

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Polyana Ferreira Nunes

**Atividade da acetilcolinesterase em populações sazonais experimentais de
Zaprionus indianus Gupta 1970 (Diptera: Drosophilidae) expostas ao
organofosforado Malathion**

**Uberaba
2019**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Polyana Ferreira Nunes

**Atividade da acetilcolinesterase em populações sazonais experimentais de
Zaprionus indianus Gupta 1970 (Diptera: Drosophilidae) expostas ao
organofosforado 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

2019

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

N927a Nunes, Polyana Ferreira
Atividade da acetilcolinesterase em populações sazonais experimentais de *Zaprionus indianus* Gupta 1970 (Diptera: Drosophilidae) expostas ao organo-fosforado *malathion* / Polyana Ferreira Nunes. -- 2019.
53 f. : il., tab.

Dissertação (Mestrado Interdisciplinar em Biociências Aplicadas) --
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019
Orientador: Prof. Dr. Luís Gustavo da Conceição Galego
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo José Mendonça

1. Inseticidas. 2. Acetilcolinesterase. 3. Mosca-das-frutas. 4. Estações do Ano. I. Galego, Luís Gustavo da Conceição. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 632.951

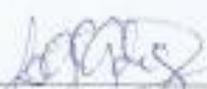
POLYANA FERREIRA NUNES

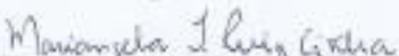
Atividade da acetilcolinesterase em populações sazonais experimentais de *Zaprionus indianus* Gupta 1970 (Diptera: Drosophilidae) expostas ao organofosforado *malathion*

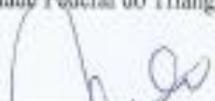
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, área de concentração - Materiais Aplicados em Biociências, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

6 de setembro de 2019.

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Luís-Gustavo da Conceição Galego
Universidade Federal do Triângulo Mineiro


Prof.ª Dr.ª Mariângela Torreglosa Ruiz Cintra
Universidade Federal do Triângulo Mineiro


Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto
Universidade de Uberaba

Dedico toda a minha jornada acadêmica a obra de arte mais inspiradora e meu objeto de investigação, a natureza.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente sou grata por essa força cósmica e inexplicável, chamada Deus, que inspira com suas criações, guia através da intuição, ensina através das dificuldades e protege colocando pessoas que caminham ao meu lado me amparando a cada queda e celebrando comigo todas as vitórias.

Agradeço ao meu marido por estar comigo em todas as dificuldades, sempre acreditando no meu potencial e até mesmo contribuindo com a minha pesquisa, me ajudando a colocar armadilhas para a coleta. Aos meus familiares por me incentivarem e me ensinarem que a sabedoria é uma das poucas coisas que não podem nos ser tirada. Aos meus orientadores tenho muito a agradecer, principalmente pela paciência, mas ao mesmo tempo, entre erros e acertos, pude aproveitar aquela relação de construção e admiração que existe entre o mestre e o discípulo, que muitas vezes ultrapassa os limites da aprendizagem acadêmica e se torna um ensinamento para a vida toda. Muito aprendi também com os técnicos de laboratório Daniela e Rheltheer, que acompanharam todo o processo de análise do meu projeto e com meus colegas do grupo de estudo *Evolução de Zaprionus indianus*.

Por fim, gostaria de agradecer aos professores pesquisadores que participaram da banca de qualificação e defesa da presente dissertação, pois contribuíram imensamente com suas correções, considerações e também ao apresentarem as muitas possibilidades do projeto possui, o que me ajudou a acreditar ainda mais no potencial da pesquisa e sua contribuição para a comunidade acadêmica. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES), sou grata pelo apoio e financiamento, investindo no estudo e na pesquisa de pessoas que acreditam que a ciência pode ser utilizada para verdadeiramente contribuir para o desenvolvimento, saúde e bem estar da sociedade.

*“A ciência se compõe de erros
que por sua vez, são o passo
para a verdade” (Júlio Verne)*

RESUMO

A espécie *Zaprionus indianus* é uma espécie originária da África porém é encontrada em muitos continentes do planeta, incluindo o continente americano. Essa espécie possui um potencial de se tornar praga em culturas de frutas que são amplamente distribuídas no Brasil, e o seu controle bem como de outros grupos de insetos, incluindo vetores de doenças como o *Aedes aegypti*, é realizado através da utilização de inseticidas organofosforados, em áreas rurais e urbanas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial bioindicador de contaminação por Malathion da enzima Acetilcolinesterase, alvo do inseticida, em gerações F1 de populações de Uberaba e Peirópolis da espécie *Zaprionus Indianus*. Além de verificar se existe diferença significativa relacionada ao sexo, bem como o comportamento sazonal, relacionado a atividade catalítica dessa enzima em estações secas e úmidas. Foram realizadas análises de espectrofotometria de luz e eletroforética em gel de poliacrilamida para avaliar a ação e inibição enzimática, utilizando as cabeças dos indivíduos experimentais. Os dados encontraram valores significativos em comparações de atividades encontradas em populações de estações diferentes, além de uma correspondência entre o final de uma estação e meio de outra. Os testes de inibição demonstraram valores inferiores de atividade enzimática quando exposta ao inseticida Malathion em populações das estações de março e junho. Valores não significativos foram encontrados para comparações entre machos e fêmeas. De acordo com os resultados das análises, a enzima AChE mostrou um alto potencial como bioindicadora de contaminação por Malathion.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Organofosforado. Sazonalidade.

ABSTRACT

Zaprionus indianus is a species originally from Africa but is found on many continents of the planet, including the American continent. This species has the potential to become a pest in fruit crops that are widely distributed in Brazil, and its control as well as other insect groups, including disease vectors such as *Aedes aegypti*, is accomplished through the use of organophosphate insecticides, in rural and urban areas. The present work aimed to evaluate the potential bioindicator of Malathion contamination of the enzyme Acetylcholinesterase, target of the insecticide, in F1 generations of Uberaba and Peirópolis populations of *Zaprionus Indianus*. In addition to verifying if there is significant difference related to sex, as well as seasonal behavior, related to the catalytic activity of this enzyme in dry and humid seasons. Light spectrophotometry and polyacrylamide gel electrophoretic analysis were performed to evaluate the enzymatic action and inhibition using the heads of the experimental subjects. The data found significant values in comparisons of activities found in populations of different seasons, as well as a correspondence between the end of one season and a half of another. Inhibition tests showed lower values of enzyme activity when exposed to the Malathion insecticide in populations of the March and June seasons. Non-significant values were found for comparisons between males and females. According to the results of the analyzes, the enzyme AChE showed a high potential as a bioindicator of Malathion contamination.

Keywords: Acetylcholinesterase. Organophosphate. Seasonality.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Indivíduo de <i>Z. indianus</i> em habito dorsal evidenciando as principais características morfológicas desse plano corporal, incluindo as faixas brancas longitudinais diagnósticas para a espécie.....	14
Figura 2	Morfologia externa de machos (esquerda) e fêmeas (direita) de <i>Z. indianus</i>	15
Figura 3	Interação da enzima acetilcolinesterase (AChE) com o substrato acetilcolina (ACh), resultando em ácido acético e colina.....	19
Figura 4	Armadilhas de garrafas PET utilizadas na captura dos indivíduos da espécie <i>Z. indianus</i>	25
Figura 5	Processo de preparação da amostra para análise bioquímica.....	26
Figura 6	Cubetas utilizadas na análise da atividade da AChE no espectrofotômetro.....	28
Figura 7	Curvas de inibição da acetilcolinesterase de <i>Z. indianus</i> pelo Malathion em $\mu\text{l/ml}$	29
Figura 8	Curva padrão de albumina bovina 1,0 mg/ml em solução salina (NaCl 0,9%) obtida e sua leitura foi realizada traves da técnica de espectrofotometria de luz a 650 nm.....	30
Figura 9	Atividade da AChE de <i>Z. indianus</i> em machos e fêmeas coletados em estações secas (1: junho/2018; 2: setembro/2018) e Úmida (Chuva 1: março/2018; Chuva 2: dezembro/2018).....	35
Figura 10	Atividade da AChE de <i>Z. indianus</i> nas estações chuvosas 1 e 2 (Março/2018; Dezembro/2018) e secas 1 e 2 (Junho/2018; Setembro/2018).....	38
Figura 11	Atividade da AChE de <i>Z. indianus</i> em Uberaba e Peirópolis, para cada coleta.....	39
Figura 12	Dosagem de proteínas- valor em mg de proteínas presentes na amostra.....	39
Figura 13	Atividade específica- que corresponde ao valor da média em absorbância dividido pela concentração de proteínas totais em cada amostra.....	40
Figura 14	Padrão de bandas da AChE em machos (m) e fêmeas (f) de <i>Z. indianus</i> realizadas em estações seca e úmida em Uberaba (U) e Peirópolis (P) em géis de poliacrilamida.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados meteorológicos contendo informações de temperatura e umidade mensal.....	26
Tabela 2	Média e erros-padrão da atividade enzimática, em mol/mL, da AChE de <i>Z. indianus</i> em mol/mL, enzima esta extraída de machos e fêmeas de <i>Z. indianus</i> oriundos de populações sazonais (seca e úmida) de Uberaba (MG) e Peirópolis, em cada tempo de aferição da atividade, bem como a ANOVA (F) para cada comparação entre grupos amostrais.....	33
Tabela 3	Média e erros-padrão da atividade enzimática, em mol/mL, da AChE de <i>Z. indianus</i> em mol/mL, enzima esta extraída de machos e fêmeas de <i>Z. indianus</i> oriundos de populações sazonais (seca e úmida) de Uberaba (MG) e Peirópolis, em cada tempo de aferição da atividade, com substrato de análise tratado com Malathion, bem como a ANOVA (F) para cada comparação entre grupos amostrais.....	34
Tabela 4	Coefficientes de variação da atividade enzimática da AChE, bem como desta sob exposição ao Malathion (inibição), em populações sazonais de <i>Z. indianus</i> amostradas em estações Secas (S1:junho/2018; S2: setembro/2018) e Úmida (U1: março/2018; U2: dezembro/2018).....	36
Tabela 5	Média e erros-padrão da variação da atividade enzimática da AChE de <i>Z. indianus</i> , com ou sem inibição por <i>malathion</i> , em mol/mL e porcentagem (%), avaliados em espectrofotometria entre os tempos 0 e 20 minutos enzima esta extraída de indivíduos de <i>Z. indianus</i> oriundos de populações sazonais (seca e úmida) de Uberaba (MG) e Peirópolis, (Seca 1:junho/2018; Seca 2: setembro/2018) e Úmida (Úmida 1: março/2018; Úmida 2: dezembro/2018).....	37
Tabela 6	Comparações par-a-par realizadas pelo teste t de student para a variação da atividade enzimática da AChE de <i>Z. indianus</i> avaliada entre os tempos 0 e 20 minutos para cada amostragem sazonal realizada em populações de Uberaba (Ura) e Peirópolis (Pei). A diagonal superior apresenta dados da atividade sem inibidor e a inferior com o inibidor Malathion.....	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterase

ANOVA: análise de variância

BOD: Biochemical Oxygen Demand

DTNB: 5: 5-ditiobis-2- Nitrobenzóico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

HCl: ácido clorídrico

INMET: Instituto Nacional de Metereologia

µl: microlitro

Mm: Mol por minuto

kat- unidade de atividade catalítica

OP: organofosforados

ppm: partes por milhão

SADMET: Seção de Armazenamento de Dados Meteorológicos

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	TAXONOMIA, MORFOLOGIA E DESENVOLVIMENTO DE <i>ZAPRIONUS INDIANUS</i> (GUPTA, 1970).....	14
1.2	<i>ZAPRIONUS INDIANUS</i> E A COLONIZAÇÃO DE NOVOS TERRITÓRIOS: A INVASÃO DA ÁSIA E DAS AMÉRICAS...	16
1.3	DINÂMICA EVOLUTIVA E O PROCESSO BIOINVASIVO DE <i>Z. INDIANUS</i> NO BRASIL.....	17
1.4	ACETILCOLINESTERASE (ACHE).....	18
1.5	INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS (OPS).....	20
1.6	RESISTÊNCIA A INSETICIDAS.....	21
1.7	ORGANISMOS BIOINDICADORES.....	22
2	OBJETIVOS.....	24
2.1	GERAL.....	24
2.2	ESPECÍFICOS.....	24
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	25
3.2	METODOLOGIA.....	27
3.2.1	Ensaio Enzimático.....	27
3.2.2	Inibição Enzimática.....	28
3.2.3	Dosagem de proteína.....	29
3.2.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	30
3.2.5	Análise de dados.....	31
4	RESULTADOS.....	32
4.1	ENSAIO ENZIMÁTICO.....	32
4.1.1	Inibição por Malathion e atividade enzimática da AChE entre machos e fêmeas.....	32
4.1.2	Inibição por <i>Malathion</i> e atividade enzimática entre estações (úmida e seca).....	36
4.2	DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	39
4.3	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)...	
5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONCLUSÕES.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 TAXONOMIA, MORFOLOGIA E DESENVOLVIMENTO DE *ZAPRIONUS INDIANUS* GUPTA, 1970

A família *Drosophilidae* inclui cerca de 4.300 espécies descritas em 75 gêneros que apresentam uma alta variação morfológica e biológica (BACHLI, 2015). Uma das espécies da família que invadiu as Américas no final dos anos 90 é a mosca do figo *Zaprionus indianus*, pertencente ao gênero *Zaprionus* (COQUILLET, 1902) que apresenta dois subgêneros e cerca de 59 espécies catalogadas, sendo 48 delas pertencentes ao subgênero Afrotropical *Zaprionus* e as outras 11 ao subgênero oriental e australiano *Anaprionus* (YASSIN; DAVID, 2010; YASSIN et al., 2010).

Os indivíduos de *Z. indianus* (Figura 1) apresentam um comprimento médio de 3,0 mm, coloração marrom claro, olhos avermelhados e a presença de faixas longitudinais de cor branco-prateadas, contornadas por listras pretas presentes na cabeça e tórax, localizadas na região dorsal (CHASSAGNARD; TSACAS, 1993).

