



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO



**DINÂMICA POPULACIONAL DE *Stomoxys calcitrans*
(DIPTERA: MUSCIDAE) E DETECÇÃO DA MUTAÇÃO *kdr-*
his, ASSOCIADA À RESISTÊNCIA A PIRETROIDES, EM
USINAS SUCROALCOOLEIRAS DO ESTADO DE SÃO
PAULO**

CAMPO GRANDE – MS
2021

TÂMIRIS APARECIDA DOS SANTOS SILVA

**DINÂMICA POPULACIONAL DE *Stomoxys calcitrans*
(DIPTERA: MUSCIDAE) E DETECÇÃO DA MUTAÇÃO *kdr-
his*, ASSOCIADA À RESISTÊNCIA A PIRETROIDES, EM
USINAS SUCROALCOOLEIRAS DO ESTADO DE SÃO
PAULO**

**Population dynamics of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae)
and detection of *kdr-his* mutation, associated with resistance to
pyrethroids, in sugarcane mills from the state of São Paulo**

TÂMIRIS APARECIDA DOS SANTOS SILVA

Orientadora: Dra. Andréa Alves do Egito

Coorientadora: Taciany Ferreira de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Epidemiologia e controle de doenças.

CAMPO GRANDE – MS
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora do Perpétuo Socorro pelo dom da vida, sabedoria e persistência destinada para que esta trajetória fosse concluída.

Agradeço à minha família pelo amor incondicional, paciência, apoio e incentivo.

Agradeço à minha querida orientadora Dra. Andrea Alves do Egito, pela confiança, conselhos, amizade, ensinamentos, paciência e por sua energia capaz de me tranquilizar nos momentos em que mais precisei.

Agradeço à minha coorientadora Tacyany Ferreira de Souza, pela confiança, amizade, ensinamentos e por ter acreditado e contribuído para que este sonho fosse concluído.

Agradeço ao Dr. Antonio Thadeu Medeiros de Barros pela paciência, conselhos, por me adotar como sua aluna e compartilhar seu conhecimento.

Agradeço à Volare Consultoria Ambiental, pelo apoio oferecido durante este período, e por ter me permitido conhecer pessoas tão especiais e companheiras como a Thays Jucá e Clara Anne.

Agradeço à Adrieli Fasolo pela contribuição durante as contagens de *Stomoxys calcitrans* e durante as coletas a campo, além da amizade, conselhos e companheirismo.

Agradeço às usinas do presente estudo que contribuíram para realização do projeto e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Agradeço às queridas “*Stomoxys girls*” Franciele Oliveira e Andressa Nantes, pela paciência, amizade, companheirismo, ensinamentos dentro e fora do laboratório.

Agradeço ao meu noivo Gustavo Gomes pela amizade, cuidado, parceria, amor e acalento, por ter acreditado em mim nas vezes que eu não pude acreditar, obrigada por tudo a todo momento.

Gratidão a todos que compartilharam esse sonho comigo!

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO

Figura 1. Distribuição espacial dos surtos causados por *Stomoxys calcitrans* associados a usinas sucroalcooleiras (dados não publicados). Fonte: Paulo Cançado, 2017..... 10

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Pontos mutacionais no canal de sódio associado à resistência aos inseticidas piretroides em diferentes espécies de insetos. Em destaque a mutação pontual da mosca-dos-estábulo descrita por Olafson et. al (2011) na mosca-dos-estábulo. Fonte: Adaptada, RINKEVICH et al., 2013..... 21

CAPÍTULO II

Artigo 1

Figura 1. Dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo (···), em relação a parâmetros climáticos em usina sucroenergética no município de Pereira Barreto, SP, de janeiro 2018 a dezembro 2019 38

Figura 2. Dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo (···), em relação a parâmetros climáticos em usina sucroenergética no município de Sud Mennucci, SP, de janeiro 2018 a dezembro 2019 39

CAPÍTULO III

Artigo 2

Figura 1. PCR - Alelo específica para verificar a presença do alelo *kdr-his* em população de *S. calcitrans* oriundas de uma usina sucroalcooleira no município de Sud Mennucci/SP..... 58

Figura 2. Neighbornet construída a partir da matriz de diferenciação genética, baseada na estatística F de Wright, entre as populações da mosca-dos-estábulo capturadas nos municípios de Buritizal, Nova Independência, Pereira Barreto e Sud Mennucci, estado de São Paulo 59

Figura 3. Dendrograma construído a partir da matriz de diferenciação genética, com base no índice FST, pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), para as populações da mosca-dos-estábulo dos municípios de Buritizal, Nova Independência, Pereira Barreto e Sud Mennucci, estado de São Paulo 60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Artigo 1

Tabela 1. Distribuição de armadilhas para monitoramento da flutuação populacional da mosca-dos-estábulo em usinas sucroalcooleira nos municípios Pereira Barreto e Sud Mennucci no estado de São Paulo	34
Tabela 2. Abundância de mosca-dos-estábulo capturadas semanalmente em armadilhas adesivas em usinas sucroalcooleiras em dois municípios de Pereira Barreto e Sud Mennucci, estado de São Paulo	35
Tabela 3. Análise de correlação entre variáveis climáticas e média semanal de moscas capturadas por armadilha nos ambientes monitorados durante o período de entressafra e safra da cana-de-açúcar (2018 e 2019), no município de Pereira Barreto, SP	40
Tabela 4. Análise de correlação entre variáveis climáticas e média semanal de moscas capturadas por armadilha nos ambientes monitorados durante o período de entressafra e safra da cana-de-açúcar (2018 e 2019), no município de Sud Mennucci, SP	41
Tabela 5. Diferença entre a captura de <i>Stomoxys calcitrans</i> por armadilha durante a entressafra e safra da cana-de-açúcar em usinas sucroalcooleiras nos municípios de Pereira Barreto e Sud Mennucci, SP, durante 2018 e 2019	41
Tabela 6. Análise de variância entre a captura de <i>Stomoxys calcitrans</i> nos ambientes monitorados em relação ao período de entressafra e safra da cana-de-açúcar, em usinas presentes no município de Pereira Barreto e Sud Mennucci, SP.....	42

CAPÍTULO III

Artigo 2

Tabela 1. Frequência alélica e genotípica da mosca-dos-estábulo para alelo susceptível e <i>kdr-his</i> nos municípios de Buritizal, Nova Independência, Pereira Barreto e Sud Mennucci no estado de São Paulo durante o período da safra 2019.....	58
Tabela 2. Heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e DP (Desvio padrão) em populações de <i>Stomoxys calcitrans</i> de usinas sucroalcooleiras	

nos municípios de Buritzal, Nova Independência, Pereira Barreto e Sud Mennucci, estado de São Paulo	59
Tabela 3. Matriz de distância genética aos pares baseada no índice F_{ST} entre as populações de <i>Stomoxys calcitrans</i> em usinas sucroalcooleiras nos municípios de Buritzal, Nova Independência, Pereira Barreto e Sud Mennucci, estado de São Paulo	60

SUMÁRIO

Resumo.....	III
Abstract.....	IV
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA.....	12
<i>Stomoxys calcitrans</i>	14
1 Ecologia.....	14
2 Prevenção e controle.....	16
2.1 Piretroides.....	17
2.2 Resistência aos inseticidas piretroides.....	19
Referências bibliográficas.....	22
CAPÍTULO II.....	30
Artigo 1.....	30
Dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo (<i>Stomoxys calcitrans</i>) em usinas de cana-de-açúcar no estado de São Paulo.....	30
Introdução.....	31
Material e métodos.....	33
Resultados.....	34
Discussão.....	42
Conclusão.....	48
Agradecimentos.....	49
Referências bibliográficas.....	49
CAPÍTULO III.....	52
Artigo 2.....	52
Resistência da mosca-dos-estábulo (<i>Stomoxys calcitrans</i>) aos inseticidas piretroides em usinas sucroalcooleiras do estado de São Paulo.....	52
Introdução.....	53
Material e métodos.....	54
Resultados e discussão.....	56
Conclusão.....	61

Agradecimentos.....	62
Referências bibliográficas	62

SILVA, T.A.S. Dinâmica populacional de *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) e detecção da mutação *kdr-his*, associada à resistência a piretroides, em usinas sucroalcooleiras do estado de São Paulo. 2021. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 2021. 64p.

Resumo: No Brasil, surtos causados pela mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) estão associados a usinas sucroalcooleiras adjacentes a propriedades pecuárias. A sazonalidade natural desta mosca mostra picos populacionais durante os meses quentes e úmidos do ano. Para amenizar os efeitos causados por esta praga produtores rurais e usinas de cana-de-açúcar têm adotado amplamente o controle químico, porém o uso intensivo tem levado à seleção de indivíduos resistentes. Portanto, o objetivo do presente estudo foi conhecer a dinâmica populacional e avaliar a ocorrência da mutação *kdr-his*, associada à resistência da mosca-dos-estábulo aos inseticidas piretroides. O estudo da dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo foi realizado no município de Pereira Barreto (PB) e Sud Mennucci (SM) durante 2018 e 2019. Para o estudo foram instaladas armadilhas reflexivas, as quais eram recolhidas e trocadas a cada sete dias, nas quais os espécimes eram identificados e contados. A dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo nas usinas sucroenergéticas nos municípios de Pereira Barreto (PB) e Sud Mennucci (SM), São Paulo, apresentou frequências diferentes e os picos ocorreram nos meses de janeiro, maio/junho e outubro/novembro. Deste modo foi constatada uma estreita relação entre as ações de controle desempenhadas nas lavouras fertirrigadas, no pátio de compostagem e a qualidade no manejo dos resíduos da produção animal e a densidade populacional da praga. O estudo para avaliar a ocorrência da mutação *kdr-his* por PCR alelo-específico foi realizado nos municípios de Buritizal (BTZ), Nova Independência (NI), Pereira Barreto (PB) e Sud Mennucci (SM), totalizando 200 indivíduos. A frequência total do alelo *kdr-his* foi de 0,263, já a frequência genotípica total obtida foi 0,480 para homocigoto susceptível, 0,515 para heterocigoto e 0,005 para homocigoto *kdr-his*. Os resultados evidenciam que a mutação *kdr-his* está presente nas populações de mosca-dos-estábulo em usinas do estado de São Paulo.

Palavras-chave: Mosca-dos-estábulo, monitoramento, resistência a inseticidas, “*knockdown resistance*”.

SILVA, T.A.S. Population dynamics of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) and detection of *kdr-his* mutation, associated the resistance the piretroid, in sugarcane mills of state of São Paulo. 2021. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 2021. 64p.

Abstract: In Brazil, outbreaks caused by the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) are associated with sugarcane mill activities near livestock properties. The natural seasonality of this fly shows population peaks during hot and humid months of the year. To alleviate the effects caused by this pest, rural producers and sugarcane mills have widely adopted the chemical control, however its intensive use has led to the selection of resistant individuals. Therefore, the objective of the present study was to know the population dynamics and to evaluate the occurrence of the *kdr-his* mutation as a mechanism of pytrhroid-resistance of the stable fly to pyrethroid insecticides occurs due to. For the study, reflective traps were installed, which were collected and exchanged each time. seven days, in which specimens were identified and counted. The population dynamics of stable flies in sugarcane mills in the municipalities of Pereira Barreto (PB) and Sud Mennucci (SM), São Paulo presented different frequencies and the population peaks occurred in January, May/June and October/November. Thus, a close relationship was found between the control actions performed in the fertigated crops, in the composting yard and the quality in the management of animal production residues, and population abundance of the pest. The study to assess the occurrence of the *kdr-his* mutation in stable flies by allele-specific PCR was carried out in the municipalities of Buritizal (BTZ), Nova Independência (NI), Pereira Barreto (PB) and Sud Mennucci (SM), totaling 200 individuals. The total frequency of the *kdr-his* allele was 0.263, while the total genotypic frequency obtained was 0,480 for susceptible homozygote, 0,515 for heterozygote and 0,005 for *kdr-his* homozygote. The results showed that the *kdr-his* mutation is present in sugarcane mills in the state of São Paulo.

Keywords: Stable fly, monitoring, insecticide, resistance, knockdown resistance.

1 INTRODUÇÃO

A mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) é um díptero cosmopolita, predominante em regiões de clima tropical, responsável por causar grandes prejuízos econômicos aos setores pecuário e sucroenergético (KOLLER et al., 2009; BARROS et al., 2010; GRISI et al., 2014; DOMINGHETTI, 2017).

Grisi et al. (2014) estimaram que os prejuízos econômicos causados por esta praga na bovinocultura brasileira chegam a US \$ 335 milhões por ano. Todavia, ao considerar o impacto econômico diante das ocorrências de surto, esse valor ser superior devido às alterações nos procedimentos de gestão das usinas sucroalcooleiras, em virtude da área de abrangência da bacia de fertirrigação, tal como as atividades de apoio aos pecuaristas afetados (DOMINGHETTI et al., 2015). Nos Estados Unidos, as perdas econômicas ultrapassam dois bilhões de dólares (TAYLOR et al., 2012).

Em 1973, na cidade de Piracicaba, em São Paulo, foi registrado o primeiro surto da mosca-dos-estábulo associado aos subprodutos orgânicos (como palhada, vinhaça e torta de filtro) gerados por uma usina de açúcar e álcool (NAKANO et al., 1973). Em usinas sucroalcooleiras, a mosca-dos-estábulo encontra amplas áreas com disponibilidade de subprodutos orgânicos para o desenvolvimento de seus estádios imaturos. Tais fatores, associados à alta capacidade de reprodução e dispersão da espécie, contribuem favoravelmente para promover a ocorrência de surtos (DOMINGHETTI et al., 2015).

O estado de São Paulo é o maior produtor de cana-de-açúcar do Brasil, durante a safra 2019/2020 foram produzidas 341.819.940 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, o correspondente a 51% da produção nacional (IBGE, 2019). Não coincidentemente, é a região de maior incidência de surtos da mosca-dos-estábulo em propriedades pecuárias associadas a usinas sucroalcooleiras (Figura 1).

Para a redução dos efeitos negativos gerados por esta praga na cadeia produtiva bovina, a indústria sucroalcooleira e o setor pecuário têm implementado medidas de manejo sanitário, associadas ao controle químico, o qual é fundamentado na utilização de inseticidas e larvicidas (DOMINGHETTI et al., 2017; BARROS et al., 2019). Infelizmente, esta estratégia de controle pode se tornar pouco eficiente ao longo do tempo em função de uma redução da suscetibilidade dos insetos aos inseticidas (CILEK e GREENE, 1994).

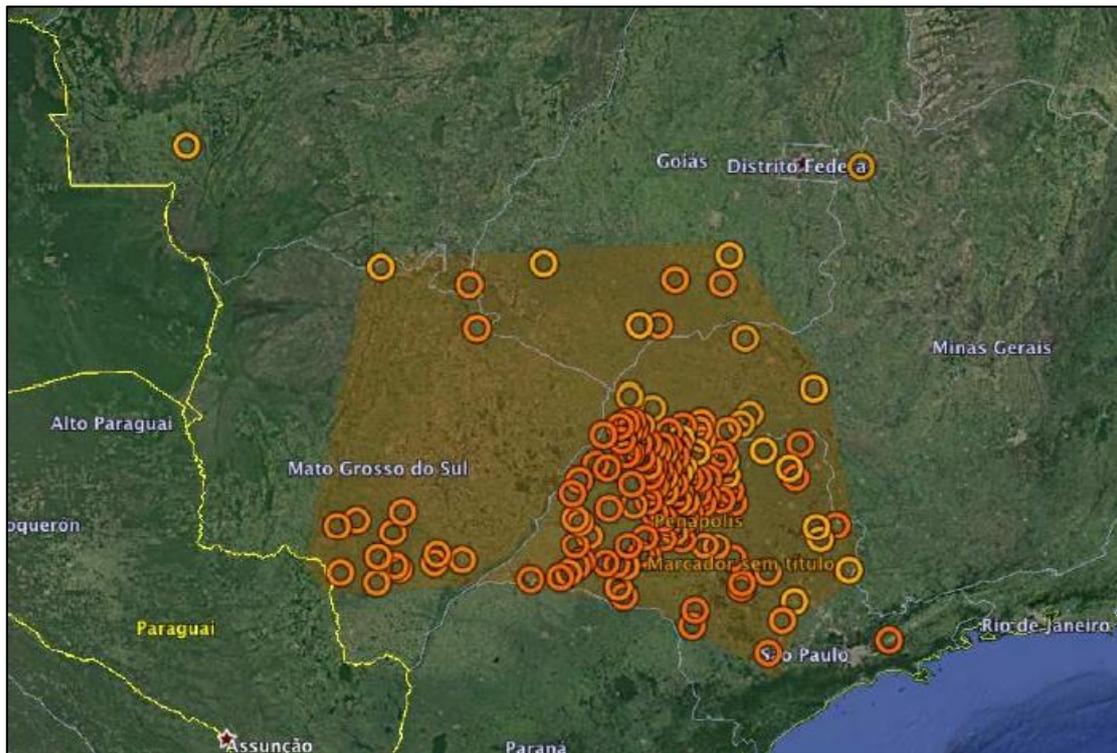


Figura 1. Distribuição espacial dos surtos causados por *Stomoxys calcitrans* associado a usinas sucroalcooleiras (dados não publicados). Fonte: Paulo Cançado, 2017.

Olafson et al. (2011) identificou que o mecanismo molecular de resistência da mosca-dos-estábulo aos inseticidas piretroides ocorreu devido a uma mutação pontual nos genes dos canais de sódio. Esta foi observada na posição 1014 do transcrito, sendo caracterizada pela substituição de uma leucina por uma histidina, coincidente com mutações de resistência *kdr* em outros dípteros. Recente no Brasil, Oliveira (2019) constatou a presença da mutação *kdr-his* em espécimes de *S. calcitrans* oriundas dos estados de Mato Grosso do Sul e Goiás.

Dado o exposto acima, o objetivo da presente dissertação foi o estudo da dinâmica populacional de *S. calcitrans* e detecção da mutação *kdr-his*, associada à resistência aos inseticidas piretroides, em usinas sucroalcooleiras do estado de São Paulo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudo da dinâmica populacional e avaliação da ocorrência da mutação *kdr-his* no gene que codifica os canais de sódio dependentes de voltagem e promove a resistência aos inseticidas piretroides.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a correlação entre os fatores climáticos e dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo nas usinas nos municípios paulistas de Pereira Barreto e Sud Mennucci e propriedades pecuárias adjacentes;
- b) Avaliar a presença da mutação pontual relacionada com resistência aos inseticidas piretroides em mosca-dos-estábulo, no estado de SP, mediante a amplificação por PCR alelo específico;
- c) Determinar a frequência alélica e genotípica das mutações *kdr-his* em populações de *S. calcitrans* provenientes do estado de São Paulo.

CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

A mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) é um díptero cosmopolita, responsável por causar grandes prejuízos econômicos ao setor pecuário (KOLLER et al., 2009; BARROS et al., 2010).

Grisi et al. (2014) estimaram que os prejuízos econômicos causados pela mosca-dos-estábulo no Brasil atingem US\$ 335,46 milhões por ano, podendo esse valor ser maior devido a não inclusão das perdas decorrentes dos surtos.

A mosca se desenvolve em matéria orgânica vegetal em processo de fermentação e decomposição. Os adultos se alimentam de sangue, sua picada é dolorosa gerando grande desconforto aos animais. Além das perdas devido ao estresse causado aos animais, ela pode ainda atuar como vetor mecânico ou biológico de vários patógenos incluindo vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos (BALDACCHINO et al., 2013).

A mosca-dos-estábulo ataca várias espécies como bovinos, equídeos, canídeos e suínos, bem como seres humanos (BITTENCOURT & BORJA, 2002). O local de parasitismo varia conforme a espécie hospedeira; em bovinos e equinos estão presentes na porção distal dos membros anteriores e posteriores, já em caninos e suínos atacam preferencialmente as orelhas (CAMPBELL et al., 2001; SHAPIRO, 2010; TAYLOR et al., 2016).

