



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITOS DO BUTÓXIDO DE PIPERONILA NA TOXICIDADE DO
ORGANOFOSFORADO TEMEFÓS E O ENVOLVIMENTO DE ESTERASES
NA RESISTÊNCIA DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) AO
TEMEFÓS**

BOSCOLLI BARBOSA PEREIRA

ORIENTADOR: Dr. Warwick Estevam Kerr / UFU

CO-ORIENTADOR: Dr. Luiz Carlos Guilherme / EMBRAPA

UBERLÂNDIA – MG

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITOS DO BUTÓXIDO DE PIPERONILA NA TOXICIDADE DO
ORGANOFOSFORADO TEMEFÓS E O ENVOLVIMENTO DE ESTERASES NA
RESISTÊNCIA DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) AO TEMEFÓS**

BOSCOLLI BARBOSA PEREIRA

ORIENTADOR: Dr. Warwick Estevam Kerr / UFU

CO-ORIENTADOR: Dr. Luiz Carlos Guilherme / EMBRAPA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA – MG

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P436e Pereira, Boscolli Barbosa, 1986-
Efeitos do butóxido de piperonila na toxicidade do organofosforado
Temefós e o envolvimento de esterases na resistência de *Aedes aegypti*
(Díptera: culicidae) ao Temefós / Boscolli Barbosa Pereira. - 2008.
36 f. : il.

Orientador: Warwick Estevam Kerr.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. *Aedes aegypti* - Teses. I. Kerr, Warwick Estevam, 1922- . II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU:

595.771



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITOS DO BUTÓXIDO DE PIPERONILA NA TOXICIDADE DO
ORGANOFOSFORADO TEMEFÓS E O ENVOLVIMENTO DE ESTERASES NA
RESISTÊNCIA DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) AO TEMEFÓS**

BOSCOLLI BARBOSA PEREIRA

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Warwick Estevam Kerr (Orientador)

Examinadores: Dr. Carlos Ueira Vieira / UFU

Dr. Maurício Bacci Júnior / UNESP

Data da defesa: 15 / 12 / 2008

As sugestões da Comissão Examinadora e as normas PGGB para o formato da dissertação foram contempladas.

Dr. Warwick Estevam Kerr

*“Nós somos o que fazemos
repetidamente, a excelência não é um
feito, e sim, um hábito.”*

(Aristóteles)

AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico esse trabalho a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para que obtivesse sucesso nessa jornada. A vocês, meu Obrigado!

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	09
CAPÍTULO I: Fundamentação Teórica	11
O <i>Aedes aegypti</i> e a dengue	12
O controle do vetor da dengue	12
Resistência a inseticidas	13
Controle alternativo de <i>Aedes aegypti</i>	15
Referências	18
CAPÍTULO II: Efeitos do butóxido de piperonila na toxicidade do organofosforado temefós e o envolvimento de esterases na resistência de <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) ao temefós	22
Resumo	23
Abstract	24
Introdução	25
Material e Métodos	26
Material biológico	26
Linhagens de <i>Aedes aegypti</i>	26
Pré-tratamento com PBO e exposição ao TE	26
Atividade esterásica	27
Resultados	27
Susceptibilidade e resistência ao TE: efeitos de PBO na toxicidade de TE	27
Efeitos de PBO na atividade esterásica	29
Discussão	30
Agradecimentos	32
Referências	32

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
WHO	World Health Organization
DNA	Ácido desoxirribonucléico
mg	Miligrama
L	Litro
ppm	Partes por milhão
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
<i>A. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
PBO	Butóxido de piperonila
MFO _s	Oxidases multifuncionais
L4	Larvas no quarto estágio de desenvolvimento
mL	Mililitro
h	Hora
μL	Microlitro
mM	Milimolar
pH	Potencial hidrogeniônico
°C	Graus Celsius
nm	Nanômetro
Min	Minuto
X ²	Teste do Qui-quadrado
μM	Micromolar

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

TABELA I: Percentual de mortalidade de larvas de *A. aegypti* nos testes controle e nos testes experimentais com cinco concentrações diferentes de PBO.....26

TABELA II: Atividade esterásica de larvas das linhagens suscetível e resistente tratadas com concentrações diferentes de PBO em diferentes tempos de exposição.....27

APRESENTAÇÃO

As doenças transmitidas por mosquitos são responsáveis por elevados índices de mortalidade e morbidade no cenário mundial. No Brasil, a incidência de dengue tem aumentado ascendentemente. As constantes epidemias da doença chamam a atenção dos programas públicos de saúde que adotam como principal estratégia de controle dos vetores o uso intensivo de inseticidas. É sabido que o uso freqüente de inseticidas pode levar a seleção de populações de mosquitos resistentes, tornando ainda mais difícil o controle desses vetores favorecendo o incremento dos casos da doença. Assim, a eficiência dos inseticidas rotineiramente empregados ou o desenvolvimento de resistência por parte dos vetores devem sempre ser avaliados como medida de segurança para a população envolvida e também como uma economia para os cofres públicos, na medida em que novas alternativas de controle são propostas.

O presente trabalho foi desenvolvido em dois capítulos, o primeiro caracteriza os aspectos gerais do mosquito *Aedes aegypti*, dos programas de combate a este vetor, dos mecanismos de resistência dos insetos aos inseticidas e do uso de sinergistas como estratégia racional de controle de populações resistentes de *A. aegypti*. No segundo capítulo encontram-se os resultados obtidos da exposição de linhagens resistentes e suscetíveis de larvas no estágio L4 de *A. aegypti* ao inseticida organofosforado temefós combinado com o sinergista butóxido de piperonil. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do sinergista na toxicidade de temefós e o envolvimento de esterases na resistência de *A. aegypti* ao organofosforado. A freqüente exposição do *A. aegypti* aos inseticidas, a ausência de informações atuais da susceptibilidade deste vetor ao temefós, a comprovação da resistência e a proposta de uma nova forma de controle justificam a importância desse trabalho. As referências bibliográficas estão dispostas de acordo com os padrões definidos no *Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov/serials/lii.html>).

