



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – UFTM
PROGRAMA INTERDISCIPLINAR EM BIOCÊNCIAS APLICADAS – PIBA



Laís Vaz da Costa

**A espécie invasora *Zaprionus indianus* GUPTA 1970 (Diptera: Drosophilidae):
possibilidades como bioindicadora de poluição por *malathion***

Uberaba – MG

2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – UFTM
PROGRAMA INTERDISCIPLINAR EM BIOCÊNCIAS APLICADAS – PIBA



Laís Vaz da Costa

**A espécie invasora *Zaprionus indianus* GUPTA 1970 (Diptera: Drosophilidae):
possibilidades como bioindicadora de poluição por *malathion***

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, área de concentração em Materiais Aplicados em Biociências, para obtenção do título de mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luís Gustavo da Conceição Galego

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo José Mendonça

Uberaba – MG

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

Z48e Vaz-Costa, Laís
A espécie invasora *Zaprionus indianus* GUPTA 1970 (Diptera: Drosophi-
lidae): possibilidades como bioindicadora de poluição por *malathion* / Laís
Vaz da Costa. -- 2017.
62 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado Interdisciplinar em Biociências Aplicadas) --
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017
Orientador: Prof. Dr. Luís Gustavo da Conceição Galego
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo José Mendonça

1. Inseticidas Organofosforados. 2. Dípteros. 3. Acetilcolinesterase. I.
Galego, Luís Gustavo da Conceição. II. Universidade Federal do Triângulo
Mineiro. III. Título.

CDU 632.951

Laís Vaz da Costa

**A espécie invasora *Zaprionus indianus* GUPTA 1970 (Diptera:
Drosophilidae): possibilidades como bioindicadora de poluição por
*malathion***

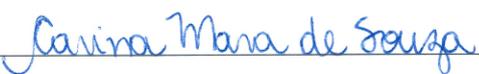
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, área em Materiais Aplicados em Biociências, para obtenção do título de mestre em Ciências.

28 de agosto de 2017

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Luís Gustavo da Conceição Galego – Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM



Prof.^a Dr.^a Carina Mara de Souza
Universidade Federal de Uberlândia – UFU



Prof. Dr. Wagner Rodrigues da Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

Dedico a todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste Mestrado.

“ Os mais fortes também têm seus momentos de fragilidade.

As pessoas mais cultas passam por momentos de incoerência.

O ser humano mais gentil também perde a paciência.

*A pessoa mais rígida e autossuficiente derrama suas lágrimas,
ainda que escondidas.*

*Em alguns momentos da vida você irá ficar decepcionado consigo
mesmo e com as pessoas que ama.*

*Não só de sucessos vive o ser humano, mas da convicção de que
nas dificuldades podemos escrever os melhores textos das nossas vidas.*

Augusto Cury

RESUMO

O uso indiscriminado de inseticidas pode causar a contaminação do ambiente, afetando o solo, o ar e as águas superficiais e subterrâneas. Um dos organofosforados mais utilizados no Brasil é o *Malathion*, com ampla utilização na agricultura e uso domiciliar, bem como em programas de saúde pública no controle de vetores de doenças. Em ambientes sujeitos a pressão seletiva de agrotóxicos, os alelos conferem resistência a inseticidas tendem a aumentar sua frequência. Dados obtidos no estudo com *Zaprionus indianus* confirmam a presença de um locus marcador para ambientes expostos ao *Malathion*, conferindo a essa espécie numerosas possibilidades de uso como bioindicador para monitorar o uso excessivo. O presente estudo, teve como objetivo: ampliar o conhecimento sobre a ocorrência e a sobrevivência de *Z. indianus*, submetidas ao bioensaio com *Malathion*, analisar a atividade enzimática e a inibição por *Malathion*. Os indivíduos coletados em Uberlândia, apresentaram o maior número e a maior diferenciação da proporção sexual. Não houve diferença significativa estatisticamente no padrão de resistência ao *Malathion*, quanto a sobrevivência dos indivíduos de *Z. indianus*, entre as localidades estudadas. O conjunto de dados obtidos nesse trabalho reforça a premissa que *Z. indianus*, aparece em grande abundância dentro das comunidades de drosofilídeos coletadas em áreas do Bioma Cerrado. Apresenta também, aspectos enzimáticos na inibição por *Malathion*, os quais poderão auxiliar no direcionamento de estudos futuros, ligados à avaliação de risco ecológico pela contaminação de inseticidas no ambiente urbano.

Palavras-chave: acetilcolinesterase, organofosforados, perturbação antrópica, Diptera

ABSTRACT

The indiscriminate use of insecticides can cause contamination of the environment, affecting soil, air and surface and groundwater. One of the most organophosphorus insecticide widely used in Brazil is the *malathion* one, which is employed in agriculture and domestic, as well as in control of disease's vector into public health. In environments subject to selective pressure of pesticides, alleles confer resistance to insecticides tend to increase their frequency. Data obtained in the study with *Zaprionus indianus* confirm the presence of a marker locus for environments exposed to *Malathion*, giving this species numerous possibilities of use as a bioindicator to monitor overuse. The objective of this study was to increase knowledge about the occurrence and survival of *Zaprionus indianus*, submitted to the bioassay with *Malathion*, to analyze the enzymatic activity and inhibition by Malathion. The individuals collected in Uberlândia, presented the greatest number and the greatest differentiation of the sexual proportion. There was no statistically significant difference in the pattern of resistance to *Malathion*, as the survival of individuals of *Z. indianus*, among the studied localities. The set of data obtained in this work reinforces the premise that *Z. indianus* appears in great abundance within the communities of drosofilídeos collected in areas of the Cerrado Biome. It also presents enzymatic aspects in inhibition by *Malathion*, which may help in the direction of future studies, linked to the ecological risk assessment by the contamination of insecticides in the urban environment.

Key words: acetylcholinesterase, organophosphates, antropic disturbance, Diptera

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura Molecular do *Malathion*

Figura 2: Áreas de coleta de *Zaprionus indianus* amostradas no presente estudo.

Figura 3: Mortalidade obtida para populações de *Z. indianus* amostradas no cerrado brasileiro submetidas, em laboratório, a diferentes concentrações do organofosforado *malathion*.

Figura 4: Atividade específica (absorbância/ μg de proteína) da AChE de *Z. indianus* versus tempo de reação (min) em cada área de coleta

Figura 5: Atividade específica (absorbância/ μg de proteína) da AChE de *Z. indianus* versus tempo de reação (min) das coletas obtidas no município de Guáira (SP) com diferentes concentrações de *Malathion* (ppm): 50, 100, 200 e 400.

Figura 6: Atividade específica (absorbância/ μg de proteína) da AChE de *Z. indianus* versus tempo de reação (min) das coletas obtidas no município de São José do Rio Preto (SP) com diferentes concentrações de *Malathion* (ppm): 50, 100, 200 e 400.

Figura 7: Atividade específica (absorbância/ μg de proteína) da AChE de *Z. indianus* versus tempo de reação (min) das coletas obtidas no município de Uberlândia (MG) com diferentes concentrações de *Malathion* (ppm): 50, 100, 200 e 400.

Figura 8: Atividade específica (absorbância/ μg de proteína) da AChE de *Z. indianus* versus tempo de reação (min) das coletas obtidas no município de Uberaba (MG) com diferentes concentrações de *Malathion* (ppm): 50, 100, 200 e 400.

Figura 90: Atividade enzimática (absorbância/ μg de proteína) por minuto, em cada um dos tempos aferidos (1: 0 minuto; 2: 5 minutos; 3: 10 minutos; 4: 15 minutos; 5: 20 minutos) de AChE de *Z. indianus*. Para os ensaios bioquímicos, a solução de enzima-tampão de extração foi tratada (T) ou não (C) com uma dosagem de 0,40 $\mu\text{l/ml}$ de *Malathion*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de indivíduos de *Z. indianus*, outras espécies de Drosophilídeos coletados em cada área amostrada e a abundância relativa (%).

Tabela 2: Número de machos (Nm) e fêmeas (Nf) de *Z. indianus* coletados em cada área amostrada e os valores de qui-quadrado obtidos nas comparações da proporção sexual.

Tabela 3: Número de indivíduos sobreviventes ao bioensaio em cada área de coleta x concentração do *malathion* ($\mu\text{l}/\text{cm}^2$).

Tabela 4: Média e erros-padrão da atividade enzimática da AChE de *Z. indianus* em absorbância/ μg de proteína extraída de indivíduos oriundos de diferentes populações geográficas do cerrado brasileiro, em cada tempo de aferição da atividade, com substrato de análise tratado com diferentes concentrações de *malathion*, bem como a ANOVA (F) para cada comparação entre grupos amostrais.

Tabela 5: Comparações par-a-par por meio do teste t de Tukey ($p < 0,05$) entre os dados de atividade da AChE (absorbância/ μg de proteína) para populações geográficas do cerrado brasileiro de *Z. indianus*. **Udi:** Uberlândia (MG); **Ura:** Uberaba (MG); **Gua:** Guairá (SP); **SJRP:** São José do Rio Preto (SP); **1:** não tratado com *malathion* e tempo zero; **2:** não tratado com *malathion* e tempo vinte minutos; **3:** tratado com 0,40 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de *malathion* e tempo zero; **4:** tratado com 0,40 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de *malathion* e tempo vinte minutos

Tabela 6. Dosagem de proteínas totais em cada amostra

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterase

ANOVA: análise de variância

DDT: 1,1,1-tricloro-2,2-di(ρ -clorofenil)

DNTB: 5: 5-ditiobis-2- Nitrobenzóico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

HCl: ácido clorídrico

ICBN: Instituto de Ciências Biológicas e Naturais

ICENE: Instituto de Ciências Exatas, Naturais e Educação

ICTE: Instituto de Ciências Tecnológicas e Exatas

OP: organofosforados

Ppm: partes por milhão

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Z. indianus: Zaprionus indianus

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: ARTIGO DE REVISÃO (Para ser submetido a publicação): A evolução da resistência ao *malathion* em Diptera

| | |
|--|----|
| 1 Introdução | 11 |
| 2 Agrotóxicos no Brasil..... | 12 |
| 3 Lei dos Agrotóxicos..... | 13 |
| 4 Metabolização do <i>Malathion</i> | 15 |
| 5 Padrões de resistência ao <i>Malathion</i> em Diptera..... | 16 |
| 6 Considerações Finais..... | 19 |
| 7 Referências Bibliográficas..... | 20 |

CAPÍTULO 2: Padrão de resistência ao *Malathion* e atividade da acetilcolinestarese em populações de *Zaprionus indianus* GUPTA 1970 (Diptera: Drosophilidae) oriundas do cerrado

| | |
|-----------------------------------|----|
| 1 Introdução..... | 29 |
| 2 Material e Métodos..... | 35 |
| 3 Resultados..... | 38 |
| 4 Discussão..... | 46 |
| 5 Conclusão..... | 50 |
| 6 Conclusões Gerais..... | 51 |
| 7 Referências Bibliográficas..... | 52 |

CAPÍTULO 1: Padrões de resistência ao inseticida *Malathion* em Diptera

1 Introdução

O ataque de pragas é uma realidade para as populações humanas desde o advento da agricultura durante o Período Neolítico. Há registros bíblicos de plantações devastadas por insetos. Acreditava-se que as pragas eram castigos dos deuses em razão do mau comportamento humano. A constante busca por espaço e alimento tornou o *Homo sapiens* o principal agente transformador da natureza. O desejo de melhorar as condições de vida e aumentar a produção de alimentos estimulou o desenvolvimento de substâncias químicas que permitissem o controle de pragas.

Os agentes químicos têm seu uso citado desde a Antiguidade, porém foi com o advento da indústria química, na segunda metade do século XIX, que seu uso tornou-se tecnicamente viável (SILVA et al., 2012). Apesar de não terem sido efetivamente empregados durante a Segunda Guerra Mundial, foi nesta época que se desenvolveram os agentes químicos mais potentes (HOLSTEGE et al., 1997). Um marco importante foi a descoberta da atividade do inseticida 1,1,1-tricloro-2,2-di(*p*-clorofenil) etano em 1939, conhecido como DDT. Esse inseticida foi utilizado pela primeira vez em 1943, no combate de piolhos que infestavam tropas norte-americanas na Europa e que transmitiam uma doença chamada tifo exantemático (BRANCO, 2003).

Os organofosforados (OP) começaram a substituir os organoclorados no controle de algumas espécies de insetos que já apresentavam evolução de resistência a estes (CRINNION, 2000, D'AMATO et al., 2002). Esses compostos tiveram seu uso intensificado depois da proibição da maioria dos compostos organoclorados, sendo substituídos principalmente nas campanhas de combate a endemias, por apresentarem vantagens como a menor toxicidade ao ambiente e aos seres vivos (ECOBICHON, 1996, NUNES; TAJARA, 1998, MUKHERJEE; GOPAL, 2002, FLORES et al., 2004, BRAGA; VALLE, 2007). Os OP são os pesticidas que apresentam fósforo em sua composição (BRAGA; VALLE, 2007). Os primeiros compostos foram preparados por alquimistas na Idade Média, mas seu estudo sistemático teve início no século XIX, por Lassaigne em 1820 (DOS SANTOS et al., 2007).

O inseticida *Malathion* (Figura 1), O,O-dimetil-S-(1,2-dicarboxietil) fosforoditioato (C₁₀H₁₉O₆PS₂), introduzido em 1950 pela Companhia Americana

Cyanamid, é um organofosforado não-sistêmico (ANVISA, 1985), que atua no controle de insetos como os Coleoptera, Diptera, Hemiptera e Lepidoptera e vetores de doenças como os Culicidae, em diversas culturas como as de algodão, arroz, trigo, cacau, café, citros, feijão, pepino, berinjela, tomate, couve, alface, repolho, morango, noqueira, pêsego, maçã e plantas ornamentais (CHEMINOVA, 2017).

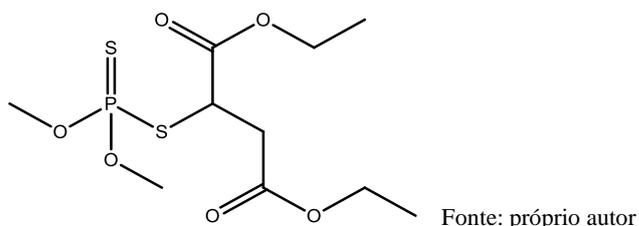


Figura 1: Estrutura Molecular do *malathion*.

Os agrotóxicos, de acordo com a sua toxicidade, são classificados em: extremamente tóxicos (Classe I), altamente tóxicos (Classe II), medianamente tóxicos (Classe III) e pouco tóxicos (Classe IV) (EDDLESTON et al., 2002, RIBEIRO et al., 2007). A classificação toxicológica com base no DL50, indica que o *Malathion* pertence à classe III, sendo medianamente tóxico e classe III para periculosidade para meio ambiente.

2 Agrotóxicos no Brasil

No Brasil, durante a primeira metade do século XX, foram utilizados produtos agrotóxicos naturais, que eram produzidos localmente (BULL; HATHAWAY, 1986). A utilização de produtos químicos se iniciou na década de 40, com grande aumento na década de 60, como parte da política de modernização da agricultura brasileira, período denominado de Revolução Verde, quando o governo ofereceu incentivos para a instalação da indústria de agrotóxicos no país e levou a agricultura a se caracterizar como monoculturas extensivas e o amplo uso de fertilizantes químicos sintéticos e agrotóxicos nas lavouras foi promovido ao condicionar a obtenção do crédito rural à aquisição de agrotóxicos (MENEZES, 2005; SOARES; PORTO, 2009; PORTO; SOARES, 2012).