O primeiro surto de *S. calcitrans* associado a usinas no Brasil, foi registrado em 1973, em Piracicaba/SP (NAKANO et al., 1973). Atualmente, no Brasil, a ocorrência de surtos está frequentemente relacionada à presença de usinas sucroalcooleiras, uma vez que estas dispõem de extensas áreas favoráveis ao desenvolvimento deste díptero (BARROS et al., 2010; DOMINGHETTI et al., 2015). O manejo inadequado dos resíduos orgânicos oriundos da produção do açúcar e do etanol, tais como palhada da cana, vinhaça e torta de filtro, criam condições favoráveis ao desenvolvimento deste inseto (BARROS et al., 2010; BITTENCOURT, 2012; CORRÊA et al., 2013). A alta capacidade de reprodução e dispersão da mosca propicia sua disseminação massiva a propriedades pecuárias próximas às usinas e, consequentemente, a ocorrência de surtos (DOMINGHETTI et al., 2015).

Para a redução dos efeitos negativos gerados por este inseto na cadeia produtiva agropecuária, tanto usinas quanto produtores rurais estão implementado

práticas de controle cultural, bem como o controle químico dos adultos (DOMINGHETTI et al., 2015). Cabe salientar que o uso de inseticidas nos animais no combate a mosca-dos-estábulo é pouco eficiente, haja vista que esse ectoparasito não permanece por longos períodos em seus hospedeiros; além disso, essa praga possui alta capacidade de dispersão. Infelizmente, esta estratégia de controle tende a tornar-se menos eficiente ao longo do tempo, devido à redução da suscetibilidade da mosca aos inseticidas em função do desenvolvimento de resistência (BARROS et al., 2012).

O uso de produtos inseticidas é uma estratégia comum no controle de artrópodes na agricultura e na pecuária, além de vetores de importância em saúde pública (ROUSH, 1987). Os inseticidas possuem origem natural ou sintética e são capazes de eliminar os insetos em diferentes fases do seu ciclo biológico. Atualmente, as indústrias de defensivos agrícolas oferecem vários grupos químicos de pesticidas, tais como carbamatos, lactonas macrocíclicas, neonicotinoides, organofosforados, organoclorados e piretroides, entre outros (BOWMAN, 2010).

Em função de sua elevada eficácia, baixa toxicidade e relativo baixo custo, os piretroides se destacam dentre os inseticidas mais utilizados, tanto no controle de pragas agrícolas quanto veterinárias (SODERLUND, 2013). A facilidade de acesso a estes produtos, bem como seu uso contínuo, tem contribuído para a seleção de espécies de artrópodes resistentes (PITZER et al., 2010). A resistência a estes inseticidas está relacionada a alterações genéticas nos sítios alvos dos inseticidas, assim como no seu metabolismo (SODERLUND, 2008; RINKEVICH et al., 2013). Tal ocorrência já foi descrita em diversas moscas como *Drosophila melanogaster* (BATISTE-ALENTORN et al., 1986; AMICHOT et al., 1992), *Musca domestica* (BUSVINE, 1951; FINE, 1961; WILLIAMSON, 1993; FREEMAN, 2019), *Haematobia irritans* (SPARKS et al., 1985; BARROS et al., 2012) e *S. calcitrans* (CILEK e GREENE, 1994; PITZER et al., 2010; OLAFSON et al., 2011; OLAFSON et al., 2019a; BARROS et al., 2019). É importante destacar que a insensibilidade do inseto à ação do inseticida compromete seu controle, além disso, o aumento da pressão de seleção dos inseticidas ocasiona a permanência de indivíduos resistentes no ambiente e, conseqüentemente, a disseminação dos genes que conferem essa característica (PITZER et al., 2010; OLAFSON et al., 2011; OLAFSON et al., 2019a).

Stomoxys calcitrans

Stomoxys calcitrans (Diptera: Muscidae), popularmente conhecida como “mosca-dos-estábulos”, “mosca-do-bagaço” ou “mosca-da-vinhaça”, possui forma e tamanho semelhantes à mosca doméstica, no entanto, apresenta aparelho bucal picador-sugador. Essa mosca possui o corpo acinzentado, o mesonoto com quatro faixas longitudinais castanho-escuras e o segundo e terceiro segmentos do abdômen com três manchas escuras, semelhante a um tabuleiro de xadrez (SERRA-FREIRE e MELLO, 2006; TAYLOR et al., 2016; PATRA et al., 2018).

A mosca-dos-estábulos apresenta dimorfismo sexual, as fêmeas possuem maior distância entre os olhos compostos que os machos (TAYLOR et al., 2016). Ambos os sexos são hematófagos, sendo capazes de se alimentar até três vezes ao longo do dia (HARIS et al., 1974; BOWMAN, 2010).

As fêmeas realizam postura em locais com umidade, especificamente em matéria orgânica vegetal em processo de fermentação, como silagem, feno, palha de forrageiras, bem como esterco de aves, bovinos e suínos (KOLLER et al., 2009; SEMELBAUER et al., 2018). Durante a oviposição, as fêmeas são capazes de depositar no mínimo 20 ovos por postura, efetuando várias posturas a longo do dia, produzindo de 500 até mil ovos ao longo de seu ciclo de vida (KOLLER et al., 2009). Após eclosão, as larvas passam por três estádios (L₁, L₂ e L₃), se desenvolvendo facilmente em matéria orgânica úmida. A mosca-dos-estábulos passa por processo de metamorfose completa, seu desenvolvimento dura em torno de 15 a 22 dias, enquanto a vida média dos adultos é de aproximadamente 30 dias (SCOOF, 1964).

1 Ecologia

A mosca-dos-estábulos é uma praga cosmopolita, adaptada a regiões de clima temperado, subtropical e tropical. Aprecia ambientes diversos que sejam ricos em nutrientes orgânicos para sua oviposição, assim como alimentação durante a fase larvar (FOIL e HOGSETTE, 1994).

No Brasil, devido ao clima tropical, as condições térmicas favoráveis ao desenvolvimento dos estádios imaturos da mosca-dos-estábulos (MORAES, 1990). Além disso, a predominância da bovinocultura somada à expansão do setor sucroenergético, proporcionou a formação de um sistema agroecológico favorável ao seu desenvolvimento biológico, contribuindo para a ocorrência de explosões populacionais dessa praga (DOMINGHETTI, 2017).

Anteriormente as altas infestações pela mosca-dos-estábulo eram restritas a propriedades de produção leiteira e confinamentos de gado, em virtude do acúmulo de matéria orgânica, assim como a precária condição higiênico-sanitária das instalações pecuárias (MILLER et al., 1973; FOIL e HOGSETTE, 1994). O primeiro relato de surto em propriedades pecuárias relacionado à produção do açúcar e etanol ocorreu em 1973 (NAKANO et al., 1973). O manejo inadequado dos resíduos orgânicos oriundos da produção do processo de industrialização da cana-de-açúcar, como palhada, vinhaça e torta de filtro, proporcionam condições favoráveis ao desenvolvimento da mosca-dos-estábulo (BARROS et al., 2010; BITTENCOURT, 2012; CORRÊA et al., 2013). A alta capacidade de reprodução e dispersão da mosca propicia sua disseminação massiva para as propriedades pecuárias adjacentes às áreas fertirrigadas com vinhaça via aspersão, em busca de alimento e, por conseguinte, a ocorrências de surtos (DOMINGHETTI et al., 2015).

Elevadas infestações por *S. calcitrans* são decorrentes de um conjunto de fatores bióticos e abióticos, assim como as condições de manejo dos subprodutos orgânicos em processo de fermentação (TAYLOR et al., 2007). Os picos populacionais normalmente ocorrem no verão/primavera, devido a elevada precipitação pluviométrica e altas temperaturas (MORAES, 1990; BRITO et al., 2008; PARRAVANI et al., 2019).

Estudos evidenciaram que temperatura ideal para o desenvolvimento da mosca-dos-estábulo é de 25°C, apresenta variação entre 18°C e 30°C, não ocorrendo desenvolvimento larvar em temperaturas superiores a 35°C (AGUIAR-VALGODE & MILWARD-DE-AZEVEDO, 1992). Quando adultas possuem maior atividade sob condições térmicas entre 20°C e 27°C (GERRY et al., 2007), sendo inibidas em temperaturas abaixo de 7°C (SEMAKULA et al., 1989).

A precipitação pluviométrica também pode influenciar na abundância da mosca-dos-estábulo, uma vez que proporciona condições de umidade nos resíduos orgânicos gerados pela usina, bem como aqueles produzidos ou estocados nas fazendas pecuárias. No entanto, o excesso de chuva pode prejudicar o processo de pupação das larvas de *S. calcitrans*, devido à migração dessas para áreas mais secas para completar seu ciclo biológico (FOIL e HOGSETTE, 1994). De acordo com Bittencourt e Moya-Borja (2000), índices de pluviosidade maiores que 150 mm resultam na redução da infestação do parasito nos animais. O alto índice

de chuva, associado às altas temperaturas do verão, atua favoravelmente para a redução da densidade populacional (BROCE et al., 2005).

Outra variável climática a ser considerada é a umidade relativa do ar, que tende a beneficiar o desenvolvimento das formas imaturas de *S. calcitrans* quando entre 70-80% (AGUIAR-VALGODE e MILWARD-DE-AZEVEDO, 1992).

Segundo Gersabeck e Merrit (1985) o comportamento de dispersão da mosca-dos-estábulo também é influenciado pelo vento, devido à capacidade do ar em conduzir os odores atrativos a esse díptero. Fato também descrito por Dominghetti et al. (2017) verificaram que a velocidade do vento pode estimular ou limitar a dispersão da mosca-dos-estábulo.

2 Prevenção e controle

As principais formas para prevenir e controlar os surtos causados por *S. calcitrans* envolvem práticas de manejo para eliminar os focos de reprodução (DOMINGHETTI et al., 2015). Ressalta-se que tais práticas devem ser adotadas tanto nas usinas quanto nas propriedades pecuárias, pois essas mantêm a população da mosca-dos-estábulo ao longo de todo o ano (BARROS et al., 2010).

As boas práticas a serem realizadas pela usina incluem o manejo dos subprodutos orgânicos como a vinhaça e a torta de filtro. No pátio de torta de filtro a principal medida se refere à compostagem do material, a fim de eliminar as formas imaturas da mosca-dos-estábulo (BITTENCOURT, 2012).

Apesar da influência da usina na produção da mosca-dos-estábulo, ainda existem poucas bases científicas para fundamentar as estratégias de controle, bem como seu real efeito a campo (BITTENCOURT, 2012; DOMINGHETTI et al., 2015).

O manejo preventivo nas áreas de lavouras fertirrigadas com vinhaça via aspersão já foram inicialmente investigadas por alguns autores que destacam ações como fracionar a aplicação de vinhaça (KOLLER et al., 2009; KASSAB et al., 2012), incorporação da palhada ao solo (BITTENCOURT, 2012), queima profilática (CANÇADO et al., 2013) e realizar a limpeza das margens e fundo dos canais condutores de vinhaça (BITTENCOURT, 2012).

Nas propriedades pecuárias é recomendada a higienização frequente das instalações, principalmente em confinamento e granjas leiteiras, nas quais há maior acúmulo de excrementos animais, bem como restos de alimentos. Após a remoção,

o material deve ser destinado corretamente, podendo ser espalhado sobre a pastagem ou devidamente coberto para a realização de compostagem (KOLLER et al., 2009).

Barros et al. (2010) verificaram que as propriedades que forneciam suplementação volumosa aos animais possuíam histórico de infestação por *S. calcitrans* anterior à instalação de usinas, embora com abundância muito menor. Esses alimentos necessitam de armazenamento adequado, haja vista que devido ao processo de fermentação são potencialmente atrativos para a postura e posterior desenvolvimento desta praga. Diante disso, é fundamental que a silagem seja devidamente coberta durante período de uso, além da destinação adequada do material remanescente.

De acordo com Kassab et al. (2012), durante os surtos, uma alternativa é o controle químico por meio de inseticidas de origem natural ou sintética com o objetivo de eliminar a população de *S. calcitrans* emergente e conter os prejuízos causados por esta praga ao setor agropecuário. No entanto, essa alternativa de controle tende a tornar-se pouco eficiente ao longo do tempo, uma vez que a pressão do uso de inseticidas pode levar à redução da suscetibilidade dos insetos e, conseqüentemente, à seleção de indivíduos resistentes (MOREIRA et al., 2012; BARROS et al., 2012; OLAFSON et al., 2019).

A utilização de agentes biológicos para o controle da mosca-dos-estábulo é tida como uma opção e a literatura destaca o uso de fungos como o *Metarhizium anisopliae* (MORAES, 2007; CRUZ-VAZQUEZ et al., 2015) e parasitoides da família Pteromalidae (Hymenoptera) (SKOVBGARD & JESPERSEN, 1999).

2.1 Piretroides

Os piretroides são derivados sintéticos das piretrinas, extraídas das flores de crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*, também chamado de *Pyrethrum cinerariaefolium*), sendo a maioria derivada do ácido ciclopropanocarboxílico, com exceção do fenvalerato (SILVA, 2009; FIGUEIREDO, 2014).

Conhecidos desde 1920, os piretroides são amplamente utilizados para o controle de pragas e vetores de doenças, devido à rápida atuação, baixa toxicidade para mamíferos, baixo impacto ambiental e pouca volatilidade (MILLER, 1988; RINKEVICH et al., 2013).

Estes inseticidas atuam por contato ou ingestão, afetando o sistema nervoso central e periférico dos insetos (MILLER, 1988; DOMINGUES, 2005). Os piretroides alteram a cinética dos canais de sódio dependentes de voltagem e, conseqüentemente, aumentam a permeabilidade de sódio na membrana das células nervosas, desencadeando o efeito *knockdown*, manifestado por rápida incoordenação e impossibilidade de voar (SALGADO et al., 1983b; MILLER, 1988; BLOOMQUIST, 1996).

De acordo com sua estrutura química os inseticidas piretroides podem ser classificados em dois grupos: tipo I e II (SALGADO et al., 1983b). O tipo I é composto pela aletrina, bifentrina, bioaletrina, permetrina e resmetrina. Enquanto os piretroides do tipo II são mais potentes devido a presença do grupo alfa-ciano ligado ao fenilbenzil ou outro álcool, sendo eles cipermetrina, deltametrina, fenpropatrina, fenvalerato e lambda-cialotrina (VALENTINE, 1990; SILVA, 2009; FIGUEIREDO, 2014). Além disso, os sintomas de intoxicação diferem conforme o tipo. Quando intoxicados pelo tipo I, os insetos apresentam incoordenação e excitabilidade, já o tipo II provoca convulsão e rápida paralisia, esse último é considerado mais tóxico, pois prolonga a abertura dos canais por um período mais duradouro, maior que a do tipo I (SALGADO et al., 1983a; SALGADO et al., 1983b; BLOOMQUIST, 1996; SHAFER et al., 2004; FIGUEIREDO, 2012). Os piretroides tipo II também possuem ação sobre o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA), o qual contribui para a ocorrência de convulsões (VALENTINE, 1990; BLOOMQUIST, 1996; FIGUEIREDO, 2012).

Os canais de sódio são fundamentais para manter o equilíbrio elétrico celular. Durante o estímulo nervoso, esses se abrem, permitindo a entrada de sódio para o meio intracelular, processo chamado de ativação. Após um curto período os canais se fecham, permitindo que a membrana entre no estágio de repolarização (REECE, 2012).

O início e a prolongação dos estímulos elétricos por toda a extensão do axônio são mediados por canais de sódio dependentes de voltagem. Nos mamíferos e insetos, o canal de sódio é constituído por uma subunidade alfa formadora de poros, essa é composta por quatro domínios homólogos (I - IV) e cada domínio é formado por seis segmentos transmembranares (S1 - S6) (RINKEVICH et al., 2013). Os segmentos S1 a S4 atuam como módulos de detecção de tensão, já os segmentos S5 e S6 são conectados por alças da membrana (região P) e formam

os domínios formadores de poros (VAIS et al., 2001; RINKEVICH et al., 2013; DONG et al., 2014).

Em situação normal, o potencial de ação nas células excitáveis se inicia após a despolarização da membrana neural, promovendo a mudança de carga no interior da membrana (positiva) e, conseqüentemente, sua ativação. Os canais de sódio dependentes de voltagem se abrem e permitem a entrada do sódio para o meio intracelular, alguns milissegundos depois os canais são fechados. A inativação é realizada por partículas formadoras de resíduos, por meio de um *linker* entre os domínios III e IV (RINKEVICH et al., 2013).

Os piretroides modificam (inativam ou desativam) os canais de sódio e interrompem seu fechamento, conseqüentemente deprimem a função das células nervosas do indivíduo (BLOOMQUIST, 1996; PITZER et al., 2010).

Após a modificação, as células nervosas entram em um estado de excitabilidade extrema, permanecendo assim até que a célula não seja capaz de manter a atividade da bomba de sódio-potássio (DAVIES et al., 2007).

2.2 Resistência aos inseticidas piretroides

Segundo Crow (1957) a resistência é uma herança genética, sendo esta conferida pela alteração dos genes originais e, por conseguinte, a seleção de indivíduos resistentes à ação dos inseticidas.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a resistência é definida como o desenvolvimento da capacidade do organismo em tolerar diferentes doses de um agente tóxico letal para indivíduos normais da mesma espécie (OMS, 1976).

Os piretroides são utilizados mundialmente para o controle de pragas no setor agropecuário, o que favoreceu a seleção de ectoparasitos resistentes ao grupo químico (BOWMAN, 2010; DU et al., 2013; RINKEVICH et al., 2013).

Resistência aos piretroides foi descrita em muscídeos hematófagos como a mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) (ROUSH et al., 1986; BARROS et al., 2012; DOMINGUES et al., 2019) e a mosca-dos-estábulo (CILEK & GREENE, 1994; PITZER et al., 2010; OLAFSON et al., 2011; BARROS et al., 2019; OLIVEIRA, 2019).

Nos insetos, a resistência aos inseticidas está associada a padrões genéticos, os quais podem manifestar-se das seguintes formas: (I) alterações comportamentais, onde o inseto evita o contato com os inseticidas, preferindo locais não

tratados (SPARKS et al., 1989; ZYZAK et al., 1996); (II) alterações fisiológicas, que incluem redução da penetração do inseticida pela cutícula do inseto alvo, aumento da detoxificação metabólica por monoxigenases dependentes de citocromo P-450, esterases e glutathione S-transferases e, por conseguinte, rápida excreção do inseticida (ROUSH, 1993; SODERLUND, 1997); (III) redução da sensibilidade do sítio alvo ou moleculares (ROUSH, 1993; SODERLUND & BLOOMQUIST, 1990).

Os insetos que apresentam maior produção de monoxigenases, ou ainda a geração de P-450 com maior capacidade catalítica, realizam a oxidação do inseticida de forma mais rápida (SODERLUND & BLOOMQUIST, 1990).

As esterases catalisam os piretroides por hidrólise do éster central, sendo uma das principais enzimas a carboxilesterase; cabe salientar que essa enzima também atua sobre inseticidas organofosforados e carbamatos (SODERLUND & BLOOMQUIST, 1990; ROUSH, 1993). O metabolismo dos inseticidas por glutathione S-transferases é mediado pela degradação de moléculas endógenas e exógenas com a glutathione reduzida (GSH), essas são biotransformadas em ácido mercaptúrico e excretadas. A resistência metabólica a organofosforados e ao diclorodifenil-tricloroetano (DDT) é mediada por glutathione S-transferases (DU et al., 2013).

Além da resistência metabólica, a forma mais comum de resistência nos insetos é a alteração do sítio-alvo de ação dos piretroides, os canais de sódio dependentes de voltagem presentes nas membranas neurais (SODERLUND & BLOOMQUIST, 1990; SODERLUND, 2010).

