

SINERGISMO A INSETICIDAS FOSFORADOS EM POPULAÇÕES DE *Leucoptera coffeellum* (GUÈR-MÈNEV.) (LEPIDOPTERA: LYONETIIDAE)

Daniel B. FRAGOSO¹, Raul Narciso C. GUEDES¹ Pedro JUSSELINO-FILHO & Leonardo C. MAGALHÃES¹. ¹Universidade Federal de Viçosa, E-mail:dfragoso@alunos.ufv.br

RESUMO : O objetivo deste trabalho foi evidenciar preliminarmente os mecanismos bioquímicos de resistência a inseticidas fosforados em populações de *L. coffeellum*. 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, determinadas para a população susceptível. Os sinergistas butóxido de piperonila e dietil-maleato suprimiram significativamente a resistência, sugerindo que detoxificação metabólica por monooxigenases dependentes de citocromo P-450 e glutathion-S-transferases sejam os principais mecanismos de resistência de *L. coffeellum* a inseticidas fosforados, com um menor envolvimento de esterases, o que indica também um possível desenvolvimento de resistência múltipla a estes compostos.

PALAVRAS-CHAVE: Sinergista, mecanismo de resistência, *L. coffeellum*

ABSTRACT: The objective of this study was preliminarily identify the biochemical mechanisms of insecticide resistance of *Leucoptera coffeellum*. The study of the probable resistance mechanisms of *L. coffeellum*. Was carried out using bioassays with insecticide plus synergist to identify the probable main detoxification enzymes involved in the resistance. The synergists piperonyl-butoxide and diethyl-maleate significant suppressed the resistance, suggesting that detoxification by cytochrome P-450-dependent monooxygenases and glutathion-S-transferases are the main resistance mechanisms to organophosphates insecticides in *L. coffeellum*; detoxification by esterases seem to play a minor role on organophosphate resistance in this insect-pest, suggesting a possible case of multiple resistance.

KEY WORDS: Sinergista, resistance mechanisms, *L. coffeellum*

INTRODUÇÃO

Populações de bicho-mineiro do cafeeiro resistentes aos inseticidas organofosforados fenitrotiom, fentiom, diazinom e clorpirifós, foram constatadas na Tanzânia (Bardner e Mcharo, 1988). No Brasil, Alves et al. (1992) e Fragoso (2000) através de estudos de detecção, encontraram populações de *L. coffeellum* resistentes a inseticidas em municípios produtores de café no estado de Minas Gerais. Conhecimentos toxicológicos sobre o efeito de praguicidas em organismos-praga são importantes para o manejo da resistência, primordialmente na identificação, escolha e adoção de táticas adequadas de uso destes compostos, que buscam retardar a ocorrência deste fenômeno e, principalmente, prolongar a vida útil dos inseticidas. 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). Diante da evidência de populações de *L. coffeellum* resistentes a inseticidas fosforados, associada a grande importância deste grupo químico para o controle dessa séria praga do cafeeiro, além da não existência de trabalhos sobre mecanismos de resistência, este trabalho objetivou determinar preliminarmente os prováveis mecanismos bioquímicos de resistência aos inseticidas clorpirifós, dissulfotom, etiom e paratiom-metílico.

MATERIAL E MÉTODOS

Para detecção de populações de *L. coffeellum* resistentes aos inseticidas, foi usada como padrão de suscetibilidade uma população de Viçosa, além de dez populações provenientes das regiões produtoras de café do Triângulo Mineiro, Alto do Jequitinhonha, oeste e sul do estado de Minas Gerais. Nestes locais foram coletadas folhas minadas e pupas para o estabelecimento da criação. 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. Os compostos químicos usados em grau técnico foram os inseticidas fosforados clorpirifós, dissulfotom, etiom e paratiom-metílico, mais os sinergistas dietil-maleato, trifetil-fosfato e butóxido de piperonila. Estes compostos foram diluídos em acetona em grau analítico.