Figura 1 - Indivíduo de *Z. indianus* em habito dorsal evidenciando as principais características morfológicas desse plano corporal, incluindo as faixas brancas longitudinais diagnósticas para a espécie



Fonte: Perucello, 2018a

A espécie *Z. indianus* apresenta como nicho alimentar o consumo de bactérias e leveduras encontradas em frutos e são atraídas até os frutos em fermentação pelos voláteis alcoólicos liberados durante o processo (GOMES et al., 2003). O substrato do fruto é

utilizado como nicho para acasalamento, oviposição das fêmeas e desenvolvimento das larvas (LACHAISE et al., 2004). O período de incubação dos ovos desse *Drosophilidae* ocorre entre 24 a 36 horas e seu desenvolvimento até a fase adulta se realiza entre 15 a 20 dias, e longevidade dos adultos ocorrendo entre 24 a 83 dias (STEIN et al., 2003; SETTA; CARARETO, 2005; ALAWANLEH, et al., 2016). Em condições laboratoriais com temperatura controlada (25°C), machos e fêmeas podem sobreviver até três meses, e a prole de uma fêmea pode chegar a mais de 60 indivíduos, podendo encontrar variações devido às diferenças nas condições experimentais e da composição da dieta (SETTA; CARARETO, 2005; ALAWANLEH, et al., 2016).

As variações fenotípicas quantitativas entre os sexos é baixa para a espécie, apresentando diferenças de 2% para o comprimento das asas e 1% para o tamanho do tórax (DAVID et al., 2006a). Porém, outros caracteres morfológicos podem ser utilizados para a triagem de machos e fêmeas. A presença do surstilo, na extremidade do abdome de machos, e de ovopositor, na de fêmeas (Figura 2), podem ser utilizados nesse processo de identificação sexual.

Figura 2 - Morfologia externa de machos (esquerda) e fêmeas (direita) de *Z. indianus*. As setas indicam o surstilo, em machos, e o ovopositor, em fêmeas



Fonte: Perucello, 2018b

Nota: As setas indicam o surstilo, em machos, e o ovopositor, em fêmeas

1.2 ZAPRIONUS INDIANUS E A COLONIZAÇÃO DE NOVOS TERRITÓRIOS: A INVASÃO DA ÁSIA E DAS AMÉRICAS

A origem de *Z. indianus* é provavelmente a região Sub-Saariana (Afrotropical), apesar do epíteto *indianus* sugerir uma origem asiática na região biogeográfica Oriental. De fato, a primeira descrição da espécie foi realizada em espécimes coletados na Índia e realizada por Gupta (1970). A principal hipótese para a origem da espécie é que ela tenha surgido de uma linhagem ancestral do gênero *Zaprionus* oriunda da região oriental que colonizou a África e lá evoluiu para *Z. indianus* (OKADA, 1981; YASSIN et al., 2008; COMMAR et al., 2012). A introdução e colonização da espécie nas regiões Oriental (Índia) e Neotropical (Américas) aconteceu no século XX, a primeira no final dos anos 70 e início dos 80 e a última no final dos 90. Esse processo contemporâneo de introdução e colonização da espécie teria sido facilitado pela intensificação no comércio mundial de frutas e culminou em uma amplitude global de distribuição da espécie que, atualmente, é encontrada na Índia, nas regiões Oriental, Afrotropical e Australiana, além da Neotropical (Américas) conforme apresentado por diversos estudos sobre a diversidade de Drosophilidae e o registro de *Z. indianus* nas áreas (OKADA; CARSON, 1983; GOÑI et al., 2001; LINDE et al., 2006; GALEGO; CARARETO, 2012; MARKOW et al., 2014).

O primeiro registro de *Z. indianus* no Brasil ocorreu em 1999, em uma plantação de caqui (*Diospyrus kaki* L., Ebenaceae), no município de Santa Isabel, no estado de São Paulo, e de figo-roxo, em Valinhos, também no estado de São Paulo (STEIN et al., 2003; TIDON et al., 2003). Em virtude do impacto econômico causado nas culturas de figo-roxo na época, que produziram uma perda de 50% da safra, a espécie recebeu a alcunha de mosca do figo (VILELA, 1999). A espécie rapidamente se dispersou pelo Brasil e foi então registrada de norte a sul do país, e em outros países da Américas do sul e também na América do Norte (CASTRO; VALENTE, 2001; TONI et al., 2001; TIDON et al., 2003; CULIK et al., 2005; LINDE et al., 2006; RENKEMA, 2013). Além do figo-roxo, a espécie também já foi registrada em associações com carambola, mamão, caju, tomate, acerola, goiaba, banana, totalizando 31 famílias e 74 espécies de frutos (LACHAISE; TSACAS, 1983; KATO et al., 2004; CULIK et al., 2005).

A introdução da espécie no território brasileiro ocorrera por meio da intervenção antrópica do comércio de frutas entre África e Brasil. A hipótese mais aceita propõe uma introdução única, em propágulo numeroso e posterior expansão rápida pelo território sul americano. Essa hipótese apresenta como evidências padrões de traços quantitativos (DAVID et al., 2006) e distribuição das inversões cromossômicas (ANANINA et al.,

2006) e dos polimorfismos de esterases (GALEGO; CARRETO, 2010, 2012) em populações brasileiras e sul-americanas de *Z. indianus*. O impressionante potencial adaptativo dessa espécie, logo chamou atenção dos pesquisadores o que, resulta, em estudos de diferentes áreas da biologia que, buscam entender, os mecanismos responsáveis por essa adaptação tão bem-sucedida. Além disso, o aumento populacional acelerado e descontrolado evidenciou um potencial da espécie em se tornar uma praga agrícola e uma espécie que poderia desencadear algum impacto ecológico, sobretudo em relação às relações ecológicas competitivas e na configuração de teias alimentares que envolveriam outros Drosophilidae, não só em ambientes naturais, mas também em cultivos e em áreas urbanas (FERREIRA; TIDON, 2005). De fato, Galego e Carreto (2005) evidenciaram, em populações de laboratório, um sucesso competitivo de *Z. indianus* quando em interação com uma espécie nativa (*Drosophila sturtevantii*) e uma introduzida (*D. simulans*) de Drosophilidae.

1.3 DINÂMICA EVOLUTIVA E O PROCESSO BIOINVASIVO DE *Z. INDIANUS* NO BRASIL

O sucesso de colonização de uma espécie invasora depende da superação de pressões variadas conforme as variáveis presentes no território colonizado e das características adaptativas e pré-adaptativas presentes na espécie, características estas que surgem ao longo da história evolutiva que podem ser fruto de processos biológicos, tais como mutações genéticas, presença de plasticidade fenotípica, ou por uma combinação de ambos (GILBERT et al., 2016).

Estudos genéticos e ecológicos envolvendo espécies invasoras da família Drosophilidae sugerem que elas podem ser utilizadas como modelo biológico para a compreensão dos processos de introdução, colonização e adaptação de bioinvasores (GALEGO; CERON; CARARETO, 2006; CLARK et al., 2007; GALEGO; CARARETO, 2010; JENNINGS, 2011; MOHANTY; KHANNA, 2017). Além disso, a presença de populações de drosofilídeos não só endêmicas, como também cosmopolitas, permitiu a melhor compreensão da disseminação continental de espécies dessa família (TIDON et al., 2003).

Essas populações podem apresentar interações competitivas, sobretudo quando da introdução de um bioinvasor. A espécie *Z. indianus*, por exemplo, apresenta algumas particularidades relacionadas ao nicho de alimentação e reprodução que diferem daqueles de outros drosofilídeos, tais como acasalamento e ovoposição ocorrerem em frutos de

diferentes espécies e com diferentes estados de maturação (CASTRO; VALENTE, 2001; VILELA et al. 2001; LINDE et al., 2006). Essas características poderiam proporcionar uma vantagem adaptativa de *Z. indianus* sobre outras espécies. De fato, Galego e Carareto (2005) mostraram que a presença de larvas *Z. indianus* interfere na viabilidade e no tempo de desenvolvimento de outros drosofilídeos, incluindo uma espécie nativa (*Drosophila sturtevantii*) e uma introduzida (*D. simulans*). Além desse potencial competitivo, a espécie apresenta facilidade em ocupar área com cultivares, que são amplamente distribuídos pelo Brasil.

Outro ponto importante que poderia estar relacionado ao sucesso adaptativo de *Z. indianus* durante seu processo de colonização no Brasil é o predomínio do clima tropical na maior parte do país, similar ao da sua região de origem (DAVID et al., 2006a, 2006b; YASSIN et al., 2008a, 2008b). Nesse sentido, o fator climático poderia ser determinante na sobrevivência e reprodução da espécie, uma vez que trata-se de um organismo ectotérmico, cujo desenvolvimento, distribuição, reprodução e dinâmica populacional são fortemente afetados pela variação da temperatura.

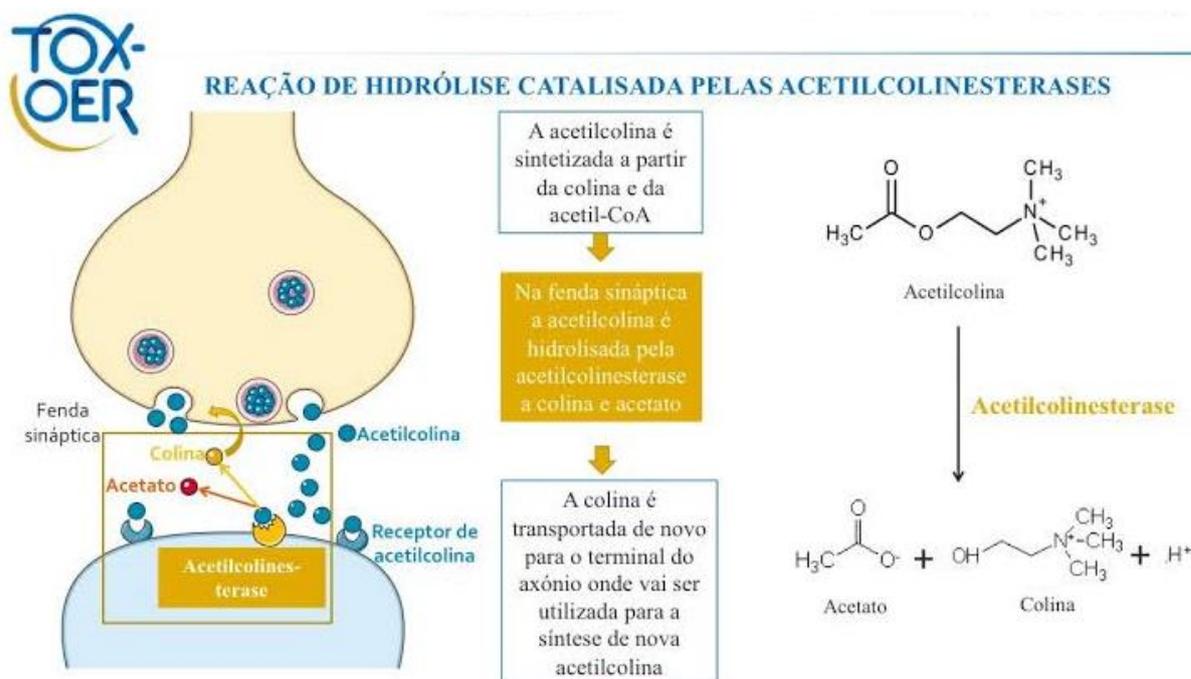
A espécie *Z. indianus* responde à variação de temperatura com alterações morfológicas, tais como tamanho do corpo, asas, peso e número de ovários, bem como troca de nicho, resistência à baixa temperatura e dessecação (KARAN, 1998; KARAN et al., 1999; HOFFMAN et al., 2001; YASSIN et al. 2009; DA MATA et al., 2010). Além disso, as condições climáticas podem interferir na regulação da taxa metabólica dos organismos, juntamente com o pH e a concentração de substrato (cinética química), proporcionando condições propícias para a atividade das enzimas relacionadas ao metabolismo do organismo, tais como aquelas do grupo das esterases, enzimas estas com múltiplos papéis biológicos em insetos (OAKESHOTT et al., 1999).

1.4 ACETILCOLINISTERASE (ACHE)

As esterases são isoenzimas caracterizadas por possuírem um sítio catalítico formado por três resíduos de aminoácidos, especializadas principalmente na hidrólise de ésteres (OAKESHOTT et al., 1999; BENCHARIT et al., 2003). As colinesterases, pertencentes a esse grupo, realizam a hidrólise de ésteres carboxílicos da colina especificamente. Existem duas classes desse grupo, a acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), esta última possui como substrato a buritilcolina (GARCIA, et al. 2000; LIONETTO et al., 2013).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é encontrada principalmente nos gânglios cerebrais de insetos, apresentando papel biológico de finalização da transmissão do impulso nervoso nas fendas sinápticas (QUINN, 1987; SILMAN; SUSSMAN, 2005). Este ocorre por meio da relação entre substrato (o neurotransmissor acetilcolina - ACh) e o sítio ativo da enzima, sendo que esta possui um sítio aniônico e um sítio esterásico. O primeiro possui um resíduo de aspartato da AChE com carga negativa, e o outro uma hidroxila presente na molécula da serina e a molécula histidina. A reação no sítio esterático ocorre da seguinte forma. A carbonila do neurotransmissor ACh sofre um ataque por elétrons da hidroxila provenientes da serina, e a retirada de um próton pela histidina. A histidina doa o próton para colina da ACh, que é então liberada, deixando a AChE acetilada (ARAÚJO et al., 2016). Esta sofre hidrólise, formando o ácido acético, liberando o resíduo de acetato do sítio catalítico e permitindo que a enzima possa realizar sua função novamente (Figura 3).

Figura 3. Interação da enzima acetilcolinesterase (AChE) com o substrato acetilcolina (ACh), resultando em ácido acético e colina.