A resistência aos piretroides foi descrita na mosca doméstica em 1951 (BUSVINE, 1951) e identificada geneticamente em 1954 (MILANI, 1954). O conhecimento da estrutura e aminoácidos que formam os canais de sódio (SALKOFF et al., 1987; OKAMOTO et al., 1987) contribuiu para a identificação do gene denominado *para* em *D. melanogaster*. Esses foram baseados em estudos de termossensibilidade, no qual os insetos sofriam paralisia imediata quando submetidos a temperaturas restritivas, retornando ao seu estado normal em temperaturas toleráveis (GRIGLIATTI et al., 1973; GANETZKY & WU, 1986; SALKOFF et al., 1987). Com o sequenciamento do DNA foi possível verificar que o alelo *para* ocorre em diferentes posições do gene dos canais de sódio (LOUGHNEY et al., 1989).

Os insetos resistentes aos piretroides apresentam alterações na sequência ou conformação das proteínas do gene dos canais de sódio, conseqüentemente, impedem a ligação do inseticida ao seu sítio de ação (WILLIAMSON, 1993). Essa

é mediada pelo alelo *knockdown resistance (kdr)* e *super-kdr*, a última resulta em um grau de insensibilidade potencialmente maior (BLOOMQUIST, 1996).

O efeito *kdr* ocorre devido a uma mutação no gene dos canais de sódio, alterando o sítio-alvo de ação dos piretroides (SODERLUND & BLOOMQUIST, 1990; SODERLUND, 2010). Mutações nos canais de sódio estão localizadas nos segmentos 4 e 5 ou entre as hélices transmembranares S5 e S6 do domínio II, sugerindo que as alterações genéticas estejam presentes na região próxima a abertura interna do canal (SODERLUND, 2010). Segundo Olafson et al. (2011) na mosca-dos-estábulo assim como em outros dípteros, a mutação ocorre pontualmente no segmento 1014 do gene do canal de sódio, no qual foi verificada a substituição do aminoácido leucina por uma histidina (L1014H), levando à transversão de uma timina para adenina. Existem vários e distintos pontos mutacionais no gene dos canais de sódio (Figura 1) que podem levar ao efeito *kdr (knockdown)* em diferentes espécies de insetos (RINKEVICH et al., 2013).

Uma destas mutações pode ocorrer mediante a substituição de uma leucina por uma fenilalanina (CTT para TTT) na posição 1014 (SMITH et al., 1997), estando localizada no segmento 6 do domínio II no gene que codifica o canal de sódio (BLOOMQUIST, 1996). Por outro lado, a mutação *super-kdr* leva a substituição de uma metionina por uma trionina (ATG para ACG) na posição 918, sendo localizada entre os segmentos 4 e 5, no domínio II (BLOOMQUIST, 1996)

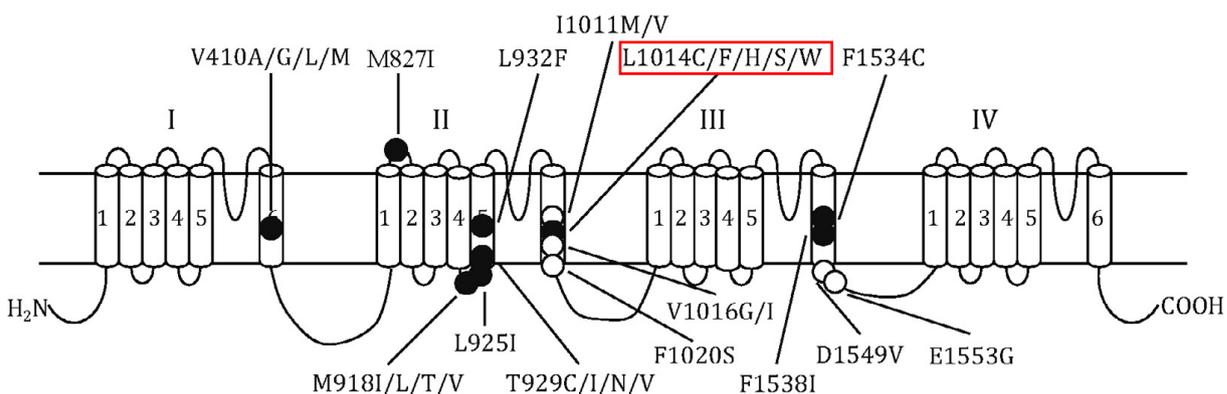


Figura 1. Pontos mutacionais no canal de sódio associado à resistência aos inseticidas piretroides em diferentes espécies de insetos. Em destaque a mutação pontual da mosca-dos-estábulo descrita por Olafson et. al (2011) na mosca-dos-estábulo. Fonte: Adaptada, RINKEVICH et al., 2013.

A resistência de *S. calcitrans* aos inseticidas piretroides foi descrita nos Estados Unidos em 1994, a partir de um bioensaio com populações a campo (CILEK

& GREENE, 1994). Em estudos semelhantes realizados nos Estados Unidos (MARON, et al. 1997; PITZER et al., 2010), França (SALEM et al., 2012; TAINCHUM et al, 2018), Alemanha (REISSERT-OPPERMANN et al., 2019) e, recentemente, no Brasil, no estado de Mato Grosso do Sul (BARROS et al., 2019; OLIVEIRA, 2019), foi constatado a ocorrência de populações resistentes aos piretroides.

O primeiro estudo para elucidar o mecanismo molecular de resistência da mosca-dos-estábulo aos piretroides foi realizado nos Estados Unidos com moscas resistentes (oriundas de seleção laboratorial) e espécimes selvagens (OLAFSON et al., 2011). Neste estudo foi identificada uma mutação pontual devido a uma alteração de aminoácido, leucina-histidina (Leu1014His), coincidente com mutações de resistência *kdr* em outros dípteros. A presença do alelo *kdr-his* foi previamente confirmada em populações de *S. calcitrans* nos Estados Unidos, França e Tailândia (OLAFSON et al., 2019).

No Brasil, até 2019 não existiam relatos da resistência genotípica da mutação *kdr-his* nesta espécie. O primeiro relato ocorreu a partir do sequenciamento de um fragmento do gene do canal de sódio em populações de colônias da Embrapa Gado de Corte e municípios de MS e GO, onde foi possível detectar o alelo *kdr-his* e três outros *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphism*) ainda não descritos na literatura (OLIVEIRA, 2019). Assim, dada a importância da praga no setor pecuário e sucroenergético na região do estado de São Paulo, o presente trabalho tem como objetivo o estudo da dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo em usinas sucroalcooleiras e verificar a ocorrência de resistência aos inseticidas piretroides através da mutação *kdr-his* em populações do referido Estado.

Referências bibliográficas

AGUIAR-VALGODE M.; MILWARD-DE-AZEVEDO, E. M. V. Determination of thermal requirements of *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera, Muscidae), under laboratory conditions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.87, n. 1, p. 11-20, 1992.

AMICHOT, M. et al. Target modification as a molecular mechanism of pyrethroid resistance in *Drosophila melanogaster*. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 44, n. 3, p. 183-190, 1992.

BALDACCHINO, F. et al. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. **Parasite**, v. 20, 2013.

- BARROS, A. T. M. et al. *Stomoxys calcitrans* outbreaks in pastured beef cattle in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 30, n. 11, p. 945-952, 2010.
- BARROS, A. T. M. et al. Susceptibility of the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae), to insecticides in Brazil. **Rev Bras. Parasitol. Vet.**, v. 21, n. 2, p. 125-132, 2012.
- BARROS, A. T. M. et al. Resistance of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), to cypermethrin in outbreak areas in Midwestern Brazil. **Rev Bras. Parasitol. Vet.**, v. 28, n. 4, p. 802-806, 2019.
- BITTENCOURT, A. J.; MOYA-BORJA, G. E. Flutuação sazonal de *Stomoxys calcitrans* em bovinos e equinos no Município de Espírito Santo do Pinhal. **Rev. Univ. Rur. Cienc. Vida**, v. 22, p. 101-106, 2000.
- BITTENCOURT, A. J.; BORJA, G. E. M. *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera, Muscidae): Feeding sites preferred on bovine body. **Rev. Bras. de Zootecnia**, v. 4, n.1, p. 75-83, 2002.
- BITTENCOURT, A. J. Avaliação de surtos e medidas de controle ambiental de *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) na Região Sudeste do Brasil. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 34, n. 1, 2012.
- BLOOMQUIST, J. R. Ion channels as targets for insecticides. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 41, p. 163-90, 1996.
- BRITO, L. G. et al. Manual de identificação, importância e manutenção de colônias estoque de dípteras de interesse veterinário em laboratório. **Embrapa Rondônia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2008.
- BROCE, A. B.; HOGSETTE, J.; PAISLEY, S. Winter feeding sites of hay in round bales as major developmental sites of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) in pastures in spring and summer. **J. Econ. Entomol.**, v. 98, n. 6, p. 2307-2312, 2005.
- BOWMAN, D. D. **Georgis – Parasitologia Veterinária**. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, 244p.
- BUSVINE, J. R. Mechanism of resistance to insecticide in house flies. **Nature**. p. 193-195, 1951.
- CAMPBELL, J. B. et al. Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle. **J. Econ. Entomol.**, v. 94, n. 3, p. 780-783, 2001.
- CANÇADO, P. H. D. et al. Uso da queima profilática no controle emergencial e prevenção de surtos pela mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) em propriedades produtoras de cana-de-açúcar. Campo Grande: **Embrapa Gado de Corte**, 2013.

CASTRO, B. G.; SOUZA, M. M. S.; BITTENCOURT, A. J. Isolamento de espécies enterobacterianas em *Stomoxys calcitrans*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2654-2657, 2008.

CILEK, J. E.; GREENE, G. L. Stable fly (Diptera: Muscidae) insecticide resistance in Kansas cattle feedlots. **J. Econ. Entomol.**, v. 87, n. 2, p. 275- 279, 1994.

CORRÊA, E. C. et al. Abundância de *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) em diferentes subprodutos canavieiros. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n. 11, p. 1303-1308, 2013.

CRUZ-VÁZQUEZ, C. et al. Efficacy of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* in the control of infestation by stable flies *Stomoxys calcitrans* (L.), under natural infestation conditions. **Vet. Parasitol.**, v. 212, n. 3-4, p. 350-355, 2015.

DAVIES, T. G. E. et al. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. **IUBMB life**, v. 59, n. 3, p. 151-162, 2007.

DOMINGHETTI, T. F. S. et al. *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) outbreaks: current situation and future outlook with emphasis on Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 24, n. 4, p. 387-395, 2015.

DOMINGHETTI, T. F. S. **Dinâmica populacional e surtos de *Stomoxys calcitrans* em usina sucroalcooleira e propriedades pecuárias adjacentes.** Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2017. 89p.

DOMINGUES, V. M. F. **Utilização de um produto natural (cortiça) como adsorvente de pesticidas piretroides em águas.** Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto. 2005. 224p.

DOMINGUES, L. N. et al. Impacts of long-term insecticide treatment regimes on *skdr* and *kdr* pyrethroid resistance alleles in horn fly field populations. **Parasitol. Res.**, v. 118, n. 9, p. 2485-2497, 2019.

DONG K, D. Y. et al. Molecular Biology of Insect Sodium Channels and Pyrethroid Resistance. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 50, p. 1-17, 2014.

DU, Y. et al. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 10, n. 29.

FIGUEIREDO, A. C. P. **Piretroides: uma nova geração de inseticidas.** Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa. 2014. 33p.

FINE, B. C. et al. Pattern of pyrethrin-resistance in house flies. **Nature**, v. 191, n. 4791, 1961.

FREEMAN, J. C.; ROSS, D. H.; SCOTT, J. G. Insecticide resistance monitoring of house fly populations from the United States. **Pestic. Biochem. Phys.**, v. 158, p. 61-68, 2019.

FOIL, L. D.; HOGSETTE, J. A. et al. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. **Rev. - Off. Int. Epizoot.**, v. 13, n. 4, p. 1125-1158, 1994.

FÖRSTER, M. et al. Pilot study on synanthropic flies (e.g. *Musca*, *Sarcophaga*, *Calliphora*, *Fannia*, *Lucilia*, *Stomoxys*) as vectors of pathogenic microorganisms. **Parasitol. Res.**, v. 101, n. 1, p. 243-246, 2007.

GANETZKY, B.; WU, C. F. Neurogenetics of membrane excitability in *Drosophila*. **Annu. Rev. Genet.**, v. 20, n. 1, p. 13-44, 1986.

GERSABECK, E. F.; MERRITT, R. W. Dispersal of adult *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) from known immature developmental areas. **J. Econ. Entomol.**, v. 78, n. 3, p. 617-621, 1985.

GRIGLIATTI, T. A. et al. Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 120, n. 2, p. 107-114, 1973.

GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GODWIN, R. M. et al. Predicting nuisance fly outbreaks on cattle feedlots in subtropical Australia. **Animal Production Science**, v. 58, n. 2, p. 343-349, 2018.

HARIS, R. L.; MILLER, J. A.; FRAZAR, E. D. Horn Flies and Stable flies: Feeding Activity. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 67, n. 6, p. 891-894, 1974.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: < <https://sibra.ibge.gov.br/tabela/1618>>.

INGLES, P. J. et al. Characterization of voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant house fly strains. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 26, n. 4, p. 319-326, 1996.

KASSAB, S. O. Novos surtos populacionais de mosca-dos-estábulo no Mato Grosso do Sul: medidas de controle e prevenção. **Rev. Agrarian.**, v. 5, n. 15, p. 84-88, 2012.

KOLLER, W. W. et al. 2009. Surtos da mosca-dos-estábulo, *Stomoxys calcitrans*, em Mato Grosso do Sul: novo problema para as cadeias produtivas da carne e suínos? Campo Grande, MS: **Embrapa Gado de Corte**, p. 1 - 31.

LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, p. 231-253, 2007.

LOUGHNEY, K.; KREBER, R.; GANETZKY, B. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. **Cell**, v. 58, n. 6, p. 1143-1154, 1989.

MARON, P. C. R. G. et al. Susceptibility of stable flies (Diptera: Muscidae) from southeastern Nebraska beef cattle feedlots to selected insecticides and comparison of 3 bioassay techniques. **J. Econ. Entomol.**, v. 90, n. 2, p. 293-298, 1997.

MILANI, R. Comportamento mendeliano della resistenza alla azione abbatante del DDT: correlazione tra abbattimento e mortalità in *Musca domestica* L. **Riv. Parasitol.**, v. 15, p. 513-542, 1954.

MILLER, T. A. Mechanisms of Resistance to Pyrethroid Insecticides. **Parasitol. Today**, v. 4, n. 7, p. 58-59, 1988.

MITZMAIN, M. B. The bionomics of *Stomoxys calcitrans* Linnaeus; a preliminary account. **Philipp. J. Sci.**, v. 8, p. 29-48, 1913.

MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes-Revisão. **Rev. Cient. Eletrô. Med. Vet.**, n. 18, p. 1-58, 2012.

MORAES, A. P. R. **Stomoxys calcitrans: Estabelecimento de colônia e efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre seus estágios imaturos.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Veterinária, Universidade Rural do Rio de Janeiro. 2007. 65p.

MORAES, J. L. C. **Toxicidade comparativa de alguns inseticidas organofosforados e piretróides sobre larvas e adultos de *Stomoxys calcitrans* Linnaeus 1958.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de biologia, Universida

de Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí. 1990. 75p.

MOREIRA, M. F.; MANSUR, J. F.; FIGUEIRA-MANSUR, J. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. **Inst. Nac. Ciênc. Tecnol. Entomol. Mol.**, v. 15, p. 1-23, 2012.

NAKANO, O.; JUNIOR, L. A. P.; CAMARGO, A. H. Controle químico de adultos e larvas da mosca doméstica. **O Biológico**, v. 39, p. 5-8, 1972.

OKAMOTO, H. et al. Dislocation reduction in GaAs on Si by thermal cycles and InGaAs/GaAs strained layer superlattices. **Jpn. J. Appl. Phys.**, v. 26, n. 12, p. 1950-1952, 1987.

OLAFSON, P. U.; PITZER, J. B.; KAUFMAN, P. E. Identification of a mutation associated with permethrin resistance in the para-type sodium channel of the stable fly (Diptera: Muscidae). **J. Med. Entomol.**, v. 104, n.1, p. 250-257, 2011.

OLAFSON, P. U. et al. Frequency of *kdr* and *kdr-his* alleles in Stable Fly (Diptera: Muscidae) populations from the United States, Costa Rica, France, and Thailand. **J. Med. Entomol.**, v. 20, n. 1, p. 1-5, 2019 (a).

OLAFSON, P.U. et al. Functional genomics of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, reveals mechanisms underlying reproduction, host interactions, and novel targets for pest control. **BioRxiv**, mai 2019 (b). Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/05/02/623009.full.pdf>>.

OLIVEIRA, F. S. Detecção da mutação *kdr-his* (*knockdown resistance*), associada à resistência a inseticidas piretroides, e prospecção de novos polimorfismos de vasa única no gene dos canais de sódio de moscas-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*). **Embrapa Gado de Corte-Tese/dissertação (ALI+CE)**, 2019.

PARRAVANI, A. et al. Seasonal abundance of the stable fly *Stomoxys calcitrans* in southwest England. **Med. Vet. Entomol.**, v. 33, n. 4, p. 485-490, 2019.

PATRA, G. et al. *Stomoxys calcitrans* and its importance in livestock: a review. **Int. J. Agric. Res.**, v. 6, p. 30-37, 2018.

PITZER, J. B.; KAUFMAN, P. E.; TENBROECK, S. H. Assessing permethrin resistance in the stable fly (Diptera: Muscidae) in Florida using laboratory selections and field evaluations. **J. Econ. Entomol.**, v. 103, p. 2258-2263, 2010.

REECE, W. O. **Dukes, fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, p. 926.

REISSERT-OPPERMANN, S. et al. Insecticide resistance in stable flies (*Stomoxys calcitrans*) on dairy farms in Germany. **Parasitol. Res.**, v. 118, n. 9, p. 2499-2507, 2019.

RINKEVICH, F. D.; DU, Y.; DONG, K. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 106, n. 3, p. 93-100, 2013.

ROUSH, R. T. et al. Inheritance and effective dominance of pyrethroid resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 79, n. 5, p. 1178-1182, 1986.

ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 32, n. 1, p. 361-380, 1987.

ROUSH, RT. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. **Parasitol. Today** 1993; 9(5):174-9.

SALEM, A. et al. Susceptibility of Two European strains of *Stomoxys calcitrans* (L.) to Cypermethrin, Deltamethrin, Fenvalerate, λ -cyhalothrin, Permethrin and Phoxim. **Int. J. Appl. Res. in Vet. Med.**, v. 10, n. 3, 2012.

SALGADO, V. L.; IRVING, S. N.; MILLER, T. A. Depolarization of motor nerve terminals by pyrethroids in susceptible and *kdr*-resistant house flies. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 20, n. 1, p. 110-114, 1983 (a).

SALGADO V. L.; IRVING, S. N.; MILLER, T. A. The importance of nerve terminal depolarization in pyrethroid poisoning of insects. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 20, n. 2, p. 169-182, 1983 (b).

SALKOFF, L. et al. Genomic organization and deduced amino acid sequence of a putative sodium channel gene in *Drosophila*. **Science**, v. 237, n. 4816, p. 744-749, 1987.

SCOTT, J. A. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. **Fla. Entomol.**, v. 78, n. 3, p. 399, 1995.

SEMAKULA, L. M.; TAYLOR, R. A. J.; PITTS, C. W. Flight behavior of *Musca domestica* and *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) in a Kansas dairy barn. **J. Med. Entomol.**, v. 26, n. 6, p. 501-509, 1989.

SEMELBAUER, M. et al. The Factors Influencing Seasonal Dynamics and Spatial Distribution of Stable Fly *Stomoxys calcitrans* (Diptera, Muscidae) within Stables. **Insects**, v. 9, n. 142, p. 1-11, 2018.

SHAFER, T. J.; MEYER, D. A.; CROFTON, K. M. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. **Environ. Health Perspect.**, v. 113, n. 2, p. 123-136, 2004.

SHAPIRO, L. S. **Pathology & Parasitology for Veterinary Technicians**. 2th edition. Delmar, Cengage Learning: Nova York, 2005, p. 135-285.

SMITH, T. J. et al. The L1014F point mutation in the house fly *Vssc1* sodium channel confers knockdown resistance to pyrethroids. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 27, n. 10, p. 807-812, 1997.

SODERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: **Pesticide resistance in Arthropods**, Springer, Boston, MA, 1990.

SODERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 34, n. 1, p. 77-96, 1989.

SODERLUND, D. M. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. **Pest. Manag. Sci.**, v. 64, n. 6, p. 610-616, 2008.

SODERLUND, D. M. Toxicology and mode of action of pyrethroid insecticides. In: **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology**. Academic Press, 2010. p. 1665-1686.

SILVA, N. M. D. **Investigação da resistência a inseticidas na mosca-da-bicheira *Cochliomyia hominivorax* (Diptera; Calliphoridae)**. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). 2009. 103p. Instituto de biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SKOVGARD, H.; JESPERSEN, E. Activity and relative abundance of hymenopterous parasitoids that attack puparia of *Musca domestica* and *Stomoxys calcitrans*

(Diptera: Muscidae) on confined pig and cattle farms in Denmark. **Bull. Entomol. Res.**, v. 89, n. 3, p. 263-269, 1999.

SOLÓRZANO, J. A. et al. Biology and trapping of Stable flies (Diptera: Muscidae) developing in pineapple residues (*Anonas comosus*) in Costa Rica. **J. Insect. Sci.**, v. 15, n. 1, p. 145, 2015.

SPARKS, T. C. et al. The role of behavior in insecticide resistance. **Pestic. Sci.**, v. 26, n. 4, p. 383-399, 1989.

TAINCHUM K, SHUKRI S, DUVALLET G, ETIENNE L, JACQUIET P. Phenotypic susceptibility to pyrethroids and organophosphate of wild *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) populations in southwestern France. **Parasitol. Res.**, v. 117, n.12, p. 4027-4032, 2018.

TAYLOR, D. B.; BERKEBILE, D. R.; SCHOLL, P. J. Stable fly population dynamics in eastern Nebraska in relation to climatic variables. **J. Med. Entomol.**, v. 44, n. 5, p. 765-771, 2007.

TAYLOR, D. B.; MOON, R. D.; MARK, D. R. Economic impact of Stable flies (Diptera: Muscidae) on dairy and beef cattle production. **J. Med. Entomol.**, v. 48, n. 1, p. 198-209, 2012.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Veterinary Parasitology**. 4th edition. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2016, p. 180.

VAIS, H. et al. The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium. **Pest. Manag. Sci.**, v. 57, n. 10, p. 877-888, 2001.

VALENTINE, W. M. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. **Vet. Clin. North Am Small Anim. Pract.**, v. 20, n. 2, p. 375-382, 1990.

WILLIAMSON, M. S. et al. Knockdown resistance (*knr*) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). **Mol. Gen. Genet.**, v. 240, n. 1, p. 17-22, 1993.

WHO - Expert Committee on Insecticides & World Health Organization. (1976). Resistencia de vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas: 22 informe del Comité de Expertos de la OMS en Insecticidas [se reunió en Ginebra del 16 al 23 de septiembre de 1975]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. Disponible em:< <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40929>>.

CAPÍTULO II

Artigo 1

Population dynamics of stable flies (*Stomoxys calcitrans*) in sugarcane mills from the state of São Paulo

Dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) em usinas de cana-de-açúcar no estado de São Paulo

Abstract: The large-scale production of organic substrates resulting from the production of ethanol has favored the occurrence of population outbreaks of *Stomoxys calcitrans* in livestock farms in the vicinity of sugarcane mills. The objective of the present study was to investigate the population dynamics of stable flies in sugarcane mills in the counties of Pereira Barreto (PB) and Sud Mennucci (SM), São Paulo. Data collection was carried out from January/2018 to December/2019 by using reflective sticky traps placed in vinasse-fertigated sugarcane fields, filter cake composting yard and cattle ranches adjacent to fertigated areas. The entomological material was collected weekly and sent for identification and counting. The fluctuation of *S. calcitrans* in the sugarcane mills presented different tendencies, with populational peaks occurred in the months of January, May/June and October/November. There were no strong enough correlations to relate the average of flies identified by trap to climatic conditions. However, a close relationship was found between the control actions carried out in the fertigated crops and the filter cake areas and quality in the management of animal production residues. Such factors were determinant for the occurrence of an increase in the population density of the pest regardless of the period analyzed.

Keywords: vinasse, seasonality, population fluctuation.

Resumo: A geração de subprodutos orgânicos em larga escala, decorrentes da produção de etanol, tem favorecido a ocorrência de surtos populacionais de *Stomoxys calcitrans* nas proximidades de usinas sucroenergéticas. O objetivo do presente estudo foi conhecer a dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo em usinas sucroenergéticas nos municípios de Pereira Barreto (PB) e Sud Mennucci (SM), São Paulo. A coleta dos dados foi realizada de janeiro/2018 a dezembro/2019, para isso foram instaladas armadilhas adesivas reflexivas nas lavouras canavieiras fertirrigadas via aspersão, pátio de compostagem da torta de filtro e fazendas pecuárias adjacentes às áreas fertirrigadas. O material entomológico foi recolhido

semanalmente e encaminhado para identificação e contagem dos espécimes. De maneira geral, nas usinas dos municípios de PB e SM a flutuação populacional apresentou tendências similares, com características bimodais. Em 2018 tanto PB quanto SM a elevada abundância na captura da mosca-dos-estábulo em janeiro, período de entressafra da cana-de-açúcar. Todavia, o segundo período de aumento populacional da praga em PB foi registrado em outubro e em SM no mês de novembro. No ano de 2019, os picos populacionais ocorreram nos meses de janeiro, maio/junho e outubro/novembro. Não foram observadas correlações fortes entre a média de moscas por armadilha e condições climáticas. No entanto, foi constatada estreita relação entre as ações de controle desenvolvidas nas lavouras fertirrigadas, no pátio de compostagem e a qualidade no manejo dos resíduos da produção animal. Tais fatores foram determinantes para o aumento na abundância populacional da praga, independente do período analisado.

Palavras-chaves: vinhaça, sazonalidade, flutuação populacional.

Introdução

Popularmente conhecida como “mosca-dos-estábulo”, *Stomoxys calcitrans* é um ectoparasito responsável por causar grandes impactos econômicos nas cadeias produtivas pecuária e sucroenergética nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Minas Gerais (Koller et al., 2009; Dominghetti et al., 2015).

A mosca-dos-estábulo se desenvolve em matéria orgânica vegetal em processo de fermentação (Brues, 1913; Foil & Hogsette, 1994). Os adultos se alimentam de sangue, principalmente de bovinos e equinos, sendo a picada extremamente dolorosa gerando desconforto e estresses aos animais. Podem ainda atuar como vetores mecânicos de vários agentes de doenças, o que inclui bactérias, fungos, protozoários e helmintos (Baldacchino et al., 2013), tornando-os importantes à saúde pública e sanidade animal. Os danos causados pelo parasito implicam diretamente na produção animal, reduzindo o ganho de peso e produção de leite em até 20% e 60%, respectivamente (Campbell et al., 2001; Koller et al., 2009). De acordo com estudo realizado por Grisi et al. (2014) no Brasil, os prejuízos econômicos causados pela praga podem ultrapassar a US \$ 335,46 milhões por ano.

Durante o período de safra da cana-de-açúcar, a mosca se dispersa para áreas da usina, atraídas pelos subprodutos orgânicos oriundos do processamento da cana-de-açúcar, como a vinhaça (subproduto líquido obtido na produção do álcool após a destilação do caldo da cana-de-açúcar fermentado) e torta de filtro (subproduto sólido proveniente da filtração do caldo da cana) (Barros et al., 2010). De acordo com Corrêa et al. (2013), a capacidade média

de produção da mosca-dos-estábulo na torta de filtro é de 55,8 moscas/m², enquanto nas lavouras fertirrigadas com vinhaça é de 24,2 moscas/m², fato que demonstra o alto potencial deste díptero nos substratos orgânicos presentes nas usinas. Este fato evidencia a relevância da qualidade do manejo destes subprodutos visando a eliminação de potenciais focos de proliferação da mosca-dos-estábulo.

É importante considerar que as falhas de manejo dos resíduos oriundos da produção animal em propriedades onde há confinamentos, leiteiras, granja de aves e suínos, assim como haras, também oferecem um ambiente favorável ao desenvolvimento dos estádios imaturos (Broce et al., 2005; Barros et al., 2010). Assim sendo, é fundamental que a limpeza das instalações e a destinação dos dejetos sejam realizadas de maneira adequada e como maior rigor durante o período de entressafra, uma vez que, com o início das atividades de industrialização da cana-de-açúcar, a mosca-dos-estábulo se dispersa para as áreas da usina em busca de locais para a oviposição (Bittencourt, 2012; Dominghetti, 2017).

A dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo é influenciada por um conjunto de fatores bióticos e abióticos, tais como temperatura, precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar, velocidade do vento, entre outros (Taylor et al., 2007). Contudo, no Brasil, além das condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da espécie, a presença de usinas sucroalcooleiras próximas às propriedades pecuárias favorece a ocorrência de surtos, uma vez que estas dispõem de extensas áreas favoráveis ao seu desenvolvimento durante o período de safra da cana-de-açúcar, que quando não manejadas corretamente criam oportunidades para a formação de possíveis focos para a proliferação do díptero (Barros et al., 2010; Cancado et al., 2013; Dominghetti et al., 2015).

Os surtos causados pela mosca-dos-estábulo em propriedades pecuárias, relacionados às usinas sucroenergéticas, foram descritos no estado de São Paulo (Nakano et al., 1973; Queiroz, 2011; Bittencourt, 2012), Mato Grosso do Sul (Barros et al., 2010; Kassab et al., 2012; Dominghetti, 2017), Mato Grosso (Jusbrasil, 2015) Minas Gerais (Bittencourt, 2012) e Goiás (Neves & Mendonça, 2019).

O estado de São Paulo é o maior produtor nacional de cana-de-açúcar, considerado referência mundial na produção de etanol. De acordo com a ÚNICA (União da Indústria de Cana-de-açúcar), no estado há 139 usinas em operação (Unidata, 2019), sendo consequentemente, o estado que mais registra ocorrências relacionadas aos surtos da mosca-dos-estábulo (informação pessoal – dados não publicados). Apesar da criação do programa de controle e prevenção de surtos da mosca-dos-estábulo, por meio da RESOLUÇÃO SAA - 38, a alta capacidade de produção e as falhas no manejo dos resíduos orgânicos provenientes da

produção de açúcar e etanol favoreceram a ocorrência de explosões populacionais. No Brasil, os estudos sobre a dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo em usinas e propriedades pecuárias são escassos. Diante da importância do conhecimento a respeito da bioecologia da praga para o setor sucroenergético e pecuário, o presente estudo tem como objetivo avaliar a dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo em usinas sucroalcooleiras do estado de São Paulo.

Material e métodos

a. Local do estudo

O estudo a campo foi realizado em usinas localizadas nos municípios de Pereira Barreto (PB) (20°32'03"S 51°14'38"W), sendo esta produtora de etanol e em Sud Mennucci (SM) (20°43'41"S 50°57'39"W), na qual ocorre a produção de açúcar VHP (*Very High Polarization*) e etanol, ambas no estado de São Paulo, com distância de aproximadamente 50 km entre seus polos industriais. As propriedades adjacentes à bacia de fertirrigação, em um raio de até 15 km do polo industrial de ambas as usinas apresentavam sistema de produção de gado de corte confinado, gado leiteiro, gado extensivo e sítios com prática de policultura de subsistência.

Durante os dois anos do estudo, os dados meteorológicos referentes à temperatura, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar (UR) estavam disponíveis no Clima Canal da UNESP Ilha Solteira (<http://clima.feis.unesp.br>). Destaca-se que as estações se encontravam nas áreas das usinas estudadas.

b. Armadilhas e coletas

Para a coleta do material entomológico foram utilizadas armadilhas adesivas reflexivas (“*Alsynite*”) distribuídas nas lavouras canavieiras fertirrigadas com vinhaça via aspersão, pátio de compostagem de torta de filtro e propriedades pecuárias (Tabela). Essa armadilha é constituída por uma estrutura cilíndrica de fibra de vidro ondulada, transparente, revestida por um plástico adesivo (Isca® e ColeAgro®) e fixada em uma estaca de madeira fendida, de modo que a borda superior se mantivesse a um metro em relação ao solo (Broce et al., 1988).

Tabela 1. Distribuição de armadilhas para monitoramento da flutuação populacional da mosca-dos-estábulo em usinas sucroalcooleira nos municípios Pereira Barreto e Sud Mennucci no estado de São Paulo.

Município	Nº de armadilhas	Lavouras canavieiras	Pátio de torta de filtro/fuligem	Fazendas pecuárias
PB	29	18	3	8
SM	27	14	3	10

É importante salientar que todas as armadilhas foram georreferenciadas permanecendo continuamente ativas e fixadas no mesmo local durante o período de estudo. Os plásticos adesivos (refis entomológicos) foram substituídos semanalmente e posteriormente encaminhados à Volare Consultoria Ambiental Ltda. para identificação e contagem dos espécimes.

c. Análise estatística

Os dados de contagem das moscas utilizados para a descrição da dinâmica populacional foram representados pela média mensal de espécimes capturados por armadilha, sendo apresentados na forma de gráficos.

Para a realização da análise estatística foram utilizados testes não paramétricos, em virtude da discrepância entre os valores, nos quais a mediana confere maior representatividade dos dados. Os testes não paramétricos utilizados foram Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e Coeficiente de correlação de Spearman (Zaar, 1999).

O teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$) foi aplicado para verificar a diferença de captura da mosca-dos-estábulo entre os anos e para determinar a diferença estatística entre os períodos de entressafra e safra. Enquanto o teste Kruskal-Wallis e comparação de Dunn foram aplicados para avaliar se houve diferença estatística significativa, ao nível de 5%, nas capturas semanais realizadas nos diferentes ambientes (lavouras canavieiras, pátio de compostagem da torta de filtro e fazendas pecuárias).

Resultados

Ao longo de dois anos de monitoramento da flutuação populacional de *S. calcitrans* nas usinas sucroalcooleiras PB e SM foram capturados 544.962 e 554.047 espécimes, respectivamente.

De modo geral, não houve diferença estatística entre a mediana de moscas capturadas semanalmente durante os anos de 2018 e 2019 nas usinas sucroalcooleiras PB e SM (Tabela 22). Contudo, ao considerar o total de espécimes capturados em 2019 em relação ao ano anterior, constatou-se que a usina de PB apresentou um aumento de 35%, enquanto na usina SM houve redução de 28%.

Tabela 2. Abundância de mosca-dos-estábulo capturadas semanalmente em armadilhas adesivas em usinas sucroalcooleiras em dois municípios de Pereira Barreto e Sud Mennucci, estado de São Paulo.

Município	Ano	Nº de moscas capturadas	Mediana	Mínimo	Máximo	P
PB	2018	232.295	74,3	8,8	748,3	0,1980
	2019	312.667	142,8	1,4	837,4	
SM	2018	321.371	171,3	9,6	824,6	0,1536
	2019	232.676	169,5	2,6	493,5	

Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$), utilizado na comparação das medianas.

Ao longo do período de estudo em PB as temperaturas médias mensais exibiram variação entre 21,7°C a 28,3°C, com média anual de 25,5°C. A maior temperatura em cada ano foi registrada em março/2018 (27,7°C) e janeiro/2019 (28,3°C). Enquanto as menores temperaturas ocorreram durante o mês de agosto/2018 e julho/2019, sendo 21,7°C e 21,8°C, respectivamente.

A precipitação pluviométrica anual registrada em 2018 foi 1.190,3 mm, enquanto em 2019 foi de 988,0 mm. O período chuvoso foi observado durante setembro a abril, nos quais os meses de janeiro e novembro/2018, fevereiro e dezembro/2019, exibiram maior pluviosidade. Em contrapartida, os menores índices pluviométricos foram vistos no ano de 2018, em maio, junho e julho, já em 2019 foram os meses de junho, julho e setembro que apresentaram menores níveis. A variação dos índices da umidade relativa do ar ao longo dos dois anos foi de 53,7% a 80,4%.

A distribuição da frequência de captura da praga foi bimodal, onde os picos populacionais em 2018 ocorreram em janeiro (verão) e outubro/novembro (primavera). Já em 2019 foram registrados nos meses de maio/junho (outono/inverno) e dezembro (verão).

Em 2018, a maior abundância da mosca-dos-estábulo foi constatada durante o mês de outubro, cuja média geral mensal de espécimes capturados foi de 506,6 moscas/armadi-

lha. Esta condição permeou até o mês de novembro, onde a média obtida foi 457,0 moscas/armadilha. Em ambos os meses foram registradas temperaturas elevadas, alto índice pluviométrico e umidade relativa do ar acima de 70% (primavera/verão). Por outro lado, em 2019, o aumento da abundância populacional de *S. calcitrans* ocorreu nos meses de maio e junho (outono/inverno), cujas respectivas médias mensais foram 546,5 e 530,9 moscas/armadilha. Neste período, a temperatura registrada foi inferior a 25°C, diferentemente de maio e junho/2018, a precipitação pluviométrica foi 88,1 mm, enquanto a umidade relativa do ar se manteve acima de 63,3%. Além disso, nos dois anos os menores níveis de captura foram registrados em fevereiro (entressafra), no qual as condições meteorológicas foram semelhantes. De modo geral, nos dois anos de monitoramento os picos populacionais apresentaram características bimodais, com um pico no verão (dezembro/janeiro) e outro no outono/inverno (maio/junho) ou primavera (outubro) (Figura 1).

Durante os dois anos de estudo na usina localizada no município de SM, a temperatura média mensal oscilou entre 20,2°C e 28,5°C, com média anual de 25,0°C. Os maiores registros anuais ocorreram nos meses dezembro/2018 (27,6°C) e janeiro/2019 (28,5°C). Enquanto as menores temperaturas anuais foram obtidas durante o mês de agosto/2018 (21,2°C) e julho/2019 (20,2°C).

A precipitação pluviométrica em 2018 foi 1.164,1 mm, com os meses de janeiro (263,7 mm) e novembro (266,4 mm) apresentando maior ocorrência de chuva, já o período de estiagem foi registrado em junho e julho. No decorrer de 2019, todos os meses apresentaram ocorrência de chuva, com volume acumulado de 971,8 mm, sendo o menor índice pluviométrico registrado no mês de junho, enquanto o maior índice foi observado no mês de dezembro (246,8 mm). A umidade relativa do ar apresentou variação entre 61,3% e 83,6% ao longo dos dois anos.

Conforme os dados quantitativos, em 2018 o pico populacional ocorreu de forma bimodal, os quais foram registrados janeiro (verão) (498,4 moscas/armadilhas) e novembro (481,2 moscas/armadilha) (primavera). Cabe destacar, que neste período as condições de temperatura, pluviosidade e umidade relativa do ar em janeiro e novembro foram similares. Por outro lado, os menores níveis de captura foram alcançados durante os meses mais secos e com menores temperaturas (outono/inverno).

Em 2019, a média de moscas capturadas por armadilha apresentou aumento durante o último mês de entressafra. Após o início da safra houve aumento progressivo da população da mosca-dos-estábulo, culminando em pico populacional no mês de junho (368,9 moscas/armadilha), este foi registrado durante o período de inverno. A segunda onda de aumento

populacional foi registrada durante o mês de dezembro (285,4 moscas/armadilha) (verão). De modo geral, nos meses de janeiro a março (verão/outono) exibiram os menores níveis de captura (Figura 2).

Na tabela 3 são expostas as correlações entre os fatores climáticos e a média de espécimes identificados semanalmente em PB. Conforme os resultados referentes à correlação de *Spearman* dos parâmetros climáticos com a média de moscas capturadas por armadilha na semana de captura (0) e até 4 semanas antes (-1, -2, -3, -4), foi possível verificar que não ocorreram correlações fortes, apenas correlações fracas e moderadas. Nas lavouras canavieiras e pátio de torta de filtro, independente da semana ou período analisado, não foi constatada relação entre a média de captura e as variáveis analisadas. Por outro lado, na entressafra, foi observada correlação entre a média de captura nas fazendas pecuárias registrada na semana de coleta e a temperatura média obtida três semanas antes desta, sendo negativamente fraca.