Foram feitos bioensaios com 3º instar larval do bicho-mineiro, com tamanho padronizado de $0,29 \pm 0,09$ cm, usando-se placas de Petri (9,0 x 1,5 cm) e papel-filtro impregnado com os compostos veiculados em acetona. A proporção inseticida: sinergista usada foi 1:10. Primeiro foi colocado o inseticida sobre o papel-filtro e após a evaporação do solvente, foi colocado o sinergista. Os papéis-filtro secos foram colocados nas placas de Petri, as quais receberam 20 lagartas/placa, com três repetições para cada concentração. Cada curva de concentração-mortalidade foi obtida a partir de cinco a sete concentrações, determinadas preliminarmente pelos ensaios de faixa de resposta. As placas de Petri foram mantidas a temperatura de 25 ± 1 °C e umidade relativa de 70 ± 5 %, até o momento da avaliação da mortalidade dos espécimens. A mortalidade foi avaliada após um período de exposição de seis horas. Essas concentrações foram usadas na evidênciação de sinergismo para cada inseticida. Os dados de mortalidade obtidos dos bioensaios de concentração-resposta foram submetidos a análise de próbite. Para verificar se a mortalidade provocada por cada inseticida em mistura com sinergista era significativamente diferente da mortalidade provocada apenas pelo inseticida, aplicou-se o teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados das concentrações discriminatórias (CL_{99}) de inseticidas em mistura com sinergista ao 3º instar larval de *Leucoptera coffeellum* para a população suscetível estão apresentados no Quadro 1. Os respectivos valores das CL_{99} para cada inseticida foram utilizados na evidênciação dos mecanismos bioquímicos de resistência. Os resultados de toxicidade dos inseticidas clorpirifós, dissulfotom, etiom e paratiom-metílico isoladamente e em mistura com sinergista para as populações resistentes, estão apresentados no Quadro 2. Baseado nestes resultados, evidencia-se o envolvimento de mais de um mecanismo bioquímico na metabolização de inseticidas em *L. coffeellum*, 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 glutathiona-S-transferases como principais mecanismos de resistência de *L. coffeellum* a inseticidas organofosforados, evidenciados pelo o sinergismo de butóxido de piperonila e dietil-maleato (Quadro 2). 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; 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 (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 2). 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).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o uso de sinergistas são de natureza preliminar, necessitando de estudos adicionais para que possam ser consolidados os padrões de resistência cruzada e resistência múltipla em populações de bicho-mineiro do cafeeiro, possibilitando o desenvolvimento de estratégias efetivas para o controle dessas populações, o que será objeto de estudo em futuras investigações.

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.
- 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. **Environmental Entomology**, v.13, p.348-353, 1984.
- DAUTERMAN, W.C. Role of hydrolases and glutathione-S-transferases in insecticide resistance. In: GEORGHIOU G.P., SAITO, T. **Pest resistance to pesticides**. New York, 1983. p.229-247.
- FRAGOSO, D.B. Resistência e sinergismo a inseticidas fosforados em populações de *Leucoptera coffeella* (Guèr-Ménev.) (Lepidoptera: Lyonetiidae), UFV, Viçosa, 35p, 2000. [Tese de Mestrado]
- ISHAAYA, I. Insect detoxifying enzymes: Their importance in pesticide synergism and resistance. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.22, p.263-276, 1993.
- SCOTT, J.G. Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies, and pitfalls. In: ROUSH, R.T., TABASHNIK, B.E. **Pesticide Resistance in Arthropods**. New York : Chapman & Hall, 1990. p.39-57.
- SONDERLUND, D.M., BLOOMQUIST, J.R. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: ROUSH, R.T., TABASHNIK, B.E. **Pesticide Resistance in Arthropods**. New York: Chapman & Hall, 1990. p.58-96.
- WILKINSON, C.F. Role of mixed function oxidase in insecticide resistance. In: GEORGHIOU, G.P., SAITO, T. **Pest resistance to pesticides**, New York : 1983. 175-205.

Quadro 1 - Toxicidade de inseticidas em mistura com sinergista ao 3º instar larval de *Leucoptera coffeellum* para a população suscetível (Viçosa).

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

*RS = Razão de sinergismo (CL₅₀ inseticida não-sinergizado ÷ CL₅₀ inseticida sinergizado).Quadro 2. Mortalidade de larvas de *Leucoptera coffeellum* pela CL₉₉ de inseticidas com e sem adição de sinergistas para populações resistentes

População	% Mortalidade			
	Dissulfotom	Dissulfotom + Butóxido de piperonila	Dissulfotom + Trifenil-fosfato	Dissulfotom + 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	Etiom + Trifenil-fosfato	Etiom + Dietil-maleato
Araguari	21,00	41,00*	0,00*	25,00
Bambuí	15,00	76,00*	57,00*	8,00
Capelinha	29,25	90,91*	51,51*	89,89*
Patrocínio	29,25	35,00	12,00	42,00
	Paratium-metilico	Paratium-metilico + Butóxido de piperonila	Paratium-metilico + Trifenil-fosfato	Paratium-metilico + Dietil-maleato
Araguari	10,02	22,00	24,00	26,00
Bambuí	76,75	44,00*	54,00*	45,00*
Patrocínio	14,00	40,00*	10,00	24,00
	Clorpirifós	Clorpirifós + Butóxido de piperonila	Clorpirifós + Trifenil-fosfato	Clorpirifós + 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 5% de probabilidade.

AVISO

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS
SEGUINTE ENDEREÇOS:

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV
Viçosa - MG
Cep: 36571-000
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485
Fax : (31) 3891-3911

EMBRAPA CAFÉ

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)
Edifício Sede da Embrapa - sala 321
Brasília - DF
Cep: 70770-901
Tel: (61) 448-4378
Fax: (61) 448-4425