CAPÍTULO I

Fundamentação Teórica

O *Aedes aegypti* e a dengue

Configurada como um problema de saúde pública, a dengue, cuja manifestação mais grave é a dengue hemorrágica, tem causado preocupação em âmbito mundial. Os países tropicais são os que apresentam maiores índices de infestação, pois suas características ambientais, climáticas e sociais favorecerem o desenvolvimento e proliferação de seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti* descrito por Linnaeus em 1762 (Forattini 1999).

A dengue é uma arbovirose que já é considerada uma epidemia no Brasil. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre cinquenta e cem milhões de pessoas se infectem anualmente, em mais de cem países, de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes morrem em consequência da dengue (WHO 1992).

A transmissão da doença ocorre principalmente pela picada de mosquitos *Aedes* infectados com algum dos quatro sorotipos de vírus da dengue. O vetor tem hábito domiciliar, vive em regiões predominantemente urbanizadas onde fatores como crescimento populacional, migrações, viagens aéreas, urbanização inadequada, mau funcionamento dos sistemas de saúde e a falta de saneamento adequado contribuem para a dispersão ativa do mosquito e para a disseminação dos vários sorotipos da doença (Tauil 2001, Teixeira et al. 2002).

O controle do vetor da dengue

Em programas públicos de controle do vetor, têm sido utilizados inseticidas de diferentes classes. Atualmente, os mais utilizados são os organofosforados e os piretróides. Os piretróides como a cipermetrina, a permetrina e a deltametrina, empregados no controle de insetos adultos, possuem atividade neurotóxica e atuam no sistema nervoso provocando hiperestimulação dos impulsos nervosos devido o fato de bloquearem o movimento iônico de sódio através da membrana dos neurônios (De Lorenzo et al. 2006).

Os principais efeitos causados pelos organofosforados estão relacionados, primeiramente, à inibição da acetilcolinesterase, uma importante enzima do sistema nervoso que, quando inibida, provoca acúmulo de acetilcolina nas sinapses com conseqüente colapso do sistema nervoso, resultando na morte do organismo contaminado (Fulton & Key 2001). Os efeitos secundários, porém muito relevantes, são resultantes da genotoxicidade dos organofosforados. O efeito genotóxico é causado por lesões no DNA, incluindo quebras, bases modificadas e eventos de perdas de cromossomos durante a divisão celular (Kirsch-Volders et al. 2003).

O grande problema decorrente do uso intensivo de inseticidas se deve ao fato de que esses produtos não afetam somente organismos alvos, como também provocam efeitos em outros organismos e até mesmo na espécie humana (Titenko-Holand et al. 1997). Ao atingir os ambientes aquáticos, por exemplo, os organofosforados afetam os organismos alvo e não alvo, alterando a estrutura dos ecossistemas, podendo matar, inclusive, os predadores naturais das larvas de *A. aegypti* (Das & John 1999, Çakir & Sarikaya 2005, Piña-Guzmán et al. 2006). Os efeitos dos inseticidas em animais não alvos vão desde alterações fisiológicas, relativamente simples, até a morte do organismo, entretanto, a exposição às concentrações subletais dessas substâncias podem resultar em alterações metabólicas em níveis individuais, que implicarão em mudanças nos parâmetros populacionais (Duquesne 2006).

Resistência a inseticidas

A freqüente exposição das populações de *Aedes* aos inseticidas promove uma intensa pressão seletiva que favorece o aumento do número de insetos resistentes, comprometendo o controle e favorecendo a transmissão da dengue. Diversos casos de populações de *A. aegypti* resistentes têm sido registrados no Brasil (Andrade & Modolo 1991, Marcoris 1995, 1999).

A susceptibilidade de mosquitos a inseticidas pode ser avaliada pela realização de testes em laboratório. É possível testar uma dose conhecida ou uma concentração-diagnóstica. Segundo recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), por exemplo, uma concentração de 0,012 mg/L

(ppm) de temefós deve ser suficiente para causar a morte de 99,9% de toda uma amostra de larvas de *A. aegypti* (WHO 1992).

É importante salientar que além da detecção de resistência para a formulação das estratégias de controle, também é fundamental o conhecimento dos seus mecanismos. Os mecanismos de resistência de insetos a inseticidas podem resultar de diferentes fenômenos como a redução da penetração do inseticida pela cutícula do inseto; alterações nos alvos de ação do inseticida ou por mudanças nos sistemas enzimáticos para uma rápida detoxificação, envolvendo várias enzimas como as oxidases, esterases e transferases (Hemingway 2000, Hemingway et al. 2004) que permitem ao inseto converter o inseticida em uma forma não tóxica ou eliminá-lo rapidamente do organismo. Quanto à insensibilidade do sítio de ação, os mecanismos se relacionam às alterações na enzima acetilcolinesterase e nos canais de sódio (Karunaratne 2001, Soderlund 2003).

O metabolismo ou detoxificação vem sendo o mecanismo mais estudado de resistência de insetos a inseticidas. Por meio desse processo, o inseto consegue modificar ou detoxificar o inseticida a uma taxa mínima, reduzindo o alcance dessas moléculas ao sítio alvo. Frequentemente, após esse processo, o inseticida é convertido em uma forma menos tóxica ou pode ser expulso rapidamente do corpo do inseto (Hemingway 2000).