Fonte: TOXOER, de [Reação de hidrólise catalisada pela enzima acetilcolinesterase], 2017

O processo de transmissão do impulso nervoso de modo geral, se inicia com a formação do neurotransmissor acetilcolina, com funções no processo cognitivo (atenção,

aprendizado e memória), na motivação e recompensa, no processamento de estímulos, além da participação no processo de sono e vigília (ARAÚJO, 2016). Primeiramente, a colina é captada no plasma pelos neurônios colinérgicos e entra na célula nervosa através do transportador sódio-colina, esta reage com a Acetil co-enzima A (Acetil-CoA), catalisada pela enzima colina acetil-transferase, formando a Acetilcolina. Após a sua síntese, a ACh é empacotada em vesículas esperando a chegada de um estímulo, em forma de potencial de ação, e então ao receber a mensagem, é liberada na região da fenda sináptica que irá agir em seus receptores. A enzima acetilcolinesterase, capta o neurotransmissor ACh presente nas fendas sinápticas, evitando disparos contínuos nas terminações nervosas (TOUTANT, 1989). Os inseticidas do tipo organofosforados impedem a ligação entre substrato e enzima, pois se ligam à AChE e impedem, assim, a degradação da ACh.

1.5 INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS (OPS)

A estratégia mais antiga para o controle de populações de insetos, e ainda a mais utilizada, é baseada no uso de inseticidas, há anos já utilizada em sua forma natural e posteriormente em sua forma sintética. Os inseticidas, pesticidas ou praguicidas possuem a função de eliminar insetos, independente da fase em que se encontram em seu ciclo de vida (MOREIRA et al., 2012).

Os inseticidas são classificados em quatro classes: piretoides, carbamatos, organoclorados e organofosforados (OPs). Os organofosforados são constituídos por ésteres, ácidos à base de fósforo que contem ligações com carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e nitrogênio (BRAGA; VALLE, 2007a).

Os OPs e carbamatos são capazes de inibir a atividade enzimática da acetilcolinesterase, pois promovem uma interação com a serina no sítio ativo da enzima por meio do processo de fosforilação ou descarbamilação (FOURNIER; MUTERO, 1994; GALLOWAY; HANDY, 2003; BAKRY, et al., 2011). A permanência do neurotransmissor no seu receptor colinérgico, causa hiper-excitação do sistema nervoso e por fim a morte do organismo (DOMINGUES et al., 2010). As ligações podem ser reversíveis ou “irreversíveis”, como é o caso dos organofosforados, as aspas indicam que a colinesterase é capaz sim de degradar o composto inibidor, porém o organismo pode vir a óbito, antes mesmo de a reação acontecer (SLOTKIN, 2004).

A escolha dos pesquisadores agrícolas por utilizar esse composto se deve ao fato de serem biodegradáveis e não acumularem nos tecidos, porém devido a sua instabilidade

química requer uma aplicação mais regular (BRAGA; VALLE, 2007). A presença de grandes quantidades desse inseticida como resultado de práticas agrícolas, pode comprometer ar, água, solo, o que implica na contaminação de organismos não-alvo, incluindo a espécie humana. O OP Malathion utilizado amplamente no controle de vetores e pragas agrícolas é caracterizado como organofosforado líquido sintético, de cor castanha e possui uma classificação toxicológica III (média-alta) (RIBEIRO et al., 2007). E se assemelha aos produtos utilizados no controle de diferentes grupos de insetos, além de Diptera, e em uma variedade de cultivos não apenas o de frutas (CHEMINOVA, 2017). O uso de produtos da classe dos organofosforados são utilizado também para controle de mosquitos vetores como *Aedes aegypti* (ANVISA, 2012).

A ação da AChE no processo de transmissão do impulso nervoso é essencial, e as consequências provenientes da interrupção desse processo, podem causar graves danos ao sistema nervoso. As respostas do corpo dependem do tipo de organofosforado, do tempo que o organismo esteve exposto e da concentração utilizada (POPE, 1999). Em humanos, os sintomas relacionados ao sistema nervoso central causado pela inibição da enzima envolvem dor de cabeça, depressão, tontura, problemas cardio respiratórios, convulsões, falta de memória, e morte do organismo (SALVI, et al. 2003). Além de comprometer o sistema nervoso, gastro intestinal e respiratório de humanos, o OP Malathion apresenta caráter mutagênico. Indivíduos com alto nível de exposição, apresentaram problemas de fertilidade, malformações congênitas, câncer, e mutações genéticas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1986; MATOS et al., 1988, PERTILE et al., 2018; SILVA et al., 2018; VAINIO, 2019).

O uso contínuo de inseticidas pode, além de danos à saúde humana, provocar impactos ecológicos e também atuar como agente seletivo para a evolução da resistência de insetos a esses agentes químicos.

1.6 RESISTÊNCIA A INSETICIDAS

A origem da resistência a algum composto tóxico ocorre por meio de uma exposição contínua dos indivíduos de uma população a ele, de forma que aqueles que apresentam genes de resistência tendem a ser mantidos na população, enquanto os suscetíveis são eliminados. Dessa forma, é possível que, ao longo do tempo, toda a população apresente resistência a esse composto.

A resistência a inseticidas pode ocorrer por diferentes mecanismos, como o aumento da detoxicação do corpo, a resistência física ou comportamental do inseto ao ser

exposto, ou a diminuição da interação da toxina com o sítio ativo afetado (PASTEUR; RAYMOND, 1996). Dois desses mecanismos são mais comumente associados ao grupo das esterases, e são resultados de mutações que alteram genes implicados na resistência (FOURNIER; MUTERO, 1994). O primeiro envolve mutações pontuais em nucleotídeos que alteram a sequência de codificação do gene, o que pode resultar em um sítio ativo insensível ao efeito do composto tóxico, localizado na enzima AChE, alvo de inseticidas (WEILL et al., 2003). O segundo são mutações que causam alterações na região promotora de enzimas relacionadas ao processo de detoxificação do corpo, como as carboxiesterases, o que envolvem mutações que afetam o gene completo (tal como duplicação e amplificação ou ruptura e perda) ou alterações apenas na regulação cis, e trans do gene (RANSON et al., 2002). É possível descrever a resistência em duas dimensões, uma dimensão genética molecular e uma dimensão bioquímica / fisiológica (FEYEREISEN et al., 2015).

Os insetos possuem dois genes para a formação da enzima AchE (Ace 1 e 2), mutações nesses genes conferem resistência à inibição por inseticidas organofosforados ou carbamatos (RUSSELL, et al., 2004). É possível encontrar muitos sítios mutados em vários organismos na AchE resistente, alelos múltiplos com uma ou mais mutações que indicam múltiplas origens de resistência, e outros polimorfismos em linhagens resistentes (KOZAKI, et al., 2009; GALEGO; CARARETO, 2010). Galego e Carareto (2010) detectaram um alelo da Esterase 3, uma carboxilesterase, em *Z. indianus* cuja a frequência era maior em populações com histórico de aplicação de inseticidas e em populações experimentais continuamente ao Malathion.

1.7 ORGANISMOS BIOINDICADORES

O estudo da biologia, ecologia e evolução de uma espécie pode evidenciar um desequilíbrio no ambiente, ou até mesmo indicar o caminho para o controle de sua própria população, pois os organismos adaptados ao local, são sensíveis às alterações ambientais em virtude da evolução do processo adaptação-ambiente, que geralmente é lento e gradual (CANDIDO et al., 2012). Nesse sentido, as espécies bioindicadoras podem ser valiosas para se compreender a dinâmica da resistência à inseticidas.

O biomonitoramento tem como objetivo colher informações quanto a alterações nas condições ecológicas apresentadas pelo ambiente por meio da análise de alterações comportamentais, morfológicas e fisiologia de um organismo vivo. Os *Drosophilidae* são um excelente grupo para estudos dessa natureza, pois além de responder de forma

significativa à exposição à inseticidas (SUN; PANKASKIE, 1954; DEWEY, 1958; PHILLIPS, 1962; GALEGO; CARARETO, 2010) são facilmente mantidos com baixo custo de manutenção, apresentam ciclo de vida curto, além da abundância de indivíduos (CANDIDO et al., 2012; DEWEY, 1958).

Populações de *Z. indianus* são encontradas em todas as regiões do Brasil, e ocupam todos os domínios fitogeográficos brasileiros, o que a torna candidata a modelo biológico para se investigar mecanismos de adaptação que podem ser utilizados em práticas de biomonitoramento (SANTOS, et al., 2016; DÖGE, et al., 2015; POPPE, et al., 2015). Além disso, o histórico de exposição a inseticidas como o Malathion, pode possibilitar a utilização da espécie *Z. indianus* como bioindicadora através da identificação do loco marcador. Dessa forma se torna possível acompanhar a evolução da resistência ao inseticida, controlar as concentrações do organofosforado evitando o seu uso indiscriminado e desenvolver estratégias de manejo de pragas agrícolas mais eficazes e também vetores que transmitem doenças (GALEGO; CARARETO, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o uso potencial da espécie *Z. indianus* como modelo biológico para o monitoramento da contaminação ambiental pelo inseticida Malathion considerando possíveis variações sazonais da AChE de populações dessa espécie.

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Comparar a variação sazonal da atividade enzimática da AChE de *Z. indianus* em duas populações geográficas com diferentes condições de exposição ao Malathion;
- ✓ Comparar se existe variação na atividade enzimática da AChE relacionada ao gênero dentro da espécie.
- ✓ Avaliar o potencial bioindicador de contaminação por Malathion da AChE de *Z. indianus*, baseado no padrão de resposta da enzima quando exposta a esse inseticida.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Indivíduos de *Zaprionus indianus* foram coletados em Uberaba (MG), na região central da cidade, (19° 44' 54" S e 47° 55' 55" W) e no bairro rural de Peirópolis (19° 43'26" S e 47° 44'45" W), cerca de 20 Km de distância do centro de Uberaba, a coleta em duas regiões diferentes foi determinada afim de verificar a diferença na resistência ao inseticida em regiões com diferentes graus de urbanização. As coletas foram realizadas com o auxílio de seis armadilhas fechadas contendo isca de banana e fermento biológico ®Fleishmann conforme a Figura 4 (PENARIOL et al., 2008). Essas armadilhas foram colocadas a cerca de 1,70m do chão nas áreas amostradas por um período de vinte e quatro horas, separadas em duplas dispostas frente uma a outra.

Figura 4. Armadilhas de garrafas PET utilizadas na captura dos indivíduos da espécie *Z. indianus*.



Fonte: Da autora, 2018

As coletas foram efetuadas em março e dezembro de 2018 (estação chuvosa) e junho e setembro de 2018 (estação seca), as estações foram nomeadas como úmida 1 (março), úmida 2 (dezembro), seca 1 (junho) e seca 2 (setembro) para melhor compreensão dos resultados. Os dados meteorológicos presentes na Tabela 1, foram fornecidos pela Seção de Armazenamento de Dados Meteorológicos (SADMET) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

Tabela 1: Dados meteorológicos contendo informações de temperatura e precipitação sazonal (estações seca e úmida) em Uberaba durante 2018

ESTAÇÃO (2018)	TEMPERATURA MÉDIA (°C)	PRECIPITAÇÃO (mm)
Úmida 1 (Janeiro a Março)	23,8	204,3
Seca 1 (Abril a Junho)	20,0	50,33
Seca 2 (Julho a Setembro)	21,3	28,7
Úmida 2 (Outubro a Dezembro)	23,6	209,0

Fonte: elaborada pelo autor, 2019

Nota: De acordo com a INMET, os valores podem ser extrapolados devido à proximidade dos pontos onde foram colocadas as armadilhas

Foram individualizados 30 casais (fêmeas e machos) obtidos em cada coleta, cada casal em um tubo de ensaio contendo meio de cultura banana-ágar para obtenção das linhagens, em uma estufa incubadora Biochemical Oxygen Demand (BOD), com temperatura controlada ($25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$). Após sete dias os casais foram descartados e os meios de cultura com as oviposturas foram monitorados até a emergência dos indivíduos. Da primeira geração foram retiradas as cabeças dos indivíduos que emergiram, e realizado o processo de maceração em tampão de amostra Tris-HCl 8,8, 0,1M para serem utilizadas no ensaio bioquímico (Figura 5).

Figura 5 - Processo de preparação da amostra para análise bioquímica



Fonte: Da autora, 2018

Nota: retirada das cabeças dos indivíduos de *Z. Indianus* e maceração em tampão de amostra Tris-HCl 8,8, 0,1M.