Apesar da utilização dessas substâncias terem contribuído para o aumento da produção agrícola, trouxe como consequência o uso incorreto e indiscriminado de agrotóxicos durante várias décadas, o que levou ao acúmulo de resíduos tóxicos em

alimentos, contaminação da água e do solo, intoxicação dos seres humanos, aparecimento de pragas resistentes, a interrupção do sistema de controle biológico por inimigos naturais, ocasionando surtos de insetos praga, entre muitos outros problemas (KIM et al., 2003; COSTA et al., 2004; MENEZES, 2005).

O uso dessas substâncias é fiscalizado, seu registro e comercialização só são possíveis após análise do Ministério da Agricultura, da Saúde e do Meio Ambiente. A legislação dos agrotóxicos no Brasil é um assunto recente em comparação ao cenário mundial, sendo o referencial legal mais importante a Lei nº 7802/89 (BRASIL, 1989), que rege o processo de registro de um produto agrotóxico, regulamentada pelo Decreto nº 4074/02 (BRASIL, 2002).

Desde 2009, o Brasil ocupa o primeiro lugar como consumidor e produtor mundial de agrotóxicos (FARIA et al., 2007; CARNEIRO et al., 2012, DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014). Foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, em campanhas de controle de endemias, como doença de Chagas, malária e dengue e, a partir da década de 1960, começaram a ser intensamente utilizados na agricultura (DOMINGUES et al., 2004). Um dos organofosforados mais utilizados no Brasil é o *malathion* devido ao seu baixo custo, sua alta eficácia como inseticida e baixa toxicidade em mamíferos quando comparado a outros organofosforados e continua a ser produzido em grandes volumes mundialmente (BECKER et al., 2003).

3 Lei de agrotóxicos

A Lei 7.802/89 é conhecida como Lei de Agrotóxicos por representar o marco regulatório deste produto no Brasil. Em seu Artigo 2º, Inciso I, o termo agrotóxico é definido da seguinte forma:

[...] os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

A partir dessa definição, é importante conhecer a classificação dos agrotóxicos, devido à grande diversidade de produtos com distintas formulações comerciais. Essa classificação é também importante para o diagnóstico das intoxicações e os possíveis

tratamentos. Algumas das classes de uso são: inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, acaricidas, rodenticidas, moluscicidas, formicidas (VELASCO; CAPANEMA, 2006).

Inseticidas são produtos destinados a eliminação de insetos. Os fungicidas são substâncias cuja ação é inibir a germinação de esporos, ou destruir o tubo germinativo dos diversos fungos. Herbicidas são destinados a controlar e eliminar as ervas daninhas. Rodenticidas são utilizados no combate a roedores. Acaricidas tem ação no combate aos diversos ácaros. Nematicidas são utilizados no combate de nematóides. Moluscicidas tem ação de combate a moluscos, basicamente contra o caramujo da esquistossomose. Formicidas são utilizados no controle de formigas (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

A lei de controle de inseticida nos EUA chama-se *Federal Insecticide, and Rodenticide Act* (FIFRA), e utiliza o termo pesticida para produtos químicos destinados ao combate de pragas:

[...] PESTICIDA - O termo "pesticida" significa (1) qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas a prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga, (2) qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas a ser utilizadas como regulador de planta, desoladora ou dessecante, e (3) qualquer estabilizador de nitrogênio, exceto que o termo "pesticida" não deve incluir nenhum artigo que seja um "novo medicamento animal". O termo "pesticida" não inclui produtos esterilizados químicos líquidos (incluindo quaisquer reivindicações esterilizantes ou desinfectantes subordinadas sobre esses produtos) para uso em um dispositivo crítico ou semi-crítico.

A legislação europeia utiliza o termo produtos fitofarmacêuticos para os produtos que contêm gradientes ativos que possibilitem o uso sustentável de pesticidas, tendo em conta a abordagem tratamento preventivo e profilático, que possuem as seguintes funções: proteger vegetais de organismos nocivos; influenciar os processos vitais dos vegetais; conservar ou destruir partes indesejáveis dos vegetais; limitar ou prevenir o crescimento indesejável de vegetais (COMUNIDADE EUROPEIA, 2009). Essa definição é semelhante a definição da lei de agrotóxicos brasileira, mas exclui as substâncias que são utilizadas fora do contexto agrícola, como os biocidas (MATIAS, 2008).

4 Metabolização do *Malathion*

A toxicidade aguda dos inseticidas organofosforados é maior que a dos organoclorados, mas os organofosforados são menos persistentes no meio ambiente, ou seja, sofrem rápida degradação e, conseqüentemente, é necessário um maior número de aplicações para a mesma eficácia que a dos organoclorados. O herbicida glifosato e os inseticidas malation, paration e dissulfoton são alguns exemplos de compostos organofosforados.

Os organofosforados são absorvidos pelo organismo por via dérmica, respiratória e digestiva (MARICONI, 1985). Os efeitos induzidos pela exposição aos OP em animais e humanos têm sido descritos e dependem basicamente de três fatores: tipo de OP, dose utilizada e duração da exposição (POPE, 1999). Os OP atuam irreversivelmente na inativação da enzima acetilcolinesterase (AChE), que é essencial para a função nervosa (COLOVIC et al., 2013). A partir desse conhecimento, pode-se estabelecer uma relação entre inseticidas, resistência e ação da acetilcolinesterase.

AChE é uma enzima amplamente distribuída no sistema nervoso, que participa da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em toda membrana pós-sináptica, encerrando sua ação e garantindo a intermitência dos impulsos nervosos, transmitindo a mensagem de um neurônio a outro (QUINN, 1987, FUKUTO, 1990, GRISARU et al., 1999, TÕUGU, 2001, ROCHA JÚNIOR et al., 2004, SILMAN; SUSSMAN, 2005). A inibição dessa enzima por um OP resulta na acumulação de acetilcolina na fenda sináptica, levando a sinais de intoxicação, tais como anomalias pulmonares, efeitos gastrointestinais, distúrbios musculares, debilidade motora, fraqueza, podendo provocar a morte pela superestimulação do sistema nervoso (TÕUGU, 2001; SOARES et al., 2003; CHAMBERS, 2010; ZHOU, 2011).

Estudos com animais e humanos mostram que o *Malathion*, após absorção, é oxidado no fígado por enzimas do citocromo P-450 em pequenas quantidades para malaoxon, o qual é o principal metabólito responsável pelos efeitos tóxicos (BURATTI et al., 2004). Embora o malaoxon seja mais tóxico do que o *malathion* nos organismos, a ligação éster fosforotiolato do malaoxon pode sofrer hidrólise mais facilmente do que o éster análogo presente no *malathion* (DOS SANTOS et al., 2007), que por sua vez também pode ser degradado pela ação de enzimas (BURATTI et al., 2004), uma vez que esta enzima parece ser bastante específica para o *malathion* e para os subprodutos das reações do *malathion* (WELLING et al., 1974).

Em insetos, os OP atuam inibindo irreversivelmente a ligação da enzima pela fosforilação no local catalítico (ALDRIDGE, 1950). Os aminoácidos Ser 200, His 440 e Glu 327, que estão presentes no sítio ativo da AChE, são denominados como a “tríade catalítica”, sendo essenciais para a atividade enzimática (HAREL et al., 1993). Um indicador importante de resistência a OP é a perda de sensibilidade da AChE ao inseticida, causada por modificações nos aminoácidos dessa enzima que podem comprometer a ligação ao inseticida, diminuindo ou anulando seus efeitos (AYAD; GEORGHIOU, 1975; BROGDON; MCALLISTER, 1998).

Outro mecanismo que confere resistência a inseticidas é a amplificação de genes associados a uma superexpressão das enzimas de desintoxicação, sendo que apenas o gene *ace-1* está relacionado com o fenômeno de resistência, codificando AChE nos insetos (FOURNIER et al., 1993, WEILL et al., 2002; WEILL et al., 2004; LIX; BERENBAUM, 2007, WU et al., 2010, KAKANI et al., 2011, BARIAMI et al., 2012, FAUCON et al., 2015). Cinco mutações no gene *ace-1* foram descritas em insetos resistentes a OP (MUTERO et al., 1994).

Outra questão relevante acerca dos inseticidas organofosforados é sobre a sua capacidade mutagênica e carcinogênica. Alguns organofosforados, incluindo seus subprodutos, podem provocar malformações congênitas, afetar a fertilidade, induzir abortos e mutações genéticas (WHO, 1986, KOIFMAN et al., 1998; ROJAS et al., 2000). Foram relatados em casos de câncer em jovens indígenas, elevados níveis de organofosforados encontrados no sangue (MATOS et al., 1988; KOIFMAN et al., 1998). Observações realizadas em mamíferos expostos ao *Malathion* indicam que este inseticida é potencialmente genotóxico e um forte agente mutagênico, podendo levar a aberrações e quebras cromossômicas (GIRI et al., 2002).

5 Padrões de resistência ao *malathion* em Diptera

A resistência a inseticidas é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como a “habilidade de uma linhagem de um organismo tolerar doses de tóxicos que seriam letais para a maioria dos indivíduos da mesma espécie”. Segundo o *Insecticide Resistance Action Committee* (2011), a resistência é definida como a “seleção de uma característica hereditária em uma população de insetos que resulta na falha do produto inseticida repetitivamente, não proporcionando o nível pretendido de controle, mesmo quando usado como recomendado”.

Os organismos são selecionados de acordo com a capacidade hereditária para resistir ao inseticida; os alelos que conferem resistência tendem a aumentar sua frequência, aumentando a proporção de indivíduos resistentes na população ao longo das gerações (ROUSH; MCKENZIE, 1987, GALEGO et al., 2010). O resultado da seleção de indivíduos não é causado pela ação direta do inseticida, mas sim pela variabilidade genética presente na população antes a sua aplicação (OPPENORTH, 1985). Essa variabilidade genética é pré-adaptativa e é resultado de mutações espontâneas que geram indivíduos resistentes a inseticidas. O desenvolvimento da resistência é um processo microevolutivo, no qual a seleção natural é o principal agente na mudança da estrutura genética de uma população (ROUSH; MCKENZIE, 1987, MOUGABURE-CUETO et al., 2004).

Devido ao uso frequente de inseticidas, como controle químico de pragas em culturas e no controle de vetores de doenças, desde o final da década de 1950, muitas espécies de insetos desenvolveram níveis significativos de resistência (KAO et al., 1985, GEORGHIOU, 1990; ARTHUR, 1996; CAMPBELL et al., 1997). As características bioquímicas e moleculares podem variar dentro dos organismos dos insetos e de acordo com os grupos químicos dos inseticidas, fornecendo um cenário complexo no gerenciamento da resistência a inseticidas (LIEBMAN et al., 2015). O uso indiscriminado e contínuo desses produtos, pode intensificar a seleção de resistência, dificultando o controle de insetos.

Os OP são a classe de inseticidas mais comumente utilizada, sendo produzido em grandes quantidades em todo o mundo, inclusive no Brasil. Mecanismos metabólicos que determinam a resistência ao inseticida *Malathion* foram registrados em diversos grupos de insetos, tais como, Diptera, Hemiptera, Homoptera, Coleoptera, Lepidoptera e Hymenoptera (GUEDES et al., 1997, BAKER et al., 1998, HE et al., 2004). Muitos estudos sugerem que o aumento da atividade de enzimas desintoxicantes como esterases, oxidases e Glutathione-S-transferases (GST) (MCKENZIE, 1996, YU, 1996, HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998 HEMINGWAY, 2000, HEMINGWAY; RANSON, 2000, KETTERMAN et al., 2011.), podem estar relacionadas com o desenvolvimento de resistência a inseticidas organofosforados (OPPENORTH, 1985, DEVONSHIRE et al., 1991, AHMAD et al, 2007).

Os dípteros têm sido uma ferramenta bastante utilizada para estudos de resistência devido ao grande número de pragas (moscas) e mosquitos envolvidos na transmissão de doenças presentes nesse grupo, que usualmente são controlados pelo uso do *Malathion*.

As atividades superiores de esterase em *Bactrocera dorsalis* presentes em indivíduos resistentes ao *Malathion*, quando comparadas as atividades encontradas em moscas suscetíveis, podem ser atribuídas ao aumento da atividade de Carboxilesterases, devido a especificidade dessa enzima para o *Malathion* (HSU et al., 2004). Também podemos encontrar em *B. dorsalis* resistentes ao *Malathion*, monooxygenases que evoluíram na degradação do *Malathion* em malaoxon (HSU et al., 2004). Mecanismos de resistência envolvendo Carboxilesterase também foram encontrados *Ceratitis capitata* e em *Lucilia cuprina* (KOREN et al., 1984, WHYARD; WALKER, 1994).

A mutação mais comum, G119S, encontrada em várias espécies de mosquitos, reduz o acesso do inseticida ao alvo da tríade catalítica presente na enzima (WEILL et al., 2004). A substituição G119S é associada com altos níveis de resistência em espécies de mosquitos, incluindo *Anopheles gambiae* (WEILL et al., 2003, WEILL et al., 2004, DJOGBENOU et al., 2008, EDI et al., 2014), *Anopheles coluzzii* (ESSANDOH et al., 2013), *Culex pipiens* (WEILL et al., 2004; CUI et al., 2006, DJOGBENOU et al., 2008) e *Anopheles albimanus* (WEILL et al., 2003, WEILL et al., 2004). Os resultados do estudo com *A. Albimanus*, principal vetor da malária, sugere um alto nível de adaptação para resistência a OP, dificultando o controle e gerenciamento dessa espécie no Peru (LIEBMAN et al., 2015).

Em *Culex quinquefasciatus* a resistência a OP ocorre pelo aumento da produção de esterase, devido à amplificação da cópia de um gene (RAYMOND et al., 1998; HAWKES; HEMINGWAY, 2002). A resistência pela duplicação do gene *ace-1* também foi relatado em *A. gambiae*, *A. coluzzii* e *C. pipiens* (LABBE et al., 2007; DJOGBENOU et al., 2009; ESSANDOH et al., 2013). A resistência a OP em *Musca domestica* foi associada a alterações tanto em genes envolvidos com a resistência metabólica quanto na sequência da enzima acetilcolinesterase (SYVANEN et al., 1996; RUSSEL et al., 2004).

Em algumas espécies de *Anopheles* resistentes, é possível encontrar níveis elevados de uma esterase cuja hidrólise é maior quando comparada aos indivíduos não resistentes (HEMINGWAY, 2000). *Ceratitis capitata* também exhibe mecanismos de insensibilidade de AChE em indivíduos resistentes ao *malathion* (KOREN et al., 1984). Dados obtidos no estudo com *Z. indianus* confirmam a presença de um locus marcador para ambientes expostos ao *Malathion*, conferindo a essa espécie numerosas possibilidades de uso como bioindicador para monitorar o uso excessivo de organofosforados, o surgimento de resistência e a elaboração de planos de manejo de pragas (GALEGO; CARARETO, 2010).

6 Considerações Finais

O *malathion* é o inseticida mais utilizado para o controle de vetores e de pragas agrícolas. O uso indiscriminado desse inseticida, favorece a seleção de indivíduos resistentes, tornando cada vez mais difícil reduzir o tamanho populacional das espécies pragas, causando danos na produção, e das espécies que são vetores, propiciando a disseminação de doenças. A resistência faz com que ocorra um aumento na dose de aplicação do produto e, também, impulsiona a busca por produtos mais tóxicos que possam apresentar maior seletividade.