Esterases, oxidases, transferases e outras enzimas estão diretamente envolvidas nos processos metabólicos de resistência. Essas enzimas atuam no aumento da eficiência do processo de forma proporcional aos níveis de expressão das mesmas. Enzimas ubíquas como as oxidases e as transferases estão relacionadas na detoxificação de diversos compostos. As esterases, no entanto, atuam especificamente na detoxificação de organofosforados (Conyers et al. 1998).

O aumento nos índices de casos confirmados de dengue confirma a necessidade de melhorias na vigilância do vetor. Monitorar a ocorrência de resistência aos inseticidas de forma periódica e em diferentes regiões do país é uma importante ferramenta para definição de estratégias racionais que envolvam fundamentação investigativa sobre o perfil resistente do vetor e os mecanismos atuantes na população estudada que apresenta essa

característica. Esse tipo de estratégia é importante para a prevenção de novas epidemias (Conyers et al. 1998).

Controle alternativo de *Aedes aegypti*

As primeiras campanhas de combate ao *A. aegypti* basearam-se na utilização de inseticidas organofosforados no controle de larvas e adultos. A detecção de populações resistentes fez com que a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) tomasse a medida de substituir os organofosforados por piretróides para o controle de adultos, visando a utilização do método de rotação de inseticidas com modos de ação diferentes para larvas e adultos (Fulton & Key 2001).

Entretanto, a utilização freqüente de piretróides também seleciona populações resistentes de *A. aegypti*. A confirmação de casos de resistência incentivou sucessivas substituições dos inseticidas empregados nas campanhas de controle (De Lorenzo et al. 2006).

Recentemente, têm sido utilizadas formulações contendo bactérias com potencial larvicida. No entanto, existem alguns problemas decorrentes da baixa persistência desse larvicida no ambiente quando comparado com o organofosforado temefós (Andrade e Modolo, 1991).

A OMS indicou outro larvicida, o *methoprene*, um análogo de hormônio juvenil, que é diferente dos inseticidas convencionais. O principal problema desse inseticida é que sua eficácia não pode ser quantificada pelo uso das metodologias de estimativa de densidade larvária (Braga et al. 2005a).

Um ensaio sobre o efeito de *methoprene* na morfogênese, mortalidade e a inibição da emergência de adultos foi conduzido com a finalidade de definir uma metodologia para avaliação do efeito de análogos de hormônio juvenil em condições laboratoriais e de campo (Braga et al. 2005b). Também existe relato de uso combinado de *methoprene* e temefós no combate às larvas de *A. aegypti* (Braga et al. 2005b).

Além do *methoprene*, um outro análogo de hormônio juvenil, o *pyriproxifen*, foi recomendado pela OMS para controlar larvas de *Aedes sp.* (Estrada & Mulla 1986, Mulla 1991).

Inibidores da síntese de quitina como o diflubenzuron e o triflumuron também encontraram emprego entre os larvicidas devido sua ação durante a ecdise (Estrada & Mulla 1986). Expostas a esses inibidores, as larvas não eliminam a cutícula velha e acabam por morrer. Entretanto, o uso desses inibidores é restrito, pois não são aplicáveis em ambientes com água potável (Mulla 1995).

Ainda na tentativa de superar o problema de resistência em insetos vetores de doenças, os sinergistas têm sido recentemente empregados. Os sinergistas agem minimizando a quantidade de inseticida químico necessária para atuar com eficácia nos alvos específicos do organismo do inseto. Isso ocorre graças ao fato dos sinergistas funcionarem como um substrato alternativo, diminuindo os níveis de detoxificação ou por reagirem com outro sítio no sistema enzimático prevenindo a detoxificação do inseticida, o que eleva as taxas de mortalidade nas populações de insetos resistentes (Beckel 2004).

Raffa & Priester (1985) ainda enfatizam que os sinergistas, ao serem misturados com inseticidas, não só minimizam os mecanismos resistentes do inseto como também reduzem os níveis de contaminação ambiental residual, preservando, inclusive, insetos benéficos e outros organismos não-alvos.

Subramanyan et al. (1989) comprovou a resistência bioquímica em algumas espécies de coleópteros por meio da combinação de inseticidas com sinergistas.

Lorini & Galley (2000) constataram que o sinergista butóxido de piperonila (PBO) induziu um aumento dose-dependente na toxicidade do inseticida deltametrina em populações resistentes de algumas espécies de coleópteros.

Informações que relacionam o potencial toxicológico de inseticidas com a identificação de mecanismos de resistência, distinguindo os sistemas enzimáticos envolvidos no fenômeno, podem ser alcançadas por meio de estudos em que os sinergistas são utilizados apropriadamente. Essas informações são relevantes no sentido de oferecerem meios alternativos para o controle eficaz de vetores importantes como o *A. aegypti* (Daglish et al. 1985, Lorini & Galley 2000).

REFERÊNCIAS:

Andrade CFS, Modolo M 1991. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in integrated control. *Rev Saúde Públ* 25: 184-187.

Beckel H, Lorini I, Lazzari MN 2004. Comportamento de adultos de diferentes raças de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleóptera, Bostrichidae) em superfície tratada com deltametrina. *Rev Bras Entomol* 48: 115-118.

Braga IA, Melo CB, Peixoto AA, Valle D 2005a. Evaluation of methoprene effect on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) development on laboratory conditions. *Mem Inst Osw Cruz* 100: 435-440.