As análises não foram realizadas utilizando populações naturais devido à dificuldade de obtenção do número de indivíduos necessários durante o período de seca. No total, foram analisados 320 indivíduos da primeira geração dos parentais coletados, sendo 80 por coleta sazonal (março, junho, setembro e dezembro). Desses 80 indivíduos, 40 (20 machos e 20 fêmeas) foram de Uberaba e os outros 40 (20 machos e 20 fêmeas) foram de Peirópolis.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Ensaio Enzimático

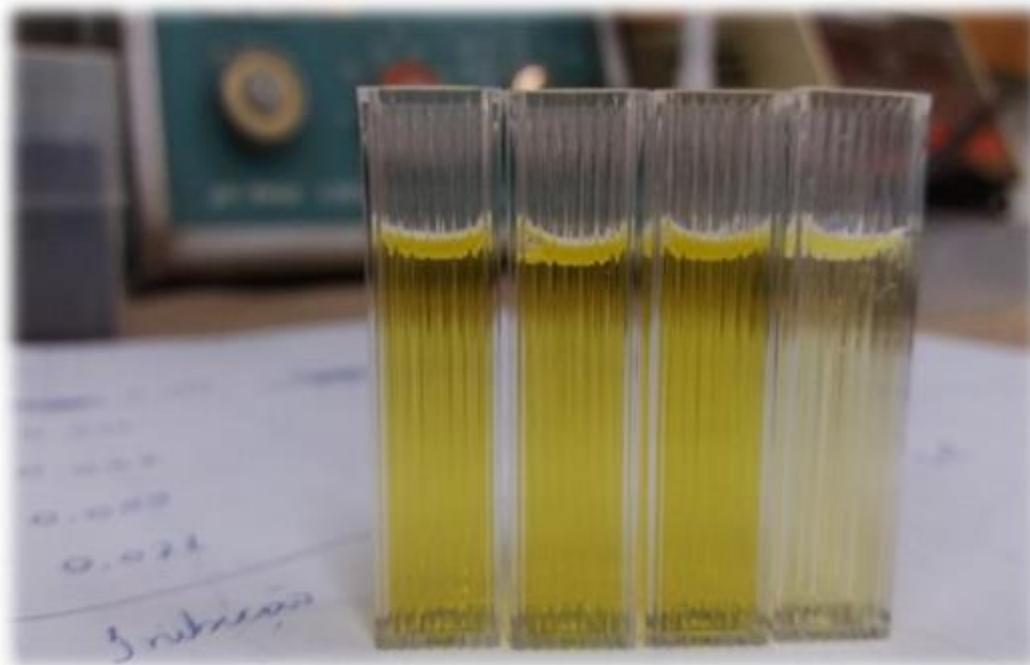
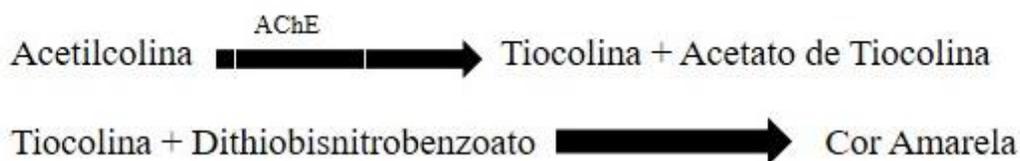
O ensaio enzimático foi preparado com a adição de 400 µl de solução de extração-Tampão Tris – HCl pH 8.8 0,1 M; 20% sacarose; 1 mM de EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético); 0,5% Trinton x-100, v/v- na amostra contendo 10 cabeças em 100 µl de solução tampão Tris-HCl 8,8, 0,1M totalizando 0.5 ml nas duas primeiras amostras (úmida 1 e seca 1) para avaliar se existe diferença da atividade da AChE de machos em duas amostras diferentes e o mesmo se repete em fêmeas. Após a verificação da diferença entre machos e fêmeas, nas coletas seguintes foram utilizadas 20 cabeças em 200 µl de solução tampão Tris-HCl 8,8 0,1M e de 800 µl de solução de extração, no intuito de utilizar o sobrenadante para análise de eletroforese. 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 seguiu o método de Ellman *et al.* (1961). A solução de análise é composta por 3,0 ml de solução tampão fosfato pH 8, 20 µl de substrato, Iodeto de Acetilcolina 0,075 M; 100 µl DTNB 0,01M - 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, foi utilizado um controle sem a presença da enzima 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.

Os valores em absorvância encontrados foram convertidos em unidade de atividade (nkat ml^{-1}) que corresponde a constante catalítica da enzima como proposto por

Morton e Singh (1982). A atividade enzimática foi medida a partir do aumento da coloração amarela (Figura 6) produzida quando a tiocolina reage com o íon ditiobisnitrobenzoato.

Figura 6 - Cubetas utilizadas na análise da atividade da AChE no espectrofotômetro



Fonte: Da autora, 2018

Nota: as três primeiras cubetas apresentam a enzima e o substrato, já a última representa o controle, contendo apenas o substrato Acetilcolina

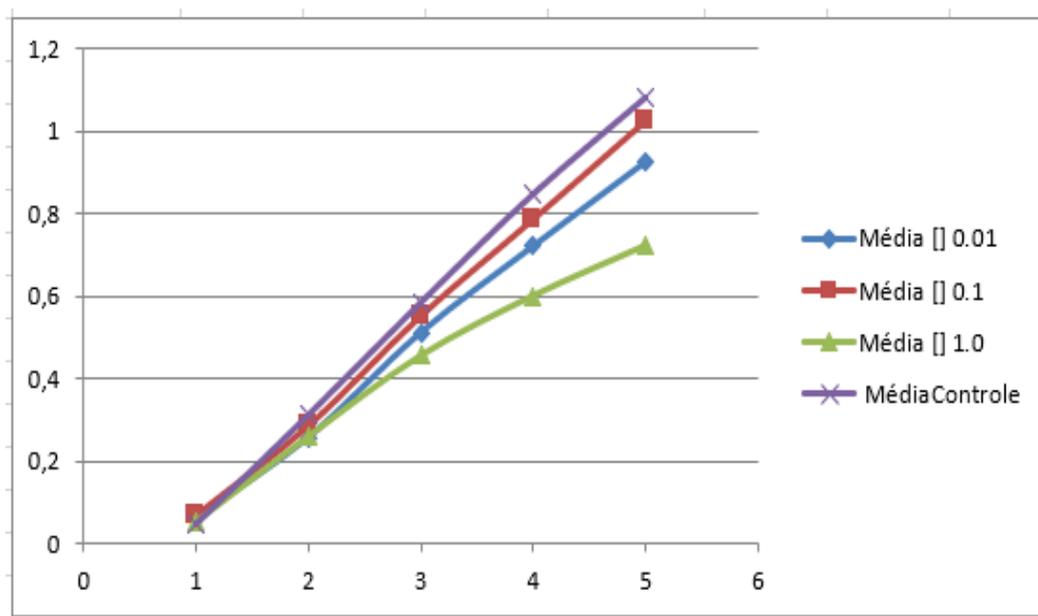
3.2.2 Inibição Enzimática

Primeiramente foi realizado um teste de eficiência para determinar dentre três diluições diferentes: 0,01 $\mu\text{l/ml}$; 0,1 $\mu\text{l/ml}$; 1 $\mu\text{l/ml}$ (Figura 7), qual apresentava maior inibição. A escolha das concentrações foi determinada para manter uma progressão logarítmica.

A inibição enzimática foi realizada, acrescentando à solução de análise descrita anteriormente, de 20 μl de uma solução aquosa de Malathion 500 CE, com diluição de 1 $\mu\text{l/ml}$, sendo esta a que apresentou maior inibição da enzima. A taxa de inibição foi medida por meio da concentração do produto da reação (tiocolina) após cinco leituras da

absorbância em espectrofotômetro a 412 nm, durante 20 minutos, com intervalos de cinco minutos para cada leitura.

Figura 7. Curvas de inibição da acetilcolinesterase de *Z. indianus* pelo Malathion em $\mu\text{l/ml}$



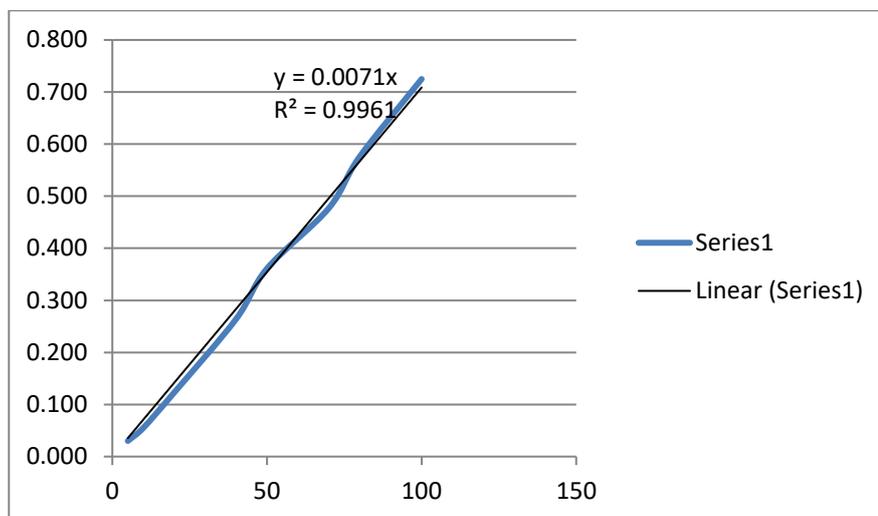
Fonte: Elaborada pela autora, 2018

Nota: Os pontos do eixo X correspondem aos tempos de exposição ao inibidor para definição da diluição mais eficaz a ser utilizada na análise de inibição enzimática, e a do Y corresponde a diluição de tiocolina, em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. 1: 0 minutos; 1: 5 minutos; 1: 10 minutos; 1: 15 minutos; 1: 20 minutos.

3.2.3 Dosagem de Proteína

A concentração de proteínas totais de todas as amostras das estações analisadas 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.

Figura 8 - Curva padrão de albumina bovina 1,0 mg/ml em solução salina (NaCl 0,9%) obtida e sua leitura foi realizada através da técnica de espectrofotometria de luz a 650 nm



Fonte: Elaborada pela autora, 2018

3.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

As amostras das cabeças maceradas em solução tampão também foram utilizadas para avaliação qualitativa da atividade de AChE de *Z. indianus*. Para isto, um volume de 15 µl dessa solução de cada uma das amostras foi aplicada em dois géis (um controle, outro exposto), aplicados em gel de poliacrilamida a 8%, compondo um conjunto de quatro amostras: 1) estação seca de Uberaba; 2) estação seca de Peirópolis; 3) estação úmida de Uberaba; 4) estação úmida de Peirópolis. Essas amostras foram, então, submetidas à eletroforese em tampão Tris-Glicina pH 8,3 a 200 V por 2 h (de acordo com CERON, 1988). Em seguida, os géis de poliacrilamida foram pré-incubados à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), por 30 minutos em Tampão Fosfato pH 6,2, sendo que um deles foi exposto, durante a incubação, a uma concentração de 1mM de Malathion, conforme proposto por Galego et al. (2006). Em seguida, os géis foram incubados à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), por 30 minutos, em solução de coloração para esterases, composta por 30 min em 50 mL de Tampão Fosfato pH 6,2, 30 mg de α -naftil acetato e 25 mg de β -naftil acetato dissolvidos em 1mL de acetona, 60 mg de Fast Blue RR diluídos em 5 mL de N-propanol. Após a detecção das bandas, os géis foram descorados/fixados por 24 horas em solução aquosa contendo 25% de etanol comercial, 10% de ácido acético glacial e 1,5% de glicerol. Os géis de poliacrilamida foram secos como descrito por Ceron, Santos e Bicudo (1992) e a intensidade das bandas da AChE foram comparadas entre o gel controle e o tratado com Malathion em relação as amostragens.

3.2.5 Análise de dados

As médias e erros-padrões dos resultados obtidos nos ensaios enzimáticos foram calculados cada grupo amostral 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: 0,01 e 1 $\mu\text{l/ml}$ 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. Para o cálculo das diferenças entre as dosagens de proteínas totais nas amostras foram realizados testes de qui-quadrado.

4 RESULTADOS

4.1 ENSAIO ENZIMÁTICO

4.1.1 Inibição por Malathion e atividade enzimática da AChE entre machos e fêmeas

A atividade da AChE de *Z. indianus* nas populações sazonais analisadas apresentou aumento, conforme esperado, ao longo do tempo de observação por espectrofotometria (de zero a 20 minutos), conforme pode ser observado na Tabela 2. A atividade mínima foi detectada no tempo 0 nas fêmeas da população sazonal do período úmido 2 de Peirópolis (0,010) e a máxima no tempo 20 minutos de medição, nos machos da população de Peirópolis coletados no período úmido 1 (1,242).

A inibição por Malathion da AChE de *Z. indianus*, por sua vez, indicou uma redução na atividade da enzima em todas as populações analisadas, quando comparada as amostras não expostas ao malathion, conforme observado na Tabela 3. Nessa condição experimental, a atividade da AChE variou entre 0,09, em machos oriundos da coleta realizada na estação seca 2 e nas fêmeas da úmida 2 de Peirópolis no tempo 0 de medição, a 0,875 em machos da coleta em período seco1 de Peirópolis.

As populações sazonais de *Z. indianus* amostradas em Uberaba, por sua vez, apresentaram a menor atividade da AChE no tempo 0 de medição nos machos da coleta Seca 2 (0,018) e a maior no tempo 20 em machos (0,933) oriundos da coleta realizada na estação Seca 1 (Tabela 2). A inibição da AChE por Malathion, por outro lado, indicou uma menor atividade dessa enzima no tempo 0 de medição em fêmeas da coleta da estação Úmida 1 (0,010) e a maior em machos da coleta da estação Seca 1 (0,681) no tempo 20 minutos de aferição.

