 1990; B-BERNARD e PHILOGÈNE, 1993). Essas enzimas atuam preferencialmente metabolizando substrato lipofílico a produtos com maior solubilidade em água ou com grupos funcionais reativos, capazes de efetuarem reações de conjugação.

O metabolismo oxidativo tem sido reportado como um dos mais importantes mecanismos destoxificativos a praticamente todas as classes de inseticidas (CASIDA, 1970; BRATTSTEN et al., 1986; SONDERLUND e BROOMQUIST, 1990; ISHAAYA, 1993). A maioria dessas evidências estão embasadas no potencial do butóxido de piperonila e outros compostos em inibir a ação de monooxigenases dependentes do citocromo P-450 (BRATTSTEN et al.,

1986; SONDERLUND e BROOMQUIST, 1990; ISHAAYA, 1993). Todavia, com uma maior atividade destas enzimas, alguns compostos pré-inseticidas, como por exemplo paratiom-metílico, sofrem ativação a metabólitos mais reativos, com substancial aumento da toxicidade (WILKINSON, 1983). Este fato pode estar associado à efetividade de controle desse inseticida em algumas regiões, onde não foi constatada resistência a esse produto.

O complexo glutathiona-S-transferase apresentou também efetiva participação no metabolismo dos inseticidas estudados, constatado pela inibição causada pelo sinergista dietil-maleato (Quadro 8). Assim como as monooxigenases e esterases, estas enzimas são importantes metabolizadoras de inseticidas organofosforados (MOTOYAMA et al., 1980; DAUTERMAN, 1983; B-BERNARD e PHILOGÈNE, 1993). Contudo, tais resultados obtidos com o uso de sinergistas são de natureza preliminar, necessitando de estudos adicionais para que possam ser bem estabelecidos os padrões de resistência cruzada e resistência múltipla em populações de bicho-mineiro, possibilitando o desenvolvimento de estratégias efetivas para o controle destas populações.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Os objetivos deste trabalho foram detectar resistência e evidenciar preliminarmente os mecanismos bioquímicos de resistência a inseticidas fosforados em populações de *Leucoptera coffeella* Guérin-Ménéville (Lepidoptera: Lyonetiidae). Na sua execução foi utilizado como material biológico dez populações de *L. coffeella* de diferentes regiões produtoras de café do Estado de Minas Gerais, que foram coletadas a campo e mantidas em gaiolas em casa de vegetação, além de uma população do cafezal adjacente ao viveiro de mudas de café da Universidade Federal de Viçosa, utilizada como padrão de susceptibilidade. Em cada local de coleta foi preenchido questionário sobre o uso de inseticidas e falhas de controle, que foram correlacionados com dados climatológicos, altimétricos e topográficos. Inicialmente foram feitos bioensaios com 3º instar larval do bicho-mineiro com a população suscetível para obtenção de faixas de respostas, que serviram como parâmetro referencial na preparação das concentrações dos bioensaios definitivos de concentração-resposta. Os dados de mortalidade obtidos dos bioensaios definitivos foram submetidos à análise de próbite para estimação das  $CL_{99}$  para cada inseticida, que foram então usadas como concentrações discriminatórias na detecção de resistência nas populações sob estudo. O estudo dos prováveis mecanismos bioquímicos de resistência desta

praga aos inseticidas, foi feito através do uso de concentrações letais discriminatórias de inseticidas em mistura com sinergistas na população susceptível. Os resultados obtidos mostraram resistência à maioria das populações, com oito populações apresentando este fenômeno ao inseticida dissulfotom, cinco ao etiom, quatro ao paratiom-metílico e apenas uma população apresentou resistência ao inseticida clorpirifós. As populações de Araguari, Patrocínio e São Gotardo e Bambuí foram resistentes a maioria dos inseticidas sob estudo, destacando-se a população de Araguari que mostrou este fenômeno aos quatro inseticidas fosforados estudados. Dados obtidos dos questionários sobre uso de inseticidas mostraram o largo uso de inseticidas nas regiões de cerrado, com algumas localidades atingindo um total de 20 aplicações por ano agrícola. Modelos de regressão múltipla mostraram associação entre grupos de inseticidas, que podem estar selecionando em favor da resistência aos inseticidas estudados, além da evidência de efeito de inseticidas ou grupos de inseticidas negativamente correlacionados aos compostos em estudo, que desfavorecem a seleção de populações resistentes a estes. Com relação ao estudo de sinergismo, os sinergistas butóxido de piperonila e dietil-maleato suprimiram significativamente a resistência, sugerindo que destoxificação metabólica por monooxigenases dependentes de citocromo P450 e glutathione-S-transferases parecem ser os principais mecanismos de resistência de *L. coffeella* a estes inseticidas, com um menor envolvimento de esterases, o que indica também um possível desenvolvimento de resistência múltipla a inseticidas fosforados. Neste contexto, há necessidade de confirmação bioquímica destes mecanismos e, principalmente, a adoção de programas de manejo de resistência a inseticidas nessas regiões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.
- ALVES, P.M.P., LIMA, J.O.G., OLIVEIRA, L. M. Monitoramento da resistência do bicho-mineiro-do-café, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) a inseticidas em Minas Gerais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.21, p.77-91, 1992.
- BARDNER, R ., MCHARO, E.Y. Confirmation of resistance of the coffee leafminer *Leucoptera MEYrich* Guesquire (Lepidoptera: Lyonetiidae) to organo-phosphate insecticide sprays in Tanzania. **Tropical Pest Management**, v.34, p.52-54, 1988.
- B-BERNARD,C., PHILOGÈNE, B.J.R. Insecticide synergists: role, importance, and perspectives. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.38, p.199-223, 1993.
- BOX, H.E. The binomics of the white coffee-leaf miner, *Leucoptera coffeella*, Guér. (Lepidoptera: Lyonetiidae), in Kenya colony. **Bulletin of Entomological Research**, v.14, p.133-145, 1923.
- BRADLEY, J.D. Taxonomic notes on *Leucoptera MEYRICK* Ghesquière and *Leucoptera coffeella* Guérin-Méneville (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.49, p.417-419, 1958.