Estudos em genética são imprescindíveis para compreender os mecanismos envolvendo os processos de resistência e a dinâmica evolutiva dessa seleção. Entender esse processo ajuda na elucidação dos caminhos futuros e no desenvolvimento de estratégias no gerenciamento da resistência. As ações a serem tomadas em relação ao controle de insetos devem levar em consideração a trajetória evolutiva. Os insetos resistentes são descendentes de um ancestral resistente, todos terão o mesmo perfil de resistência e a mesma estratégia de manejo poderá ser utilizada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD I, ASTARI S, TAN MI. Resistance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in 2006 to pyrethroid insecticides in Indonesia and its association with oxidase and esterase levels. **Pakistan Journal of Biological Sciences.**; vol. 10, p.3688-3692, 2007.

ALDRIDGE, W.N. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues. **Biochem J.**, vol. 46, p.451–460,1950

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria N° 10/ SNVS, Relação de substâncias com ação tóxica sobre animais ou plantas, cujo registro pode ser autorizado no Brasil, em atividades agropecuárias e em produtos domissanitários e determina outras providências. Brasília, DF. Publicado em 8 de março de 1985.

ARTHUR, F.H. Grain protectants: current status and prospects for the future. **Journal of Stored Products Research**, vol.32, p.293–302, 1996.

AYAD H, GEORGHIOU P. Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. **J Econ Entomol.**, vol. 68, p. 295–297, 1975.

BAKER, J. E., FABRICK, J. A., ZHU, K. Y. Characterization of esterases in *malathion*-resistant and susceptible strains of the pteromalid parasitoid *Anisopteromalus calandrae*. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, Manhattan, p.1039-1050, set. 1998.

BARIAMI V, JONES CM, POUPARDIN R, VONTAS J, RANSON H. Gene Amplification, ABC Transporters and Cytochrome P450s: Unraveling the Molecular Basis of Pyrethroid Resistance in the Dengue Vector, *Aedes aegypti*. **Plos Negl Trop Dis**, Liverpool, p.1-10, jun. 2012.

BECKER, N.; PETRIC, D.; ZGOMBA, M.; BOASE, C.; MADON, M.B.; DAHL, C.; KAISER, A. **Mosquitoes and their control**. New York: Kluwer Academic, 2003.

BULL, D.; HATHAWAY, D. *Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo*. Petrópolis: Vozes, 1986.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, vol. 16, n. 4, 2007.

BRANCO, S.M. *Natureza e agroquímicos*. 2. ed. São Paulo: Moderna, 2003.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de Janeiro de 2002. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm.

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Insecticide Resistance and Vector Control. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 4, p.605-613, dez. 1998.

BURATTI, F.M.; D'ANIELLO, A.; VOLPE, M.T.; MENEGUZ, A.; TESTAI, E. *Malathion* bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome P450 isoforms. **Drug Metabolism and Disposition**, vol.33. n. 3, p. 295-302, 2005.

CABELLO, G.; JUARRANZ, A.; BOTELLA, Y.; CALAF, G. Organophosphorous pesticides in breast cancer progression. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, vol.35, p. 1-9, 2003.

CAMPBELL, P.M.; TROTT, J.F.; CLAUDIANOS, C.; SMYTH, K.A.; RUSSELL, R.J.; OAKESHOTT, J.G. Biochemistry of carboxylesterases associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina* with comparisons to putative orthologues in other Diptera, *Biochemical Genetics*, vol. 35, p.17-40, 1997

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S. RIZOLLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. ABRASCO, Rio de Janeiro, p. 98, abril 2012.

CHAMBERS, J. E.; MEEK, E. C.; CHAMBERS, H. W. The Metabolism of Organophosphorus Insecticides. In: KRIEGER, Robert. **Handbook of Pesticide Toxicology**. Mississipi: Academic Press, p. 1399-1407, 2010.

CHEMINOVA BRASIL LTDA. Disponível em <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/MALATHION1000ECHEMINOVA.pdf>

ČOLOVIĆ, M.B.; KRSTIĆ, D.Z.; LAZAREVIĆ-PAŠTI, T.D.; BONDŽIĆ, A.M.; VASIĆ, V.M. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Curr Neuropharmacol**, vol. 11, p.315–335, 2013.

COSTA, E.L.N.; SILVA, T.; FIÚZA, L. M. - Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biologica Leopoldensia**, v.26, n.2, p.173-185, 2004.

CRINNION, W. J. Environmental Medicine, Part 4: Pesticides – Biologically Persistent and Ubiquitous Toxins. **Alternative Medicine Review**, Saindpoint, v. 5, p. 432- 447, 2000.

CUI, F.; RAYMOND, M.; BERTHOMIEU, A.; ALOUT, H.; WEILL, M.; QIAO, C.L. Recent emergence of insensitive acetylcholinesterase in Chinese populations of the mosquito *Culex pipiens* (diptera: culicidae). **J Med Entomol**. P. 878–883, 2006.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental- Uma Revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 995-1002, 2002.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, Campina Grande, v. 18, n. 12, p. 1296-1301, Dec. 2014.

DEVONSHIRE, A. L.; FIELD, L. M. GENE AMPLIFICATION AND INSECTICIDE RESISTANCE. **Annu. Rev. Entomol.**, Hertfordshire, v. 36, p.1-23, jan. 1991.

DJOGBENOU L., CHANDRE F., BERTHOMIEU A., DABIRE R., KOFFI A., ALOUT H., WEILL M. Evidence of Introgression of the ace-1R Mutation and of the ace-1 Duplication in West African *Anopheles gambiae*. **Plos One**. Cotonou, p. 1-7. maio 2008.

DJOGBENOU, L.; LABBE, P.; CHANDRE, F.; PASTEUR, N.; WEILL, M. Ace-1 duplication in *Anopheles gambiae*: a challenge for malaria control. **Malar J**, vol. 8, 2009.

DOMINGUES, M. R.; BERNARDI, M.R.; ONO, E.Y.S.; ONO, M.A. Agrotóxicos: Risco à Saúde do Trabalhador Rural. **Rev. Ciências biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 25, p. 45-54, 2004.

DOS SANTOS, V.M.R.; DONNICI, C.L.; DACOSTA, J.B.N.; CAIXEIRO, J.M.R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, São Paulo, vol. 30, n. 1, p. 159-170, feb. 2007.

ECOBICHON, D.J. Toxicology - The basic science of poisons. Ed. Mary Amdur. 5. ed., Mc Graw-Hill, p. 1111, 1996.

EDDLESTON, M; KARALLIEDDE, L.; BUCKLEY, N.; FERNANDO, R.; HUTCHINSON, G.; ISBISTER, G.; KONRADSEN, F.; MURRAY, D.; PIOLA, J.C.; SENANAYAKE, N.; SHERIFF, R.; SINGH, S.S.; SMIT, L. Pesticide poisoning in the developing world - a minimum pesticides list. **The Lancet**, vol. 360, p. 1163-1167, 2002.

EDI, C.V.; DJOGBÉNOU, L.; JENKINS, A.M.; REGNA, K.; MUSKAVITCH M.A.; POUPARDIN, R.; JONES, C.M.; ESSANDOH, J.; KÉTOH, G.K.; PAINE, M.J.; KOUDOU, B.G.; DONNELLY, M.J.; RANSON, H.; WEETMAN, D. CYP6 P450 Enzymes and ACE-1 Duplication Produce Extreme and Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. **Plos Genet**, Liverpool, p.1-12, mar. 2014.

ESSANDOH, J.; YAWSON, A.E.; WEETMAN, D. Acetylcholinesterase (*Ace-1*) target site mutation 119S is strongly diagnostic of carbamate and organophosphate resistance in *anopheles gambiae* and *anopheles coluzzii* across southern Ghana. **Malar J**; vol. 12, 2013.

FAUCON, F.; DUSFOUR, I.; GAUDE, T.; NAVRATIL, V.; BOYER, F.; CHANDRE, F.; SIRISOPA, P.; THANISPONG, K.; JUNTARAJUMNONG, W.; POUPARDIN, R.; GIROD, R.; CORBEL, V.; REYNAUD, S.; DAVID, J.P. Unravelling genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. **Genome Res**, Grenoble, p.1347-1359, set. 2015.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, p. 25-38, 2007.

FFRENCH-CONSTANT R.H., ROUSH R.T. Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assay, in Pesticide resistance in arthropods, Roush R.T. and Tabashnik B.E (eds). Chapman and Hall. New York and London. P. 4-38. 1990.

FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, Campinas, v. 7, p. 111-125, 2004.

FOURNIER, D.; MUTERO A.; PRALAVORIO, M.; BRIDE, J.M. Drosophila acetylcholinesterase: mechanisms of resistance to organophosphates. **Chemico Biological Interactions**, Antibes, v. 87, p.233-238, jun. 1993.

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental Health Perspectives**. v. 87, p. 245–254, 1990.

GALEGO, L.G.C.; CARARETO, C.M.A. Variation at the Est3 locus and adaptability to organophosphorous compounds in *Zaprionus indianus* populations. **Entomologia Experimentalis e Applicata**, São José do Rio Preto - Sp, vol. 134, n. 1, p.97-105, jan. 2010.

GEORGHIOU, G.P. Resistance potential to biopesticides and considerations of counter measures. **Pesticides and Alternatives**. Elsevier, Amsterdam, p. 409–420. 1990.

GIRI S.; PRASAD S.B.; GIRI, A.; SHARMA, G.D. Genotoxic Effects of Malation: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays *in vivo*. **Mutation Research**, v. 15, n. 514, p. 223-231, 2002.

GUEDES, R. N. C., KAMBHAMPATI, S., DOER, B. A., AND ZHU, K. Y. Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) populations from the United States and Brazil. **Bull. Entomol. Res.** Vol. 87, p. 581-586, Dez. 1997.

GRISARU, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ, H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **Eur. J. Biochem**, Israel, p.672-686, jul. 1999.

HAREL, M.; SCHALKT, I.; EHRET-SABATIERT, L.; BOUETT, F.; GOELDNERT, M.; HIRTHT, C.; AXELSEN, P. H.; SILMANII, I.; SUSSMAN, J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase **Proc. Natl. Acad. Sci.** U.S.A. n. 90, p. 9031-9035, 1993

HAWKES, N. J.; HEMINGWAY, J. Analysis of the promoters for the beta-esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, Amsterdam, v. 1574, n. 1, p. 51-62, 2002.

HE, Y.P.; MA, E.B.; ZHU, K.Y. Characterizations of general esterases in relation to *malathion* susceptibility in two field populations of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). **Pesticide Biochemistry And Physiology**, Shanxi, p.103-113, fev. 2004.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 30, 1009-1015., 2000

HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 12, p. 1-12, 1998.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 45, p. 371-391, 2000.

HOLSTEGE, C. P.; KIRK, M.; SIDELL, F. R. CHEMICAL WARFARE: Nerve Agent Poisoning. **Medical Toxicology**, Indianapolis, v. 13, n. 4, p.923-942, out. 1997.

INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. Prevention and Management of Insecticide Resistance in Vectors of Public Health Importance. Designed and produced by the IRAC Public Health Team, 2011.

EDI, C.V.; DJOGBENOU, L.; JENKINS, A.M.; REGNA, K.; MUSKAVITCH, M.A.; POUPARDIN, R. CYP6 P450 enzymes and ACE-1 duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **PLoS Genet**. 2014.

KAKANI, E. G.; BON, S.; MASSOULIÉ, J.; MATHIOPOULOS, K.D. Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 150-158, 2011.

KAO, L.R.; MOTOYAMA, N.; DAUTERMAN, W.C. The purification and characterization of esterases from insecticide resistant and susceptible houseflies, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 23, p. 228-239, 1985.

KARUNARATNE, S. H. P. P.; HEMINGWAY, J. *Malathion* resistance and prevalence of the *malathion* carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. Vol 79, p. 1060-1064, 2001.

KETTERMAN, A.J.; SAISAWANG, C.; WONGSANTICHON, J. Insect glutathione transferases. **Drug Metab Rev.**; vol. 43, p. 253–265, 2011.

KIM, S.I.; ROH, J.Y.; KIM, D.H.; LEE, H.S.; AHN, Y.J. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal Of Stored Products Research**, Suwon, v. 39, n. 3, p.293-303, mar. 2003.

KOIFMAN, R. J.; KOIFMAN, S.; VIEIRA, R. J. S. Familial aggregation of breast/ovarian cancer: age of onset along subsequent generations in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 14, p. 181-185, 1998.

KOREN, B.; YAWETZ, A.; PERRY, A. S. Biochemical properties characterising the development of tolerance to *malathion* in *Ceratitis capitata* Widemann (Diptera: Tephritidae). **J. Econ. Entomol**, vol 77, p. 864-867, 1984.

LABBE, P.; BERTHOMIEU, A.; BERTICAT, C.; ALOUT, H.; RAYMOND, M.; LENORMAND, T. Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. **Mol Biol Evol.**; vol. 24, p. 1056–1067, 2007.

LI, X; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. **Annual Review Of Entomology**, Arizona, p.231-253, jan. 2007.

LIEBMAN, K.A.; PINTO, J.; VALLE, J.; PALOMINO, M.; VIZCAINO, L.; BROGDON, W.; LENHART, A. Novel mutations on the ace-1 gene of the malária vector *Anopheles albimanus* provide evidence for balancing selection in an area of high insecticide resistance in Peru. 2015

MENEZES, E.L.A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. **Seropédica**, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, p. 58, 2005

MARICONI, F.A.M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. 7.ed. São Paulo: Distribuidora, 1985.

MATOS, E. L.; LORIA, D. J.; ALBIANO, N.; SOBEL, N.; BUJÁN, E. C. Efectos de los plaguicidas en trabajadores de cultivos intensivos. Boletim de la **Oficina Sanitária Panamericana**. v. 104, n. 2, p. 160-170, 1988.

MCKENZIE J.A. Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance. Academic Press, Inc. California. USA, 1996.

MOUGABURE-CUETO, G. Caracterización de la resistencia a insecticidas piretroides en *Pediculus humanus capitis* De Geer 1778 (Phthiraptera: Pediculidae): estudio comparativo entre estados embrionarios y post-embrionarios. Ph.D. thesis. University of Buenos Aires, 2004.

MUKHERJEE, I.; GOPAL, M. Organochlorine insecticide residues in drinking and groundwater in and around Delhi. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 76, p. 185–193, 2002.

MUTERO, A.; PRALAVORIO, M.; BRIDE, J.M.; FOURNIER, D. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. **Proc Natl Acad Sci**, USA, vol. 91, p. 5922-5926, 1994.

NUNES, M. V.; TAJARA, E. H. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Revista de Saúde Pública**, v. 3, p. 372-383, 1998.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; REGITANO, J. B. Dinâmica de pesticidas no solo. In: MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. F. (Ed.). **Química e mineralogia do solo: aplicações**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Parte II. p. 187-248, 2009.

OPPENORTH F.J. Biochemistry and genetics of insecticide resistance, in *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. **Pergamon Press**, Vol 12, p. 731-773, 1985.

PERES, F, MOREIRA, J. C. É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

PERES, F. Saúde, trabalho e ambiente no meio rural brasileiro. **Ciência Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 6, p.1995-2004, dez. 2009.

POPE, C.N. Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, vol.2, p.161-181, 1999.

PORTO, M. F; SOARES, W. L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Revista brasileira Saúde ocupacional.**, São Paulo, v. 37, n. 125, p. 17-50, 2012.

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Reviews**, v. 87, p. 955-979, 1987.

RAYMOND, M. et al. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Proceedings of the Royal Society of London - Series B – Biological sciences*, London, v. 353, n. 1376, p. 1707-1711, 1998.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impactos sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.

RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; PEREIRA, S. Y.; MARCHI, M. R. R. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, v. 30, n. 3, Jun., 2007.

ROCHA JÚNIOR, D. S.; BOTELHO, J.O.B.; FIOL, F.S.D.; OSHIMA-FRANCO, Y. Síndromes neurológicas induzidas por praguicidas organofosforados e a relação com o suicídio. **Saúde em Revista**, v. 10, n.1 4, p. 53-60, 2004.

ROJAS, R.; OJEDA, B.; BARRAZA, O. Malformaciones congénitas y exposición a pesticidas. **Rev. méd. Chile**, v. 128, n. 4, p. 399-404, abr. 2000.

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

RUSSELL, R.J. et al. Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, Canberra, v. 79, p.84-93, maio 2004.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: classical and non-classical functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, vol. 5, p. 293–302, 2005.

SILVA, G.R.; BORGES JUNIOR, I.; FIGUEROA-VILLAR, J.D.; CASTRO, A. T. DEFESA QUÍMICA: HISTÓRICO, CLASSIFICAÇÃO DOS AGENTES DE GUERRA E AÇÃO DOS NEUROTÓXICOS. **Quimica Nova**, Rio de Janeiro, vol. 35, n. 10, p.2083-2091, set. 2012.

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. S. Estimating the social cost of pesticide use: na assessment from a cute poisoning in Brazil. **Ecological Economics**, v. 68, n. 10, p. 2721-2728, Aug. 2009.

SYVANEN, M.; ZHOU, Z.; WHARTON, J. Heterogeneity of the Glutathione Transferase Genes Encoding Enzymes Responsible for Insecticide Degradation in the Housefly. **Journal Of Molecular Ievolution**, Davis, v. 43, p.236-240, fev. 1996.

TÕUGU, V. Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. **Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents**, vol. 1, p. 155-170, 2001.

VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L. O setor de agroquímicos. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro, n. 24, p. 69-96, 2006.

WALKER, C. H.; MACKNES, M. I. Esterases: Problems of identification and classification. **Biochemistry Pharmacology**, vol. 32, p. 3265-3269, 1983.

WEILL, M.; FORT, P.; BERTHOMIEU, A.; DUBOIS, M.P.; PASTEUR, N.; RAYMOND, M. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. **Proceedings Biological Sciences**, London, vol. 269, n. 1504, p. 2007-2016, 2002.

WEILL, M.; LUTFALLA, G.; MOGENSEN, K.; CHANDRE, F.; BERTHOMIEU, A.; BERTICAT, C. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. **Nature**, Montpellier, v. 423, p.136-137, maio 2003.

WEILL, M.; MALCOLM, C.; CHANDRE, F.; MOGENSEN, K.; BERTHOMIEU, A.; MARQUINE, M. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. **Insect Molecular Biology**, Montpellie, p.1-7, jan. 2004.

WELLING, W., DE VRIES, A. W., AND XOERMAN, S. Oxidative cleavage of a carboxyester bond as a mechanism of resistance to malaoxon in houseflies. **Pestic. Biochem. Physiol**, vol 4, p. 31-43, 1974.

WHYARD, S.; WALKER, V. K. Characterization of *malathion* carboxylesterase in the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. **Pestic. Biochem. Physiol**, vol. 50, p. 198-206, 1994.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Organophosphorus insecticides: a general introduction. **Environmental Health Criteria 63**, Geneva, Switzerland, 1986.

WU, S.; LI, M.; TANG, A.P.; FELTON, G.W.; WANG, J.J. Cloning and characterization of acetylcholinesterase 1 genes from insecticide resistant field populations of *Liposcelis paeta* Pearman (Psocoptera: Liposcelididae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 415-424, 2010.

XU, Q.; LIU, H.; ZHANG, L.; LIU, N. Resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, and possible mechanisms for resistance. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 61, n. 11, p. 1096-1102, 2005.

YU, S. J. Insect glutathione S-transferases. **Zoological Studies**, Taipei, v. 35, p. 9-19, 1996.

ZHOU, Z. J. Health problem caused by long-term organophosphorus pesticides exposures – study in China. In: Pesticides in the Modern World – Effects of Pesticides Exposure, 2011. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/statistics/pesticides-in-the-modern-world-effects-of-pesticides-exposure/health-problem-caused-by-long-term-organophosphorus-pesticides-exposure-study-in-china>

CAPÍTULO 2: Padrão de resistência ao *Malathion* e atividade da acetilcolinesterase em populações de *Zaprionus indianus* GUPTA 1970 (Diptera: Drosophilidae) oriundas do cerrado

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Zaprionus indianus* e a bionivásio nas Américas

A família Drosophilidae, que inclui o gênero *Zaprionus*, abrange mais de 4 mil espécies amplamente distribuídas em todo o mundo em vários ecossistemas (BACHLI, 2011). Por serem insetos pequenos, numerosos, de ciclo de vida curto, facilmente coletados e manipulados, são comuns nos estudos de genética, evolução, biologia do desenvolvimento, sistemática, ecologia e biologia molecular (POWELL, 1997; BROKKES, 2001; MATA et al., 2008; GARCIA et al., 2012). Além de serem importantes na composição das comunidades, também são extremamente sensíveis às variações ambientais, por isso drosofilídeos constituem uma ferramenta muito utilizada em estudos de conservação biológica, servindo como bioindicador de perturbação antrópica (POWELL, 1997; MATA et al., 2008; MATA et al., 2010; MATA; TIDON, 2013).

O gênero *Zaprionus* (COQUILLET, 1902) é composto por dois subgêneros e mais de 50 espécies (CHASSAGNARD; KRAAIJEVELD, 1991; CHASSAGNARD; TSACAS, 1993; YASSIN; DAVID, 2010). As espécies do gênero *Zaprionus* apresentam como características morfológicas principais a presença de faixas longitudinais branco-prateadas na região dorsal da cabeça e do tórax, geralmente bordejadas de faixas negras, possuindo entre 2,5 e 3,0 mm de comprimento, coloração marrom e olhos vermelhos (CHASSAGNARD; KRAAIJEVELD, 1991; CHASSAGNARD; TSACAS, 1993; VILELA et al., 2000). A mosca-do-figo, como foi denominada no Brasil, é atraída por substâncias voláteis liberadas pelos frutos durante o processo de maturação. Alimenta-se principalmente de bactérias e leveduras que participam da fermentação de substratos ricos em carboidratos, principalmente a levedura *Candida tropicalis* (GOMES et al., 2003).

A principal hipótese para a introdução de *Zaprionus indianus* no Brasil é que ela acidentalmente chegou em um carregamento de caqui, tendo o seu primeiro registro na região de Santa Isabel – SP, no ano de 1999 (VILELA, 1999). Independentemente do tamanho e número de propágulos na introdução, esse drosofilídeo já se encontrava em todas as regiões do país em menos de dois anos após o seu primeiro registro (COMMAR

et al., 2012). Entre todas as espécies de drosofilídeo, *Z. indianus* é a mais ecologicamente diversificada, sendo encontrada em diferentes plantas hospedeiras (YASSIN; DAVID, 2010). Essa ocupação generalista de nicho pode ser o aspecto biológico que propiciou as condições de se estabelecer em diferentes ecossistemas brasileiros, apresentando um excelente modelo para os estudos de invasões biológicas (PIRES et al., 2008; COMMAR et al., 2012).

Zaprionus indianus foi registrada pela primeira vez no continente norte americano em Chiapas, no México em 2002 (CASTREZANA, 2007). A atual distribuição dessa espécie na América do Norte é incerta, mas já foi relatada nos estados da Carolina do Sul, Florida, Alabama, Mississippi, Texas, Arizona, Califórnia, Virginia e Pensilvânia (VAN DER LINDE et al., 2006, VAN DER LINDE, 2010; JOSHI et al., 2014), Ontário do Sul e Quebec no Canadá (RENKENA et al., 2013). Apesar da preferência por climas quentes (SILVA et al., 2005; GARCIA et al., 2008). Estudos com populações de *Z. indianus* indicaram que a espécie permanece no estágio de ovo e pupa durante períodos mais frios até que condições mais quentes e favoráveis para o seu desenvolvimento ocorram (ALAWAMLEH, 2016). A adaptação de *Z. indianus* a climas mais frios sugere uma plasticidade na tolerância ao impacto ambiental, indicando uma grande capacidade adaptativa para invadir, colonizar e sobreviver em ambientes de regiões temperadas (MATA et al., 2010, LASA; TODEO, 2015).

Outra característica importante, que também pode contribuir para a adaptabilidade de *Z. indianus*, é o seu alto poder de competitividade com espécies nativas. No Brasil, a mosca do figo mostrou um comportamento atípico de drosofilídeos, colonizando frutos antes da sua maturação (VILELA et al., 2001). Esse comportamento influencia na aptidão de espécies que chegam posteriormente aos frutos, contribuindo para a diminuição do seu tamanho corporal e aumentando o tempo de desenvolvimento das espécies tardias, além de conferir vantagem de dispersão da mosca do figo sobre as demais espécies de drosofilídeos (SHORROCKS; BINGLEY, 1994; VILELA et al., 2001). O estudo de Galego e Carareto (2005) mostrou que a presença de larvas *Z. indianus* interferiu na viabilidade e no tempo de desenvolvimento de outros drosofilídeos.

A espécie *Z. indianus* é nativa da África Tropical e ocorre nas regiões Afrotropical, Oriental e Australiana (VILELA et al., 2000). A alta similaridade nas condições ambientais do ambiente de origem com o ambiente de destino também pode ter contribuído para que essa espécie obtivesse sucesso na região Neotropical (DOGE et al., 2015). Atualmente essa espécie tem apresentado uma diminuição na sua abundância

nas regiões invadidas. A espécie apresentou uma grande expansão demográfica após a invasão, porém com posterior redução populacional e tornou-se mais restrita a ambientes urbanos (COMMAR et al., 2012; GARCIA et al., 2012; MATAVELLI et al., 2015).

Estudos sobre a prevalência de espécies nativas em ambientes conservados e de espécies exóticas em ambientes alterados indicam que a dominância de espécies exóticas em ambientes perturbados é comum (FERREIRA; TIDON, 2005; MCKINNEY, 2006; GOTTSCHALK et al., 2007; SCHNITZLER et al., 2007). No estudo realizado em Porto Alegre (GARCIA et al., 2012), *Z. indianus* apresentou-se como um importante bioindicador de perturbação antrópica, de forma que a abundância de *Z. indianus* aumentava conforme o grau de perturbação da área ou a proximidade com áreas urbanas, sendo sua presença inexistente em áreas de conservação ambiental. Além disso, áreas com aplicação regular de agrotóxicos também apresentam a ocorrência da espécie (GALEGO; CARARETO, 2009), o que a torna adequada para estudos de biomonitoramento de áreas com poluição por inseticidas.

1.2 O organofosforado malathion

Inseticidas são muito utilizados como controle de vetores de doenças e de pragas agrícolas, porém o uso indiscriminado de inseticidas pode causar a contaminação do meio ambiente, afetando o solo, o ar e as águas superficiais e subterrâneas (SILVA et al., 2013; BORSOI et al., 2014; LIMA, 2016).

A grande expansão da fronteira agrícola do país, visando suprir as necessidades de consumo interno tanto quanto as exigências do mercado exterior, abriu portas para o investimentos em maquinário agrícolas mais eficientes e de alta tecnologia que permitiram a produção em grande escala (LIMA, 2016). Afim de evitar o ataque de pragas, é comum a aplicação de pesticidas nas lavouras, para garantir a qualidade da produção (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012). Entretanto, muitas vezes esses pesticidas são aplicados de forma arbitrária, sem conhecimento técnico, de forma constante e algumas vezes até desnecessária.

Um dos organofosforados mais utilizados no Brasil é o *Malathion* (O, O-dimetil S1-2-di (etoxicarbonil) etilfosforoditioato), com ampla utilização na agricultura e uso domiciliar, bem como em programas de saúde pública no controle de vetores de doenças (DELGADO, 2006). É classificado na farmacologia como um anticolinesterásico, pois ele atua inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) (QUERINO, 2000). Os

pesticidas organofosforados reagem com as enzimas que possuem resíduos do aminoácido serina, no sítio ativo que decompõe a acetilcolina, após a transmissão do impulso nervoso de um neurônio a outro (QUERINO, 2000; HEMINGWAY, 2000). Devido à alta afinidade química entre o composto organofosforado e a enzima no sítio catalítico das esterases, a inibição é irreversível (BRAGA; VALLE, 2007).

O uso contínuo de inseticidas tem favorecido as populações resistentes a se estabelecerem, ocasionando problemas para o controle de insetos (BRAGA; VALLE, 2007). Embora existam vários estudos documentados sobre resistência a inseticidas, o número de mecanismos envolvidos é pequeno, e os principais mecanismos genéticos descritos na literatura estão relacionados à diminuição da taxa de penetração do inseticida pela cutícula, à detoxificação metabólica aumentada e à diminuição da sensibilidade do sítio ativo (BRAGA; VALLE, 2007).

1.3 Acetilcolinesterase (AChE)

A AChE é uma isoenzima do grupo das esterases que atua na hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético nas sinapses nervosas (ALDRIDGE, 1953). Está presente em todo o sistema nervoso central e periférico, atuando na transmissão dos impulsos nervosos, sinalizando o término dos impulsos nervosos na membrana pós-sináptica (QUINN, 1987, FUKUTO, 1990, GRISARU et al., 1999, TÕUGU, 2001, ROCHA JÚNIOR et al., 2004, SILMAN; SUSSMAN, 2005). Possui uma grande importância para a genética e toxicologia e o aumento na sua atividade metabólica tem sido reportada como o principal mecanismo de resistência aos inseticidas organofosforados (CALLAGHAN et al., 1994, HEMINGWAY, 2000). Estágio de vida, sexo, tecidos, hormônios, alimentos e condições ambientais são alguns dos fatores que podem alterar o nível de enzimas nos organismos. Estudos sugerem que as isoenzimas apresentam um alto grau de polimorfismo em drosophilas e outros organismos, podendo estar relacionadas à evolução da adaptabilidade nessas espécies (VILLATTE; BACHMANN, 2002; LI et al. 2005; BAFFI et al., 2007)

Os organofosforados exercem uma ação tóxica por meio da inibição da acetilcolinesterase, que é essencial para a função nervosa em insetos, resultando na acumulação de acetilcolina na fenda sináptica, não havendo interrupção no impulso nervoso, provocando sinais de intoxicação e podendo provocar a morte por hiperativação

do sistema nervoso em insetos (ECOBICHON, 2001; CHAMBERS, 2010; COLOVIC et al., 2013). Nesse sentido, as isoenzimas esterases estão relacionadas com o valor adaptativo de resistência e degradação de inseticidas organofosforados (FIELD; DEVONSHIRE, 1998; GUERRERO, 2000; BAFFI, 2006).

Um dos mecanismos de resistência, envolvendo a atividade de AChE, é a superprodução de esterases que atuam sequestrando as moléculas dos inseticidas, dificultando sua chegada ao sítio de ação e provocando a inativação da acetilcolinesterase (HEMINGWAY, 2000). Outro mecanismo que confere resistência a inseticidas é a amplificação de genes associados a uma superexpressão das enzimas de detoxificação, sendo que apenas o gene *ace-1* está relacionado com o fenômeno de resistência (FOURNIER et al., 1993, WEILL et al., 2002; WEILL et al., 2004; LIX; BERENBAUM, 2007, WU et al., 2010, KAKANI et al., 2011, BARIAMI et al., 2012, FAUCON et al., 2015).