Tabela 2 - Média e erros-padrão da atividade enzimática, em absorvância/ μg de proteína, da AChE de *Z. indianus*, enzima esta extraída de machos e fêmeas de *Z. indianus* oriundos de populações sazonais (seca e úmida) de Uberaba (MG) e Peirópolis, em cada tempo de aferição da atividade, bem como a ANOVA (F) para cada comparação entre grupos amostrais

População	Atividade Enzimática (absorvância/ μg de proteína)				
	$\bar{X} \pm \text{EP}$ (Tempo – min)				
<i>MACHOS</i> /Tempo	0	5	10	15	20
Uberaba (MG) Seca 1	0,053 \pm 0,010	0,318 \pm 0,040	0,547 \pm 0,039	0,758 \pm 0,049	0,933 \pm 0,047
Uberaba (MG) Seca 2	0,018 \pm 0,005	0,069 \pm 0,029	0,120 \pm 0,059	0,171 \pm 0,094	0,223 \pm 0,122
Uberaba (MG) Úmida 1	0,036 \pm 0,004	0,208 \pm 0,039	0,383 \pm 0,075	0,552 \pm 0,110	0,704 \pm 0,146
Uberaba (MG) Úmida 2	0,037 \pm 0,028	0,029 \pm 0,009	0,058 \pm 0,022	0,074 \pm 0,028	0,094 \pm 0,038
$F_{3;16}$	1,20	13,27***	15,62***	14,56***	13,50***
Peirópolis (MG) Seca 1	0,059 \pm 0,006	0,360 \pm 0,012	0,637 \pm 0,016	0,153 \pm 0,082	1,137 \pm 0,045
Peirópolis (MG) Seca 2	0,019 \pm 0,022	0,063 \pm 0,029	0,110 \pm 0,057	0,736 \pm 0,025	0,190 \pm 0,101
Peirópolis (MG) Úmida 1	0,053 \pm 0,007	0,268 \pm 0,012	0,488 \pm 0,022	0,108 \pm 0,016	1,242 \pm 0,179
Peirópolis (MG) Úmida 2	0,019 \pm 0,004	0,051 \pm 0,012	0,080 \pm 0,012	0,933 \pm 0,046	0,142 \pm 0,019
$F_{3;16}$	12,48***	86,74***	94,11***	102,25***	23,57***
<i>FÊMEAS</i> /Tempo	0	5	10	15	20
Uberaba (MG) Seca 1	0,058 \pm 0,011	0,376 \pm 0,095	0,537 \pm 0,045	0,739 \pm 0,048	0,897 \pm 0,023
Uberaba (MG) Seca 2	0,019 \pm 0,002	0,076 \pm 0,019	0,134 \pm 0,037	0,088 \pm 0,025	0,844 \pm 0,012
Uberaba (MG) Úmida 1	0,049 \pm 0,010	0,218 \pm 0,007	0,352 \pm 0,027	0,650 \pm 0,020	0,756 \pm 0,020
Uberaba (MG) Úmida 2	0,020 \pm 0,002	0,044 \pm 0,009	0,063 \pm 0,015	0,087 \pm 0,25	0,103 \pm 0,025
$F_{3;16}$	4,71*	6,59**	36,35***	108,62***	71,49***
Peirópolis (MG) Seca 1	0,059 \pm 0,008	0,381 \pm 0,012	0,634 \pm 0,015	0,765 \pm 0,019	0,874 \pm 0,017
Peirópolis (MG) Seca 2	0,015 \pm 0,005	0,065 \pm 0,032	0,110 \pm 0,061	0,625 \pm 0,007	0,155 \pm 0,093
Peirópolis (MG) Úmida 1	0,043 \pm 0,005	0,265 \pm 0,011	0,452 \pm 0,011	0,616 \pm 0,011	0,642 \pm 0,015
Peirópolis (MG) Úmida 2	0,010 \pm 0,001	0,019 \pm 0,002	0,038 \pm 0,005	0,607 \pm 0,008	0,192 \pm 0,057
$F_{3;16}$	15,40***	112,07***	110,13***	61,08***	73,57***

Fonte: elaborada pelo autor, 2018

Nota: Valores significativos para a ANOVA estão em negrito.

Tabela 3 - Média e erros-padrão da atividade enzimática, em absorvância/ μg de proteína, da AChE de *Z. indianus*, enzima esta extraída de machos e fêmeas de *Z. indianus* oriundos de populações sazonais (seca e úmida) de Uberaba (MG) e Peirópolis, em cada tempo de aferição da atividade, com substrato de análise tratado com Malathion, bem como a ANOVA (F) para cada comparação entre grupos amostrais

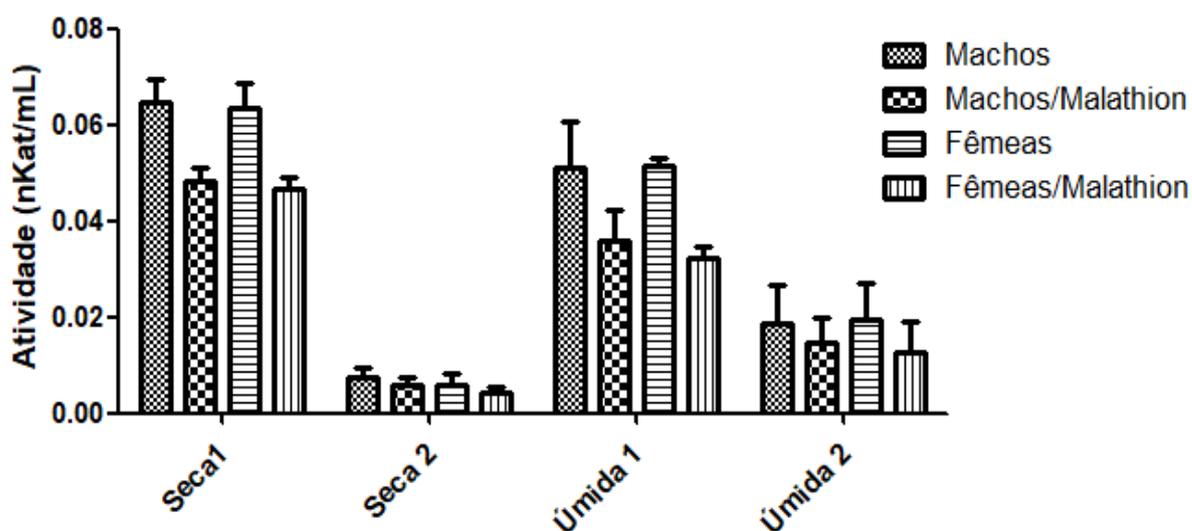
População	Atividade Enzimática (absorvância/ μg de proteína) X _± EP (Tempo – min)				
	0	5	10	15	20
<i>MACHOS</i>					
Uberaba (MG) Seca 1	0,011±0,003	0,236±0,017	0,429±0,024	0,570±0,021	0,681±0,018
Uberaba (MG) Seca 2	0,016±0,005	0,068±0,017	0,103±0,036	0,130±0,052	0,152±0,065
Uberaba (MG) Úmida 1	0,036±0,004	0,184±0,027	0,316±0,052	0,432±0,079	0,508±0,092
Uberaba (MG) Úmida 2	0,017±0,001	0,041±0,004	0,074±0,010	0,084±0,014	0,095±0,020
F _{3;16}	10,94***	19,95***	19,91***	18,12***	19,31***
Peirópolis (MG) Seca 1	0,042±0,010	0,239±0,025	0,455±0,014	0,732±0,061	0,875±0,008
Peirópolis (MG) Seca 2	0,009±0,003	0,050±0,026	0,086±0,044	0,118±0,060	0,153±0,077
Peirópolis (MG) Úmida 1	0,044±0,005	0,257±0,020	0,361±0,019	0,484±0,029	0,589±0,040
Peirópolis (MG) Úmida 2	0,017±0,004	0,039±0,008	0,063±0,009	0,080±0,010	0,113±0,012
F _{3;16}	5,69*	5,782*	72,57***	42,10***	33,38***
<i>FÊMEAS</i>					
Uberaba (MG) Seca 1	0,037±0,005	0,241±0,017	0,411±0,014	0,547±0,123	0,657±0,015
Uberaba (MG) Seca 2	0,011±0,008	0,033±0,027	0,053±0,044	0,076±0,062	0,098±0,075
Uberaba (MG) Úmida 1	0,035±0,011	0,178±0,017	0,301±0,020	0,380±0,030	0,446±0,004
Uberaba (MG) Úmida 2	0,010±0,007	0,040±0,017	0,044±0,019	0,067±0,029	0,086±0,031
F _{3;16}	2,94	27,99***	58,77***	49,04***	44,75***
Peirópolis (MG) Seca 1	0,035±0,005	0,290±0,016	0,439±0,016	0,554±0,027	0,725±0,046
Peirópolis (MG) Seca 2	0,018±0,005	0,066±0,034	0,102±0,053	0,135±0,007	0,164±0,081
Peirópolis (MG) Úmida 1	0,027±0,011	0,171±0,010	0,308±0,011	0,415±0,018	0,519±0,030
Peirópolis (MG) Úmida 2	0,009±0,002	0,014±0,002	0,026±0,004	0,046±0,008	0,061±0,010
F _{3;16}	1,69	47,86***	61,31***	48,86***	43,23***

Fonte: Elaborada pelo autora, 2018

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

Os coeficientes de variação (erro-padrão/média) para todos os dados amostrais incluindo machos e fêmeas para um mesmo tempo de aferição da absorbância da atividade enzimática da AChE de *Z. indianus*, bem como nas amostras tratadas e coleta (área e estação) são apresentados na Tabela 4, o mesmo ocorrendo na análise gráfica desses resultados (Figura 6). Houve diferença significativa (>25%) entre a atividade enzimática da AChE entre machos e fêmeas de *Z. indianus* para a 2ª coleta em estação seca realizada em Uberaba nos tempos de medição 10, 15 e 20 minutos, o mesmo ocorrendo para a 2ª de estação úmida de Uberaba no tempo 0, e para a 2ª coleta da estação seca em Peirópolis, nos tempos 5, 10 e 20 minutos. Padrão similar foi registrado para a inibição da AChE pelo Malathion, de forma que a 2ª coleta da estação seca apresentou diferenças significativas entre machos e fêmeas tanto Uberaba quanto de Peirópolis. Nessas coletas, machos apresentaram maior atividade enzimática da AChE e menor inibição da enzima pelo Malathion do que as fêmeas, conforme dados apresentados pela Figura 9. Em virtude desse resultado, as demais análises estatísticas foram realizadas utilizando os dados conjuntos de machos e fêmeas.

Figura 9 - Atividade da AChE de *Z. indianus* em machos e fêmeas coletados em estações secas (1: junho/2018; 2: setembro/2018) e Úmida (Chuva 1: março/2018; Chuva 2: dezembro/2018), na ausência e presença do inseticida organofosforado Malathion



Fonte: Da autora, 2018

Tabela 4 - Coeficientes de variação da atividade enzimática da AChE, bem como desta sob exposição ao Malathion (inibição), em populações sazonais de *Z. indianus* amostradas em estações Secas (S1:junho/2018; S2: setembro/2018) e Úmida (U1: março/2018; U2: dezembro/2018)

Coleta		Atividade da AChE					Inibição da AChE pelo Malathion				
		0	5	10	15	20	0	5	10	15	20
<i>Uberaba</i>	S1	13	14%	5%	4%	4%	5%	5%	3%	2%	2%
	S2	%	22%	26%	37	28	33	32	36	38	38
	U	13	9%	10%	%	%	%	%	%	%	%
	I	%	18%	20%	9%	10	15%	8%	9%	10%	10%
	U	13			22	%	26	20%	19%	19%	19%
	2	%			%	21	%				
		46				%					
		%									
<i>Peirópolis</i>	S1	8%	2%	2%	2%	2%	14%	6%	2%	6%	6%
	S2	15	31	35	3%	38	23%	34	34	33	33
	U	%	%	%	3%	%	18%	%	%	%	%
	I	9%	3%	3%	21	10	20%	8%	4%	4%	5%
	U	18	23%	17%	%	%		23%	19%	14%	14%
	2	%				16					
					%						

Fonte: Elaborada pela autora, 2018

Nota: Os valores em negrito representam os resultados que apresentaram diferenças significativas entre as coletas.

4.1.2 Inibição por *Malathion* e atividade enzimática entre estações (úmida e seca)

A atividade enzimática da AChE de *Z. indianus*, quando considerada a variação dela entre os tempos 0 e 20 minutos de medição e a sazonalidade (seca e úmida) indicou valores entre 0,043 e 0,061 mol/ml, em indivíduos da coleta na estação Úmida 2 de Uberaba e Peirópolis, entre 0,539/0,652 mol/ml, na estação Seca 1 de Uberaba e Peirópolis. Sob a ação do Malathion, a atividade da AChE variou entre 0,077 e 0,074 mol/ml, nos indivíduos da coleta na estação Úmida 2 de Uberaba e Peirópolis, entre 0,643 e 0,762 mol/ml, na estação Seca 1 de Uberaba e Peirópolis. O maior aumento percentual da atividade da AChE de *Z. indianus* foi detectado nos indivíduos da coleta Seca1 de Peirópolis (65,1%) e o menor nos da coleta Úmida 2 de Uberaba (4,3%), sem inibição pelo Malathion. O aumento percentual da atividade da enzima nas amostras tratadas com Malathion variou entre 4,6% (Úmida 2 Peirópolis) e 47,4% (Seca 1 Peirópolis). Os dados para todas as amostragens estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Média e erros-padrão da variação da atividade enzimática da AChE de *Z. indianus*, com ou sem inibição por Malathion, em *Abs/μg proteína* e porcentagem (%), avaliados em espectrofotometria entre os tempos 0 e 20 minutos enzima esta extraída de indivíduos de *Z. indianus* oriundos de populações sazonais (seca e úmida) de Uberaba (MG) e Peirópolis, (Seca 1: junho/2018; Seca 2: setembro/2018) e Úmida (Úmida 1: março/2018; Úmida 2: dezembro/2018)

Coletas	Atividade da AChE sem inibição		Atividade da AChE com inibição	
	(Abs / μg Prot.)	%	(Abs / μg Prot.)	%
<i>Uberaba</i>				
Seca 1	0,539±0,017	53,8±1,7	0,643±0,013	40,0±0,8
Seca 2	0,135±0,041	13,52±4,1	0,111±0,045	6,9±2,8
Úmida 1	0,447±0,004	44,71±4,3	0,442±0,051	27,46±3,2
Úmida 2	0,043±0,018	4,3±1,8	0,077±0,014	4,8±0,9
<i>Peirópolis</i>				
Seca 1	0,652±0,022	65,1±1,4	0,762±0,046	47,4±2,9
Seca 2	0,113±0,047	11,3±4,7	0,145±0,049	9,0±3,1
Úmida 1	0,614±0,066	61,4±6,6	0,517±0,028	32,2±1,8
Úmida 2	0,061±0,010	6,0±1,0	0,074±0,010	4,6±0,6

Fonte: Elaborada pela autora, 2018

As comparações par-a-par (teste t) para os dados da atividade enzimática da AChE de *Z. indianus* na presença ou ausência do inibidor Malathion (Tabela 6) indicaram diferenças significativas para os dados de quase todas as populações, com exceção para as comparações entre as atividades sem inibição em (i) Uberaba Seca 2 e Peirópolis Seca 2; (ii) Peirópolis Seca 1 e Peirópolis Úmida 2/ Uberaba Seca 1; (iii) Peirópolis Úmida 2 e Uberaba Úmida 2/Peirópolis Seca 2. Em relação à atividade com inibidor, as comparações foram não significativas entre (i) Uberaba Seca 1 e Peirópolis Seca 1; (ii) Uberaba Seca 2 e Uberaba Úmida 2, Peirópolis Seca 2 e Úmida 2; (iii) Uberaba Úmida 1 e Peirópolis Úmida 1.

