



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Programa Interdisciplinar em Biociências Aplicadas



JONATHAN DE OLIVEIRA RIOS

**ESTERASES DE *ZAPRIONUS INDIANUS* GUPTA, 1970 (DIPTERA:
DROSOPHILIDAE): BIOMARCADORES PARA A CONTAMINAÇÃO POR
MALATHION?**

**UBERABA
2020**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Programa Interdisciplinar em Biociências Aplicadas

JONATHAN DE OLIVEIRA RIOS

**ESTERASES DE *ZAPRIONUS INDIANUS* GUPTA, 1970 (DIPTERA:
DROSOPHILIDAE): BIOMARCADORES PARA A CONTAMINAÇÃO POR
MALATHION?**

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

Orientador: Prof. Dr. Luís Gustavo da Conceição Galego

**UBERABA
2020**

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

R453e Rios, Jonathan de Oliveira
Esterases de *Zaprionus Indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae):
biomarcadores para a contaminação por malathion? / Jonathan de Oliveira
Rios. -- 2019.
56 f. : il., graf., tab.

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

1. Isoenzimas. 2. Hidrolases de Éster Carboxílico. 3. Acetilcolinesterase.
I. Galego, Luís Gustavo da Conceição. II. Universidade Federal do
Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 577.152

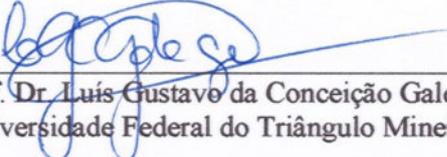
JONATHAN DE OLIVEIRA RIOS

Esterases de *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae): Biomarcadores para a contaminação por *malathion*?

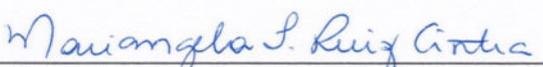
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, área de concentração - Materiais Aplicados em Biociências, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

17 de dezembro de 2019.

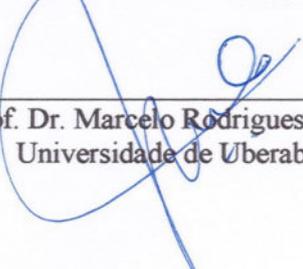
Banca Examinadora:



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



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



Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto
Universidade de Uberaba

Dedico a todos meus familiares e a todas as
pessoas que contribuíram e contribuem ao
avanço da ciência.

Agradecimentos

Começo agradecendo a minha família, ao meu padrasto e minha mãe que amo muito por sempre terem me apoiado e incentivado a estudar. Ao meu padrasto que para mim é meu pai sempre curioso na área da biologia, obrigado por toda ajuda. Sem o apoio deles talvez eu não tivesse feito uma graduação. Agradeço também a minha tia Roberta, a primeira pessoa da nossa família a entrar em uma universidade, ela foi meu suporte nas escolhas e no incentivo do curso, tenho grandes lembranças quando limpávamos a casa juntos e do nada surgira a ‘quitinha’. A minha vizinha que amo de paixão, sempre me perguntando como estava meus estudos e sempre demonstrando interesse e curiosidade na minha pesquisa. Agradeço as meus primos/afilhado Maria Giulia e Vicente que mesmo pequenos chegaram à família e em minha vida para me deixar mais feliz. São as lembranças deles que me consola nos momentos que tive de tristeza e querer desistir de tudo. Agradeço ao meu irmão Erick por todo seu apoio e conversas, te amo muito ‘atu’. Uma vez li em um livro a seguinte frase ‘ acredite nos valores e na força que a sua família lhe transmitiu’ e mais uma vez agradeço a todos vocês, quando pensei em desistir vocês foram meus pensamentos, meu motor para continuar, vocês não tem ideia do quão grande é meu amor por todos vocês.

Não poderia deixar de agradecer a rainha do laboratório, bióloga das aves e com quem aprendi muito, Daniella. Obrigado por cada ajuda nos meus experimentos, por fazer os meios de cultura, separar as minhas filhas e, até nas coletas, sem a sua ajuda acho que não teria terminado nada a tempo. Obrigado Dany rainha por todas as eletroforeses que fizemos juntos até, nas férias, por todos os erros e paciência que teve comigo.

Agradeço a minha amiga e irmã que a faculdade me deu, Luma Astun eu não sei o que faria sem sua ajuda e sem eu reclamando de tudo nas mensagens, você lendo meu trabalho e me ajudando com todos os ‘numerozinhos’ que pra mim eram indecifráveis. Obrigada linda do meu coração. Amo-te mais que nutella.

Obrigado ao grupo de estudos de *Z.indianus* e, em especial, ao meu amigo Sávio e a professora Mariângela Torreglosa pelas dicas nos experimentos que foram de grande valia.

Não poderia deixar de agradecer ao meu amigo que tem muita paciência e carisma e acima de tudo uma grande humildade: Gabriel (Sininho) você é foda amigo e esta no meu coração.

Queria agradecer também a Mestra e amiga Poliana (Poly) por cada ajuda que me deu no laboratório, por cada conselho, por cada carona e por cada disciplina juntos e, nos momentos de desespero, por cada pastel comido no mercadão. Você é muito especial pra mim.