1.4 Resistência genética a inseticidas

Os artrópodes, de maneira geral, apresentam uma grande habilidade de adaptação ao uso de produtos químicos, relacionada a fatores genéticos, bioecológicos e operacionais (GALLO et al., 2002). Uma das mais importantes questões da biologia evolutiva trata da variação genética existente em populações de organismos e a significância adaptativa dessa variação (SPACKMAN et al., 1994). Em ambientes sujeitos a pressão seletiva de agrotóxicos, os alelos que conferem resistência a inseticidas tendem a aumentar sua frequência (GALEGO; CARARETO, 2010).

Após testes de resistência com organofosforados em carrapatos, foi possível identificar que uma das esterases estava presente somente em espécies tolerantes e outra estava presente em todas as linhagens e apresentava atividade enzimática crescente, de acordo com o nível de resistência (BAFFI, 2006). Em *Culex quinquefasciatus* a resistência a organofosforados (OP) ocorre pelo aumento da produção de esterase, devido à amplificação das cópias de um gene (RAYMOND et al., 1998; HAWKES; HEMINGWAY, 2002). Já em espécies de *Anopheles* resistentes ao *malathion*, é possível encontrar níveis elevados de uma esterase cuja a atividade de hidrólise é superior quando comparada aos indivíduos não resistentes (HEMINGWAY, 2000).

A resistência a OP em *Musca domestica* foi associada a alterações tanto em genes envolvidos com a resistência metabólica quanto na sequência da enzima

acetilcolinesterase (SYVANEN et al., 1996; RUSSEL et al., 2004). Dados obtidos no estudo com *Z. indianus* confirmam a presença de um loco marcador para ambientes expostos ao *malathion*, conferindo a essa espécie numerosas possibilidades de uso como bioindicador para monitorar o uso excessivo de organofosforados, a evolução da resistência a inseticidas e a elaboração de planos de manejo de pragas (GALEGO; CARARETO, 2010).

Nesse sentido, os objetivos desse trabalho foram apresentar a abundância relativa de *Z. indianus*; investigar os padrões de resistência ao *malathion* nas populações de estudo através do bioensaio; comparar a atividade da enzima AchE em populações de *Z. indianus*; verificar o uso potencial da AchE de *Z. indianus* para o biomonitoramento de poluição ambiental por *malathion*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Biológico

Adultos de *Zaprionus indianus* foram coletados em áreas urbanas das seguintes regiões (Figura 1): Guaíra (SP), localizada a 20°19'06'' S e 48°13'48'' O, São José do Rio Preto (SP), localizada a 20°49'12'' S e 49°22'44'' O, Uberaba (MG), localizada a 19°44'52'' S e 47°55'55'' O e Uberlândia (MG), localizada a 18°55'08'' S e 48°16'37'' O. As coletas ocorreram durante a estação chuvosa no período de setembro de 2016 a fevereiro de 2017. Em cada ponto de coleta foram colocadas três armadilhas contendo banana e fermento biológico a 1,80m a partir do chão e separadas entre si por 3m. Uma vez coletados, o material foi levado ao Laboratório de Zoologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, onde os indivíduos de *Z. indianus* foram separados das demais espécies e a sua frequência relativa foi calculada, além da contagem de machos e fêmeas para a espécie. Como trata-se de um estudo populacional, sem a intenção de se avaliar a guilda de Drosophilidae em cada área, somente a espécie *Z. indianus* foi considerada na identificação, sendo as demais identificadas como “outras”. Após a triagem e contagem, os indivíduos de *Z. indianus* foram mantidos em garrafas com meio de cultura banana-água em temperatura de 27°C, por 24 horas, para aclimação BOD.

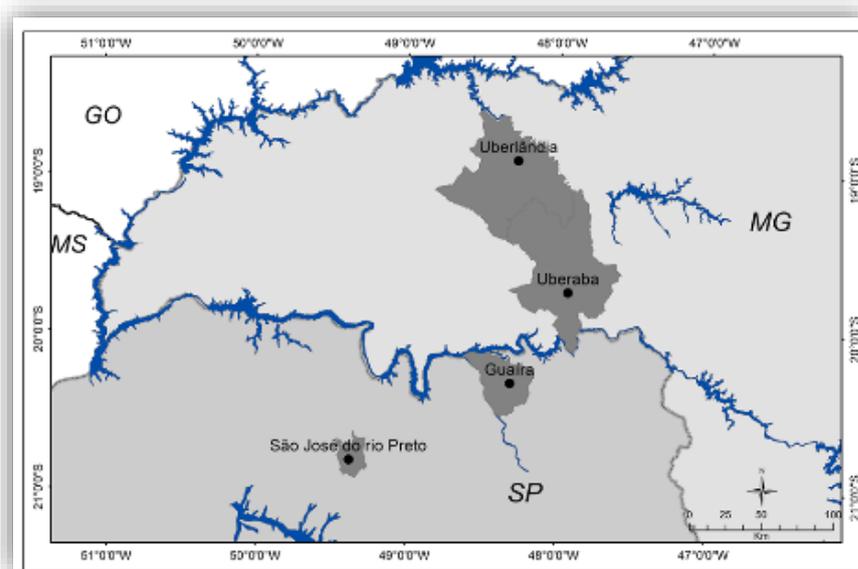


Figura 2: Áreas de coleta de *Zaprionus indianus* amostradas no presente estudo.

2.2 Bioensaio para a seleção de indivíduos resistentes ao *Malathion*

Após o período de aclimação, os indivíduos de *Z. indianus* foram utilizados nos bioensaios para a verificação do padrão de resistência ao *Malathion*. Foram amostrados 10 indivíduos, de cada população, independente do sexo, e expostos a diferentes concentrações de *malathion*. Foram preparadas, em quadruplicata, placas de Petri contendo papel absorvente onde foram aplicados 100 µl de solução de *Malathion*/Acetona com quatro concentrações diferentes: 0,02µl de *Malathion*/ cm², 0,002µl de *Malathion*/ cm², 0,0002µl de *Malathion*/ cm² e 0,00002µl de *Malathion*/ cm². Além dessas placas, também foi realizado um controle, para cada população, contendo 100 µl de acetona/placa.

Para cada população foram preparadas um total de 20 placas de Petri. As placas foram mantidas em temperatura de 27°C, na presença de luz, por cinco horas, sendo a mortalidade registrada em cada placa de hora em hora. Os indivíduos sobreviventes para cada população foram selecionados e suas cabeças foram utilizadas no preparo das amostras do ensaio enzimático. Para cada amostra foram utilizadas 20 cabeças maceradas em 200 µl de tampão de extração (Tris-HCl 8,8 0,1 M). O macerado resultante foi mantido em freezer até sua utilização.

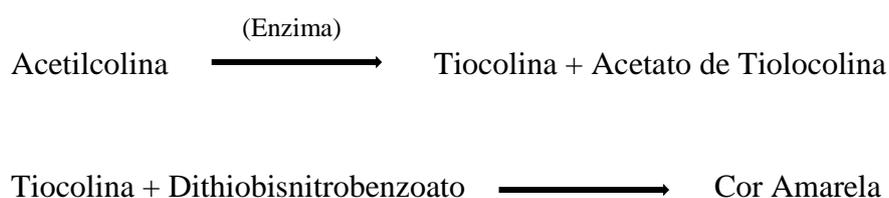
2.3 Ensaio Enzimático

O ensaio enzimático foi preparado com a adição de 800 µl de solução de extração (Tampão Tris – HCl 8,8 0,1 M, 20% sacarose, 1 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e 0,5% Trinton x-100 (v/v)) na amostra contendo 20 cabeças em 200 µl de solução tampão Tris-HCl 8,8, totalizando 1 ml. As amostras foram homogeneizadas em agitador durante um minuto. A solução homogeneizada foi centrifugada a 14.000 rpm por cinco minutos.

A análise da atividade enzimática foi realizada pelo método de Ellman et al (1961). A solução de análise foi preparada com 3,0 ml de solução tampão fosfato pH 8, 20 µl de substrato (Iodeto de Acetilcolina 0,075 M), 100 µl DNTB 0,01M (foi preparado 39,6 mg de 5: 5-ditiobis-2- Nitrobenzóico dissolvidos em 10 ml de solução tampão Tris-HCl 8,8 0,1 M e 15 mg de bicarbonato de sódio) e 50 µl de sobrenadante do homogeneizado. Essa amostra foi submetida a leitura no espectrofotômetro a 412 nm, realizado em triplicata para cada população estudada, durante 20 minutos com intervalos

de cinco minutos para cada leitura. Para cada ensaio, um controle sem a presença da enzima foi realizado em paralelo para estimar a hidrólise espontânea do substrato. Os 50 µl de sobrenadante da enzima foram adicionados imediatamente antes da leitura para que fosse possível estimar a atividade enzimática no ponto zero.

A atividade enzimática foi medida a partir do aumento da cor amarela produzida quando a tiocolina reage com o íon ditiobisnitrobenzoato. Baseia-se no acoplamento destas reações:



2.4 Ensaio de Inibição Enzimática

A inibição enzimática foi realizada, acrescentado à solução de análise (descrita anteriormente), 20 µl do inseticida *malathion* diluído em acetona, em quatro concentrações diferentes: 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm e 400 ppm. As amostras foram submetidas a leitura no espectrofotômetro a 412 nm, realizados em triplicata para cada população estudada, durante 20 minutos com intervalos de cinco minutos para cada leitura.

2.5 Dosagem de Proteína

A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada pelo método de Lowry et al (1951). A principal vantagem do método de Lowry é a sua alta sensibilidade para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios (ZAIA et al., 1998). A medição foi realizada como o intuito de correlacionar a atividade enzimática com a quantidade de proteínas, para determinação da atividade específica. Uma curva-padrão utilizando solução de albumina bovina 1,0 mg/ml em solução salina (NaCl 0,9%) foi realizada e a leitura feita em espectrofotômetro a 650 nm.

2.6 Análise Estatística

Os números de indivíduos totais das coletas foram contabilizados, sendo apenas identificados as espécimes de *Z. indianus*. O cálculo da abundância relativa (%), foi realizado através da seguinte fórmula: $\% = n \times (100/N)$, onde % é a percentagem da espécie que se quer calcular, n é o número de organismos da espécie, e N é o número total de organismos na amostra. As comparações da proporção sexual foram obtidas através do teste de qui-quadrado, com $p < 0,005$.

A média e o erro-padrão para cada grupo amostral foi realizada por meio do software *Excel for Windows*, bem como as análises de variância (ANOVA) para as comparações entre o tempo de atividade e a concentração do *Malathion* em cada grupo amostral. As ANOVA para as comparações entre o tempo mínimo e máximo (0 e vinte minutos, respectivamente) de medição da atividade enzimática, bem como da menor e maior concentração do *Malathion* em cada grupo (0 e 0,40 $\mu\text{l/ml}$ respectivamente) foi desenvolvida por meio do *Minitab 18*. No caso de diferenças significativas, foi realizada a comparação par-a-par por meio dos Teste t de Tukey, com $p < 0,05$. Além disso, os gráficos de atividade enzimática foram construídos por meio do *Excel for Windows*, assim como o da atividade enzimática por minuto.

3 RESULTADOS

3.1 Abundância relativa de *Z. indianus*

Foram coletados 3.182 espécimes de drosofilídeos, sendo destes 2.332 da espécie *Zaprionus indianus*, não havendo identificação específica dos outros 850 espécimes coletados, todos da ordem Diptera. Do total de indivíduos identificados, 1.275 foram coletados em Uberlândia - MG, 241 na região em Uberaba - MG, 552 em Guaíra - SP e 264 em São José do Rio Preto – SP (Tabela 1).

Dentre as populações estudadas, as populações de Guaíra (SP) e Uberlândia (MG) apresentaram diferença estatística na proporção sexual (Tabela 2), com um predomínio de indivíduos fêmeas. A proporção sexual de *Z. indianus* para as demais populações não diferiu estatisticamente.

Tabela 1: Número de indivíduos de *Z. indianus*, outras espécies de Diptera coletados em cada área amostrada e a abundância relativa (%).

| | <i>Z. indianus</i> | Outras | Total | % |
|-----------------------------------|--------------------|--------|-------|-------|
| Guaíra (SP) | 552 | 302 | 854 | 64,64 |
| São José do Rio Preto (SP) | 264 | 194 | 458 | 57,64 |
| Uberlândia (MG) | 1275 | 181 | 1456 | 87,57 |
| Uberaba (MG) | 241 | 173 | 414 | 58,21 |

Tabela 2: Número de machos (Nm) e fêmeas (Nf) de *Z. indianus* coletados em cada área amostrada e os valores de qui-quadrado obtidos nas comparações da proporção sexual.

| | Nm | Nf | Total | X ² * |
|-----------------------------------|-----|------|-------|------------------|
| Guaíra (SP) | 227 | 325 | 552 | 17,40** |
| São José do Rio Preto (SP) | 149 | 115 | 264 | 4,38 |
| Uberlândia (MG) | 218 | 1057 | 1275 | 552,1** |
| Uberaba (MG) | 130 | 111 | 241 | 1,50 |

*p<0,005 ** amostras com diferença significativa estatisticamente

3.2 Bioensaio

Na figura 2, pode-se ver a relação entre a mortalidade e as diferentes concentrações de *Malathion* realizadas no bioensaio. As populações coletada em São José do Rio Preto (SP) e Uberaba (MG) apresentaram taxas de mortalidade iguais, ocorrendo sobreposição no gráfico de linhas entre as duas localidades. As populações coletadas em Guaíra (SP) e Uberlândia (MG) apresentaram padrões de mortalidade muito próximos.

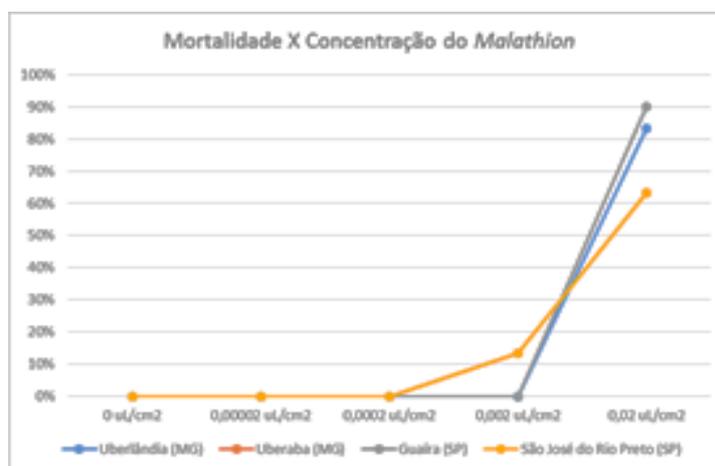


Figura 3: Mortalidade obtida para populações de *Z. indianus* amostradas no cerrado brasileiro submetidas, em laboratório, a diferentes concentrações do organofosforado *Malathion*.

Não houve diferença acentuada no padrão de resistência ao *Malathion*, quanto a sobrevivência dos indivíduos de *Z. indianus*, entre as localidades estudadas. A

mortalidade brusca ocorreu somente no ensaio com a maior concentração, 0,02 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ (Tabela 4), sendo, essa dosagem do *Malathion*, muito superior a CL50 (0,0003 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) detectada por Galego e Carareto (2010) em um estudo com populações de *Z. indianus* oriundas de áreas cultivadas e urbanizadas do cerrado paulista.