Tabela 6 - Comparações par-a-par realizadas pelo teste t de student para a variação da atividade enzimática da AChE de *Z. indianus* avaliada entre os tempos 0 e 20 minutos para cada amostragem sazonal realizada em populações de Uberaba (Ura) e Peirópolis (Pei).

	<i>Ura_{S1}</i>	<i>Ura_{S2}</i>	<i>Ura_{U1}</i>	<i>Ura_{U2}</i>	<i>Pei_{S1}</i>	<i>Pei_{S2}</i>	<i>Pei_{U1}</i>	<i>Pei_{U2}</i>
<i>Ura_{S1}</i>	--	11,53***	1,98*	24,87***	-5,14***	10,78***	-1,34	26,09***
<i>Ura_{S2}</i>	12,66***	--	-6,28***	3,56**	-14,73***	0,76	-5,84***	3,00**
<i>Ura_{U1}</i>	3,80***	-6,01***	--	10,44***	-4,43***	6,48***	-2,15*	10,12***
<i>Ura_{U2}</i>	30,73***	0,77	8,62***	--	-31,45***	-2,13*	-7,64***	-1,16
<i>Pei_{S1}</i>	-2,46	-11,57***	-4,64***	-17,13***	--	13,44***	-0,13	33,67***
<i>Pei_{S2}</i>	12,18***	-0,98	5,35***	-2,16*	11,00***	--	-6,10***	1,61
<i>Pei_{U1}</i>	3,95***	-9,19***	-1,39	-16,71***	4,52***	-8,48***	--	7,41***
<i>Pei_{U2}</i>	35,19***	0,88	8,87***	0,20	17,70***	2,32*	17,75***	--

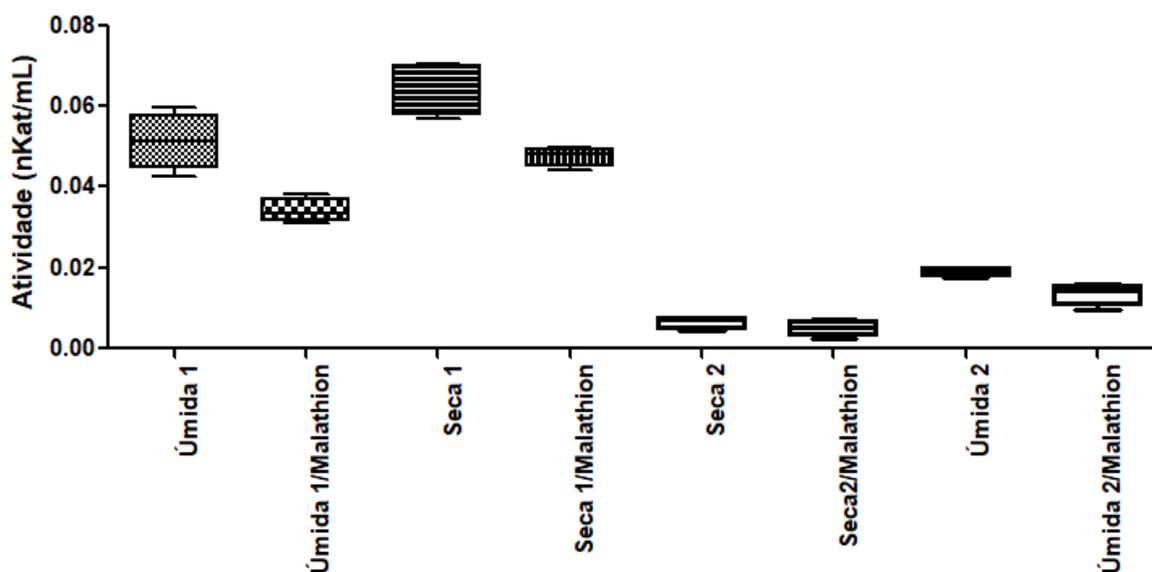
*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Fonte: elaborada pelo autor, 2018

Nota: A diagonal superior apresenta dados da atividade sem inibidor e a inferior com o inibidor Malathion. Valores significativos para o teste estão em negrito. **S1**: Seca 1, junho/2018; **S2**: Seca 2, setembro/2018; **U1**: Úmida, março/2018; **U2**: Úmida 2, dezembro/2018.

A atividade enzimática encontrada nas coletas que correspondem as estações definidas como secas e úmidas, apresentaram resultados correspondentes as estações que possuem uma proximidade cronológica, ou seja, úmida 1 – seca 1 e seca 2 – úmida 2, e que os padrões de atividade foram similares em estações sucessivas (mais altos em úmida 1 e Seca 1; mais baixos em Seca 2 e úmida 2). Sendo que as estações úmida 1(março) e seca 1(junho) apresentaram um padrão de atividade mais alto quando comparadas as atividades das estações seca 2 (setembro) e chuva 2 (dezembro) (Figuras 10 e 11). Os valores encontrados tanto de machos e fêmeas, quanto de Uberaba e Peirópolis foram unidos para verificar a atividade por estação de maneira geral.

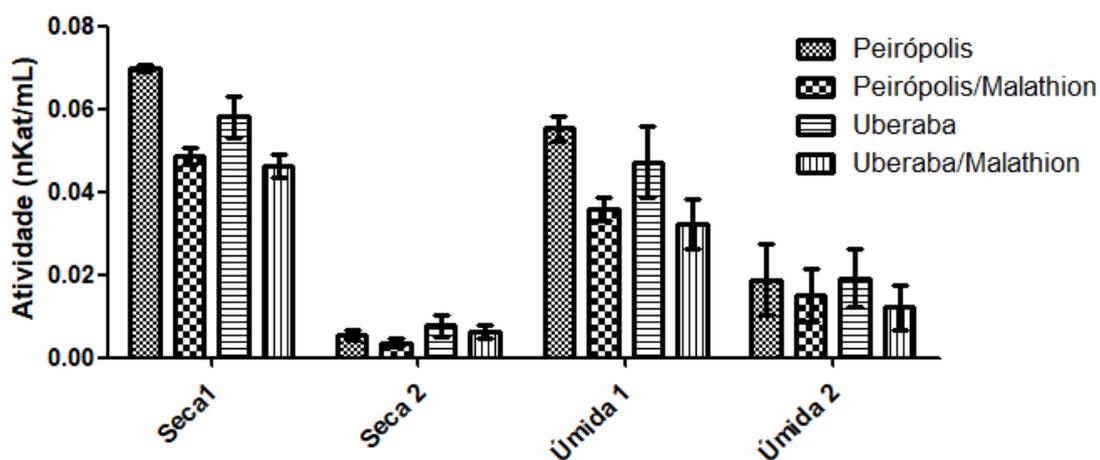
Figura 10 - Atividade da AChE de *Z. indianus* nas estações chuvosas 1 e 2 (Março/2018; Dezembro/2018) e secas 1 e 2 (Junho/2018; Setembro/2018) na ausência e presença do inseticida organofosforado Malathion



Fonte: Do autora, 2018

Os testes de análise bioquímica, com cubetas contendo o inseticida apresentaram resultados de inibição enzimática mais altos nas estações seca 1 e chuva 1, quando comparados com os valores de atividade enzimática sem a presença do composto Malathion. Além disso foi possível observar que as populações de Peirópolis apresentaram maior sensibilidade ao inseticida que as populações de Uberaba.

Figura 11 - Atividade da AChE de *Z. indianus* em Uberaba e Peirópolis, para cada coleta, na ausência e presença do inseticida organofosforado Malathion.

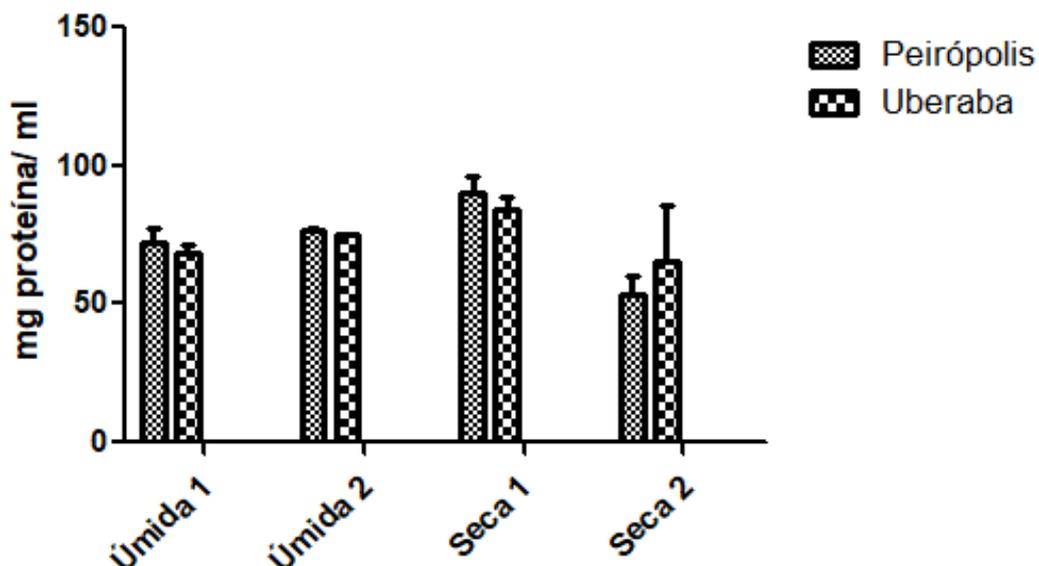


Fonte: Da autora, 2018

4.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

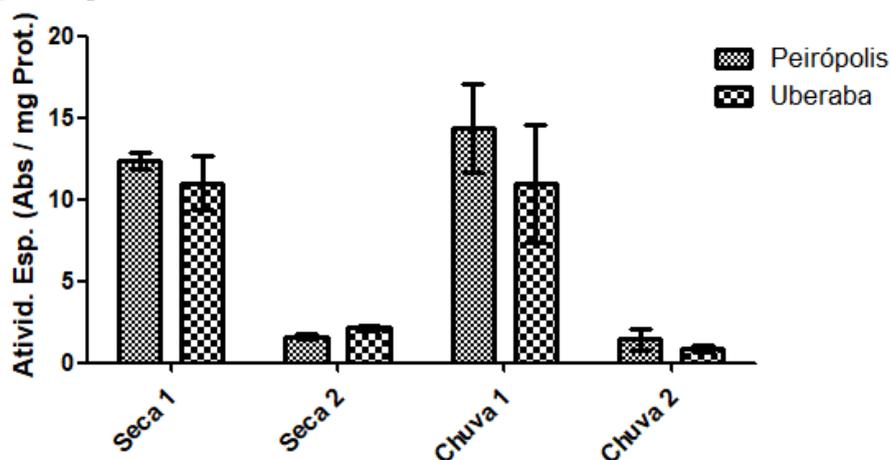
Os resultados obtidos na dosagem de proteínas evidenciaram que todas as amostras apresentam resultados dentro do intervalo de 50 a 100 μg de proteína/ ml (Figura 12). Portanto, o gráfico da atividade específica da amostra segue um padrão de colunas semelhante aos apresentados nas análises de atividade enzimática, onde a atividade das estações seca e chuva 1, são maiores quando comparadas as estações seca e chuva 2 (Figura 13).

Figura 12 - Dosagem de proteínas- valor em mg de proteínas presentes na amostra



Fonte: Da autora, 2018

Figura 13 - Atividade específica- que corresponde ao valor da média em absorvância pela concentração de proteínas totais em cada amostra

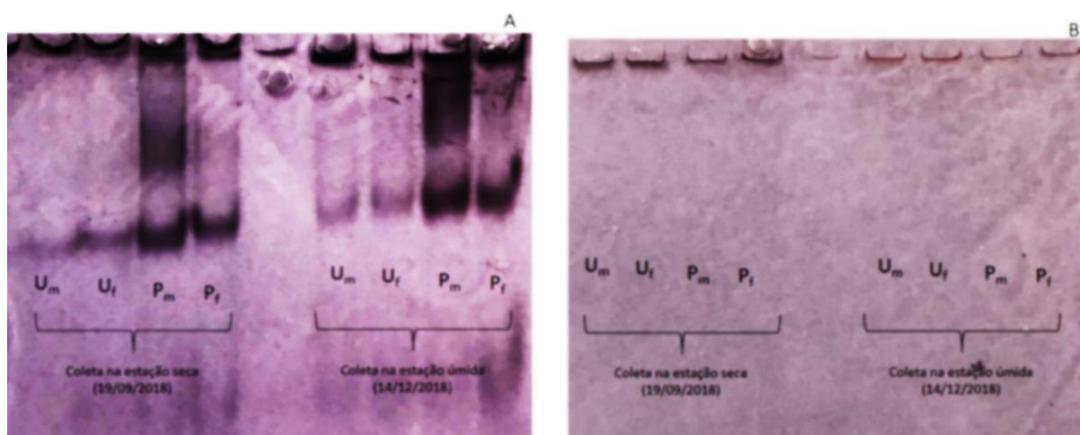


Fonte: Da autora, 2018

4.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

A PAGE das amostras contendo as cabeças de *Z. indianus* oriundas de coletas em estações Seca (s) e Úmida (u) realizadas em Uberaba (U) e Peirópolis (P) é apresentada na Figura 14A. Os resultados indicaram, em virtude da coloração mais intensa da banda referente a enzima, uma maior atividade da AChE oriunda de indivíduos de Peirópolis, especialmente na estação úmida. Machos também apresentaram maior intensidade na coloração das bandas do que fêmeas. As AChE em todas as amostras foram inibidas pelo Malathion, conforme evidenciado na Figura 14B.