- 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.
- BRINDLEY, W.A., SELIM, A.A. Synergism and antagonism in the analysis of insecticide resistance. **Environmetal Entomology**, v.13, p.348-353, 1984.
- BROWN, A.W.A. Pest resistance to pesticide. In: **Pesticide in the environment**. WHITE-STEVENS (ed.), New York, v.1, p.457-552, 1971.
- CASIDA, J.E. Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.26, p.753-772, 1970.
- CAMPANHOLA, C. **Resistência de insetos a inseticidas: importância, características e manejo**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1990. 45p.
- CROWE, T.J. Coffee leaf miner in Kenya – I: species and life histories. **Kenya Coffee**, v.29, p.173-183, 1964.
- DAUTERMAN, W.C. Role of hydrolases and glutathione-S-transferases in insecticide resistance. p.229-247. In: GEORGHIOU G.P., SAITO, T. **Pest resistance to pesticides**. New York, 1983. 426p.
- FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. London: Cambridge University Press, 1971. 333p.
- FONSECA, J.P. O “bicho-mineiro” das folhas do cafeeiro *Leucoptera meyrick* (Guérin-Méneville) **O Biológico**, São Paulo, v.10, p.253-258, 1944.
- GEORGHIOU, G.P. The magnitude of the resistance problem. p.14-43. In: **Pesticide Resistance: strategies and tactics for management**. Washington: National Academy Press, 1986. 364p.
- GEORGHIOU, G.P., TAYLOR, C.E. Factors influencing the evolution of resistance. p.18-41. In: **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**. Washington: ACS Series 1990. 421p.
- GEORGHIOU, G.P., TAYLOR, C.E. Overview of insecticide resistance. In: Green, M.B., LeBaron, H.M., Moberg, W.K. (eds.). **Managing resistance to agrochemicals: From fundamental research to practical strategies**. Washington, D.C.: National Academy Press, p.157-169, 1986.
- GEORGHIOU, G.P., LAGUNES-TEJEDA, A. **The Occurrence of Resistance in Arthropods**. Rome: FAO, 1991. 318p.

- 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., DOVER, B.A., KAMBHAMPATI, S. Resistance to chlorpyrifos-methyl, pirimiphos-methyl, and malathion in Brazilian and U.S. populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). **Journal of Economic Entomology**, v.89, p.27-32, 1996.
- GUEDES, R.N.C., ZHU, K.Y., KAMBHAMPATI, S., DOVER, B.A. An altered acetylcholinesterase conferring negative cross-insensitivity to different insecticidal inhibitors in organophosphate-resistant lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.58, p.55-62, 1997.
- GUEDES, R.N.C., K.Y. ZHU., S, KAMBHAMPATI. Altered acetylcholinesterase associated with organophosphate resistance in *Rhyzopertha dominica* (F) (Col., Bostrichidae) populations from Brazil and the United states. **Journal of Applied Entomology**, v.122, p.269-273, 1998.
- GUEDES, R.N.C. Resistência de insetos a inseticidas. p. 101-107. In ZAMBOLIM, L. **I Encontro sobre manejo de doenças e pragas**. Viçosa: UFV, 1999. 146p.
- GUEDES, R.N.C., D.B. FRAGOSO. Resistência a inseticidas: Bases gerais, situação e reflexões sobre o fenômeno em insetos-praga do cafeeiro. p.99-120. In: L. Zambolim. **I Encontro sobre produção de café com qualidade**. Viçosa: UFV, 1999. 259p.
- GRAVENA, S. Estratégias de manejo integrado do bicho-mineiro-do-cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.13, p.117-129, 1984.
- GREEN, D.S. A proposed origin of the coffee leaf-miner *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Bulletin of the Entomologica Society of America**, v.86, p.664-667, 1984.
- ISHAAYA, I. Insect detoxifying enzymes: Their importance in pesticide synergism and resistance. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.22, p.263-276, 1993.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ (IBC). **Cultura do café no Brasil, pequeno manual de recomendações**. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro do Café, 1986. 214p.