Correlações fracas e positivas, entre a precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e a média de espécimes coletados foram evidenciadas nas lavouras canavieiras e pátio de torta durante o período de safra. Já as correlações moderadas aparecem nos parâmetros UR e pluviosidade principalmente nas fazendas pecuárias durante a safra.

A tabela 4 apresenta as correlações entre os fatores climáticos e a média de espécimes identificados semanalmente em SM. Foi observada uma correlação negativa moderada entre a temperatura e a média de moscas capturadas nas lavouras na semana de coleta dos refis e nas três semanas antes desta, ao longo do período de entressafra. Contudo, na safra foi verificada apenas uma correlação positiva fraca entre a média de moscas capturadas e a temperatura registrada quatro semanas antes da coleta dos refis. Em relação ao pátio de torta de filtro, durante a entressafra as correlações observadas foram negativamente fracas ou moderadas, a última foi constatada três e duas semanas antes da coleta. Ao analisar a influência da temperatura sobre a média de espécimes identificados por armadilha nas fazendas pecuárias, foi constatado que houve diferença estatística entre as variáveis estudadas. As correlações moderadas negativas foram evidenciadas entre quatro e uma semana antes da coleta dos refis.

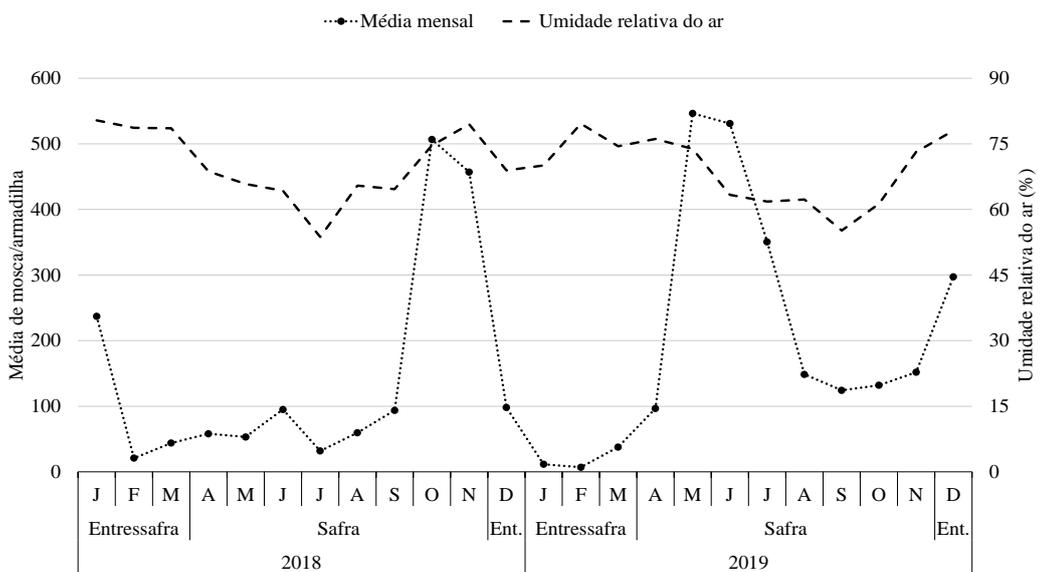
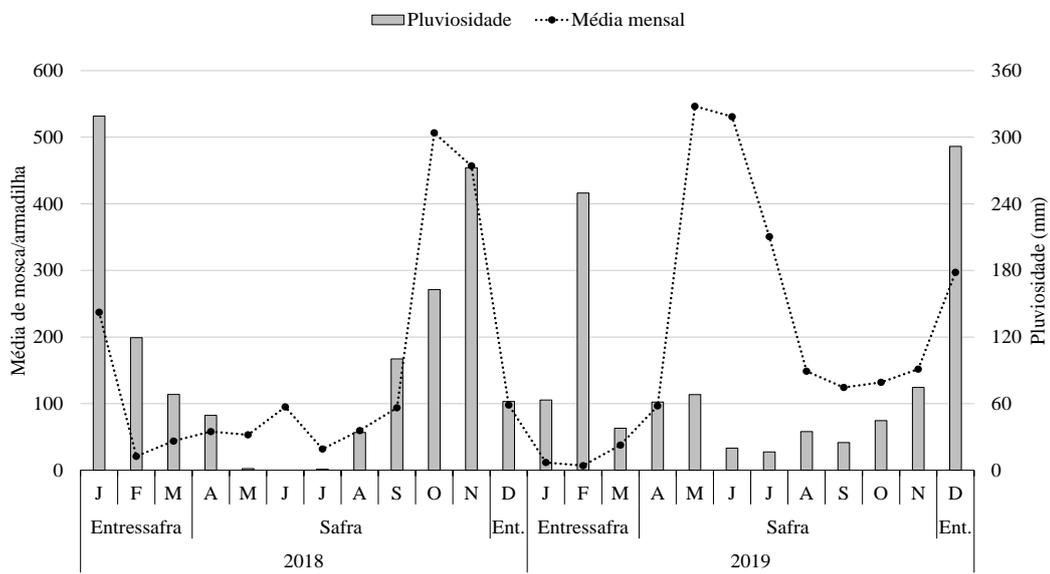
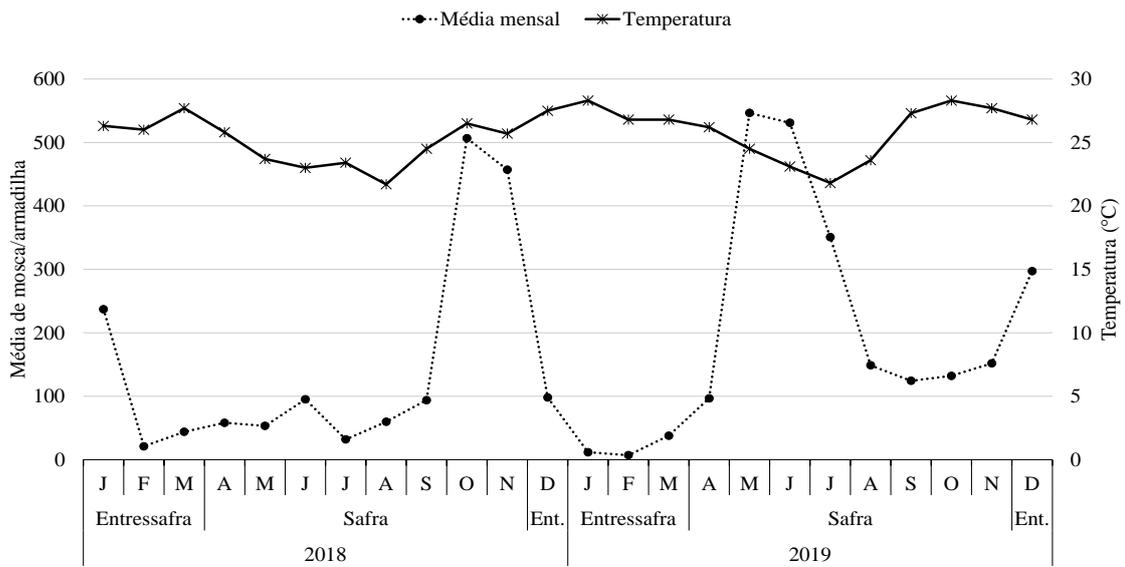


Figura 1. Dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo (---), em relação a parâmetros climáticos em usina sucroenergética no município de Pereira Barreto, SP, de janeiro 2018 a dezembro 2019.

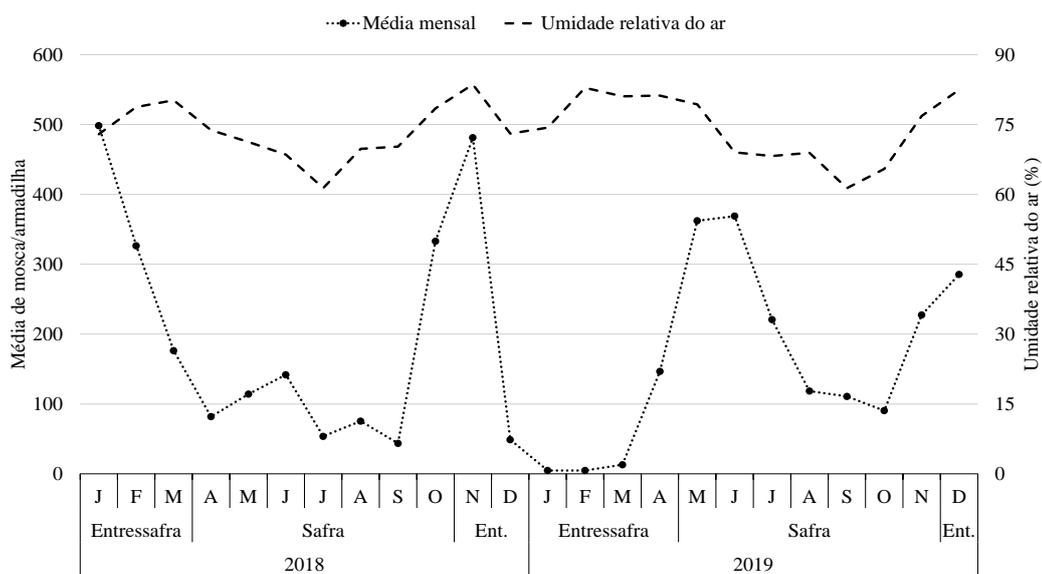
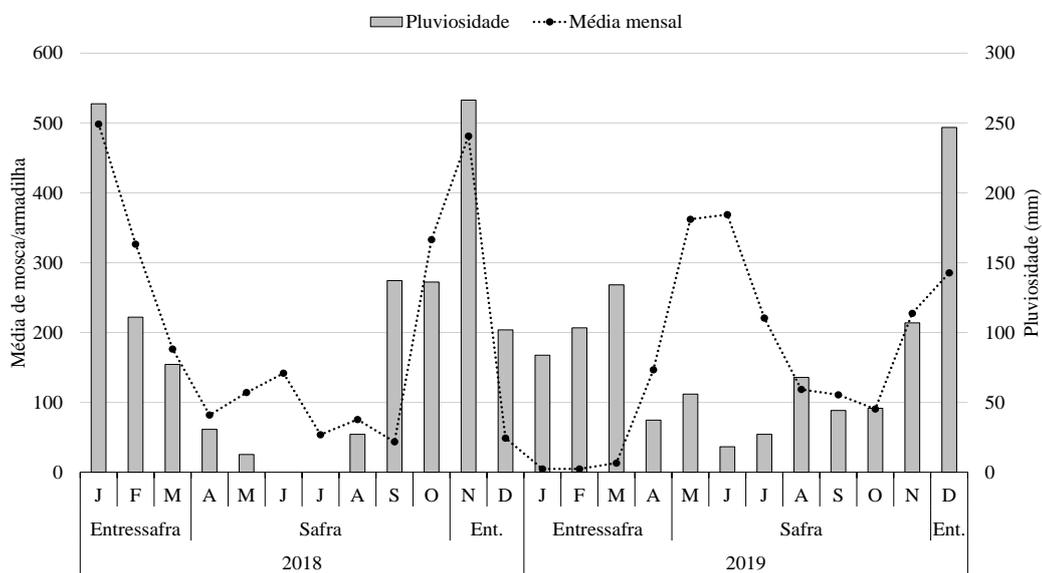
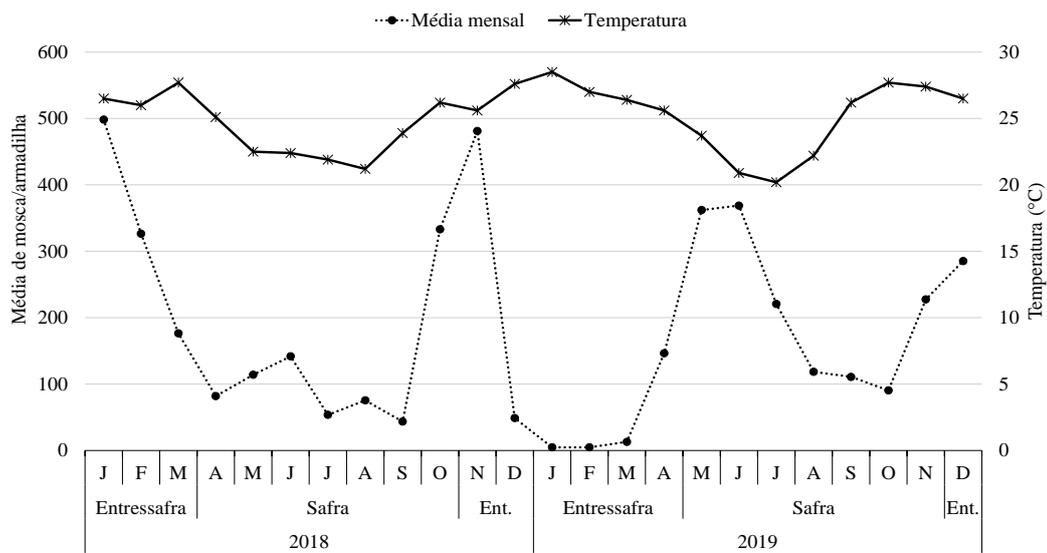


Figura 2. Dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo (---), em relação a parâmetros climáticos em usina sucroenergética no município de Sud Mennucci, SP, de janeiro 2018 a dezembro 2019.

Tabela 3. Análise de correlação entre variáveis climáticas e média semanal de moscas capturadas por armadilha nos ambientes monitorados durante o período de entressafra e safra da cana-de-açúcar (2018 e 2019), no município de Pereira Barreto, SP.

Variáveis climáticas	Lavouras canavieiras				Torta de filtro				Fazendas pecuárias			
	Entressafra		Safra		Entressafra		Safra		Entressafra		Safra	
	Coefficiente de Spearman (rs)	P										
Temperatura ⁰	-0,2462	0,1538	-0,0197	0,8725	-0,2986	0,0813	-0,1337	0,2734	-0,1075	0,5388	0,1409	0,2480
Pluviosidade ⁰	0,0942	0,5906	0,1076	0,3789	0,1166	0,5049	0,1647	0,1762	-0,0166	0,9246	0,3253	0,0063
UR ⁰	0,1821	0,2951	0,2671	0,0264	0,2794	0,1040	0,2036	0,0933	0,2783	0,1054	0,3886	0,0010
Temperatura ⁻¹	-0,3236	0,0618	0,0108	0,9301	-0,2926	0,0930	-0,1331	0,2791	-0,2280	0,1946	0,1088	0,3770
Pluviosidade ⁻¹	0,0932	0,5999	0,2650	0,0289	0,1516	0,3921	0,2708	0,0254	0,0743	0,6763	0,4182	0,0004
UR ⁻¹	0,2530	0,1488	0,3757	0,0016	0,2794	0,1094	0,2494	0,0402	0,3415	0,0480	0,4772	<0,0001
Temperatura ⁻²	-0,2151	0,2293	0,0935	0,4518	-0,2670	0,1329	-0,1022	0,4107	-0,2648	0,1363	0,1228	0,3219
Pluviosidade ⁻²	-0,0177	0,9220	0,2030	0,0993	-0,0161	0,9293	0,2099	0,0882	0,1210	0,5023	0,3835	0,0013
UR ⁻²	0,1353	0,4527	0,3041	0,0123	0,2588	0,1458	0,2445	0,0461	0,3446	0,0495	0,4302	0,0003
Temperatura ⁻³	-0,3043	0,0903	0,1279	0,3062	-0,2101	0,2484	-0,1446	0,2466	-0,3695	0,0373	0,0735	0,5573
Pluviosidade ⁻³	-0,0407	0,8249	0,3122	0,0107	0,0405	0,8260	0,2070	0,0953	0,0946	0,6066	0,5382	<0,0001
UR ⁻³	0,2529	0,1625	0,3214	0,0085	0,1860	0,3081	0,3012	0,0139	0,3589	0,0436	0,4891	<0,0001
Temperatura ⁻⁴	-0,0910	0,6264	0,2162	0,0836	-0,1625	0,3824	-0,0977	0,4385	-0,2347	0,2036	0,1128	0,3710
Pluviosidade ⁻⁴	-0,0756	0,6859	0,1811	0,1488	-0,1782	0,3373	0,1802	0,1509	-0,0121	0,9485	0,4445	0,0002
UR ⁻⁴	0,0591	0,7522	0,0085	0,0747	0,1619	0,3843	0,2658	0,0322	0,1381	0,4587	0,3938	0,0012

⁰: Dados referentes à semana da coleta dos refis entomológicos.

⁻¹: Dados referentes à uma semana antes da coleta dos refis entomológicos.

⁻²: Dados referentes a duas semanas anteriores à coleta dos refis entomológicos.

⁻³: Dados referentes a três semanas anteriores à coleta dos refis entomológicos.

⁻⁴: Dados referentes a quatro semanas anteriores à coleta dos refis entomológicos.

Ao nível de significância de 5%, a correlação entre precipitação pluviométrica e a média de captura no decorrer da safra, obtida nas lavouras canavieiras e fazendas pecuárias foram observadas na quarta e terceira semana anteriores a coleta. De maneira geral, apenas nas fazendas pecuárias o coeficiente de correlação registrado foi moderado positivo, fato ocorrido três semanas antes da coleta.

Correlações entre a UR e a média de indivíduos obtidos semanalmente nas lavouras canavieiras foram constatadas no período de entressafra e safra, no entanto se mostraram mais evidentes no período de safra, na qual apresentou influência moderadamente positiva na semana da coleta e nas três semanas anteriores a esta. De modo geral em SM foram observadas correlações significativamente moderadas positivas entre a UR alcançada em todas as semanas analisadas e a média de captura das fazendas pecuárias no período de safra da cana-de-açúcar.

No decorrer dos dois anos de monitoramento em PB, a mediana de espécimes identificados por armadilha ao longo do período de safra (135,1 moscas/armadilha) apresentou diferença estatística significativa em relação à entressafra (38,8 moscas/armadilha), onde o período de safra apresentou maior captura da mosca-dos-estábulo.

Ao comparar a mediana registrada em SM durante a entressafra (197,5 moscas/armadilha) e safra da cana-de-açúcar (152,7 moscas/armadilha), foi constatado que ao nível de significância de 5% não houve diferença estatística entre os períodos analisados (Tabela 5).

Tabela 4. Análise de correlação entre variáveis climáticas e média semanal de moscas capturadas por armadilha nos ambientes monitorados durante o período de entressafra e safra da cana-de-açúcar (2018 e 2019), no município de Sud Mennucci, SP.