Figura 84 A/B: Padrão de bandas da AChE em machos (m) e fêmeas (f) de *Z. indianus* oriundas de coletas realizadas em estações seca e úmida em Uberaba (U) e Peirópolis (P) em géis de poliacrilamida



Fonte: Da autora, 2018

5 DISCUSSÃO

Compreender os mecanismos moleculares de resposta do organismo à mudança do ecossistema, como por exemplo a sazonalidade e a presença de componentes tóxicos, pode ser utilizado como ferramenta no monitoramento e gerenciamento da espécie. O presente estudo buscou verificar se a variável sexo, apresentava alterações enzimática distintas, o que poderia interferir nos dados de análises relacionadas a resposta populacional de *Z. indianus*, caso as amostras fossem analisadas em conjunto. Por isso, se fez necessária a avaliação da atividade enzimática da AChE de machos e fêmeas, afim de averiguar se existiriam alterações significativas. Os resultados apresentaram níveis de significância na estação seca 2 de Peirópolis e Uberaba, e não significativos nas demais coletas. O mesmo tipo de análise, utilizando o método Ellman et al. (1961), foi realizada em *Ceratitis capitata* da família dos Tefitrídeos, em um teste de toxicidade de compostos naturais, e não foi encontrada diferença significativa (RABEAA et al., 2014). Partindo desse princípio de atividade independente do sexo, foi possível analisar em cada população (Uberaba e Peirópolis) um total de 40 indivíduos por estação.

Os valores de atividade enzimática foram mais altos nas duas primeiras estações analisadas quando comparadas as duas estações subsequentes, lembrando que os meses de junho e dezembro correspondem ao meio da estação (Seca1 e Úmida 2) e de março e junho ao final (Úmida 1 e Seca 2). Esse resultado pode estar relacionado a diferente pressão de seleção apresentada pela estação chuvosa 1 e seca 2, esse tipo de variações sazonais na atividade enzimática já foi encontrada em insetos (BELZUNCES et al., 1992; THOMPSON, 1996). A estação chuvosa possui maior temperatura e disponibilidade de recursos, além de ser considerada época reprodutiva, portanto é possível observar um evento de seleção natural atuando nessas populações, pois os indivíduos que apresentaram maior atividade da enzima Acetilcolinesterase conseguem responder melhor as condições apresentadas pela estação úmida, tendo em vista que a acetilcolinesterase está envolvida no processo de transmissão do impulso nervoso e a acetilcolina está relacionada a funções no processo cognitivo (ARAÚJO, 2016). O processo inverso ocorre na estação seca, devido ao custo adaptativo metabólico.

Os dados relacionados a atividade por estação também demonstram uma similaridade entre as estações chuva e seca 1 e seca e chuva 2. Essa similaridade pode ser explicada ao se considerar o curto tempo de duração das gerações de *Z. indianus* que consiste em aproximadamente 20 dias (ALAWAMLEH et al., 2016; SETTA;

CARARETO, 2005). De modo que os alelos selecionados na estação anterior ainda estão presentes na estação que a sucede, o que de acordo com os cálculos do tempo de vida, correspondem a 4 gerações entre uma estação e outra, aproximadamente.

A inibição enzimática causada pela adição do organofosforado apresentou uma correlação com a disponibilidade de recursos, assim como a atividade da AChE sem o inseticida, decorrente do auto índice de umidade. Estações chuvosas tendem a determinar um maior tamanho populacional e, com isso, maior diversidade genética (KHAMBHAMPATI; BLACK 1991; AYRES et al., 2003). A relação entre umidade e disponibilidade de recursos se deve ao fato de que a presença de umidade permite a proliferação de um número maior de leveduras e bactérias em frutos que pertencem a dieta alimentar da espécie *Z. indianus* (GOMES et al., 2003). Essa relação contribui com o aumento populacional, pois, a espécie utiliza o fruto para ovoposição, o que resulta no aumento na sua taxa reprodutiva (DOGE et al., 2015). Uma maior abundância de indivíduos de uma população, aumenta a variabilidade genética, e conseqüentemente a probabilidade de algum alelo de resistência surgir e estar presente na população natural, o inverso ocorrendo em populações de estações secas (FFRENCH-CONSTANT, 2013).

Os insetos apresentam uma ameaça não apenas econômica ao atingirem o status de praga agrícola, como também comprometem a saúde humana, pois algumas espécies transmitem doenças como a dengue, a malária, a febre amarela, a doença de chagas, a leishmaniose e a filariose (TAUIL, 2006). O Malathion pertence ao grupo dos organofosforados que são comumente utilizados no combate de insetos de modo geral, inclusive no controle de vetores (SINGHI et al., 2007). Os dados obtidos neste trabalho sugerem que provavelmente as populações de *Z. indianus* de Uberaba e Peirópolis apresentam um histórico de exposição ao Malathion (ou algum outro OP) em Uberaba e Peirópolis, uma vez o controle de vetores geralmente envolvem a aplicação de OPs e ocorrem no final da estação úmida e início da seca. Estudos direcionados a análise da sazonalidade da resistência a inseticidas na espécie *Culex pipiens*, encontraram no mês de março, uma mortalidade de aproximadamente 80% por Malathion, já no mês de outubro notou-se um aumento da resistência com um valor de mortalidade que variou de 68% a 84%. Essa alteração foi explicada pelos autores como sendo um resultado da pulverização do inseticida durante o verão (TASKIN et al., 2016).

Os dados apresentados também nos mostram um menor efeito do inseticida em Uberaba quando comparada as populações de Peirópolis, provavelmente pela diferença de graus de urbanização dos locais coletados.

É importante ressaltar que assim como nos testes de atividade enzimática, os dados de inibição também permanecem semelhantes nas estações chuva e seca 1 e seca e chuva 2, pois os indivíduos susceptíveis e os resistentes selecionados na estação anterior, fazem com que os alelos permaneçam na população por algumas gerações.

Os resultados da análise de dosagem de proteínas contribuíram para a confirmação de que a alteração da atividade catalítica da enzima AChE está relacionada a pressão de seleção do ambiente e não a quantidade de enzima presente na amostra, pois os dados demonstram uma baixa variação nos valores de absorbância das amostras analisadas que respeitam o intervalo de 50 a 100 mg de proteína/ ml. Portanto, o gráfico de atividade específica, se assemelha aos resultados encontrados nos testes de atividade enzimática.

A sazonalidade associada a plasticidade fenotípica, é um fator que pode ser determinante na distribuição, fisiologia e sobrevivência de seres vivos (PARKASH et al., 2009). Alterações na atividade enzimática relacionada aos ciclos climáticos anuais já era discutida (DAILIANIS et al., 2003; LAU et al., 2004; PFEIFER et al., 2005). Os resultados da presente pesquisa evidenciaram a plasticidade fenotípica na atividade da enzima Acetilcolinesterase em resposta a sazonalidade, e resultados similares foram encontrados em *Philosamia ricini* (bicho-da-seda) como resposta a estresse devido a baixas temperaturas (SINGH et al., 2013). Outros estudos encontraram alterações metabólicas induzidas por estresse climático na espécie *Z. indianus*, como endurecimento por calor, a aclimatação a fome e a dessecação. Os resultados mostraram um aumento nos níveis, de trealose (54%), prolina (49%) e lipídios corporais totais (36%) (KALRA; PARKASH, 2016; KALRA et al., 2017).

A enzima AChE permitiu a compreensão de diferentes fatores, relacionados a sazonalidade, que influenciam uma população de drosofilídeos como *Z. indianus*, bem como o estudo da interação entre enzima e inseticida, possibilitando um maior entendimento do histórico de aplicação da espécie nas regiões coletadas. O que comprova o seu alto potencial como bioindicadora de contaminação por Malathion.

6 CONCLUSÃO

O estudo da espécie *Z. indianus* e sua interação com o ambiente nos permitiu compreender o padrão de resposta da espécie quando em contato com o composto inseticida Malathion. A enzima Acetilcolinesterase alvo desse inseticida, mostrou alterações não só em relação a inibição enzimática quando em contato com o composto, como também alterações em sua capacidade catalítica em resposta a alterações climáticas apresentadas durante o ano.

Portanto, com base nos resultados obtidos, a enzima AChE presente no sistema nervoso central dos organismos, incluindo a espécie *Z. indianus* mostrou um alto potencial como bioindicadora de contaminação por Malathion. Essa enzima pode ser utilizada como uma espécie *repórter* para o controle e monitoramento de contaminação ambiental por Malathion e outros compostos organofosforados. Além disso, os resultados de inibição demonstraram que entre os meses de março a junho, esta enzima está mais susceptível ao inseticida, o que indica que são meses adequados para o controle de pragas e vetores. O estabelecimento de períodos para promover o contato do inseticida com as populações alvo, reduz a interação e a pressão seletiva causada pelo composto, o que permite a diminuição na frequência de alelos resistentes.

Foi possível também, encontrar alterações sazonais da enzima como resposta a alterações climáticas, nas análises bioquímicas realizadas. Esses resultados nos convida a refletir que as alterações na atividade enzimática podem ocorrer por outros fatores que não envolvem apenas a inibição da enzima por competição do seu sitio ativo, como ocorre com os organofosforados.

REFERÊNCIAS

- ALAWAMLEH, A. *et al.* Biological Studies on the african fig fly, *Zaprionus indianus* GUPTA (Diptera: Drosophilidae). **Agriculture & Forestry**, Podgorica, v. 62, n. 4, p. 65-71, 2016.
- ANANINA, G. *et al.* Inversion polymorphism and a new polytene chromosome map of *Zaprionus indianus* Gupta (1970) (Diptera, Drosophilidae). **Genética**, Bowling Green, v. 131, p. 117-25, 2007.
- ANVISA. **Portaria nº 10/SNVS de 08 de Março de 1985**. [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 providencias]. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 mar. 1985. Disponível em: <https://www.jusbrasil.com.br/diarios/3413972/pg-75-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-14-03-1985>. Acesso em: 12 jan. 2018.
- ARAÚJO, C. R. M. *et al.* Acetilcolinesterase - AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual Química**, Niterói, v. 8, n. 6, p.1818-34, 2016.
- AYRES, C. F. J. *et al.* Genetic differentiation of *Aedes aegypti*, the major dengue vector in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 40, p. 430-5, 2003.
- BACHLI, G. **TaxoDros**: the database on taxonomy of Drosophilidae. 2015. Disponível em: <http://www.taxodros.uzh.ch/>. Acesso em: 07 jul. 2017.
- BAKRY, F. A.; HASHEESH, W. S.; HAMDI, S. A. H. Biological, biochemical, and molecular parameters of *Helisoma duryi* snails exposed to the pesticides Malathion and Deltamethrin. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, Califórnia, v. 101, n. 2, p. 86–92, 2011.
- BELZUNCES L. P.; GAUTHIER M.; COLIN M. E. Acetylcholinesterase in *Apis mellifera* head during postembryonic development—existence of a glycoinositol-anchored membrane form at early pupal stages. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, Oxford, v. 103, p. 57–63, 1992.
- BENCHARIT, R. W. *et al.* Crystal structure of human carboxylesterase 1 complexed with the Alzheimer’s drug tacrine: from binding promiscuity to selective inhibition. **Chemistry and Biology**, Mariland Heights, v. 10, p. 381-6, 2003.
- BRAGA, I. A.; VALLE, V. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, DF, v. 16, p. 279-93, 2007.
- CANDIDO, A. K. A. A. *et al.* Fauna edáfica como bioindicadores de qualidade ambiental na nascente do rio São Lourenço, Campo Verde - MT, Brasil. **Engenharia Ambiental**, Local, v. 9, n. 1, p. 67-82, 2012.

- CASTRO, F. L.; VALENTE, V. L. S. *Zaprionus indianus* invading communities in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Drosophila Information Service**, Oklahoma, n. 84, p. 15-7, 2001.
- CERON, R. Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos. **Biological Sciences – Genetics**, Leicester, v., n., p.28-33, 1988.
- CHASSAGNARD, M. T.; TSACAS, L. Le sous-genre *Zaprionus* S. Str. Définition de groupes d'espèces et révision du sous-groupe vittiger (Diptera: Drosophilidae). **Annales de la Société Entomologique de France**, n. 29, p. 173-194, 1993.
- CHEMINOVA Ltda Brasil. **Malathion 1000 EC Cheminova**. 2017. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/MALATHION1000ECHEMINOVA.pdf>. Acesso em: 24 jul. 2018.
- CLARK, A. G. *et al.* Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. **Nature**, London, v. 450, p. 203–18, 2007.
- COQUILLET, D. W. New Diptera from Southern Africa. **Proc. United States National Museum.**, Kansas, v. 24, p. 27-32, 1902.
- COMMAR L. S. *et al.* Taxonomic and evolutionary analysis of *Zaprionus indianus* and its colonization of Palearctic and Neotropical regions. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 2, p. 395–406, 2012.
- CULIK, M. P.; MARTINS, D. S.; VENTURA, J. A. Uma nova praga potencial para o mamão e outros registros de pragas no Espírito Santo. *In*: SIMPOSIO PAPAYA BRASILEIRO, 2, 2005, Vitória. **Anais [...]**. Vitória: INCAPER, 2005. p. 518-21. Disponível em: <https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/916/1/2005-entomologia-19.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- DAILIANIS, S. *et al.* Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**, Amsterdam, v. 56, p. 446-70, 2003.
- DA MATA, R. A. *et al.* Invasive and flexible: niche shift in the drosophilid *Zaprionus indianus* (Insecta, Diptera). **Biological Invasions**, Knoxville, n. 12, p. 1231–41, 2010.
- DAVID, J. R. *et al.* Sexual dimorphism of body size and sternopleural bristle number: a comparison of geographic population of an invasive cosmopolitan drosophilid. **Genetica**, v. 128, p. 109-22, 2006a.
- DAVID, J. R. *et al.* Quantitative trait analyses and geographic variability of natural populations of *Zaprionus indianus*, a recent invader in Brazil. **Heredity**. Edinburgh, v. 96, p. 53-62, 2006b.
- DEWEY, J. E. Utility of bioassay in the determination of pesticide residues. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Washington, v. 6, n.4, p. 274-281, 1958.

DOGE, 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. **Biol Invasions**, Dordrecht, v. 17, p. 2461–2474, 2015.