3.3 Ensaio Enzimático

A atividade enzimática da AChE obtida para cada população é apresentada na Figura 1. As populações de Uberlândia (MG) e Guaíra (SP) apresentaram um padrão similar de atividade enzimática, ligeiramente mais acentuado que Uberaba (MG) e São José do Rio Preto (SP) sobretudo a partir do tempo 10 minutos (Figuras 1 e 6 e Tabelas 1 e 2). Após vinte minutos de avaliação da atividade enzimática, detectou-se a formação de dois padrões de atividade: um alto, em Uberlândia (1,03), Guaíra (0,970) e Uberaba (0,942), e outro ligeiramente mais baixo em São José do Rio Preto (0,897), com diferenças significativas entre os dados de São José do Rio Preto e Uberlândia.

Tabela 4: Média e erros-padrão da atividade enzimática da AChE de *Z. indianus* em absorbância/ μg de proteína extraída de indivíduos oriundos de diferentes populações geográficas do cerrado brasileiro, em cada tempo de aferição da atividade, com substrato de análise tratado com diferentes concentrações de *Malathion*, bem como a ANOVA (F) para cada comparação entre grupos amostrais.

| População | Atividade Enzimática (absorbância/ μg de proteína) X _{±EP} (Tempo – min) | | | | | F _{3,9} |
|----------------------------|--|---------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|
| | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | |
| São José do Rio Preto (SP) | | | | | | |
| [] = 0,00 | 0,081±0,003 | 0,203±0,018 | 0,425±0,017 | 0,658±0,023 | 0,897±0,023 | 325,786*** |
| [] = 0,05 | 0,078±0,001 | 0,185±0,023 | 0,402±0,018 | 0,592±0,009 | 0,844±0,012 | 420,150*** |
| [] = 0,10 | 0,068±0,003 | 0,190±0,008 | 0,367±0,009 | 0,590±0,022 | 0,756±0,020 | 385,650*** |
| [] = 0,20 | 0,052±0,002 | 0,156±0,010 | 0,331±0,013 | 0,561±0,023 | 0,741±0,012 | 433,715*** |
| [] = 0,40 | 0,039±0,001 | 0,150±0,007 | 0,322±0,008 | 0,491±0,040 | 0,610±0,012 | 120,136*** |
| F _{3,9} | 76,994*** | 2,345 | 10,465** | 5,730* | 33,050*** | |
| Guaíra (SP) | | | | | | |
| [] = 0,00 | 0,090±0,001 | 0,214±0,007 | 0,497±0,002 | 0,765±0,019 | 0,970±0,019 | 882,613*** |
| [] = 0,05 | 0,085±0,002 | 0,234±0,012 | 0,442±0,004 | 0,625±0,007 | 0,854±0,008 | 1696,066*** |
| [] = 0,10 | 0,079±0,002 | 0,198±0,010 | 0,404±0,004 | 0,616±0,011 | 0,823±0,010 | 1324,241*** |
| [] = 0,20 | 0,061±0,001 | 0,186±0,005 | 0,393±0,007 | 0,607±0,008 | 0,829±0,015 | 1275,538*** |
| [] = 0,40 | 0,042±0,002 | 0,168±0,016 | 0,376±0,014 | 0,514±0,007 | 0,750±0,019 | 461,575*** |
| F _{3,9} | 97,562*** | 5,782* | 40,560*** | 60,566*** | 29,466*** | |

| | | | | | | |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|
| Uberaba (MG) | | | | | | |
| [] = 0,00 | 0,064±0,004 | 0,234±0,026 | 0,451±0,005 | 0,734±0,039 | 0,942±0,023 | 232,236*** |
| [] = 0,05 | 0,055±0,003 | 0,200±0,014 | 0,388±0,021 | 0,658±0,023 | 0,897±0,023 | 341,742*** |
| [] = 0,10 | 0,047±0,002 | 0,203±0,018 | 0,354±0,019 | 0,629±0,015 | 0,852±0,019 | 408,032*** |
| [] = 0,20 | 0,040±0,001 | 0,189±0,012 | 0,333±0,020 | 0,559±0,023 | 0,712±0,009 | 312,494*** |
| [] = 0,40 | 0,020±0,001 | 0,096±0,007 | 0,225±0,019 | 0,440±0,026 | 0,616±0,018 | 207,728*** |
| F _{3;9} | 49,057*** | 9,483** | 21,337*** | 17,736*** | 50,362*** | |
| Uberlândia (MG) | | | | | | |
| [] = 0,00 | 0,085±0,005 | 0,274±0,007 | 0,540±0,019 | 0,781±0,020 | 1,003±0,025 | 464,935*** |
| [] = 0,05 | 0,084±0,005 | 0,264±0,012 | 0,517±0,021 | 0,764±0,045 | 0,922±0,005 | 223,481*** |
| [] = 0,10 | 0,079±0,002 | 0,229±0,006 | 0,505±0,009 | 0,687±0,005 | 0,883±0,015 | 1407,063*** |
| [] = 0,20 | 0,067±0,003 | 0,210±0,011 | 0,458±0,003 | 0,643±0,011 | 0,860±0,012 | 1203,757*** |
| [] = 0,40 | 0,048±0,002 | 0,190±0,010 | 0,408±0,015 | 0,537±0,010 | 0,791±0,025 | 401,442*** |
| F _{3;9} | 16,234*** | 13,383*** | 11,952*** | 18,237*** | 18,823*** | |

[]: Concentração de *malathion* por amostra, em *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

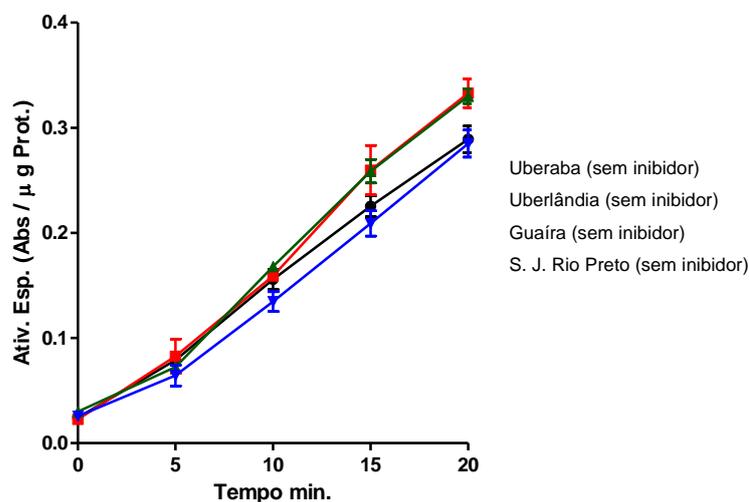


Figura 4: Atividade específica (absorbância/ μg de proteína) da AChE de *Z. indianus* versus tempo de reação (min) em cada área de coleta

3.4 Inibição Enzimática

Todas as amostras analisadas apresentaram inibição enzimática dependente da concentração do *Malathion* (Figuras 5 a 8). Aos 20 minutos, nas amostras de Uberlândia foi observada uma redução de atividade da ordem de 21% quando utilizada a concentração de 400 ppm; enquanto na mesma concentração do inibidor, as amostras de Uberaba, São José de Rio Preto e Guaíra apresentaram uma redução de atividade enzimática da ordem de 35%, 28% e 24% respectivamente.

As amostras de Uberaba e São José do Rio Preto apresentaram uma maior sensibilidade ao inibidor em relação aos demais (Tabela 2). Nesse sentido, dois agrupamentos de inibição foram detectados em relação as populações: um estatisticamente menos intenso em Guaíra e Uberlândia, e outro mais intenso em Uberaba e São José do Rio Preto (Tabelas 1 e 2).

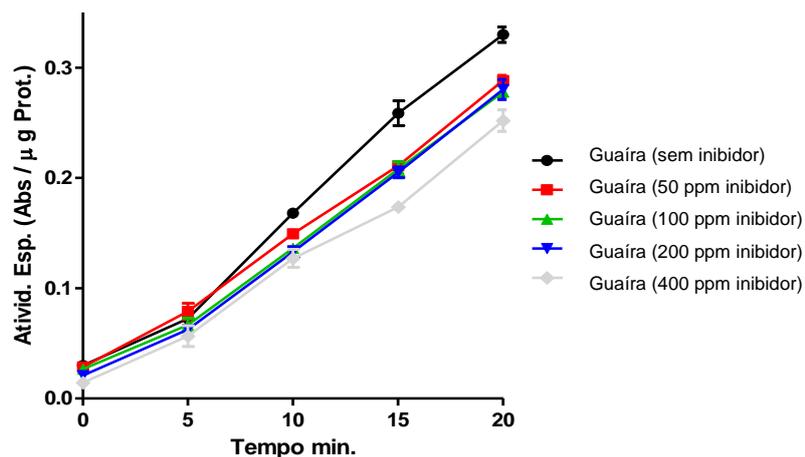


Figura 5: Atividade específica (absorbância/ μg de proteína) da AChE de *Z. indianus* versus tempo de reação (min) das coletas obtidas no município de Guaíra (SP) com diferentes concentrações de *Malathion* (ppm): 50, 100, 200 e 400.

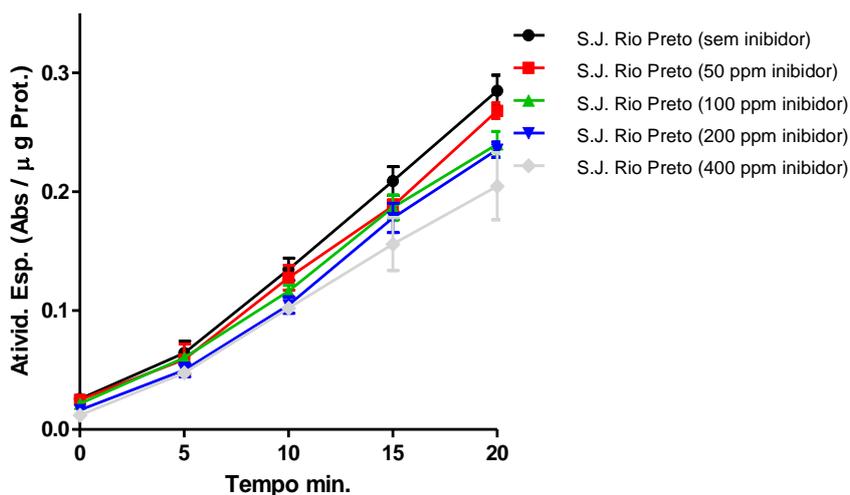


Figura 6: Atividade específica (absorbância/ μg de proteína) da AChE de *Z. indianus* versus tempo de reação (min) das coletas obtidas no município de São José do Rio Preto (SP) com diferentes concentrações de *Malathion* (ppm): 50, 100, 200 e 400.

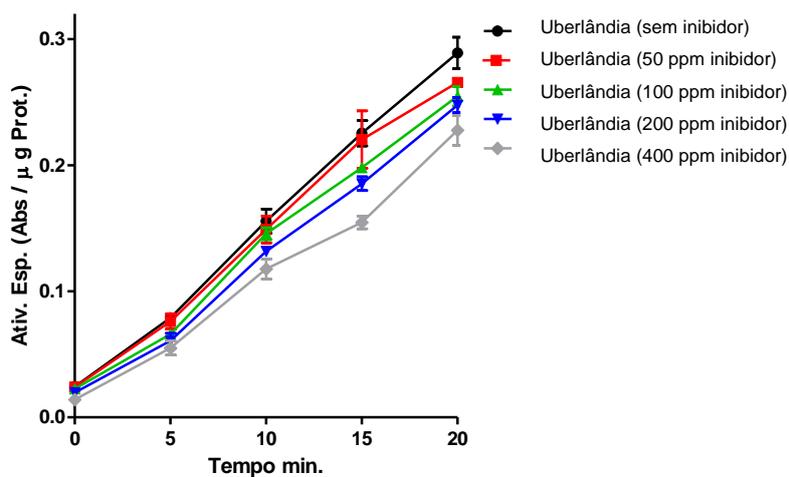


Figura 7: Atividade específica (absorbância/ μg de proteína) da AChE de *Z. indianus* versus tempo de reação (min) das coletas obtidas no município Uberlândia (MG) com diferentes concentrações de *Malathion* (ppm): 50, 100, 200 e 400.

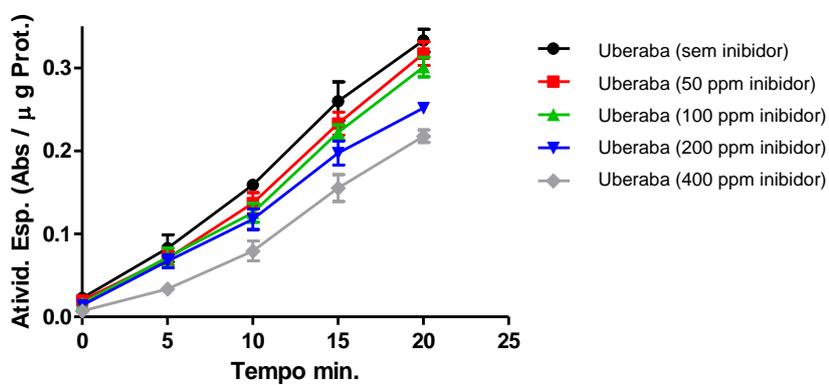


Figura 8: Atividade específica (absorbância/ μg de proteína) da AChE de *Z. indianus* versus tempo de reação (min) nas coletas obtidas no município de Uberaba (MG) com diferentes concentrações de *Malathion* (ppm): 50, 100, 200 e 400.

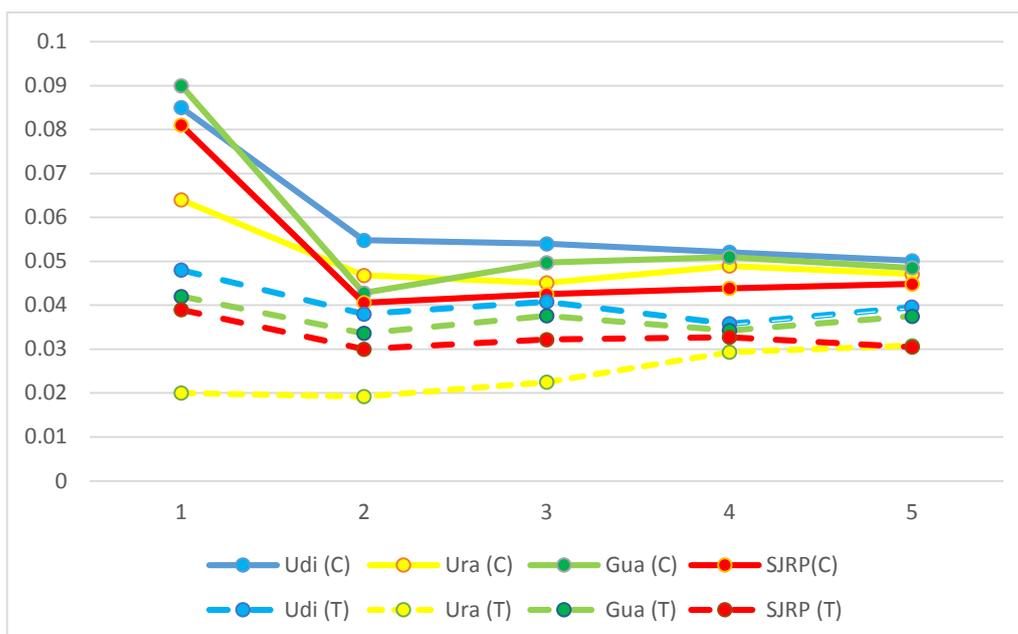


Figura 9: Atividade enzimática (absorbância/ μg de proteína) por minuto, em cada um dos tempos aferidos (1: 0 minuto; 2: 5 minutos; 3: 10 minutos; 4: 15 minutos; 5: 20 minutos) de AChE de *Z. indianus*. Para os ensaios bioquímicos, a solução de enzima-tampão de extração foi tratada (T) ou não (C) com uma dosagem de 400 ppm de *malathion*.