Braga IA, Mello CB, Reis IM, Lima JBP, Viana-Medeiros PF, Valle D 2005b. Effect of methoprene, an insect growth regulator, over temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, in laboratory conditions. *J Med Entomol* 42: 830-837.

Çakir S, Sarikaya R 2005. Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test. *Food Chem Toxicol* 43: 443-450.

Conyers CM, Macnicoll AD, Price NR 1998. Purification and characterization of an esterase involved in resistance to organophosphorous insecticides in the saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). *Insect Biochem Mol Biol* 28: 435-448.

Daglish GJ, Eelkema M, Harrison LM 1995. Chlorpyrifosmethyl plus either methoprene or synergized phenothrin for control of Coleoptera in maize in Queensland, Australia. *J Stored Prod Res* 31: 235-241.

Das P, John G 1999. Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in vivo in *Etroplus suratensis* (Bloch) following exposure to organophosphorus pesticides. *Toxicol Lett* 104: 11-116.

Delorenzo ME, Serrano L, Chung KW, Houguet J, Key PB 2006. Effects of the insecticide permethrin on three life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Ecotoxicol Environ Saf* 64: 122-127.

Duquesne S 2006. Effects of an organophosphate on *Daphnia magna* at suborganismal and organismal levels: Implications for population dynamics. *Ecotoxicol Environ Saf* 65: 145-150.

Estrada JG, Mulla MS 1986. Evaluation of two insect growth regulators against mosquitoes in the laboratory. *J Am Mosq Control Assoc* 2: 57-60.

Forattini OP 1999. Yellow fever. *Rev Saúde Públ*: 33 534-537.

Fulton MH, Key PB 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ Toxicol Chem* 20: 37-45.

Hemingway J 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 1009-1015.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 653-665.

Karunaratne SHPP, Hemingway J 2001. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. *Bull World Health Organ* 79: 1060-1064.

Kirsch-volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate Jr.M, Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surrallés J, Vanhauwaert A, Wakata A 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res* 540: 153-163.

Lorini I, Galley DJ 2000. Effect of the synergists piperonyl butoxide and DEF in deltamethrin resistance on strains of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *An Soc Entomol Bras* 29: 749-755.

Macoris MLG, Camargo MF, Silva IG, Takaku L, Andrighetti MT 1995. Modificação da susceptibilidade de *Aedes aegypti* ao temephos. *Rev Patol Trop* 24: 31-40.

Macoris MLG, Andrighetti MT, Takaku L, Glasser C, Garbeloto VC, Cirino CB 1999. Alteração de resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Públ* 33:521-522.

Mulla MS 1991. Insect growth regulators for vector control of mosquito pests and disease vectors. *Chin J Entomol - Spec Publ* 6: 81-91.

Mulla MS 1995. The future of insect growth regulators in vector control. *J Am Mosq Control Assoc* 11: 269 -273.

Piña-Guzmán B, Solís-Heredia MJ, Rojas-García AE, Urióstegui-Acosta, M, Quintanilla-Veja B 2006. Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 216: 216-224.

Raffa KF, Priester TM 1985. Synergists as research tools and control agents in agriculture. *J Agric Entomol* 2: 27-45.

Soderlund DM, Knipple DC 2003. The molecular biology of knockdown resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 563-577.

Subramanyam B, Harein PK, Cutkomp LK 1989. Organophosphate resistance in adults of red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and sawtoothed grain beetle (Coleoptera: Cucujidae) infesting barley stored on farms in Minnesota. *J Econ Entomol* 82: 989-995.

Tauil PL 2001. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad Saúde Publ* 17: 99-102.

Teixeira MG, Barreto ML, Costa MCN, Ferreira LD, Vasconcelos PF, Cairncross S 2002. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Trop Med Int Health* 7: 757-62.

Titenko-Holand N, Windham P, Kolachana F, Reinisch S, Parvatham S, Osorio AM, Smith MT 1997. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: A study of malathion-exposed workers. *Mutat Res* 388: 85-95.

World Health Organization (WHO) 1992. Vector resistance to pesticides. *Fifteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control* 818: 61-62.

CAPÍTULO II

**Efeitos do butóxido de piperonila na toxicidade
do organofosforado temefós e o envolvimento de
esterases na resistência de *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae) ao temefós**

RESUMO:

A resistência aos inseticidas continua sendo um grande problema para o efetivo controle de *Aedes aegypti*, que é o vetor da dengue. O inseticida organofosforado temefós (TE) tem sido usado para controlar populações de *A. aegypti* resistentes a piretróides. O butóxido de piperonila (PBO) é utilizado como um sinergista de inseticidas para controlar insetos resistentes. PBO é conhecido por inibir a bioativação de inseticidas organofosforados. Este estudo foi conduzido para avaliar os efeitos de PBO na toxicidade de temefós utilizando alguns bioensaios. Estes bioensaios, realizados nas linhagens resistentes ou suscetíveis de larvas no estágio L4 de *A. aegypti* ao TE revelaram que nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2%, o PBO teve significativo ($p < 0,05$; Teste do Qui-quadrado para heterogeneidade) efeito sinergista na toxicidade de TE. Nós demonstramos que elevadas atividades esterásicas estiveram associadas com a sobrevivência das larvas L4 de *A. aegypti* expostas somente ao TE. Resultados de ensaios bioquímicos sugerem que o PBO teve significativo ($p < 0,05$; Tukey, Kramer) efeito inibidor na atividade esterásica total das larvas de *A. aegypti*. O alto efeito sinergista observado nas concentrações mencionadas de PBO na toxicidade de temefós às larvas pode ser explicado pela redução da atividade esterásica devido à inibição por PBO.