Variáveis climáticas	Lavouras canavieiras				Torta de filtro				Fazendas pecuárias			
	Entressafra		Safra		Entressafra		Safra		Entressafra		Safra	
	Coefficiente de Spearman (rS)	P	Coefficiente de Spearman (rS)	P								
Temperatura ⁰	-0,4371	0,0024	0,0282	0,8338	-0,2885	0,0518	-0,2156	0,1040	-0,3880	0,0077	-0,0918	0,4929
Pluviosidade ⁰	0,1766	0,2403	0,0557	0,6781	0,2557	0,0862	-0,0407	0,7619	0,3110	0,0353	0,0201	0,8808
UR ⁰	0,2218	0,1384	0,4085	0,0014	0,1810	0,2287	0,0641	0,6326	0,0067	0,9646	0,4018	0,0018
Temperatura ⁻¹	-0,4007	0,0063	0,0934	0,4896	-0,3362	0,0239	-0,2331	0,0810	-0,5013	0,0004	0,0588	0,6641
Pluviosidade ⁻¹	0,1354	0,3750	0,1196	0,3756	0,0958	0,5315	-0,0454	0,7372	0,2513	0,0958	0,0729	0,5897
UR ⁻¹	0,2257	0,1360	0,4309	0,0008	0,1834	0,2278	0,0815	0,5469	-0,0144	0,9254	0,3624	0,0056
Temperatura ⁻²	-0,4987	0,0006	0,1659	0,2216	-0,4611	0,0016	-0,1461	0,2826	-0,5568	<0,0001	0,1185	0,3843
Pluviosidade ⁻²	0,1786	0,2459	0,1996	0,1402	0,1835	0,2331	0,0121	0,9296	0,2816	0,0639	0,1475	0,2781
UR ⁻²	0,3820	0,0105	0,4447	0,0006	0,3206	0,0338	0,1467	0,2807	-0,0063	0,9674	0,4265	0,0010
Temperatura ⁻³	-0,4311	0,0039	0,1844	0,1776	-0,4262	0,0043	-0,2559	0,0593	-0,5968	<0,0001	0,1248	0,3638
Pluviosidade ⁻³	0,1866	0,2309	0,3287	0,0142	0,2532	0,1013	0,1534	0,2633	0,2910	0,0583	0,4165	0,0015
UR ⁻³	0,4567	0,0021	0,4766	0,0002	0,4055	0,0069	0,3160	0,0187	0,0527	0,7371	0,5469	<0,0001
Temperatura ⁻⁴	-0,2446	0,1184	0,3158	0,0200	-0,3038	0,0504	-0,2352	0,0868	-0,4994	0,0008	0,1743	0,2075
Pluviosidade ⁻⁴	0,0409	0,7973	0,3439	0,0108	0,0597	0,7072	0,0897	0,5191	0,1518	0,3371	0,3638	0,0068
UR ⁻⁴	0,3292	0,0332	0,3720	0,0056	0,2614	0,0944	0,3447	0,0106	-0,0195	0,9023	0,4164	0,0017

⁰: Dados referentes à semana da coleta dos refis entomológicos.

⁻¹: Dados referentes à uma semana antes da coleta dos refis entomológicos.

⁻²: Dados referentes a duas semanas anteriores à coleta dos refis entomológicos.

⁻³: Dados referentes a três semanas anteriores à coleta dos refis entomológicos.

⁻⁴: Dados referentes a quatro semanas anteriores à coleta dos refis entomológicos.

Tabela 5. Diferença entre a captura de *Stomoxys calcitrans* por armadilha durante a entressafra e safra da cana-de-açúcar em usinas sucroalcooleiras nos municípios de Pereira Barreto e Sud Mennucci, SP, durante 2018 e 2019.

Usina	Período	Meses	Mediana	Mínimo	Máximo	P
PB	Entressafra	35	38,8	1,4	424,6	<0,0001
	Safra	69	135,1	9,3	837,8	
SM	Entressafra	46	197,5	2,6	824,6	0,7884
	Safra	58	152,7	34,5	493,5	

Diferença estatística pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Os dados descritivos e a análise da influência das atividades industriais (entressafra e safra) sobre a mediana de espécimes identificados nos ambientes monitorados evidenciaram disparidade nos resultados obtidos nas usinas acompanhadas.

Em PB durante o período de entressafra, a mediana de captura nas fazendas pecuárias (107,4 moscas/armadilha) foi maior em relação aos outros ambientes, considerando o nível de significância de 5%. Por outro lado, durante a safra a mediana registrada nas lavouras canavieiras, pátio de compostagem e fazendas pecuárias, não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Ao considerar os dados obtidos em SM, foi constatado que estatisticamente houve diferença entre as medianas de captura da mosca-dos-estábulo nos ambientes monitorados. A mediana obtida no pátio de torta de filtro se mostrou menor quando comparada com as lavouras canavieiras e fazendas pecuárias durante a entressafra (1,9 moscas/armadilha) e safra (69,8 moscas/armadilha). Salienta-se que análise dos dados foi realizada individualmente para cada usina (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de variância entre a captura de *Stomoxys calcitrans* nos ambientes monitorados em relação ao período de entressafra e safra da cana-de-açúcar, em usinas presentes no município de Pereira Barreto e Sud Mennucci, SP.

Usinas	Ambientes	Entressafra			Safra		
		Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo
PB	Lavouras canavieiras	16,3 ^a	1,3	385,5	142,5 ^a	1,0	953,1
	Pátio de torta	5,0 ^a	0,0	894,7	98,0 ^a	4,7	1.549,5
	Fazendas pecuárias	107,4 ^b	1,1	529,9	133,9 ^a	9,9	966,6
SM	Lavouras canavieiras	46,7 ^a	1,1	765,4	167,0 ^a	32,5	464,2
	Pátio de torta	1,9 ^b	0,0	737,0	69,8 ^b	3,7	961,7
	Fazendas pecuárias	344,2 ^a	3,6	1.253,3	147,0 ^a	20,6	762,0

Letras diferentes, em uma mesma usina, indicam diferença significativa no teste de Dunn ($p < 0,05$) após o teste de Kruskal – Wallis significativo.

Discussão

O funcionamento das usinas sucroalcooleiras envolve dois períodos, entressafra e safra. Durante a entressafra não há o funcionamento da indústria e, conseqüentemente, não ocorre a geração de substratos orgânicos nas áreas da usina (bagaço, vinhaça e torta de filtro). No entanto, no período de safra ocorre a colheita e moagem da cana-de-açúcar, por conse-

guinte a geração dos subprodutos orgânicos decorrentes da produção de açúcar e etanol (Bittencourt, 2012; Cançado et al., 2013; Barros, 2010). No Brasil, a ocorrência de explosões populacionais associadas a usinas foi descrita pela primeira vez em 1973, no município de Piracicaba, em São Paulo (Nakano et al., 1973).

Dentre os locais favoráveis para o desenvolvimento da mosca-dos-estábulo nas áreas da usina destacam-se o pátio de compostagem da torta de filtro e fuligem, e as lavouras fertirrigadas com vinhaça via aspersão (Corrêa et al., 2013). Além disso, a predominância da bovinocultura somada à expansão do setor sucroenergético, proporcionou a formação de um sistema agroecológico favorável ao desenvolvimento biológico de *S. calcitrans*, contribuindo para a ocorrência de explosões populacionais da praga em propriedades pecuárias circunvizinhas à bacia de fertirrigação das usinas (Dominghetti, 2017).

A distribuição sazonal de *S. calcitrans* em condições naturais foi estudada por Bittencourt & Moya-Borja (2000), em Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, com pico populacional observado durante o mês de dezembro. Resultado semelhante foi encontrado por Rodríguez-Batista et al. (2005) em levantamento feito no estado de Minas Gerais.

Dominghetti (2017) realizou um estudo semelhante em usina sucroalcooleira e propriedades pecuárias adjacentes, no estado de Mato Grosso do Sul, verificou a ocorrência de aumento populacional da mosca-dos-estábulo uma vez ao ano, especificamente durante o outono/inverno, diferindo dos resultados observados no presente estudo, onde a flutuação da praga apresentou características bimodais.

De forma semelhante à encontrada no presente estudo, em estudos realizados em estabelecimentos pecuários nos Estados Unidos, Canadá, França e Inglaterra, foram verificados picos bimodais nas populações de *S. calcitrans* estudadas (Taylor et al., 2007; Beresford & Sutcliffe, 2009; Jacquiet et al., 2014; Parravani et al., 2019).

No Brasil, o clima tropical é predominante na região noroeste do estado de São Paulo, caracterizado pela ocorrência de chuvas excessivas no verão e invernos secos (Rolim et al., 2007). O período de maior pluviosidade corresponde aos meses novembro a abril, no qual a precipitação anual apresenta variação entre 750 e 1.800 mm, sendo os meses de maio a outubro o período mais seco (<40 mm); durante os meses mais frios a temperatura registrada é em torno a 18°C, enquanto no período mais quente do ano é superior a 22°C (Nery et al., 2004; Rolim et al., 2007).

A temperatura ideal para o desenvolvimento larvar da mosca-dos-estábulo é de 25°C, apresentando variação entre 18°C e 30 °C (Aguiar-Valgode & Milward-de-Azevedo,

1992). Por outro lado, Berry et al. (1998), verificaram que as temperaturas de máximo desenvolvimento larvar se encontram entre 25°C e 30°C, em situações abaixo ou acima desta faixa de temperatura as taxas de desenvolvimento das formas imaturas são reduzidas. Quando adulta, a *S. calcitrans* possui maior atividade sob condições térmicas entre 20°C e 27°C (Gerry et al., 2007). Jacquiet et al. (2014) descrevem que a temperatura mínima para a atividade da mosca é de 15°C, sendo inibidas em temperaturas abaixo de 7°C (Semakula et al., 1989). Ao considerar os dados obtidos no presente estudo, foi observado que durante os dois anos de monitoramento da flutuação populacional da mosca-dos-estábulo a temperatura média permaneceu acima de 20°C. Vale lembrar que os dados aqui apresentados se referem às médias mensais, deste modo não é possível inferir que em ambos os municípios as populações de *S. calcitrans* encontraram condições térmicas favoráveis para o bom desempenho dos adultos.

A precipitação pluviométrica também é uma variável climática que pode influenciar a dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo, uma vez que propicia condições de maior umidade nas lavouras fertirrigadas e no pátio de compostagem, bem como em substratos diversos (silagem, feno, resíduos de suplementação alimentar, dejetos etc.) produzidos ou estocados nas fazendas pecuárias (Barros et al., 2010; Bittencourt, 2012). No entanto, o excesso de chuva pode prejudicar o processo de pupação das larvas de *S. calcitrans*, pois impossibilita o deslocamento destas para áreas mais secas, para que possam completar seu ciclo evolutivo (Foil e Hogsette, 1994). De acordo com Bittencourt e Moya-Borja (2000) índices de pluviosidade maiores que 150 mm resultam na redução da infestação da praga aos animais. Ainda segundo estes autores a pluviosidade pode atuar de forma positiva ou negativa no desenvolvimento das formas imaturas. Tais condições diferem dos resultados observados neste estudo, uma vez que foram registrados elevados níveis da captura da mosca-dos-estábulo tanto na primavera/verão como também no outono/inverno.

Em uma análise de caso, Barros et al. (2010) verificaram que nos meses de outubro/novembro houve aumento populacional de *S. calcitrans* em duas usinas e cinco propriedades do Mato Grosso do Sul. Segundo os autores a aplicação da vinhaça nas lavouras e a ocorrência de chuvas ampliaram a área e a umidade dos substratos orgânicos e, por conseguinte favoreceram a proliferação da praga. Relação semelhante também foi descrita por Bittencourt (2012), nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Kassab et al. (2012) verificaram em usinas do Mato Grosso do Sul elevada abundância da praga nos meses de julho, agosto, setembro e novembro, sendo o último de maior intensidade, provavelmente devido ao período de maior pluviosidade.

De modo geral, estudos relacionados à dinâmica populacional da mosca-dos-estábulo em regiões de usinas sucroalcooleiras são escassos. Neste estudo, foram observados picos bimodais de captura da mosca-dos-estábulo em dezembro/janeiro e maio/junho ou outubro/novembro, variando em função do ano. Os picos ocorridos no início da estação chuvosa (primavera), coincidem com os observados em estudos sobre a sazonalidade da mosca em São Paulo (Bittencourt & Moya-Borja, 2000) e Minas Gerais (Rodríguez-Batista et al., 2005), e sugerem que o início das chuvas represente um fator de risco, aumentando a probabilidade de ocorrência de surtos caso existam condições predisponentes. Entretanto, os picos populacionais observados em maio/junho (outono/inverno) não apresentam relação com a sazonalidade natural da mosca, e sim a convergência das populações estabelecidas nas propriedades pecuárias para as áreas da usina em virtude da ampla variedade de locais favoráveis ao seu desenvolvimento com o início da aplicação de vinhaça via aspersão. De forma semelhante, Dominghetti (2017) observou, em uma usina de cana-de-açúcar em Mato Grosso do Sul, maior abundância de *S. calcitrans* no período de outono/inverno, com posterior declínio populacional na primavera (suposta época de pico populacional em condições naturais), evidenciando que a abundância da mosca apresentou relação com manejo dos subprodutos orgânicos gerados no período de safra.

O manejo falho dos resíduos orgânicos, tais como a palhada da cana, vinhaça e torta de filtro, oriundos da produção do açúcar e do etanol, criam condições favoráveis ao desenvolvimento da mosca-dos-estábulo (Barros et al., 2010; Bittencourt, 2012; Corrêa et al., 2013).

As usinas do presente estudo realizavam o manejo preventivo e corretivo tanto em áreas próprias quanto nas fazendas pecuárias adjacentes à bacia de fertirrigação. Dentre elas, destacam-se o tratamento prévio com larvicida (IGR – Inseticida Regulador de Crescimento) das lavouras canavieiras antes do processo de fertirrigação, assim como ações corretivas envolvendo a eliminação dos pontos de maior acúmulo de umidade por meio da incorporação ao solo. No pátio de compostagem o manejo predominante foi o revolvimento das leiras de torta de filtro por meio de implementos agrícolas (compostador e pá carregadeira), visando a redução da umidade deste subproduto. Ademais, as usinas também priorizaram o trabalho preventivo junto aos pecuaristas da região, as práticas adotadas incluíam a doação de bandeiras bicolores com inseticida para controle dos espécimes adultos, assim como o auxílio para a limpeza das instalações pecuárias com maior acúmulo de resíduo orgânico procedente do sistema de produção animal.

Ao considerar o período de maior captura da mosca-dos-estábulo, foi constatado que PB, houve maior abundância da praga durante o período de safra, fato esperado uma vez que as áreas da usina possuem maior disponibilidade de matéria orgânica em processo de fermentação. Resultados semelhantes foram descritos por Corrêa et al. (2013) e Dominghetti (2017). No entanto, a usina SM não apresentou diferença estatística significativa entre a captura nos períodos de entressafra e safra, diferindo dos estudos mencionados.

Conforme observado no presente estudo, a elevada densidade populacional verificada na usina SM, nos meses de janeiro e fevereiro/2018 possivelmente está relacionada às dificuldades de manejo envolvendo os procedimentos adotados na limpeza de reservatórios e canais de vinhaça no período de entressafra. Essas ocorreram em virtude do elevado índice pluviométrico que dificultou a realização do manejo mecânico para o controle da praga, contribuindo para o aumento populacional e, conseqüentemente, a convergência para fazendas pecuárias em busca de hospedeiros. De acordo com Dominghetti (2017) no período de entressafra, em virtude da expressiva redução dos substratos para proliferação de *S. calcitrans* nas áreas da usina, há maior predominância da praga nas fazendas pecuária em virtude da disponibilidade de locais para a reprodução e alimento. No presente estudo, foi verificado que o aumento da abundância da praga em janeiro, também apresentou relação com as condições de armazenamento da silagem em uma propriedade situada a menos de 5 km de distância em linha reta das áreas de reforma do canavial onde houve dificuldade de manejo com o resíduo decorrente da limpeza do reservatório de vinhaça. Desta forma, os resultados constatados neste estudo evidenciam a importância do adequado manejo preventivo e corretivo tanto nas áreas da usina quanto nas propriedades pecuárias.

Bittencourt & Moya-Borja (2000), verificaram a presença de correlação entre os fatores climáticos e a população da mosca-dos-estábulo em um estudo realizado para avaliação sazonal de *S. calcitrans*, em bovinos e equinos. De modo geral, as correlações entre as variáveis climáticas e a média de semanal de captura nas lavouras canavieiras, pátio de torta de filtro e fazendas pecuárias apresentaram-se fracas ou moderadas e, em algumas situações, negativas. Correlações negativas foram descritas por Dominghetti (2017) em estudo semelhante, que evidenciou maior influência do manejo realizado nas lavouras canavieiras que das condições climáticas.

Diferente do que é verificado em regiões sem a influência de usinas (Bittencourt & Moya-Borja, 2000; Rodríguez-Batista et al., 2005), ainda que as variáveis em estudo tenham apresentado significância, foi observado maior relação entre o manejo dos subprodutos orgânicos gerados pela usina e a abundância populacional da praga. Deste modo, a flutuação

populacional na praga está estreitamente relacionada ao manejo dos subprodutos orgânicos nas áreas da usina e propriedades pecuárias adjacentes.

Estudos demonstram que durante o período de entressafra a abundância da mosca nas lavouras canavieiras e pátio de torta são menores quando comparados à captura nas propriedades pecuárias, fato que condiz com o comportamento biológico da praga, uma vez que não há produção de substratos orgânicos atrativos para mosca na usina neste período (Corrêa et al., 2013; Dominghetti, 2017); tais condições foram verificadas em PB. Contudo, devido a dificuldades operacionais na limpeza dos reservatórios e canais de vinhaça em SM, assim como em fazendas pecuárias, a captura da mosca nos respectivos ambientes foi semelhante.

Broce et al. (2005) verificaram nos Estados Unidos o aparecimento de até 19.600 moscas por metro quadrado de feno misturado com fezes e urina de bovinos, evidenciando a alta capacidade de proliferação do parasito em locais de criação de animais, sem influência da indústria da cana-de-açúcar, mantendo a reprodução da mosca mesmo no período da entressafra.

Com o início das atividades industriais, a fermentação de substratos orgânicos, como a palhada com vinhaça e a torta de filtro, atrai adultos de *S. calcitrans*, e proporciona condições favoráveis ao desenvolvimento das formas imaturas (Serra et al., 2017). Barros et al. (2010) verificaram um alto índice de desenvolvimento larvar nas lavouras canavieiras fertirrigadas com vinhaça e no pátio de compostagem da torta de filtro. Tal fato foi comprovado por Corrêa et al. (2013) ao estudarem o potencial de produção de *S. calcitrans* destes substratos.

De acordo com Serra et al. (2017) a aplicação de vinhaça nas lavouras canavieiras pode contribuir para a manutenção das populações dispersão de *S. calcitrans* para culturas da cana. Dominghetti (2017) constatou que durante o período de safra nas lavouras canavieiras, sem aplicação de vinhaça, que a captura de *S. calcitrans* foi menor quando comparada às lavouras fertirrigadas com vinhaça; além disso, também foi verificado que as fazendas pecuárias monitoradas apresentaram maiores níveis de captura em relação aos demais ambientes em estudo. Corrêa et al. (2013) estimaram que a produção de mosca-dos-estábulo nas grandes extensões de lavouras canavieiras e no pátio de torta poderia alcançar uma média mensal de 24 milhões e 37 mil moscas, respectivamente.

Ao considerar os resultados da comparação da mediana de espécimes capturadas obtidas no presente estudo foi observada que a flutuação populacional da praga se comportou diferente do estudo realizado por Dominghetti (2017). Desta forma, estatisticamente a mediana de espécimes capturados nas lavouras canavieiras, pátio de torta e fazendas pecuárias

em PB foram iguais. Já em SM foi observado diferença entre a mediana de captura no pátio de torta de filtro, uma vez que esta mostrou-se menor em comparação Dominghetti (2017) aos demais ambientes. Possivelmente este fato está relacionado à adequação do manejo leiras de torta de filtro envolvendo maior frequência de revolvimento e a aplicação de larvicida no período chuvoso mediante a presença de imaturos.

As diferenças observadas apontam que a flutuação populacional em usinas sucroenergéticas e propriedades pecuárias não apresentam o mesmo padrão. Esta é totalmente influenciada pelo manejo dos subprodutos orgânicos de origem industrial e ao manejo dos resíduos da produção animal. Além disso, é importante considerar que estas podem apresentar diferenças entre sistemas de produção, capacidade de moagem da cana-de-açúcar, tamanho da área de aplicação de vinhaça, presença ou ausência de pátio de compostagem da torta de filtro, adubação orgânica (cama de frango ou esterco de poedeira), bem como as boas práticas de manejo dos subprodutos adotadas pela usina. Outro fator importante é a presença de propriedades pecuárias adjacentes à bacia de fertirrigação, com sistema de produção leiteira e confinamento.

Neste contexto, é importante que os setores sucroenergético e pecuário estejam comprometidos em adotar as boas práticas de manejo dos substratos orgânicos com o propósito de prevenir a ocorrência de explosões populacionais e, posteriores prejuízos econômicos a ambos.