Tabela 5: Comparações par-a-par por meio do teste t de Tukey ($p < 0,05$) entre os dados de atividade da AChE (absorbância/ μg de proteína) para populações geográficas do cerrado brasileiro de *Z. indianus*. **1:** não tratado com *malathion* e tempo zero; **2:** não tratado com *malathion* e tempo vinte minutos; **3:** tratado com 0,40 $\mu\text{l/ml}$ de *malathion* e tempo zero; **4:** tratado com 0,40 $\mu\text{l/ml}$ de *malathion* e tempo vinte minutos

| | Udi 1 | Udi 2 | Udi 3 | Udi 4 | Ura 1 | Ura 2 | Ura 3 | Ura 4 | Gua 1 | Gua 2 | Gua 3 | Gua 4 | SJRP 1 | SJRP 2 | SJRP 3 | SJRP 4 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Udi1 | -- | *** | NS | *** | NS | *** |
| Udi2 | *** | -- | *** | *** | *** | NS | *** | *** | *** | NS | *** | *** | *** | ** | *** | *** |
| Udi3 | NS | *** | -- | *** | NS | *** | NS | *** |
| Udi4 | *** | *** | *** | -- | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | NS | *** | ** | *** | *** |
| Ura1 | NS | *** | NS | *** | -- | *** | NS | *** | NS | *** | NS | *** | NS | *** | NS | *** |
| Ura2 | *** | NS | *** | *** | *** | -- | *** | *** | *** | NS | *** | *** | *** | NS | *** | *** |
| Ura3 | NS | *** | NS | *** | NS | *** | -- | *** | NS | *** | NS | *** | NS | *** | NS | *** |
| Ura4 | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | -- | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | NS |
| Gua1 | NS | *** | NS | *** | NS | *** | NS | *** | -- | *** | NS | *** | NS | *** | NS | *** |
| Gua2 | *** | NS | *** | *** | *** | NS | *** | *** | *** | -- | *** | *** | *** | NS | *** | *** |
| Gua3 | NS | *** | -- | *** | NS | *** | NS | *** |
| Gua4 | *** | *** | *** | NS | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | -- | *** | *** | *** | *** |
| SJRP 1 | NS | *** | -- | *** | NS | *** |
| SJRP 2 | *** | ** | *** | ** | *** | NS | *** | *** | *** | NS | *** | *** | *** | -- | *** | *** |
| SJRP 3 | NS | *** | NS | *** | -- | *** |
| SJRP 4 | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | NS | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | -- |

NS: Não significativo; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.5 Dosagem de Proteínas

Tabela 6. Dosagem de proteínas totais em cada amostra

| Localidade | Proteínas totais |
|---------------------------------|-------------------------|
| Guaíra – SP | 148 µg/ml |
| São José do Rio Preto-SP | 157,3 µg/ml |
| Uberaba- MG | 141,3 µg/ml |
| Uberlândia- MG | 173,3 µg/ml |

A tabela 6 mostra a dosagem de proteínas totais em cada população, onde, a partir dela foi calculado a atividade específica (absorbância/ µg de proteína).

4 DISCUSSÃO

No Bioma Cerrado, *Z. indianus* está entre as três espécies de drosofilídeos mais abundantes, podendo representar aproximadamente 90% dos drosofilídeos coletados (TIDON, 2006). Um dos fatores mais relevantes para a diversidade em comunidades de insetos é a heterogeneidade espacial (KRIJGER; SEVENSTER, 2001). Em drosofilídeos ocorre agregação intraespecífica, muitas vezes influenciadas pela fragmentação de recursos, onde espécies competidoras não necessitam compartilhar o mesmo ambiente (SHORROCKS; SEVENSTER, 1995).

Em 1930, Fischer propôs a teoria de *sex ratio*, segundo a qual uma população bem adaptada, apresenta proporção sexual igual (SEGER; SUBBLEFIELD, 2002). Diferenças nas proporções sexuais em drosofilídeos podem estar associados a origem genética, fisiológica ou ambiental. A seleção natural pode manter um dos sexos em maior frequência, resultando em distorções na proporção sexual (SREERAMA REDDY; KRISHNAMURTHY, 1973). Desvios na população com predomínio de fêmeas, em drosofilídeos são comuns, muitas vezes associados ao fato dos machos serem mais ativos, estando mais suscetíveis ao risco de predação (SREERAMA REDDY; KRISHNAMURTHY, 1973).

Outro fator que pode influenciar a proporção sexual, principalmente em insetos, é o investimento que os machos realizam durante a corte das fêmeas, implicando uma seleção sobre a habilidade de competição entre os machos para conseguirem oportunidade para o acasalamento (KOKKO; JENNIONS, 2008). Tem sido considerado também, que as distorções na proporção sexual podem variar sazonalmente e são relatadas em maior quantidade em comunidades com tamanhos populacionais grandes (SREERAMA REDDY; KRISHNAMURTHY, 1973).

No presente estudo, obtive evidências dessa tendência nas populações coletadas em Uberlândia (MG), na qual houve um predomínio muito maior de indivíduos fêmeas em relação aos indivíduos machos, sendo a região do estudo onde ocorreu maior diferença significativamente estatística para esse parâmetro. Pode-se inferir também que pelo fato do município de Uberlândia ser o com maior densidade demográfica, com uma população estimada pelo IBGE 2016 em 669.672 habitantes, é a área em que possivelmente ocorra um maior grau de perturbação ambiental, podendo influenciar na proporção sexual nas populações de *Z. indianus*. Taxas de crescimento populacional de drosofilídeos podem

ser afetadas por vários fatores ambientais (DÖGE et al., 2015), portanto, são necessárias análises futuras para uma melhor compreensão das distorções na proporção sexual dessas moscas. Além disso, a espécie *Z. indianus* tende a ser mais abundante em áreas mais urbanizadas (GARCIA et al., 2012).

Áreas mais urbanizadas tendem a apresentar maior exposição a inseticidas utilizados no controle de vetores de doenças. O *Malathion*, por exemplo, é amplamente aplicado no controle de populações de *Aedes aegypti* e todas as localidades aqui amostradas apresentam histórico de aplicação desse OP.

A resistência aos inseticidas pode ser detectada em várias áreas de distribuição geográfica, existindo a possibilidade de que as populações resistentes apresentem diferentes padrões, dependendo do tipo e número de mecanismos envolvidos na resistência que evoluíram em cada população (LIEBMAN et al., 2015). Os resultados do bioensaio de susceptibilidade de insetos adultos de *Z. indianus* expostos ao *malathion* sugerem a evolução da resistência ao OP, uma vez que foram detectados indivíduos resistentes mesmo em concentrações superiores a CL50 detectada no estudo de Galego et al.; (2010) com populações do cerrado. Além disso, a resistência detectada entre as populações sugere a ação mecanismos de convergência adaptativa mediados pela seleção por *Malathion* nas áreas amostradas.

Os estudos com o monitoramento de resistência por meio de bioensaio são de grande importância, mas é preciso analisar também os parâmetros bioquímicos e moleculares, para que seja possível detectar os diferentes mecanismos de resistência e sua trajetória evolutiva ao longo do tempo. Devem ser estabelecidas relações entre os níveis externos de exposição, níveis internos de contaminação e efeitos adversos prévios (VAN DER OOST et al., 2003). Conhecer a suscetibilidade dos organismos, em relação ao uso de inseticidas, facilita na escolha dos planos de manejo para controlar qualquer população de espécies pragas ou de vetores de doenças. Esse monitoramento deveria ocorrer ao longo do tempo, em conjunto com os registros de aplicações do *malathion*, levando em consideração a dosagem e frequência com que esse produto é aplicado nas áreas dos campos de estudo.

O cenário atual apresenta uma grande preocupação, por parte das autoridades em saúde pública, no que se refere ao controle de vetores. Especialmente ao *Aedes aegypti*, que é o principal transmissor da dengue e da febre amarela urbana, e recentemente foi atribuído ao mesmo, a transmissão de doenças como a chikungunya e a zika. O controle químico ainda é uma das principais estratégias de controle de pragas e vetores. Nos

ambientes urbanos onde ocorrem maior prevalência de doenças transmitidas por insetos, são realizadas constantes pulverizações de inseticidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A poluição causada por esses compostos é complexa e necessita de uma demanda de estudos para que se possa avaliar os riscos que a população humana, os animais não alvos e os ecossistemas urbanos estão expostos. Os inseticidas organofosforados, como o *malathion*, são compostos frequentemente utilizados em ambientes antrópicos e são encontrados contaminando o ambiente em diversas regiões do mundo (CLAYTON et al., 2003; WANG et al., 2012). Compreender as interações dos inseticidas e os efeitos causados nos ambientes, torna-se importante para indicar o nível de degradação ou segurança de um ecossistema.

Mesmo não sendo alvo direto do controle químico, as populações de *Zaprionus indianus* estão submetidas em ambiente natural à pressão de seleção de várias classes de inseticidas. A exposição constante a esses compostos pode selecionar populações resistentes (BESERRA et al., 2007; PERRY et al., 2011).

A principal resposta metabólica frente a exposição ao inseticida é que cada molécula da enzima é capaz de sequestrar uma molécula do inseticida, reduzindo a quantidade de inseticida disponível para interagir com a acetilcolinesterase. Como podemos observar através de nossos testes de inibição enzimática, que independente da área de coleta e da concentração do *malathion*, ainda continuou apresentando atividade enzimática pela medida da absorvância, com diferenças significativas entre as populações.

Os indivíduos resistentes podem ter modificações genéticas, bioquímicas, fisiológicas, comportamentais e morfológicas e podem ser avaliadas através de análises moleculares, ensaios enzimáticos e bioensaios de suscetibilidade. O primeiro estudo de caracterização da atividade enzimática de esterases em *Z. indianus* foi realizada por Galego e Carareto (2006). Em 2010, os mesmos autores, confirmam a potencial adaptabilidade conferida pelo Est- 3 em ambientes sujeitos a exposição de inseticidas. Conferindo a *Z. indianus* a possibilidade para o uso dessa espécie como biomarcadora para monitorar o uso excessivo de inseticidas no ambiente.

Cada população de *Z. indianus* pode representar um caso específico de estudo, visto que padrões de resistência depende de fatores como os tipos de mutações envolvidas, a frequência dos genes ligados à resistência, o histórico de aplicações do inseticida e o nível de sensibilidade ao composto (HEMINGWAY et al., 2004).

Não podemos descartar a hipótese de diferenciação geográfica das amostras, uma vez que as coletas foram realizadas em locais diferentes, mesmo com condições climáticas e pluviométricas semelhantes. De um lugar para outro, os indivíduos podem ter sido submetidos diferentes pressões ocasionadas pelo uso de inseticidas, como intervalo de aplicação e a concentração do produto, podendo resultar assim, em diferentes graus de suscetibilidade e mecanismos de resistência.

Os indivíduos descendentes de uma população resistente, terão o mesmo padrão de resistência e a mesma estratégia de controle poderia ser aplicada. Se cada população teve uma origem independente, provavelmente cada uma terá um perfil de resistência diferente. Essa distinção de diferentes mecanismos de resistência é de suma importância para a prática no gerenciamento de resistência, considerando que as ações a serem aplicadas deverá levar em consideração o cenário evolutivo de cada um.

5 CONCLUSÃO

As informações obtidas nesse trabalho buscam compreender o papel de um dos mais importantes inseticidas utilizados no controle de vetores no Brasil, o *Malathion*. Uma vez que o ambiente urbano é constantemente impactado pela atividade antrópica, levando ao acúmulo de poluentes ambientais que podem afetar a saúde humana e causar relevantes danos ao ecossistema.

O conjunto de dados obtidos nesse trabalho reforça os resultados de estudos anteriores com populações de *Z. indianus* oriundas do cerrado brasileiro, nos quais há relatos de grande abundância da espécie em comunidades de drosofilídeos. A espécie é também fortemente associada a ambientes urbanos, com níveis significativos de perturbação e possuem um alto padrão de resistência ao inseticida *Malathion*. A partir dessas afirmações, podemos concluir que *Z. indianus* pode ser utilizada como uma espécie *repórter* para o monitoramento da contaminação ambiental por *malathion*. Devido a possibilidade de inseticidas causarem desequilíbrios no ambiente, é de grande importância detectar os efeitos da dissipação do *malathion* e quais consequências estas substâncias estão causando nos organismos.

Incorporar o uso de insetos biomarcadores para avaliar a qualidade ambiental de um ecossistema, como *Z. indianus*, tem se mostrado uma ferramenta extremamente importante para a caracterização das exposições aos inseticidas, para monitorar o uso excessivo desses produtos e a partir desses conhecimentos, contribuir para a elaboração de estratégias para a gestão de controle de insetos pragas e vetores. Os dados aqui apresentados, relacionam aspectos bioquímicos enzimáticos na inibição por *malathion*, os quais poderão auxiliar no direcionamento de estudos futuros, ligados à avaliação de risco ecológico pela contaminação de inseticidas no ambiente urbano.

6 CONCLUSÕES GERAIS

A espécie invasora *Zaprionus indianus* GUPTA 1970 (Diptera: Drosophilidae) constitui um organismo modelo para vários estudos em biologia, uma vez que é abundante nas regiões tropicais, é de fácil coleta e manutenção em laboratório e suas características morfológicas permitem sua rápida identificação em relação a outras espécies da família.

Os dados aqui obtidos permitem a proposição da utilização da espécie como uma biomarcadora de poluição ambiental por *malathion*, um organofosforado utilizado amplamente no controle de vetores de doenças em áreas urbanas e no controle de pragas agrícolas, uma vez que os dados de abundância relativa da espécie obtidos no presente estudo apresentam correlação com os padrões de resistência das populações, de forma que populações com alta densidade desse drosofilídeo poderia indicar, mesmo que indiretamente, a utilização do OP.

Além disso, os dados do ensaio enzimático para a mensuração da atividade da AChE da espécie indicou diferenças de resposta inibitória ao *malathion* nas diferentes populações. Uma vez que a técnica tem um custo de execução relativamente baixo e os resultados podem ser obtidos em um tempo curto, o ensaio enzimático com a AChE de *Z. indianus* poderia ser utilizado no monitoramento da contaminação ambiental por *malathion*.

Dessa forma, propõe-se a seguinte metodologia de monitoramento de contaminação por *malathion* utilizando como bioindicadora a espécie *Z. indianus*:

- a) Verificação de histórico de aplicação do *malathion* na localidade;
- b) Coleta de *Z. indianus* para se estimar a abundância relativa e o tamanho populacional da espécie na localidade;
- c) Caso haja abundância alta da espécie, realizar o ensaio bioquímico de atividade da AChE de *Z. indianus* conforme descrito aqui;
- d) Comparar os dados da atividade enzimática da AChE com aqueles obtidos no presente estudo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAWAMLEH, A.; KATBEH-BADER, A.; HASSAN, N.; AL-JBOORY, I.; D'ONGHIA, A. M. Biological studies on the african fig fly, *Zaprionus indianus* gupta (DIPTERA: DROSOPHILIDAE). **Agriculture & Forestry**, Podgorica, v. 62, n. 4, p.65-71, 2016.