Palavras-chaves: Temefós – Resistência – Sinergismo – Esterases - *Aedes aegypti*

ABSTRACT

Resistance to insecticides remains a major problem for the successful control of *Aedes aegypti*, which is currently one of the most widespread disease vectors in the world. The organophosphorous insecticide temephos (TE) has been used to control pyrethroid-resistant populations of *A. aegypti*. Piperonyl butoxide (PBO) has been used as a synergist of insecticides to control insects. PBO is known to inhibit the bio-activation of organophosphorous insecticides. This study was conducted to evaluate the effect of PBO on TE toxicity to *A. aegypti* using some bioassay techniques. These bioassays in both the susceptible and TE-resistant L4 larvae of *A. aegypti* strains revealed that at 0.25, 0.5, 1 and 2% concentration, PBO significantly ($p < 0.05$; Chi-square test for heterogeneity) synergized TE toxicity. We demonstrated that enhanced esterase activity was associated with survivability of L4 larvae of *A. aegypti* exposed to TE alone. Results of biochemical assays suggest that PBO had significant ($p < 0.05$; Tukey, Kramer) effect on the esterase activity in the *A. aegypti*. The observed synergistic effect of PBO at mentioned concentrations on TE toxicity to *A. aegypti* could be explained by reduced esterase activity due to PBO inhibition.

Key words: Temephos – Resistance – Synergism – Esterases – *Aedes aegypti*

INTRODUÇÃO:

A dengue, uma das principais doenças transmitidas por vírus, é um problema gravíssimo especialmente em países tropicais como o Brasil, onde o clima e os hábitos urbanos oferecem condições ótimas para o desenvolvimento e proliferação de seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti* descrito por Linnaeus em 1762 (Forattini 1999).

As estratégias de controle do principal vetor da dengue, *A. aegypti*, estão baseadas na utilização de produtos químicos e biológicos integrado com programas de manejo ambiental. Os programas públicos que visam controlar o mosquito baseiam-se no uso de inseticidas industrializados, dos quais se destacam os organofosforados e piretróides. O organofosforado temefós (TE) e o piretróide cipermetrina, utilizados no controle de larvas e adultos, respectivamente, de *Aedes*, têm sido empregados continuamente (Carvalho et al. 2004)

O uso freqüente de temefós pode levar à seleção de populações do mosquito resistentes ao inseticida (Karunaratne & Hemingway 2001), favorecendo o aumento das populações de *A. aegypti* e dos índices de casos de dengue (Marcoris et al. 1999, Campos & Andrade 2001). O número de casos de resistência aos inseticidas está aumentando em países da Ásia e Américas Central e do Sul, especialmente, no Brasil (Carvalho et al. 2004).

A detoxificação ou metabolismo é um dos mais estudados processos de resistência de insetos a inseticidas. Várias enzimas e sistemas enzimáticos estão envolvidos como as oxidases, esterases e transferases (Hemingway 2000). Essas enzimas permitem ao inseto converter o inseticida em uma forma não tóxica ou eliminá-lo rapidamente do organismo.

Para tentar superar os problemas de resistência dos insetos aos inseticidas, sinergistas, como o butóxido de piperonila (PBO), têm sido amplamente empregados. Os sinergistas agem como um substrato alternativo, competindo com o inseticida e reduzindo a detoxificação. Sinergistas também agem inibindo alostericamente outros sítios enzimáticos em esterases e oxidases multifuncionais (MFO_s), minimizando a quantidade de inseticida necessária para o controle dos insetos e os níveis de contaminação ambiental dos resíduos inseticidas (Gunning et al. 1999)

Vários trabalhos demonstraram o sucesso do uso de sinergistas no controle de insetos pela ação inibidora da atividade esterásica e de MFO_s em linhagens resistentes (Samson et al. 1990, Darglish et al. 1995, Lorini & Galley 2000). Entretanto, são raros os estudos que envolvem a ação desses sinergistas em *A. aegypti*.

O objetivo deste estudo foi determinar o envolvimento de esterases na resistência de larvas de *Aedes aegypti* ao TE, testando os efeitos de PBO na toxicidade do inseticida ao avaliar os padrões de atividade esterásica em linhagens suscetíveis e resistentes do mosquito.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Material biológico:

Amostras das linhagens suscetíveis ou resistentes de *Aedes aegypti* foram fornecidas pelo Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia. Para a realização dos experimentos foram utilizadas larvas no estágio L4 de desenvolvimento de *Aedes aegypti* como estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO 1992).

Linhagens de *Aedes aegypti*:

Para a confirmação das diferenças de resistência entre as linhagens, as larvas foram submetidas à dose diagnóstica de 0,012 mg/L de TE, segundo metodologia padronizadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO 1981). Quando a taxa de mortalidade foi igual ou superior a 98%, a população foi considerada suscetível; populações que apresentaram taxa de mortalidade entre 80 e 98% foram submetidas à repetição do teste para confirmação; populações em que as taxas de mortalidade foram iguais ou menores que 80% foram consideradas resistentes.

Pré-tratamento com PBO e exposição ao TE:

Grupos suscetíveis ou resistentes de larvas L4 foram pré-tratadas com soluções de PBO diluído em acetona em várias concentrações (0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2%) por 24 horas e expostos à concentração diagnóstica de 0,012 mg/L de solução aquosa de TE. Para cada teste, grupos de 10 larvas foram expostos em placas de Petri com 40 mL da concentração diagnóstica de 0,012

mg/L de solução aquosa de TE, enquanto os grupos controles foram expostos somente a 40 mL de água. A mortalidade das larvas foi avaliada durante 2 h de exposição.