Considerando que as usinas pertencem à mesma região e as ações de manejo e prevenção de surtos terem sido semelhantes, a dinâmica populacional foi relativamente semelhante durante estudo. Nas duas situações foi constatado um aumento populacional de *S. calcitrans* nos meses de maio e junho, período de safra e época de menor índice de precipitação pluviométrica e menores temperaturas, na qual a vinhaça aplicada sobre a palha confere um microambiente favorável ao desenvolvimento dos estágios imaturos do díptero. Desta maneira, torna-se absolutamente necessária a adoção de práticas preventivas e corretivas durante o período que antecede o início da safra, tanto nas áreas da usina quanto em propriedades pecuárias, visando reduzir a ocorrência, intensidade e duração das explosões populacionais e suas graves consequências.

Conclusão

Os picos populacionais da mosca-dos-estábulo apresentaram características bimodais, sendo registrados no verão (dezembro/janeiro) e o outro no outono/inverno (maio/junho) ou primavera (outubro).

A ausência de correlações fortes e positivas entre a média de moscas identificadas por armadilha e as variáveis climáticas, demonstrou que a flutuação populacional da praga apresenta maior relação com o manejo dos subprodutos orgânicos gerados pelas usinas.

Além disso, foi observado que os picos populacionais em ambas as usinas, estavam diretamente relacionados às dificuldades de manejo dos subprodutos orgânicos ao final do período de safra e início da entressafra, associada a manutenção das populações de *S. calcitrans* nas fazendas que apresentam condições precárias de higiene das instalações pecuárias.

Agradecimentos

Agradecemos a FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul), à equipe técnica da Volare Consultoria Ambiental, EMBRAPA Gado de Corte (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e às usinas que participaram do presente estudo pelo apoio durante a pesquisa.

Referências bibliográficas

Aguiar-Valgode M, Wilward-de-Azevedo EM. Determination of thermal requirements of *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera, Muscidae), under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87:11-20. ISSN 1678-8060

Beresford DV, Sutcliffe JF. Local infestation or long-distance migration? The seasonal recolonization of dairy farms by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) in south central Ontario, Canada. *J of Med Entomol*. 2009;102(2):788-798.

Berry IL, Kunz SE, Foerster KW. A dynamic model of the physiological development of immature stable flies. *Ann Entomol Soc Am*. 1998 Mar 15;70(2):173-176. <https://doi.org/10.1093/aesa/70.2.173>.

Brues CT. The geographical distribution of the stable fly. *J of Med Entomol* 1913:459. <https://doi.org/10.1093/jee/6.6.459>.

Baldacchino F, Muenworn V, Desquesnes M, Desoli F, Charoenviriyaphap T, Duvallet G. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite* 2013;20. <https://doi.org/10.1051/parasite/2013026>.

Barros ATM, Koller WW, Cattoll JB, Soares CO. *Stomoxys calcitrans* outbreaks in pastured beef cattle in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesq Vet Bras* 2010; 30(11): 945-952. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010001100008>.

Bittencourt AJ, Moya-Borja GE. Flutuação sazonal de *Stomoxys calcitrans* em bovinos e equinos no Município de Espírito Santo do Pinhal. *Rev Univ Rur: Cienc Vida* 2000; 22: 101-106.

Bittencourt AJ. Avaliação de surtos e medidas de controle ambiental de *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) na Região Sudeste do Brasil. *Rev Bras Med Vet* 2012; 34(S1): 73-82.

Brito LG, Oliveira MD, Giglioti R, Barbieri FD, Silva Neto FG, Chagas AD, Celestino OD. Manual de identificação, importância e manutenção de colônias estoque de dípteras de interesse veterinário em laboratório. *Embrapa Rondônia-Documentos* (INFOTECA-E), 2008. 31p.

Broce AB, Hogsette J, Paisley S. Winter feeding sites of hay in round bales as major developmental sites of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) in pastures in spring and summer. *J Econ Entomol* 2005; 98(6): 2307-2312. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.6.2307>.

Cançado PHD, Ferreira T, Piranda EM, Soares CO. Sugarcane stems as larval habitat for the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) in sugarcane plantations. *Pesq Vet Bras* 2013; 33(6): 741-744. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600009>.

Corrêa EC, Ribas ACA, Campos J, Barros ATM. Abundância de *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) em diferentes subprodutos canavieiros. *Pesq Vet Bras* 2013; 33(11): 1303-1308. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013001100003>.

Dominghetti TF, Barros AT, Soares CO, Cançado PH. *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) outbreaks: current situation and future outlook with emphasis on Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2015; 24(4): 387-395. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015079>.

Dominghetti, TF. *Dinâmica populacional e surtos de Stomoxys calcitrans em usina sucroalcooleira e propriedades pecuárias adjacentes* [Tese]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2017. 89 p.

Foil LD, Hogsette JA. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Rev Sci Tech* 1994; 13(4): 1125-1158. PMID:7711307.

Gerry AC. *Predicting and controlling stable flies on California dairies*. 2007. Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 8258: 1-11, University of California, Oakland, CA.

Jacquet P, Rouet D, Bouhsira E, Salem A, Lienard E, Franc M. Population dynamics of *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) in southwestern France. *Revue de Medecine Veterinaire* [online]. 2014 Jan 1; 165:267-71. [citado em 05 mar 2020]. Disponível em: <https://www.revmedvet.com/2014/RMV165_267_271.pdf>.

- Koller WW, Catto JB, Bianchin I, Soares CO, Paiva F, Tavares L et al. Surtos da mosca-dos-estábulo, *Stomoxys calcitrans*, em Mato Grosso do Sul: novo problema para as cadeias produtivas da carne e sucoalcooleira? Campo Grande, MS: *Embrapa gado de corte*, 2009.31 p.
- Moraes JLC. *Toxicidade comparativa de alguns inseticidas organofosforados e piretroides sobre larvas e adultos de Stomoxys calcitrans Linnaeus, 1958* [Tese]. Itaguaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1990. 62 f.
- Mullens BA, Meyer JA. Seasonal abundance of stable flies (Diptera: Muscidae) on California dairies. *J Econ Entomol*. 1987; 80(5):1039-1043.
- Nakano O, Junior LAP, Camargo AH. Controle químico de adultos e larvas da mosca doméstica. *O Biológico* 1973; 39:5-8.
- Parravani A, Chivers CA, Bell N, Long S, Burden F, Wall R. Seasonal abundance of the stable fly *Stomoxys calcitrans* in southwest England. *Med Vet Entomol* 2019; 33(4):485-490. <http://dx.doi.org/10.1111/mve.12386>.
- Rodríguez-Batista Z, Leite RC, Oliveira PR, Lopes CML, Borges LMF. Populational dynamics of *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae) in three biocenosis, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 130: 343-346.
- Rolim GS, Camargo MD, Lania DG, Moraes JD. Climatic classification of Köppen and Thornthwaite systems and their applicability in the determination of agroclimatic zoning for the state of São Paulo, Brazil. *Bragantia* 2007; 66(4): 711-720. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052007000400022>.
- Semakula LM, Taylor RA J, Pitts CW. Flight behavior of *Musca domestica* and *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) in a Kansas dairy barn. *J Med Entomol* 1989; 26(6): 501-509. <https://doi.org/10.1093/jmedent/26.6.501>.
- Taylor DB, Berkebile DR, Scholl PJ. Stable fly population dynamics in eastern Nebraska in relation to climatic variables. *J of Med Entomol* 2007; 44(5): 765-771. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.5.765>.
- UNICADATA. *Região Centro-Sul: avaliação da safra 2019/2020 e expectativas* [online]. São Paulo: UNICADATA; 2019 [citado em 06 fev 2020]. Disponível em: <http://unicadata.com.br/listagem.php?idMn=116>.
- ZAR, J. H. *Biostatistical Analysis*. 4 ed, New Jersey: Prentice-Hall, p.663, 1999.

CAPÍTULO III

Artigo 2

Resistance of stable flies (*Stomoxys calcitrans*) to pyrethroids insecticides in sugarcane mills from the state of São Paulo

Resistência da mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) aos inseticidas piretroides em usinas sucroalcooleiras do estado de São Paulo

Abstract: In Brazil, most of the outbreaks of Stable Fly (*Stomoxys calcitrans*) on livestock properties are associated with the activity of sugar and alcohol, since organic by-products are favorable to the massive development of the fly. Pyrethroids are neurotoxic insecticides used to control this agricultural pest. However, reports of resistance to them have already been described and are related to mutations in the sodium channel gene. The objective of the present study was to evaluate the existence of the *kdr-his* mutation by allele-specific PCR and to estimate its frequency in sugarcane mills from the state of São Paulo. The study was carried out in the municipalities of Buritizal (BZ), Nova Independência (NI), Pereira Barreto (PB) and Sud Mennucci (SM), where 50 specimens of *S. calcitrans* were collected in each one, totaling 200 individuals. The DNA was subsequently extracted individually and specific allele PCR was performed. The total frequency of the *kdr-his* allele was 0,263, while the total genotypic frequency obtained was 0,480 for susceptible homozygote, 0,515 for heterozygote and 0,005 for *kdr-his* homozygote. The observed results showed that the *kdr-his* mutation is present in sugarcane mills in the state of São Paulo.

Keywords: Diptera, insecticide resistance, sodium channels.

Resumo: No Brasil, a maioria dos surtos de mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) em propriedades pecuárias está associada à atividade de açúcar e álcool, uma vez que os subprodutos orgânicos são favoráveis ao desenvolvimento massivo da mosca. Os piretroides são inseticidas neurotóxicos usados para controlar essa praga. Entretanto, resistência da mosca-dos-estábulo a estes inseticidas, a mutações no gene dos canais de sódio, tem sido comprovada em distintos países. O objetivo do presente estudo foi avaliar a existência da mutação *kdr-his* por PCR alelo-específico e estimar sua frequência em usinas sucroalcooleiras do

estado de São Paulo. O estudo foi realizado nos municípios de Buritizal (BZ), Nova Independência (NI), Pereira Barreto (PB) e Sud Mennucci (SM), onde foram coletados 50 espécimes de *S. calcitrans* em cada, totalizando 200 indivíduos. *A posteriori* o DNA foi extraído individualmente e realizada a PCR alelo específico. A frequência total do alelo *kdr-his* foi de 0,263, já a frequência genotípica total obtida foi 0,480 para homocigoto susceptível, 0,515 para heterocigoto e 0,005 para homocigoto *kdr-his*. Os resultados observados evidenciam que a mutação *kdr-his* está presente em usinas do estado de São Paulo.

Palavras-chave: Diptera, resistência a inseticidas, canais de sódio.

Introdução

A mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) é uma praga cosmopolita de hábito hematófago, responsável por causar prejuízos de enorme impacto econômico a produção pecuária e sucroenergética (Koller et al., 2009; Barros et al., 2010). Segundo Grisi et al. (2014) os prejuízos econômicos causados por esta praga no Brasil atingem o valor de US\$ 335,46 milhões por ano.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, de acordo com o Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística (IBGE), ao longo da safra 2019/2020 foram produzidas no Brasil 667.532.475 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, sendo 341.819.940 oriundas de São Paulo, considerado o maior produtor nacional. Com a expansão do setor sucroenergético na região sudeste e, conseqüentemente, a geração dos subprodutos orgânicos procedente da produção de açúcar e etanol, como palha, vinhaça e torta de filtro favoreceram ao desenvolvimento da mosca-dos-estábulo, devido ampla disponibilidade substratos orgânicos em processo de fermentação (Nakano et al., 1973; Dominghetti et al., 2015).

A alta capacidade de reprodução e dispersão da mosca propicia sua disseminação massiva para as propriedades pecuárias próximas as usinas em busca de alimento e, conseqüentemente, a ocorrências de explosões populacionais (Dominghetti et al., 2015). Para reduzir os impactos causados por esta praga ao longo dos anos, as usinas, assim como os pecuaristas, adotaram práticas de manejo baseadas na utilização de produtos químicos (Barros et al., 2019).

Os inseticidas da classe piretroides são amplamente utilizados para o controle de pragas agrícolas e pecuárias, assim como para vetores de agentes de doenças. Os piretroides atuam por contato ou ingestão, interagem com os canais de sódio dependentes de voltagem no sistema nervoso central e periférico dos insetos (Soderlund & Bloomquist, 1989). Deste modo, evita o fechamento dos canais prolongando o estado de despolarização da membrana

neural, levando ao efeito *knockdown* caracterizado pela a hiperexcitação e subsequentemente a morte do inseto (Miller, 1988; Bloomquist, 1996; Domingues, 2005). Todavia, os efeitos do uso contínuo e inadequado, contribuiu para a seleção de ectoparasitos resistentes ao efeito dos piretroides (Bloomquist, 1996), sendo esta denominada *knockdown resistance (kdr)*, a qual já foi descrita na *Musca domestica* (Busvine, 1951; Freeman, 2019), *Haematobia irritans* (Sparks et al., 1985; Barros et al., 2012) e *S. calcitrans* (Cilek & Greene, 1994; Pitzer et al., 2010; Olafson et al., 2011; Olafson et al., 2019a; Barros et al., 2019; Oliveira, 2019).

A mutação no gene dos canais de sódio altera sua estrutura e, consequentemente impede a ligação dos piretroides ao seu sítio-alvo (Soderlund & Bloomquist, 1990; Soderlund, 2010). Mutações nos canais de sódio estão localizadas nos segmentos 4 e 5 ou entre as hélices transmembranares S5 e S6 do domínio II, sugerindo que as alterações genéticas estejam presentes na região próxima à abertura interna do canal (Soderlund, 2010).

Segundo Olafson et al. (2011), na mosca-dos-estábulo, assim como em outros dípteros, a resistência aos piretroides é mediada pelo alelo *kdr* – *knockdown resistance*, esta ocorre em virtude da mutação na posição 1014 do gene do canal de sódio, envolvendo a transversão de uma timina para adenina e, consequentemente a substituição do aminoácido leucina por uma histidina (*kdr-his*).

No Brasil, a resistência da mosca-dos-estábulo aos piretroides foi descrita nos estados de Mato Grosso do Sul e Goiás (Barros et al., 2019; Oliveira, 2019). Diante da necessidade do controle da praga no país, assim como o conhecimento da sua suscetibilidade aos inseticidas, o presente estudo teve por objetivo avaliar a resistência aos inseticidas piretroides via análise da mutação *kdr-his* em mosca-dos-estábulo oriundas de usinas sucroenergéticas nos municípios de Buritizal (BZ), Nova Independência (NI), Pereira Barreto (PB) e Sub Mennucci (SM) no estado de São Paulo.

Material e métodos

a. Locais de coleta

Os espécimes de *S. calcitrans* foram coletados em quatro usinas sucroenergéticas presentes nos municípios de Buritizal (BZ) (20°13'10.5"S - 47°39'15.9"O), Nova Independência (NI) (21°09'59.0"S - 51°28'05.8"W), Pereira Barreto (PB) (20°32'03"S - 51°14'38"W), Sud Mennucci (SM) (20°43'41"S - 50°57'39"W) no estado de São Paulo.

b. Coleta de *S. calcitrans*

A coleta da mosca-dos-estábulo ocorreu em 2019 durante o período de safra da cana-de-açúcar. Nos municípios de Buritizal e Pereira Barreto os espécimes foram obtidos no mês de maio, enquanto em Nova Independência e Sud Mennucci nos meses de maio e novembro, respectivamente. De maneira geral, nos períodos com maior abundância da população da mosca-dos-estábulo eram utilizados produtos comerciais à base de piretroides. Com exceção da usina presente no município de Buritizal que iniciou o uso de piretroides no último trimestre de 2018, as demais utilizavam o grupo químico desde 2017.

Para coleta foram utilizadas armadilhas do tipo *Vavoua* (Laveissière & Grebaut, 1990), a qual possui um formato de cone, com abertura na base e um coletor de plástico (garrafa “*pet*”) em seu topo. Os locais de instalação foram eleitos de acordo com a abundância de adultos no ambiente. Os insetos foram atraídos pelas cores preta e azul dos tecidos.

As armadilhas foram instaladas entre nove e dez horas da manhã e recolhidas ao final da tarde. Posteriormente, os coletores foram levados ao refrigerador para insensibilização dos indivíduos, que em seguida foram armazenados em tubos plásticos tipo *Falcon* contendo álcool 70% e levados ao Laboratório de Genômica e Melhoramento Animal da Embrapa Gado de Corte, onde foram identificados e mantidos em álcool 70% a -20°C.

c. Extração do DNA

O DNA foi extraído utilizando-se o protocolo de Olafson et al. (2011) modificado. A extração de 50 espécimes de cada população, totalizando 200 amostras, foi realizada de modo individual, sendo as moscas escolhidas de maneira aleatória. Cada indivíduo foi macerado em nitrogênio líquido e, em seguida, foi adicionado 200µl do *buffer* (1M Tris-HCl, pH 8,0; 5M NaCl; 0,5M EDTA e 400µg/ml de Proteínase K). Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 60 minutos; neste período o conteúdo foi novamente homogeneizado.

Para inativar a Proteínase K as amostras foram levadas ao banho-maria por 3 minutos a 95°C. Em seguida, centrifugadas a 13.000 rpm por cinco minutos a 4°C, a fim de obter o sobrenadante contendo o DNA. Após a extração, o mesmo, foi quantificado por espectrofotometria e armazenado a -20°C.

d. Amplificação gênica alelo-específica

As reações e os primers PCR alelo-específicos foram baseados em Olafson et al. (2011), com ligeiras modificações.

Para determinação dos genótipos suscetível e resistente (alelo *kdr-his*), amplificou-se um fragmento de 300 pb do gene do canal de sódio utilizando-se *primers forward* específicos para o alelo 1014L (f-5'TACTGTGGTCATCGGCAATCT'3) e para o alelo *kdr-his* 1014H (f-5'TACTGTGGTCATCGGCAATCA'3), e o *primer reverse* STMX (r-5'TGGTATCATTGTCGGCAGTC'3).

As reações foram feitas em um volume final de 20µl, contendo 3 µl de DNA; tampão 1x; 2,5 mM de MgCl₂; 200 mM de dNTP; 0,2 mM do *primer* 1014L ou 0,3 mM do *primer* 1014H; 0,2 mM do *primer reverse*; 1 µl de Solução Q® (QIAGEN); 2,5 UI de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). O processo de amplificação foi realizado por desnaturação prévia a 95°C por 15 minutos, acrescido de 35 ciclos de 95°C por um minuto, anelamento a 59°C por um minuto, 72°C por um minuto, com uma extensão final a 72°C por sete minutos.

Os produtos amplificados foram separados em gel agarose 2% e corados com Syber-Gold (Invitrogen®). O tamanho do fragmento foi estabelecido mediante a comparação com um marcador de peso molecular 1Kb *plus*. Os géis foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados para posterior análise.

e. Análises estatísticas

As frequências alélica e genotípica foram obtidas por contagem direta e checadas com programa Fstat versão 2.9.3.2 (Goudet, 1999), no qual foram avaliados os índices de diversidade genética das populações (heterozigosidade esperada e observada). Testes para verificar a diferenciação gênica das populações foram realizados de forma global e aos pares. No teste global utilizou-se o teste exato G (Goudet et al., 1996) assumindo acasalamento ao acaso enquanto o teste de diferenciação aos pares foi realizado utilizando-se o índice de F_{ST} de Wright. Este teste gera uma matriz de valores de p correspondentes a cada cálculo de F_{ST} pareado, bem como um nível de significância do valor p ajustado (ao nível de 5%) após uma correção de Bonferroni para comparações múltiplas.

Com auxílio do programa SplitsTree (Huson and Bryant 2006) foram gerados dendrogramas com o algoritmo Neighbor-Net (Bryant and Moulton 2004) e o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) com base na matriz de diferenciação gênica obtida pelo programa FSTAT.

Resultados e discussão

De modo geral, a principal estratégia para o controle de explosões populacionais da praga se dá por meio de produtos químicos (Cilek & Greene, 1994; Barros et al., 2010).

Conhecidos desde 1920, os piretroides são amplamente utilizados para o controle de pragas e vetores de doenças, devido à rápida atuação, baixa toxicidade para mamíferos, baixo impacto ambiental e pouca volatilidade (Miller, 1988; Soderlund & Bloomquist, 1996; Rinkevich et al., 2013).