BÄCHLI, G. TaxoDros: the database on taxonomy of Drosophilidae. 2017. Consultado em fevereiro de 2017. Disponível em: <http://www.taxodros.uzh.ch/>

BAFFI, M. A. Esterases e resistência a acaricidas no carrapato bovino *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae). Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

BAFFI, M. A., C. D. PEREIRA, C.D., G. R. L. de SOUZA, G.R.L., CERON, C.R., BONETTI, M. Esterase profile in the postembryonic development of *Rhipicephalus microplus*. **Pesq. Agropec. Bras.**, vol. 42, p. 1183-1188, 2007.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C.R.M.; QUEIROGA, M.F.C.; CASTRO JR, F.P. Resistência de Populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) ao Organofosforado Temefós na Paraíba, Brasil. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 36, n. 2, p. 303-307, 2007.

BRAIBANTE, M.E.F.; ZAPPE, J.A. A Química dos Agrotóxicos. Química e Sociedade: **Química Nova na Escola**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p.10-15, fev. 2012.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, 2007.

BORSOI, A.; SANTOS, P.R.R.; TAFFAREL, L.E. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**, Cascavel, v. 3, n. 1, p.86-100, 2014.

BROOKES, M. Fly: an experimental life. **Weidenfeld & Nicolson**, London, p. 192, 2001.

CALLAGHAN, A., BOIROUX, V., RAYMOFLD, M., PASTEUR, N. Prevention of changes in electrophoretic mobility of overproduced esterase from organophosphate-

resistant mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. **Med. Veterin. Entomol.** vol. 8, p. 391-394, 1994.

CASTREZANA, S. New records of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) in North America and a key to identify some *Zaprionus* species deposited in the Drosophila Tucson Stock Center. **Dros. Inf. Serv.**, Tucson, v. 90, p.34-36, 2007.

CHASSAGNARD, M. T.; KRAAIJEVELD, A. R. The occurrence of *Zaprionus sensu stricto* in the Palearctic region (Diptera: Drosophilidae). **Annales Société Entomologique de France** (N.S.), vol. 27, p. 495–496, 1991.

CHASSAGNARD, M. T.; TSACAS, L. Le sous-genre *Zaprionus* Définition de groupes d'espèces et révision du sousgoup vittiger (Diptera: Drosophilidae). **Annales Société Entomologique de France**, vol. 29, n. 2, p. 173-194, 1993.

CLAYTON, C. A.; PELLIZZARI, E. D.; WHITMORE, R. W. Distributions, associations, and partial aggregate exposure of pesticides and polynuclear aromatic hydrocarbons in the Minnesota Children's Pesticide Exposure Study. **Journal of exposure analysis and environmental epidemiology**, v. 13, n. 2, p. 100–111, 2003.

COMMAR, L.S.; GALEGO, L.G.C.; CERON, C.R.; CARARETO, C.M.A. Taxonomic and evolutionary analysis of *Zaprionus indianus* and its colonization of Palearctic and Neotropical regions. **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 395-406, 2012.

COQUILLET, D. W. **New Diptera from Southern Africa**. Washington: Proceedings Of The National Museum, p. 27-32, 1902.

DELGADO, E. H. B. Disfunção respiratória mitocondrial e estresse oxidativo após exposição crônica ao malathion. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Criciúma, 2006.

DÖGE, J.S.; OLIVEIRA, H.V.; TIDON, R. Rapid response to abiotic and biotic factors controls population growth of two invasive drosophilids (Diptera) in the Brazilian Savanna. **Biological Invasions**, Rio do Sul, v. 17, n. 8, p.2461-2474, abr. 2015

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FERREIRA, L.B.; TIDON, R. Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. **Biodiversity And Conservation**, Brasilia, v. 14, n. 8, p.1809-1821, jul. 2005

FIELD, L. M.; DEVONSHIRE, A. L. Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) are part of a gene family. **Biochem. J.**, vol 330, p. 169-173, 1998.

GALEGO, L. G. C.; CARARETO, C. M. A. Effects of intraspecific and interspecific pre-adult competition on the neotropical region colonizer fly *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). *Bragantia* (São Paulo), vol. 64, p. 249-255, 2005.

GALEGO, L. G., C. R. CERON, C.R., C. M. CARARETO, C. M. Characterization of esterases in a Brazilian population of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). **Genética**, vol 126, p. 89-99, 2006.

GALEGO, L. G. C.; CARARETO, C. M. A. Variation at the Est3 locus and adaptability to organophosphorous compounds in *Zaprionus indianus* populations. **Entomologia Experimentalis e Applicata**, São José do Rio Preto - Sp, v. 134, n. 1, p.97-105, jan. 2010.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, p. 345, 2002.

GARCIA, A.C.; VALIATI, V.H.; GOTTSCHALK, M.; ROHDE, C.; VALENTE, V.L.S. Two decades of colonization of the urban environment of Porto Alegre, southern Brazil, by *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae). **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, v. 98, n. 3, p. 329-338, set. 2008.

GARCIA, A.C.; HOCHMÜLLER, C.J.C.; VALENTE, V.L.S.; SCHMITZ, H.J. Drosophilid Assemblages at Different Urbanization Levels in the City of Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, Porto Alegre, v. 41, n. 1, p.32-41, fev. 2012.

GOMES, L.H.; ECHEVERRIGARAY, S.; CONTI, J.H.; LOURENÇO, M.; VINICIUS, M.; DUARTE, K.M.R. Presence of the yeast *Candida tropicalis* in figs infected by the fruit fly *Zaprionus indianus* (diptera: Drosophilidae). **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 5-7, Apr. 2003 .

GOTTSCHALK, M.S.; DE TONI, D.C.; VALENTE, V.L., HOFMANN, P.R.P. Changes in Brazilian Drosophilidae (Diptera) assemblages across an urbanisation gradient. **Neotropical Entomology** ., Londrina, v. 36, n. 6, p. 848-862, Dec. 2007 .

GUERRERO, F. D. Cloning of a horn fly cDNA, *HiaE7*, encoding an esterase whose transcript concentration is elevated in diazinon-resistant flies, **Insect Biochem. Mol. Biol.**, vol. 30, p. 1107–1115, 2000.

HAWKES, N. J.; HEMINGWAY, J. Analysis of the promoters for the beta-esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, Amsterdam, v. 1574, n. 1, p. 51-62, 2002.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.30, p. 1009-1015, 2000.

JOSHI, N.; BIDDINGER, D.; DEMCHAK, K.; DIPPEN, A. First Report of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in Commercial Fruits and Vegetables in Pennsylvania. **Journal Of Insect Science**, Biglerville, v. 14, n. 1, p.259-259, nov. 2014.

KRIJGER, C.L.; SEVENSTER, J.G. Higher species diversity explained by stronger spatial aggregation across six neotropical *Drosophila* communities. **Ecological Letters**, London, vol. 4, p. 106-115, 2001.

KOKKO, H.; JENNIONS, M. D. Parental investment, sexual selection and sex ratios. **Journal of Evolutionary Biology**, vol. 21, p. 919–948, 2008.

LASA, R.; TADEO, E. Invasive Drosophilid Pests *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in Veracruz, Mexico. **Florida Entomologist**, Xalapa, v. 98, n. 3, p.987-988, set. 2015

LI, A. Y., J. H. PRUETT, J.H., DAVEY, R. B., GEORGE, J.E. Toxicological and biochemical characterization of coumaphos resistance in the San Roman strain of *Dermatophagoides microplus* (Acari, Ixodidae). **Pesticide Biochemistry Physiology**, 2005, 81: 145-153.

LIEBMAN, K.A.; PINTO, J.; VALLE, J.; PALOMINO, M.; VIZCAINO, L.; BROGDON, W.; LENHART, A. Novel mutations on the ace-1 gene of the malária vector *Anopheles albimanus* provide evidence for balancing selection in an area of high insecticide resistance in Peru. **Malaria Journal**, vol. 14, n.74, p. 1 – 10, 2015.

LIMA, A.L.S.; OLIVEIRA, S.E.M.; REZENDE, A.L.T. Agrotóxicos: presença diária nos alimentos consumidos. **Revista Semioses**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p.9-22, out. 2016.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, vol.193, p. 265-275,1951.

MATA, R.A.; MCGEOCH, M.; TIDON, R. Drosophilid assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the Brazilian Savanna. **Biodiversity And Conservation**, v. 17, n. 12, p.2899-2916, 7 maio 2008.

MATA, R.A.; TIDON, R.; CÔRTEZ, L.G.; DEMARCO, P.; DINIZ-FILHO, J.A.F. Invasive and flexible: niche shift in the drosophilid *Zaprionus indianus* (Insecta, Diptera). **Biological Invasions**, v. 12, n. 5, p.1231-1241, ago 2009.

MATA, R.A., TIDON, R., The relative roles of habitat heterogeneity and disturbance in drosophilid assemblages (Diptera; Drosophilidae) in the Cerrado. **Insect Conserv.Biodivers.** vol.6, p. 663–670, 2013.

MATAVELLI, C.; CARVALHO, M.J.; MARTINS, N.; MIRTH, C. Differences in larval nutritional requirements and female oviposition preference reflect the order of fruit

colonization of *Zaprionus indianus* and *Drosophila simulans*. **Journal Of Insect Physiology**, Rio Claro, v. 82, p.66-74, set. 2015.

MCKINNEY, M. Urbanization as a major cause of biotic homogenization. **Biological Conservation**, Knoxville, v. 127, p.247-260, 2006.

MEGEED, M.S., GALAL, O.A., ABDEL-RAZEK, M.M. Phylogenetic relationship of na invasive drosophilid, *Zaprionus indianus* and closely related species of Drosophilidae (Diptera) based on esterase patterns. **Egypt. J. Genet. Cytol.**, vol. 44, p.281-290, 2015

PERRY, T.; BATTERHAM, P.; DABORN, P. J. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford, v. 41, n. 7, p. 411-422, 2011.

PIRES, D.J.; BELO, M.; BARBOSA, J.C. Life history estimatives in two geographic strains of *Zaprionus indianus*. **Biodiversidade**, Rondonópolis, v. 7, n. 1, p.42-55, jul. 2008.

POWELL, J.R. Progress and prospects in evolutionary biology: the drosophila model. Nova York: Oxford University Press, 1997.

QUERINO, L.A.C. Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bupiridílicos e piretróides. Rio de Janeiro; CCIN; 2000. Disponível em: <http://www.uff.br/toxicologiaclinica/IEAP%20CCIN.pdf>

RAYMOND, M.; CHEVILLON, C.; GUILLEMAUD, T.; LENORMAND, T.; PASTEUR, N. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. Proceedings of the Royal Society of London - Series B – **Biological sciences**, London, v. 353, n. 1376, p. 1707-1711, 1998.

RENKENA, J.M, MILLER, M, FRASER, H, LEGARÉ, J.P.H, HALLETT, R.H. First records of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae) from commercial fruit fields in Ontario and Quebec, Canada. **Journal of the Entomological Society of Ontario**, v. 144, p. 125-130, 2013.

RUSSELL, R.J.; CLAUDIANOS, C.; CAMPBELL, P.M.; HORNE, I.; SUTHERLAND, T.D.; OAKESHOTT, J.G. Two major classes of target site insensitivity mutations confer

resistance to organophosphate and carbamate insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 79, n. 3, p.84-93, 2004.

SCHNITZLERA, A.; HALEB, B.; ALSUMC, E.M. Examining native and exotic species diversity in European riparian forests. **Biological Conservation**, Metz, v. 138, p.146-156, 2007.

SEERAMA REDDY, G.; KRISHNAMURTHY, N.B. Sex ratio in drosophila population of Mysore. **Journal of Mysore University**, vol.25, p. 14-18, 1973.

SEGER, J.; STUBBLEFIELD, J.W. Models of sex ratio evolution. *In: Hardy I.C.W., Sex Ratios: Concepts and Research Methods*, Cambridge, United Kindom, 2002.

SHORROCKS, B., BINGLEY, M. Priority effects and species coexistence: experiments with fungal-breeding *Drosophila*. **J. Anim. Ecol.**, vol. 63, p. 799–806, 1994.

SHORROCKS, B.; SEVENSTER, J. G. Explaining local species diversity. **Proceedings of the Royal Society of London - serie B**, London, vol. 260, p.305-309, 1995.

SILVA, N.; FANTINEL, C.; VALENTE, V.L.S.; VALIATI, V.H. Population dynamics of the invasive species *Zaprionus indianus* (Gupta) (Diptera: Drosophilidae) in communities of drosophilids of Porto Alegre City, Southern of Brazil. **Neotropical Entomology.**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 363-374, June 2005.

SILVA, M.R.; CAMPOS, A.C.E.; BOHM, F.Z. AGROTÓXICOS E SEUS IMPACTOS SOBRE ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS CONTINENTAIS. **Sabios: Rev. Saúde e Bioli.**, Maringá, v. 8, n. 2, p.46-58, ago. 2013.

SPACKMAN, M. E.; OAKESHOTT, J. G.; SMYTH, I.K.A.; MEDVECZKY, K. M.; RUSSELP, R.J. A Cluster of Esterase Genes on Chromosome 3R of *Drosophila melanogaster* Includes Homologues of Esterase Genes Conferring Insecticide Resistance in *Lucilia cuprina*. **Biochemical Genetics**, Vol. 32, Nos. 1/2,p.39-62, 1994.

SYVANEN, M.; ZHOU, Z.; WHARTON, J.; GOLDSBURY, C.; CLARK, A. Heterogeneity of the glutathione transferase genes encoding enzymes responsible for insecticide degradation in the housefly. **Journal of Molecular Evolution**, vol. 43, n.3, p. 236-240, 1996.

- TIDON, R. Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. **Biol J Linn Soc.** vol. 87, p. 233–247, 2006.
- VAN DER LINDE, K. *Zaprionus indianus*: species identification and taxonomic position. **Dros. Inf. Serv.**, Tallahassee, v. 93, p.95-98, 2010.
- VAN DER LINDE, K.; STECK, G.J.; HIBBARD, K.; BIRDSLEY, J.S.; ALONSO, L.M.; HOULE, D. First records of *Zaprionus indianus* (diptera: drosophilidae), a pest species on commercial fruits from panama and the united states of america. **Florida Entomologist**, v. 89, n. 3, p.402-404, set. 2006.
- VILLATTE, F.; T. T. BACHMANN, T.T. How many genes encode cholinesterase in arthropods? **Pesticide Biochemistry Physiology**, vol. 73: 122-129 p. 2002
- VILELA, C.R. Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical region? **Dros. Inf. Serv**, vol. 82, p. 37-39, 1999.
- VILELA, C. R.; TEIXEIRA, E. P.; STEIN, C. P. Mosca-africana-do-figo, *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). In: VILELA, E. F., ZUCCHI, R. A.; CANTOR, F. (Eds.) **Histórico e impacto das pragas introduzidas**. Editora Holos, Ribeirão Preto, p. 48-52, 2000.
- VILELA, C.R., TEXEIRA, E.P., STEIN, C.P. Mosca-Africana-do-Figo, *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae), in: Vilela E., Zucchi R.A., Cantor F. (eds.), *Histórico e Impacto das Pragas Introduzidas no Brasil*. **Editora Holos**, São Paulo, p. 48-52, 2001.
- ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quim. Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.
- YASSIN, A.; DAVID, J. Revision of the afrotropical species of *Zaprionus* (Diptera, Drosophilidae), with descriptions of two new species and notes on internal reproductive structures and immature stages. **Zookeys**, Orsay, v. 51, n. 1, p.33-72, jul. 2010.

WANG, J. Z.; LI, H. Z.; YOU, J. Distribution and toxicity of current-use insecticides in sediment of a lake receiving waters from areas in transition to urbanization. **Environmental Pollution**, v. 161, p. 128–133, 2012.