Atividade esterásica

A atividade esterásica de extratos de larvas pré-tratadas com diferentes concentrações de PBO e expostas ao temefós em três tempos de exposição diferentes foi determinada com α -naftil acetato como substrato para o uso da técnica em placas de microtitulação (Devonshire 1986) com modificações de Pruett et al. (2000). As esterases foram extraídas por pulverização das larvas (grupos de 10 larvas foram utilizados para cada teste ou controle) em 100 μ L de tampão de extração (tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0). O sobrenadante obtido da centrifugação (4°C, 15.000 G, 15 min) foi coletado e diluído na proporção 1:50 com o tampão de extração. As amostras diluídas (50 μ L) foram incubadas com 150 μ L de tampão de extração contendo α -naftil acetato 0,5 mM por 30 min a 30°C em local escuro por 15 min. Em seguida, 50 μ L de tampão de extração contendo 0.15 % de *o*-dianizidina e 1,75% de dodecil sulfato de sódio foi adicionado. Os valores de densidade óptica foram mensurados em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, EUA) utilizando filtros de 450 nm. Os valores de densidade óptica foram convertidos em micromoles de naftol por minuto por mg de proteína ($\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \text{ prot.}$) de acordo com uma curva padrão, utilizando-se o programa Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, EUA).

Análises estatísticas

As taxas de mortalidade das larvas foram comparadas entre as linhagens suscetível e resistente, utilizando-se o Teste do Qui-quadrado para heterogeneidade entre as populações. Por meio da combinação dos testes de Tukey e Kramer HSD, os índices de atividade esterásica foram comparados entre as linhagens suscetível e resistente nos diferentes perfis de exposição às cinco concentrações de TE testadas. Para todos os testes, valores de *P* inferiores à 0,05 foram considerados estatisticamente significativos (Callegari-Jacques 2006).

RESULTADOS:

Susceptibilidade e resistência ao TE: efeitos de PBO na toxicidade de TE

Os resultados da exposição à concentração diagnóstica de 0,012 mg/L de temefós em 2 h de exposição das larvas de *Aedes aegypti* das linhagens suscetíveis e resistentes nos testes controles (sem pré-tratamento com PBO) e nos testes experimentais (com pré-tratamentos em diferentes concentrações de PBO) são mostrados na Tabela I.

No controle realizado somente com água não houve morte em qualquer das linhagens estudadas. Larvas da linhagem suscetível expostas à dose diagnóstica de 0,012 mg/L de temefós sem pré-tratamento com PBO apresentaram alta taxa de mortalidade (98%), porém as larvas da linhagem resistente apresentaram 51,3% de mortalidade.

Os resultados dos bioensaios com constante concentração de temefós (0,012 mg/L) aplicadas às larvas pré-tratadas com concentrações variáveis de PBO revelaram que as larvas da linhagem suscetível não apresentaram alterações significativas nas taxas de mortalidade. Entretanto, as larvas do grupo resistente apresentaram mortalidade significativamente diferente ($p < 0,05$) do grupo controle para as concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2% de PBO nos pré-tratamentos, sendo que as maiores taxas de mortalidade foram obtidas com o pré-tratamento de 1% de PBO.

TABELA I: Percentual de mortalidade de larvas de *A. aegypti* nos controles e testes com concentrações diferentes de PBO.

Linhagem	Controles		Testes				
	Água	TE (0,012 mg/L)	TE (0,012 mg/L) após pré-tratamento com PBO (%)				
			0,125	0,25	0,5	1	2
Suscetível	0	98	100	96	100	100	98
Resistente	0	51,3	52	^c 67,3	^c 78,6	^d 90,6	^c 77,3

M= mortalidade das larvas (%), ^cdiferença ao nível de significância de 5%, ^ddiferença ao nível de significância de 1%; N= 150 - Teste X^2 de heterogeneidade entre populações.

Efeitos de PBO na atividade esterásica

Os valores de atividade esterásica em larvas das linhagens suscetível ou resistente tratadas com cada uma das cinco concentrações diferentes de PBO e os respectivos grupos controles (tratados somente com solvente) em três diferentes tempos de exposição (30, 60 e 120 min) são mostrados na Tabela II. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os valores de atividade esterásica dos grupos controle (não tratados com PBO) dentre os indivíduos da linhagem suscetível e também dentre os resistentes nos três tempos diferentes de exposição. Os valores da atividade esterásica em larvas resistentes expostas a 0,25; 0,5 e 1% foram significativamente menores do que os do grupo controle quando o tempo de exposição foi estendido para 60 e 120 min ($p < 0,05$). Para as larvas suscetíveis, somente as concentrações de 0,5 e 1% de PBO em 60 ou 120 min foram efetivas para reduzir significativamente a atividade esterásica no grupo ($p < 0,05$).

TABELA II: Atividade esterásica de larvas das linhagens suscetível ou resistente tratadas com concentrações diferentes de PBO em diferentes tempos de exposição

Tempo (min)	PBO (%)	Linhagem	
		Resistente ^a (mmol.mg ⁻¹ .min ⁻¹ prot.)	Suscetível ^a (mmol.mg ⁻¹ .min ⁻¹ prot.)
30	0	339 (164) {0}	410 (144) {0}
	0,125	436 (89) {0}	402 (67) {0}
	0,25	367 (91) {0}	398 (84) {0}
	0,5	353 (51) {0}	377 (54) {0}
	1	337 (77) {0}	363 (49) {0}
	2	331 (62) {1}	349 (78) {1}

Continua...

Continuação...