- KAY, I.R., COLLINS, P.J. The Problem of resistance to insecticides in tropical insect pests. **Insect Science and its Applications**, v.8, p.715-721, 1987.
- MATHEWS, G.A. **Pest Management**. London: Longman, 1984. 231p.
- MANN, B.P. The white coffee-leaf miner. **American Naturalist**, v.6, p.596-607, 1872.
- MEY, W. Taxonomische bearbeitung der westpaläarktischen arten der gattung *Leucoptera* Hübner, 1825, s.l. (Lepidoptera, Lyonetiidae). **Deutsche Entomologische Zeitschrift**, v.41, p.173-234, 1994.
- MERVILLE., A.R. The place of biological control in the modern science of entomology. **Kenya coffee**, v.24, p.81-84, 1959.
- METCALF, R.L. Inseticides in pest management. In: METCALF, R. L & Luckmann, W. H. **Introduction to insect pest management**. John Wiley & Sons, New York, p.217-277, 1982.
- MOTOYAMA, N., NOMURA, N., DAUTERMAN, D.C. Multiple factors for organosphorus resistance in the house fly. **Pesticide Science**, v.5, p.393-402, 1980.
- NESTEL, D., DICKSCHEN, F., ALTIERI, M.A. Seasonal and spatial population loads of a tropical insect: The case of the coffee leaf-miner in Mexico. **Ecological Entomological**, v.19, p.159-167, 1994.
- NOTLEY, F.B. The *Leucoptera* leaf miners of coffee on Kilimanjaro. I *Leucoptera coffeella*, Guér. **Bulletin of Entomological Research**, v.46, p.899-912, 1948.
- OPPENORTH, F.J. Development of resistance to insecticides. In: **The future for insecticides: needs e prospects**. Metcalf, R.J., J.J. McKelvy (eds.). New York, John Wiley & Sons, p.41-59, 1976.
- PRICE, N.R. Insect resistance to pesticides: mechanisms and diagnosis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.100C, p.319-326, 1991.
- REIS, P.R., SOUZA, J.C. Manejo integrado do bicho-mineiro *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), e seus reflexos na produção de café. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, p.77-82, 1996.
- ROUSH, R.T., MULLER, G.L. Considerations for design of insecticide resistance monotrning programs. **Journal of Economic Entomology**, v.79, p.293-298, 1986.

- ROUSH, R.T. Designing resistance management programs: How can you choose? **Pesticide Science**, v.26, p.423-441, 1989.
- SAS INSTITUTE, SAS. **User's guide: statistics**. version 6.12. SAS Institute, Cary, NC, USA, 1997. 1128p.
- SCOTT, J.G. Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies, and pitfalls. In: **Pesticide Resistance in Arthropods**, Eds R.T. Roush and B.E. Tabashnik. Chapman & Hall, New York & London: 39-57, 1990.
- SILVESTRI, F. Compendio di entomologia applicata. **Portici**, v.2, p.1-32, 1943.
- SNEDECOR, G.W., COCHRAN W.G. **Statistical methods**. Iowa State University: Ames, 1967. 426p.
- SONDERLUND, D.M., BLOOMQUIST, J.R. Molecular mechanisms of insecticide resistance. p.58-96. In: ROUSH, R.T e TABASHNIK, B.E. **Pesticide Resistance in Arthropods**. New York: Chapman & Hall, 1990. 480p.
- SOUZA, J. C. DE., REIS, P. R., SALGADO, L., MELLES, C. DO C. A.. **Pragas do cafeeiro**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1981. 65p.
- SOUZA, J.C. DE., REIS, P.R., RIGITANO, R.L.O. **Bicho-mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1998. 48p.
- SPEER, M. Observações relativas à biologia do “bicho-mineiro” das folhas do cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Buccolaticidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.19, p.31-47, 1949.
- TABASHNIK, B. E., R. T. ROUSH. Introduction. p.1-3. In: **Pesticide Resistance in Arthropods**, TABASHNIK R.T. e ROUSH, B.E. New York :Chapman & Hall, 1990. 480p.
- THOMAZIELLO, R.A. Manejo integrado de pragas, doenças e plantas daninhas em café. In: **Simpósio Internacional de Manejo Integrado de Pragas, doenças e Plantas Daninhas**. Campinas: ANDEF, v.1, p.155-170, 1987.
- TOLEDO FILHO, J.A. A ocorrência de bicho-mineiro no cafeeiro. Campinas, CATI. **Boletim Fitossanitário-Bayer**, 1982. 4p.
- WILKINSON, C.F. Role of mixed function oxidase in insecticide resistance. In: **Peste resistance to pesticides**, Eds G.P. GEORGHIOU & T. Saito, New York : p. 175-205, 1983.

WILSON, J.A., A.G. CLARK., N.A. HAACK. Effect of piperonyl butoxide on diazinon resistance in field strains of the sheep blowfly, *Lucilia curpina* (Diptera: Calliphoridae), in New Zealand. **Bulletin of Entomological Research**, v.89, p.295-301, 1999.

ZETLER, J.L. Insecticide resistance in selected stored-products insects infesting peanuts in the Southeastern United State. **Journal of Economic Entomology**, v.75, n.2, p.359-362, 1982.