DOMINGUES, I.; et al. Cholinesterase and glutathione S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. **Environmental Toxicology & Chemistry**, New York, v. 29, p. 5–18, 2010.

ELLMAN, G. L.; et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 7, p. 88-95, 1961.

FERREIRA, D.S.; TIDON, R. Colonizing potential of Drosophilidae (insect, Diptera) in environments with different grades of urbanization. **Biodiversity and conservation**, London, v.14, n.8, p. 1809-1821, 2005.

FEYEREISEN, R.; DERMAUW, W.; LEEUWEN, T. VAN. Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in 2 arthropods. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 121, p. 61-77, 2015.

FOURNIER, D., MUTERO, A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 108, p. 19-31, 1994.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. The molecular genetics of insecticide resistance. **Genetics**, Austin, v. 194, p. 807-815, 2013.

GALEGO, L. G.; CERON, C. R.; 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. Effects of intraspecific and interspecific pre-adult competition on the neotropical region colonizer fly *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). **Bragantia**, Campinas, v. 64, p. 249-255, 2005.

GALEGO, L. G. C.; CARARETO, C. M. A. Analysis of the drosophilid *Zaprionus indianus* introduction in Brazil: Contribution of esterase loci polymorphisms. **Drosophila Information Service**, Oklahoma, v. 90, p.79-84, 2007.

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.

GALLOWAY, T.S; HANDY, R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. **Ecotoxicology**, London, v. 12, p.345–363, 2003.

- GARCIA, L. M., et al. Characterization of cholinesterase from guppy (*Poecilia reticulata*) muscle and its in vitro inhibition by environmental contaminants. **Biomarkers**, London, v. 5, p. 274–284, 2000.
- GILBERT, P. et al. *Drosophila* as models to understand the adaptive process during invasion. **Biological Invasions**, Dordrecht, v.18, p.1089–1103, 2016.
- GOMES, L. H. et al. Presence of the yeast *Candida tropicalis* in figs infected by the fruit fly *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae). *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 34, p. 5-7, 2003.
- GOÑI, B., et al. First record of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera Drosophilidae) in southern localities of Uruguay, South America. **Drosophila Information Service**, Oklahoma, v. 84, p. 61–65, 2001.
- GUPTA, J.P. Description of a new species of *Phorticella* and *Zaprionus* (Drosophilidae) from India. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, Bahadur Shah Zafar Marg, v.36, p.62-70, 1970.
- HOFFMANN, A. A. *et al.* Levels of variation in stress resistance in *Drosophila* among strains, local populations, and geographic region: patterns for desiccation, starvation, cold resistance and associated traits. **Evolution**, Malden, v. 55, p. 1621–1630, 2001.
- JENNINGS, B. H. *Drosophila*—a versatile model in biology & medicine. **Materials Today**, Hong Kong, v. 14, n. 5, p. 190–195, 2011.
- KALRA, B.; PARKASH, R. Effects of saturation deficit on desiccation resistance and water balance in seasonal populations of the tropical drosophilid *Zaprionus indianus*. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 219, p. 3237-3245, 2016.
- KALRA, B.; TAMANG, A. M.; PARKASH, R. Cross-tolerance effects due to adult heat hardening, desiccation and starvation acclimation of tropical drosophilid-*Zaprionus indianus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, Oxford, v. 209, p. 65–73, 2017.
- KARAN, D.; et al. Desiccation and starvation tolerance of adult *Drosophila*: opposite latitudinal clines in natural populations of three different species. **Evolution**, Malden, v. 52, p. 825–831, 1998.
- KARAN, D.; MORETEAU, B.; DAVID, J. R. Growth temperature and reaction norms of morphometrical traits in a tropical drosophilid: *Zaprionus indianus*. **Heredity**, Edinburgh, v. 83, p. 398-407, 1999.
- KATO, C. M.; set al. Ocorrência de *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) no estado de Minas Gerais. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, p. 454-455, 2004.
- KHAMBHAMPATI, S.; BLACK, W.C. Geographic origin of the US and Barzilian *Aedes albopictus* inferred from allozyme analysis. **Heredity**, Edinburgh, v. 67, p. 85-93, 1991.

- KOZAKI, T.; BRADY, S.G.; SCOTT, J.G. Frequencies and evolution of organophosphate insensitive acetylcholinesterase alleles in laboratory and field populations of the house fly, *Musca domestica* L. **Pesticide Biochemistry. Physiological**, San Diego, California, v. 95, p. 6-11, 2009.
- LACHAISE, D.; SILVAIN, J. F. How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals: The *Drosophila melanogaster*-*D. simulans* paleogeographic riddle. **Genetica**. v. 120, p. 17-39, 2004.
- LAU, P.S.; WONG, H.L.; GARRIGUES, P. Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in eastern oceanic and western estuarine waters in Hong Kong. **Continental Shelf Research**, London, v. 24, p. 1969-1987, 2004.
- LINDE, K. VAN DER; et al. First records of *Zaprionus indianus* (diptera: drosophilidae), a pest species on commercial fruits from panama and the united states of america. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 89, n. 3, p.402-404, Sept. 2006.
- LIONETTO, M. G. et al. Acetylcholinesterase as a Biomarker in Environmental and Occupational Medicine: New Insights and Future Perspectives. **BioMed Research International**. New York, v. n., p. ID 321213, 2013.
- LOWRY, O. H.; et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-75, 1951.
- MARKOW, T. A. *et al.* Population genetics and recent colonization history of the invasive drosophilid *Zaprionus indianus* in Mexico and Central America. **Biol Invasions**. v.16 p. 2427-34, 2014.
- MATOS, E. L. C. *et al.* Efectos de los plaguicidas en trabajadores de cultivos intensivos. **Boletim de la Oficina Sanitária Panamericana**. Local, v. 104, n. 2, p. 160-170, 1988.
- MOHANTY, S.; KHANNA, R. Genome-wide comparative analysis of four Indian *Drosophila* species. **Mol. Genet. Genomics**. v. 292, p.1197, 2017.
- MORTON, R. A; SINGH, R. S. The Association between malathion resistance and acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Genetics**. Local, v. 20, p. 1-2, 1982.
- MOREIRA, M. F.; MANSUR, J. F.; MANSUR, J. Resistência e Inseticidas: estratégias, desafios e perspectivas no controle de insetos. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Rio de Janeiro, cap. 15, p. 2-14, 2012.
- OAKESHOTT, J. G.; CLAUDIANOS, C.; RUSSELL, R. J.; ROBIN, G. C. Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multifene familv. **Bioessays**. Cambridge, v. 21, n. 12, p. 1031-42, 1999.

OKADA, T. Oriental species, including New Guinea. *In*: ASHBURNER, M.; CARSON, H. L.; THOMPSON, J. N. (ed.). **The genetics and biology of *Drosophila***. New York: Academic Press, 1981. v. 3, p. 261-89.

OKADA, T.; CARSON, C. H. L. Drosophilidae from banana traps over an altitudinal transect in Papua New Guinea. I. Descriptions of new species with notes on newly recorded species. **International Journal Entomology**. India, v. 25, n. 2-3, p. 127-41, 1983.

PARKASH, R.; SINGH, S.; RAMNIWAS, S. Seasonal changes in humidity level in the tropics impact body color polymorphism and desiccation resistance in *Drosophila jambulina*—Evidence for melanism-desiccation hypothesis. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 55, p. 358-68, 2009.

PASTEUR, N.; RAYMOND, M. Insecticide resistance genes in mosquitoes: their mutations, migration, and selection in field populations. **Journal of Heredity**, Washington, v. 87, p. 444-49, 1996.

PENARIOL L., BICUDO H.E.M.C. E MADI-RAVAZZI L. On the use of open or closed traps in the capture of drosophilids. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 48-51, 2008.

PFEIFER, S.; SCHIEDEK, D.; DIPPNER, J.W. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. From south-western Baltic Sea. **Journal Experiment Marine Biological Ecology**. v. 320, p. 93-103, 2005.

PERTILE, E., et al. Evidências experimentais e epidemiológicas entre exposição aos agrotóxicos e o desenvolvimento de câncer de mama. **Revista Brasileira de Pesquisa a Saúde**, Vitória, v. 20, n. 1, p. 137-47, 2018.

PERUCELLO, D. [Fotografia de indivíduo de *Z. indianus* em hábito dorsal]. Uberaba, MG: Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2018a.

PERUCELLO, D. [Morfologia externa de machos (esquerda) e fêmeas (direita) de *Z. indianus*]. Uberaba, MG: Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2018b.

PHILLIPS, W. F.; BOWMAN, M.C.; ACHULTHEISZ, R.J. Estimation of insecticide residues in foods through parallel screening methods **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Washington, v. 10, n. 6, p. 486-490, 1962.

POPE, C. N. Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? **Journal Toxicological Environment Health**, Oxford, v.2, n.2, p. 161-181, 1999.

POPPE, J. L., et al. Environmental Determinants on the Assemblage Structure of Drosophilidae Flies in a Temperate-Subtropical Region. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 44, n.2, p. 140-152, 2015.

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

RABEAA, E.I.; et al. Toxicity of naturally occurring Bio-fly and chitosan compounds to control the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann). **Natural Product Research**, Cambridge, v. 29, p. 460-465, 2014.

RANSON, H.; et al. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. **Science**, New York, v. 298, p. 179-181, 2002.

RENKEMA, J. M. First records of *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae) from commercial fruit fields in Ontario and Quebec, Canada. **Journal of the Entomological Society of Ontario**, Canadá, v. 144, p.125-130, 2013.

RIBEIRO, M. L.; et al. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**. São Paulo, v. 30, n. 3, jun., 2007.

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

SALVI, R. M; et al. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. **Toxicological Science**, New York, v. 72, p.267–271, 2003.

SANTOS, W. G. N., et al. Primeiro registro de Eucoilinae (Hymenoptera: Figitidae), parasitoides da Mosca-africana-do-figo *Zaprionus indianus* Gupta (Diptera: Drosophilidae), no bioma Caatinga. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3055-3058, set./out. 2016.

SETTA, N. D.E.; CARARETO, C. M. A. Fitness components of a recently-established population of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in Brazil.- **Iheringia. Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 95, n. 1, p. 47-51, 2005.

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

SILVA, M. G. P., et al. Tendências da morbimortalidade por câncer infantojuvenil em um polo de fruticultura irrigada. **Caderno Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro. v. 26 (1), p. 38-44, 2018.

SINGH, A.; JAISWAL, K.; SHARMA, B. Effect of low temperature stress on acetylcholinesterase activity and its kinetics in 5th instar larvae of *Philosamia ricini*. **Journal of Biochemistry Research**, London, v. 1, n. 2, p. 17-25, 2013.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in a intensive care unit. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 83, p. 22-35, 2007.

STEIN, C.P; TEIXEIRA, E.P.; NOVO, P.S. Aspectos biológicos da mosca do figo, *Zaprionus Indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae). **Entomotropica**, Campinas-SP. v.18. p.219-221, 2003.

SUN, Y. P; PANKASKIE, J. E. *Drosophila*, a Sensitive Insect, for the Microbioassay of Insecticide Residues. **Journal Economical Entomology**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 180-181, 1954.

SLOTKIN, T. A. Guidelines for developmental neurotoxicity and their impact on organophosphate pesticides: a personal view from an academic perspective. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 25, p. 631–640, 2004.

TASKIN, B.G.; et al. Seasonal dynamics of insecticide resistance, multiple resistance, and morphometric variation in field populations of *Culex pipiens*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 32 p. 1-14, 2016.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 275-277, 2006.

THOMPSON, H. M. Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. **Ecotoxicology**, London, v. 5, p. 59-81, 1996.

TIDON, R.; LEITE, D. F; LEÃO, B. F. D. Impact of the colonization of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in different ecosystems of the Neotropical region: 2 years after the invasion. **Biological Conservation**, Essex, v. 112, p. 299-305, 2003.

TONI, D. C. de; et al. First record of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in the State of Santa Catarina, Brazil. **Biotemas**, Florianópolis- Sc., v. 14, n. 1, p.71-85, 2001.

TOUTANT, J. P. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v. 32, p. 423-446, 1989.

TSACAS L., LACHAISE D. and DAVID J. Composition and biogeography of the afro-tropical drosophilid fauna. In: Ashburner M, Carson HLI and Thompson JN (eds) **The Genetics and Biology of *Drosophila***, London, v.3, p. 197-259, 1981.

TOX-OER *Learning Toxicology through Open Educational Resources*, [Reação de hidrólise catalisada pela enzima acetilcolinesterase]. Finland, 2017. Disponível em: <https://toxoyer.com/>. Acesso em: 18 ago. 2019.

LINDE, K. VAN DER. *Zaprionus indianus*: species identification and taxonomic position. **Dros. Inf. Serv.**, Tallahassee, v. 93, p.95-98, 2010.

VAINIO, H. Public health and evidence-informed policy-making: The case of a commonly used herbicide. **Scandinavian Journal Work Environment Health**. Helsinki, v. 27 p. 1-5, 2019.

VILELA, C. R. Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical region? **Drosophila Information Service**, Oklahoma, v. 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**, Ribeirão Preto, p. 48-52, 2001.

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.

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

YASSIN, A.; ARARIPE, L.O.; CAPY, P.; Da LAGE, J.L.; KLACZKO, L.B.; MAISONHAUTE, C.; OGEREAU, D.; DAVID, J.R.. Grafting molecular phylogenetic tree with morphological branches to reconstruct the evolutionary history of the genus *Zaprionus* (Diptera: Drosophilidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.47, p.903-915, 2008a.

YASSIN, A.; CAPY, P.; MADI-RAVAZZI, L.; OGEREAU, D.; DAVID, J.R. DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus indianus*. **Molecular Ecology Resources**, Columbia, v. 8, p. 491-501, 2008b.

YASSIN, A.; et al. Polyphyly of the *Zaprionus* genus group (Diptera: Drosophilidae). **Molecular Phylogenetic Evolution**, San Diego, v. 55, p. 335–339, 2010.

YASSIN, A.; DAVID, J. R. 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**, Bulgaria, v. 51, p. 33-72, 2010.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.