		Linhagem	
Tempo (min)	PBO (%)	Resistente ^a (mmol.mg ⁻¹ .min ⁻¹ prot.)	Suscetível ^a (mmol.mg ⁻¹ .min ⁻¹ prot.)
60	0	395 (231) {0}	315 (103) {1}
	0,125	321 (87) {0}	279 (51) {0}
	0,25	277 (61) ^b {0}	277 (32) {0}
	0,5	281 (36) ^b {0}	201 (90) ^b {0}
	1	263 (66) ^b {1}	198 (101) ^b {1}
	2	329 (85) {0}	292 (56) {0}
120	0	422 (156) {0}	424 (129) {0}
	0,125	375 (58) {0}	431 (69) {0}
	0,25	310 (53) ^b {0}	375 (71) {0}
	0,5	303 (71) ^b {2}	302 (58) ^b {0}
	1	246 (55) ^b {1}	271 (43) ^b {0}
	2	355 (96) {0}	360 (72) {0}

^aMédia (desvio padrão), ^b diferença ao nível de significância de 5%; *n*= 10.
 Teste de Tukey-Kramer; {número de mortes na condição avaliada}.

DISCUSSÃO:

Em insetos, inseticidas organofosforados são detoxificados por algumas enzimas como colinesterases, transferases e oxidases que atuam reduzindo a quantidade de moléculas de organofosforado livre ou hidrolisando-as (Terriere 1984, Kaliste-Korhonen et al. 1998). O metabolismo ou detoxificação é, provavelmente, o mecanismo mais estudado de resistência de insetos a inseticidas. Sinergistas têm sido empregados na tentativa de superar o problema de resistência em diversas pragas e vetores (Beckel et al. 2006, Wilson et al. 1999, Young et al. 2005). Neste estudo, nós demonstramos que o PBO, nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2% aumentou a toxicidade de temefós sobre as larvas da linhagem resistente de *A. aegypti*, sendo que os maiores efeitos foram encontrados na concentração de 1% de PBO, em que houve um acréscimo de 39,3% na mortalidade das larvas em relação ao grupo controle.

De acordo com os resultados obtidos pela análise da atividade esterásica nas populações resistentes, é possível inferir que o efeito sinergista de PBO na toxicidade de temefós ocorreu, pelo menos parcialmente, devido ao decréscimo da atividade esterásica geral destas populações, porém o efeito inibidor da atividade esterásica não foi considerado dose-tempo dependente em ambas as linhagens de larvas. Além disso, como a resistência não foi completamente suprimida, é possível presumir que outro mecanismo, além do aumento da atividade esterásica possa também estar envolvido na resistência dessas populações.

As larvas da linhagem resistente, pré-tratadas com PBO 2%, apresentaram menor mortalidade que as larvas pré-tratadas com PBO na concentração de 1%. Esta redução na taxa de mortalidade pode ser explicada por um efeito antagonista de PBO devido a uma provável ativação metabólica do citocromo P450 responsável pela inibição de PBO, visto que existem isoformas de citocromos P450 responsáveis pela inibição de organofosforados e de PBO (Scott & Wen 2001).

O PBO pode atuar como um inibidor de P450, suprimindo a bioativação de TE e reduzindo a toxicidade do organofosforado. Foi demonstrado neste estudo que PBO reduziu a toxicidade de TE, mas somente na mais alta

concentração. PBO não teve efeito significativo na toxicidade de TE na concentração de 0,125%. Entretanto, PBO sinergizou de forma crescente a toxicidade nas concentrações de 0,25% à 1%. A taxa de sinergismo de PBO foi mais alta nas concentrações de 0,5% e 1% para a linhagem resistente, mas sofreu uma redução na concentração de 2%.

Este resultado pode ser explicado pela existência de uma resistência metabólica baseada no citocromo P450 na linhagem resistente. É sabido que múltiplos isômeros de P450 existem em muitas espécies de artrópodes e todos são substrato-específicos (Li et al 2006). Alguns isômeros de P450 podem ser responsáveis pela ativação de TE enquanto outros estão envolvidos na detoxificação metabólica por serem muito mais sensíveis a inibição de PBO do que os primeiros. Isto explica como PBO sinergizou a toxicidade de TE nas concentrações mais baixas (0,25; 0,5; e 1%) e a inibiu na concentração mais alta (2%). Na concentração de 2%, os isômeros responsáveis pela bioativação de TE tiveram seu efeito aumentado, anulando parte do efeito dos isômeros envolvidos na detoxificação metabólica (Kotze & Sales 1995, Li et al. 2005, Pisani-Borg et al. 1996, Sabourault et al. 2001, Siegfried & Scharf 2001).

Os efeitos diferenciais de PBO sobre a toxicidade dos inseticidas nas linhagens resistentes observados nesses estudos foram atribuídos aos efeitos inibitórios de PBO em diferentes isômeros de P450 envolvidos na ativação ou detoxificação das moléculas de organofosforados.

Para a linhagem suscetível, os pré-tratamentos com PBO não conferiram alterações nos níveis de toxicidade, pois é provável que os indivíduos desta população tenham expressado sua tolerância normal ao inseticida (Gunning et al. 1999).

Os resultados dos ensaios toxicológicos e de esterases realizados em mosquitos da linhagem resistente indicaram que a habilidade de sobrevivência destes insetos está associada com a maior expressão de esterases. Resultados similares foram encontrados em outros ensaios que envolveram outras classes de organofosforados (Sabourault et al. 2001, Siegfried & Scharf 2001, Zhou et al. 2004).

Efeitos semelhantes aos apresentados nesse estudo foram encontrados em diferentes ensaios em que baixas concentrações de PBO sinergizaram os

efeitos de organofosforados à diferentes espécies de insetos (Beckel et al. 2006; Li et al. 2003; 2006; Wilson et al. 1999).