A existência da mutação *kdr-his* no Brasil já havia sido detectada nos estados de Mato Grosso do Sul e Goiás por sequenciamento da região alvo contendo a mutação por Oliveira (2019). Contudo, pesquisas relacionadas à resistência da mosca-dos-estábulo aos inseticidas em populações oriundas de usinas de cana-de-açúcar são escassas. No presente estudo, após a amplificação de um fragmento com 300pb do gene dos canais de sódio de 200 espécimes de *S. calcitrans*, foi possível constatar a presença do alelo *kdr-his* em 104 (52,0%) indivíduos (Figura 1).

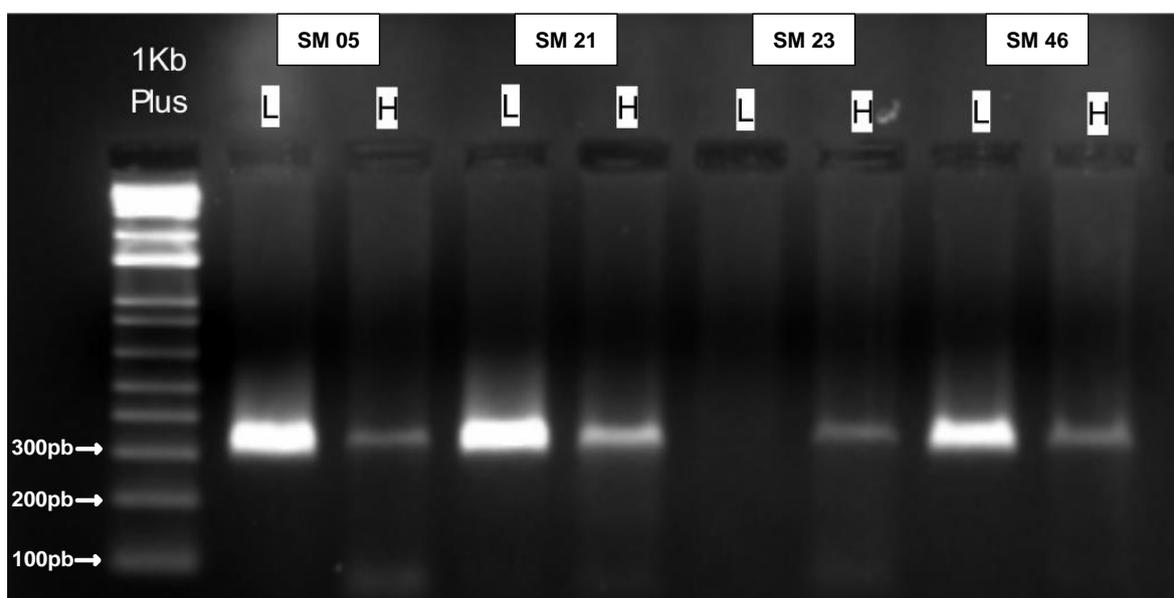


Figura 1. PCR - Alelo específica para verificar a presença do alelo *kdr-his* em população de *S. calcitrans* oriundas de uma usina sucroalcooleira no município de Sud Mennucci/SP.

Segundo Barros et al. (2019), a eficiência do controle químico tem sido comprometida pelo conhecimento limitado sobre os efeitos dos inseticidas em *S. calcitrans*, bem como pela escassez de informações sobre a suscetibilidade das populações aos inseticidas comerciais. Neste contexto, o uso contínuo dos inseticidas pode ter favorecido a seleção ectoparasitos resistentes aos grupos químicos utilizados (Rinkevich et al., 2013). Fato este comprovado pela existência do alelo *kdr-his* em distintas populações dos estados de SP (este estudo), MS e GO (Oliveira, 2019).

A frequência total do alelo *kdr-his* foi de 0,263, sendo observado apenas um homozigoto resistente e 103 indivíduos heterozigotos. Em contrapartida, a frequência genotípica

total obtida foi 0,480 para homozigoto susceptível (SS), 0,515 para heterozigoto (SR) e 0,005 para homozigoto *kdr-his* (RR). A frequência alélica foi mais alta nas populações BZ (0,30) e SM (0,36), enquanto a frequência genotípica apresentou maiores índices na BZ (0,60) e SM (0,68) para heterozigoto. Em SM também foi observado o único indivíduo homozigoto *his* (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência alélica e genotípica da mosca-dos-estábulo para alelo susceptível e *kdr-his* nos municípios de Buritizal, Nova Independência, Pereira Barreto e Sud Mennucci no estado de São Paulo durante o período da safra 2019.

	Frequência alélica			Frequência genotípica		
	N	L (sus)	H (<i>kdr-his</i>)	SS (LL)	SR (LH)	RR (HH)
BZ	50	0,70	0,30	0,40	0,60	-
NI	50	0,77	0,23	0,54	0,46	-
PB	50	0,84	0,16	0,68	0,32	-
SM	50	0,64	0,36	0,30	0,68	0,02

Em um estudo semelhante, Oliveira (2019) identificou maior frequência de indivíduos homozigotos recessivos (0,072) para a mutação *kdr-his* em mosca-dos-estábulo capturadas em usinas sucroalcooleiras no estado de Mato Grosso do Sul e Goiás. Olafson et al. (2011) também verificaram alta frequência da mutação *kdr-his*, 0,44 em média de frequência genotípica, contudo o estudo foi restrito a espécimes de colônias laboratoriais que sobreviveram à seleção por permetrina, fazenda de criação de cavalos e gado leiteiro na Florida, EUA.

A alta frequência genotípica observada por Olafson et al. (2011) quando comparada ao presente estudo pode ser justificada pela metodologia utilizada, uma vez que as populações estudadas foram unanimemente coletadas em usinas sucroalcooleiras. Os valores descritos por Oliveira (2019) apresentaram frequência genotípica superior a 10 vezes o observado neste estudo, vale destacar que para a identificação do alelo *kdr-his*, as amostras foram sequenciadas.

A heterozigosidade total observada (H_o) e esperada foi 0,515 e 0,378, respectivamente. A diversidade gênica de Nei (1972), também descrita como heterozigosidade esperada (H_e) para BZ, NI, PB e SM, foi 0,424, 0,358, 0,272 e 0,465, respectivamente, enquanto a heterozigosidade observadas foram maiores que H_e em todas as populações (Tabela 2). Com os valores de H_o superiores ao calculado para H_e é possível afirmar que as populações

estudadas sofrem de seleção/mutação não apresentando equilíbrio genético, consequentemente, apresentam excesso de heteroziguidade (Carvalho, 2017). Variações na frequência genotípica podem ocorrer nas próximas gerações da mosca. Isso porque a dispersão da mosca-dos-estábulo pode afetar a composição gênica da população (Younger, 2011).

Oliveira (2019) observou valores de H_o inferiores ao H_e . As populações estudadas no presente trabalho demonstram maior desequilíbrio genético, em relação às populações de Mato Grosso do Sul e Goiás. É importante considerar que em BTZ o inseticida passou a ser utilizado no último trimestre de 2018, logo a elevada heteroziguidade quando comparada com as demais populações pode estar associada a toxicidade dos piretroides sobre larvas e adultos (Mores, 1990). É importante salientar que uso de inseticidas é comum na cultura da cana-de-açúcar para o controle de outras pragas. A população da mosca-dos-estábulo de SM, que apresentou maior índice de heteroziguidade, diferente do município mencionado anteriormente, o uso dos piretroides para controle da praga nos períodos de maior captura iniciou em 2017, além disso, os espécimes utilizados no presente estudo foram capturados no dia 12 de novembro, visto que durante a campanha realizada no mês de maio a população de *S. calcitrans* era baixa pois a safra ainda não havia começado.

Isso pode ocorrer devido à diferença de manejo das usinas estudadas, uma vez que apesar do uso dos inseticidas piretroides, também realizavam práticas de manejo para controle da praga. Outro fator a ser considerado é a diversidade dos locais nos quais foram coletados os indivíduos do presente estudo, não apresentando padrões de endogamia.

Tabela 2. Heteroziguidade esperada (H_e), heteroziguidade observada (H_o) e DP (Desvio padrão) em populações de *Stomoxys calcitrans* de usinas sucroalcooleiras nos municípios de Buritizal, Nova Independência, Pereira Barreto e Sud Mennucci, estado de São Paulo.

	H_e	H_o (DP)
BZ	0,42	0,60 (0,07)
NI	0,36	0,46 (0,07)
PB	0,27	0,32 (0,07)
SM	0,47	0,68 (0,07)

Apesar do valor do F_{ST} ter sido relativamente baixo (0,032), estatisticamente houve diferença significativa ($P < 0,005$) quando aplicado o teste exato G (Goudet et al., 1996), assumindo acasalamento ao acaso, para avaliar a diferenciação populacional. Na tabela 3 verifica-se a matriz de diferenciação genética aos pares entre as populações estudadas baseadas no índice de F_{IT} . A maior distância ficou entre BTZ com SM (0,292), seguido das BTZ com

NI (0,217); NI com PB (0,192); NI com SM (0,025); BTZ com PB (0,008); PB com SM (0,008). Ao nível de 5% houve diferenciação genética entre BTZ e PB e entre PB e SM. Na figura 1 é possível observar uma rede filogenética baseada no algoritmo de Neighbor-Net (Bryant and Moulton, 2004) gerada pelo programa SplitsTree (Huson and Bryant, 2006), onde verifica-se a interpelação entre as distintas populações. No agrupamento realizado pela metodologia de UPGMA verifica-se que as populações NI e SM são mais próximas geneticamente entre si (Figura 2).

Tabela 3. Matriz de distância genética aos pares baseada no índice F_{ST} entre as populações de *Stomoxys calcitrans* em usinas sucroalcooleiras nos municípios de Buritzal, Nova Independência, Pereira Barreto e Sud Mennucci, estado de São Paulo.

	NI	PB	SM
BZ	0,217	0,008*	0,292
NI		0,192	0,025
PB			0,008*

*: População da mosca-dos-estábulo oriunda do município de Pereira Barreto apresentou diferença entre às demais populações estudadas.

Em estudo realizado por Guerrero et al. (2002) em mosca-dos-chifres verificou que durante o período de uso de inseticidas piretroides houve aumento do alelo *kdr*. Ainda segundo os autores, com a interrupção do uso dos piretroides houve redução da presença do alelo na população (Guerrero et al., 2002). Apesar das quatro usinas estarem localizadas no mesmo estado, as diferenças gênicas observadas possivelmente estão relacionadas a distinções do controle químico no período de maior pressão de seleção.

Além disso, é importante destacar que na BTZ o histórico de uso de inseticidas piretroides era recente, por outro lado na PB este controle também havia sido realizado em anos anteriores. A diferenciação gênica entre a PB e SM está relacionada à maior pressão de seleção enfrentada pelos indivíduos de SM, uma vez que o uso de inseticidas era mais frequente quando comparada com a PB. Apesar da diferença entre as populações, estas se encontravam a uma distância de cerca de 50 km entre si.

A proximidade genética entre a NI e SM está possivelmente relacionada à exposição da praga aos inseticidas ao longo prazo, visto o histórico do controle químico na população da usina e em propriedades de produção animal utilizados por pecuaristas da região.

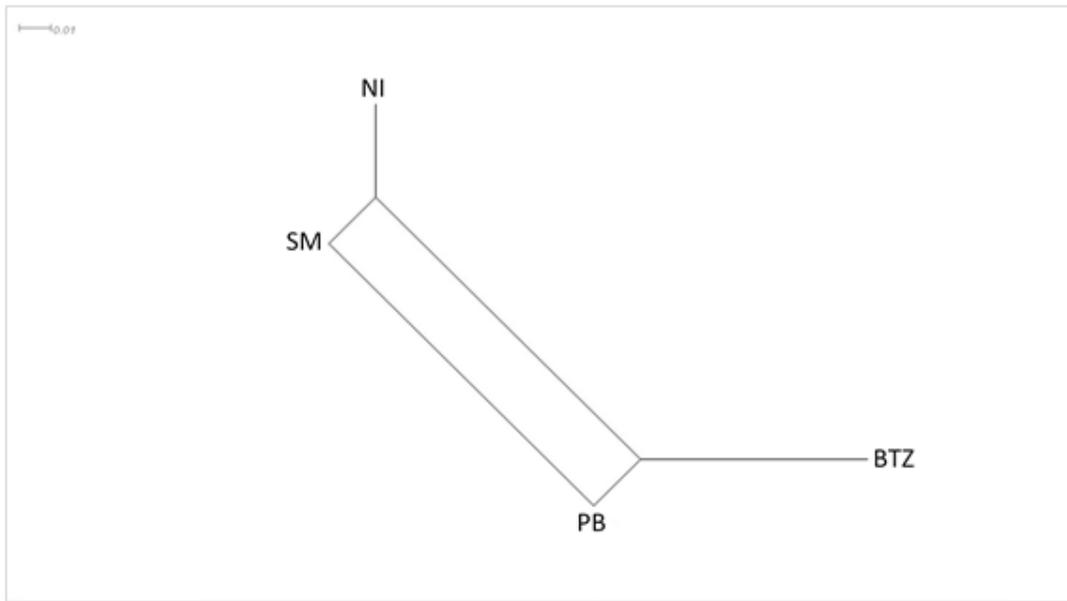


Figura 2. Neighbornet construída a partir da matriz de diferenciação genética, baseada na estatística F de Wright, entre as populações da mosca-dos-estábulo capturadas nos municípios de Buritizal, Nova Independência, Pereira Barreto e Sud Mennucci, estado de São Paulo.



Figura 3. Dendrograma construído a partir da matriz de diferenciação genética, com base no índice F_{ST} , pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), para as populações da mosca-dos-estábulo dos municípios de Buritizal, Nova Independência, Pereira Barreto e Sud Mennucci, estado de São Paulo.

Conclusão

A mutação *kdr-his* encontra-se amplamente distribuída em populações da mosca-dos-estábulo no estado de São Paulo. As populações apresentam uma frequência relativamente alta e embora globalmente a diferenciação genética não seja grande, existem popula-

ções geneticamente mais distantes entre si. Desta forma é fundamental que haja o acompanhamento das populações de *S. calcitrans* oriundas de usinas sucroalcooleiras, tal como em fazendas pecuárias, visando o uso adequado dos grupos químicos utilizados para o controle da praga.

Agradecimentos

Agradecemos a FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul), à equipe técnica da Volare Consultoria Ambiental, EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e às usinas do presente estudo pelo apoio durante a pesquisa.

Referências bibliográficas

- Barros ATM, Koller WW, Cattoll JB, Soares CO. *Stomoxys calcitrans* outbreaks in pastured beef cattle in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesq Vet Bras* 2010; 30(11): 945-952. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010001100008>.
- Barros ATM, Saueressig TM, Gomes A, Koller WW, Furlong J, Girão ES, et al. Susceptibility of the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae), to insecticides in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21(2):125-132. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000600029>. PMID:12386720.
- Barros AT, Rodrigues VD, Caçado PH, Domingues LN. Resistance of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), to cypermethrin in outbreak areas in Midwestern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2019 Dec; 28(4): 802-6. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019089>.
- Bloomquist JR. Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol* 1996; 41:163-90. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.001115>.
- Busvine JR. Mechanism of resistance to insecticide in house flies. *Nature* 1951;193-195. <https://doi.org/10.1038/168193a0>.
- Carvalho, G. C. Análise de estrutura populacional de mosquito *Culex (Culex) quinquefasciatus* e *Culex (Culex) nigripalpus* (Diptera: Culicidae) utilizando marcadores de microssatélites e morfometria geométrica alar. Universidade de São Paulo- Tese, 2017.
- Cilek JE, Greene GL. Stable fly (Diptera: Muscidae) insecticide resistance in Kansas cattle feedlots. *J Econ Entomol* 1994; 87(2): 275-279. <http://dx.doi.org/10.1093/jee/87.2.275>.

- Dominghetti TF, Barros AT, Soares CO, Cançado PH. *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) outbreaks: current situation and future outlook with emphasis on Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2015; 24(4): 387-395. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015079>.
- Domingues VMF. *Utilização de um produto natural (cortiça) como adsorvente de pesticidas piretróides em águas* [Dissertação]. Porto: Universidade do Porto; 2005.
- Figueiredo ACP. *Piretróides: uma nova geração de inseticidas* [Dissertação]. Lisboa: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias; 2014.
- Freeman, J. C.; ROSS, D. H.; SCOTT, J. G. Insecticide resistance monitoring of house fly populations from the United States. *Pestic Biochem Phys* 2019; 158:61-68. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.04.006>.
- Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, et al. Reassessment of the potential economic impact by cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2014; 23(2): 150-156. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014042>.
- Guerrero FD, Alison MW, Kammlah DM, Foil LD. 2002. Use of the polymerase chain reaction to investigate the dynamics of pyrethroid resistance in *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol* 39(5):747–754.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>>.
- Koller WW, Catto JB, Bianchin I, Soares CO, Paiva F, Tavares L et al. Surtos da mosca-dos-estábulo, *Stomoxys calcitrans*, em Mato Grosso do Sul: novo problema para as cadeias produtivas da carne e sucoalcooleira? Campo Grande, MS: *Embrapa Gado de Corte*, 2009.
- Laveissiere C, Grebaut P. Research on the tsetse (Diptera: Glossinidae) traps. Perfection of an economic model: the "Vavoua" trap. *Trop Med Parasitol*. 1990;41(2):185-92.
- Miller TA. Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticides. *Parasitol Today* 1988; 4(7): 58-59. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(88\)90080-4](https://doi.org/10.1016/0169-4758(88)90080-4).
- Nakano O, Junior LAP, Camargo AH. Controle químico de adultos e larvas da mosca doméstica. *O Biológico* 1972; 39:5-8.
- Olafson PU, Kaufman PE, Duvallet G, Solórzano JA, Taylor DB, Fryxell RT. Frequency of kdr and kdr-his alleles in stable fly (Diptera: Muscidae) populations from the United States, Costa Rica, France and Thailand. *J Med Entomol* 2019; 56(4):1145-1149. <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tjz012>.

- Olafson PU, Pitzer JB, Kaufman PE. Identification of a mutation associated with permethrin resistance in the para-type sodium channel of the stable fly (Diptera: muscidae). *J Econ Entomol* 2011; 104(1): 250-257. <http://dx.doi.org/10.1603/EC10307>.
- Oliveira, F. S. Detecção da mutação kdr-his (*knockdown resistance*), associada à resistência a inseticidas piretroides, e prospecção de novos polimorfismos de vasa única no gene dos canais de sódio de moscas-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*). Embrapa Gado de Corte-Tese/dissertação (ALICE), 2019.
- Pitzer JB, Kaufman PE, Tenbroeck SH. Assessing permethrin resistance in the stable fly (Diptera: Muscidae) in Florida by using laboratory selections and field evaluations. *J Econ Entomol* 2010; 103(6): 2258-2263. <http://dx.doi.org/10.1603/EC10166>.
- Roush RT. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. *Parasitol Today* 1993; 9(5):174-9. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90141-2](http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758(93)90141-2).
- Soderlund D M, Bloomquist J R. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: ROUSH, R.T. & TABASHNIK (eds.). *Pesticide resistance in Arthropods*, New York: Chapman & Hall, 1990, p.58-96.
- Soderlund DM. Toxicology and mode of action of pyrethroid insecticides. In: Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. v. 2, n.3, 2010, p.1665-1686.
- Sparks TC, Lockwood J A, Byford R L, Graves, J B, Leonard BR. The role of behavior in insecticide resistance. *Pestc Sci* 1989; 26(4): 383-399. <https://doi.org/10.1002/ps.2780260406>.
- Vais H, Williamson MS, Devonshire AL, Usherwood PNR. The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium. *Pest Manag Sci* 2001; 57: 877-888. <https://doi.org/10.1002/ps.392>.
- Younger C. *A study of horn fly, Haematobia irritans (L.) (Diptera: Muscidae), target site sensitivity, susceptibility, and resistance management at selected sites in Louisiana* [Dissertation]. Baton Rouge: Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College; 2011. 89 f.