O elevado nível de sinergismo de PBO 1% nos efeitos larvicidas de temefós tem uma importante aplicação no controle de larvas de *A. aegypti*. Formulações de temefós com esta concentração de PBO poderão ser favoráveis nas campanhas de combate às linhagens suscetíveis e resistentes das larvas de *A. aegypti*.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia pelas amostras das linhagens suscetíveis e resistentes de *Aedes aegypti* fornecidas.

REFERÊNCIAS

Beckel HS, Lorini I, Lazzari SMN 2006. Efeito do sinergista butóxido de piperonil na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitrotiom. *Rev Bras Entomol* 50: 110-114.

Callegari-Jacques SM 2006. Bioestatística: Princípios e Aplicações. Artmed, Porto Alegre, 255p.

Campos J, Andrade CFS 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Rev Saúde Públ* 35: 232-236.

Carvalho MSL de, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos PTR, Souza LCKR de, Yoshizawa MAC, Knox MB, Oliveira C 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. *Rev Saúde Públ* 38: 623-629.

Daglish GJ, Eslkema M, Harrison 1995. Chlorpyrifosmethyl plus either methoprene or synergized phenothrin for control of Coleoptera in maize in Queensland, Australia. *J Stored Prod Res* 31: 235-241.

Devonshire AL, Moores GD, French-Constant RH 1986. Detection of insecticide resistance by immunological estimation of carboxylesterase activity in *Myzus persicae* (Sulzer) and cross reaction of the antiserum with *Phorodon humuli* (Schrank) (Hemiptera: Aphididae). *Bull Entomol Res* 76: 97-107.

Forattini OP 1999. Yellow fever. *Rev Saúde Públ* 33: 534-537.

Gunning RV, Moores GD, Devonshire AL 1999. Esterases inhibitors synergise the toxicity of pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci* 63: 50-62.

Hemingway J 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 1009-1015.

Kaliste-Kohonen E, Tuovinen K, Hänninen O 1998. Effect of phenobarbital and β -naphthoflavone on activities of different rat esterases after paraxon exposure. *Gen Pharmacol* 31: 307-312.

Karunaratne SHPP, Hemingway J 2001. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. *Bull World Health Organ* 79: 1060-1064.

Kotze AC, Sales N 1995. Elevated in vitro monooxygenase activity associated with insecticide resistances in field-strain larvae of the Australian sheep blowfly (Diptera: Calliphoridae) *J Econ Entomol* 88 : 782-787.

Li AY, Davey RB, Miller RJ, George JE 2003. Resistance to coumaphos and diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. *J Med Entomol* 40: 482-490.

Li AY, Guerrero FD, Pruett JH 2006. Involvement of esterases in diazinon resistance and biphasic effects of piperonyl butoxide on diazinon toxicity to *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). *Pestic Biochem Physiol* 87: 147-155.

Li AY, Pruet JH, Davey RB, George JE 2005. Toxicological and biochemical characterization of temephos resistance in the San Roman strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pest Biochem Physiol* 81: 145-153.

Lorini I, Galley DJ 2000. Effect of synergists piperonyl butoxide and DEF in deltamethrin resistance on strains of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *An Soc Entomol Bras* 29: 749-755.

Pisani-Borg E, Cuany A, Burn A, Amichot M, Fournier D, Berge JB 1996. Oxidative degradation of temephos by *Drosophila*-metabolic changes associated with insecticide resistance and induction. *Pest Biochem Physiol* 54: 56-64.

Pruett JH, Oeler DD, Kammlah DM, Guerrero FD 2000. Evaluation of horn flies (Diptera: Muscidae) from a pyrethroid susceptible colony for general and permethrin esterase activities. *J Econ Entomol* 93: 920-924.

Sansom PR, Parker JR, Hall EA 1990. Synergized deltamethrin as a protectant against *Sitophilus zeamais* Motsch and *S. Oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) on stored maize. *J Stored Prod Res* 26: 155-161.

Sabourault C, Guzov VM, Koener JF, Claudianos C, Flapp FW, Feyereisen R 2001. Overproduction of a P450 that metabolize OP is linked to a loss-of-function in chromosome 2 aliesterase (MdaE7) gene in resistant house flies. *Insect Mol Biol* 10: 609-618.

Scott JG, Wen Z 2001. Cytochromes P450 of insects: the top of the iceberg. *Pest Manag Sci* 57: 958-967.

Siegfried BD, Scharf ME 2001. Mechanisms of organophosphate resistance in insects, in: *I. Ishaya* (Ed.), *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, Springer-Verlag, Berlin, Germany: 269-287.

Terriere LC 1984. Induction of detoxification enzymes in insects. *Ann Rev Entomol* 29: 71-88.

Wilson JA, Clark AG, Haak NA 1999. Effect of piperonyl butoxide on diazinon resistance in field strains of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), in New Zealand. *Bull Entomol Res* 89: 295-301.

(WHO) World Health Organization 1981. *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*, WHO/VBC/81.807, Geneva, 6pp.

(WHO) World Health Organization 1992. Vector resistance to pesticides. *Fifteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control* 818: 61-62.

Young SJ, Gunning RV, Moores, GD 2005. The effect of piperonyl butoxide on pyrethroid-resistance-associated esterases in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci* 61: 397-401.

Zhou X, Meike LJ, Siegfried BD, Scharf ME, Sarath G, Chandler LD 2004. Partial purification and characterization of a methyl-parathion resistance-associated general esterase in *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) *Pestic. Biochem. Physiol* 78: 114-125.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)