Por fim, agradeço imensamente ao meu orientador lindo, mestre Pokémon, e que me inspira no seu conhecimento. Com você aprendi muita coisa. Obrigado por aceitar ser meu orientador desde a graduação. Saiba que você transmite uma paz e que você não é qualquer orientador, você é O ORIENTADOR, um poço sem fundo de conhecimento. Obrigado por cada puxão de orelha que me deu desde a graduação, isso me fez crescer como pessoa e como aluno. Obrigado por todo apoio que me deu sobre meu futuro e sobre minhas escolhas. Sou muito grato por casa aprendizado que você me proporcionou. Valeu Luís (até hoje não aprendi a te chamar de Galego) por não ter desistido de mim. Você é foda.

Agradeço a FAPEMIG por fomentar meus estudos no mestrado.

A todos vocês saibam que de alguma maneira contribuíram para que esse trabalho saísse.

Obrigado mais uma vez a todos.

Resumo

Zaprionus indianus é um drosofilídeo de origem africana cujo os primeiros relatos no território brasileiro datam de 1999 no estado de São Paulo, infestando frutos de caqui e figo. Posteriormente, a mosca rapidamente atingiu o status de praga. Uma das formas que os agricultores utilizaram para o controle de *Z.indianus* é o manejo utilizando produtos químicos, o que pode culminar na evolução de processos de resistência a inseticidas pela praga. Um organofosforado bastante utilizado é o malathion. Alguns genes e seus produtos proteicos estão relacionados a resistência a organofosforados a inseticidas como, por exemplo, as esterases, sendo *Z.indianus* portador desses genes. Este trabalho teve por objetivo avaliar um possível papel bioindicador das esterases EST2, EST3 e EST6 em ambientes expostos a inseticidas. Foram feitos bioensaios com indivíduos expostos ao inseticida malathion e também eletroforese em gel de poliacrilamida para determinar os polimorfismos enzimáticos e a atividade da acetilcolinesterase. As análises dos bioensaios mostram uma alta mortalidade de fêmeas quando tratadas com o inseticida e os polimorfismos esterásicos mostram uma perda da heterozigosidade nas populações tratadas com o inseticida e um aumento da frequência do alelo Est3^S e Est2^F em populações tratadas com inseticida. Os resultados para a atividade da EST6 mostram uma diminuição da atividade dessas esterase em populações expostas ao organofosforado. Sendo assim, as esterases de *Z.indianus* podem desempenhar um grande papel como bioindicadoras em ambientes expostos a inseticidas.

Palavras Chaves: Isoenzimas. Carboxilesterases. Acetilcolinesterase.

Abstract

Zaprionus indianus is a drosophilid of African origin with the first report in the Brazilian territory date from 1999 in the state of São Paulo, infesting persimmon and fig fruits. Subsequently the fly quickly reached plague status. One of the ways farmers used to control *Z.indianus* is chemical management, which may culminate in the evolution of insecticide resistance processes by the pest. A widely used organophosphate is malathion. Some genes and their protein products are related to organophosphate resistance to insecticides such as esterases, and *Z.indianus* carries these genes. This study aimed to evaluate a possible bioindicator role of esterases EST2, EST3 and EST6 in environments exposed to insecticides. Bioassays were performed with individuals exposed to the malathion insecticide and also polyacrylamide gel electrophoresis to determine enzymatic polymorphisms and acetylcholinesterase activity. Bioassay analyzes show high female mortality when treated with the insecticide and esterase polymorphisms show a loss of heterozygosity in the insecticide treated populations and an increased frequency of the Est3³ and Est2^F allele in insecticide treated populations. Results for EST6 activity show a decrease in the activity of these esterase in populations exposed to organophosphate. Thus, *Z.indianus* esterases can play a large role as bioindicators in insecticide-exposed environments.

Keywords: Isoenzyme. Carboxylesterases. Acetylcholinesterase.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
1.1 Meio ambiente, Homem e Saúde	12
1.2 Taxonomia e Histórico da Introdução de <i>Zaprionus indianus</i> no Brasil.....	12
1.3 Praga do figo e Processo Bioinvasivo.....	14
1.4 Resistência e Controle de <i>Zaprionus indianus</i>	15
1.5 <i>Zaprionus indianus</i> como bioindicador ambiental	17
1.6 Acetilcolina e Acetilcolinesterase.....	18
1.7 Polimorfismos esterásicos.....	19
2. Objetivos	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. Material e Métodos.....	22
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	22
4. METODOLOGIA.	233
4.1 Bioensaios para a seleção de indivíduos resistentes ao Malathion	23
4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida- PAGE.....	24
4.3 Detecção dos polimorfismos esterásicos	24
4.4 Dosagem de Proteína	25
4.5 Ensaio enzimático para a atividade da acetilcolinesterase.....	26
5. Análises Estatísticas	29
6. RESULTADOS	31
6.1 Bioensaios de Seleção.....	31
6.2 Polimorfismos esterásicos.....	36
6.3 Distâncias Genéticas	39
6.4 Ensaio enzimático para a atividade da acetilcolinesterase.....	45
7. DISCUSSÃO.....	47
8. Conclusões	50
Referências.....	51

Lista de Abreviaturas e Siglas

AC- Aracaju Controle

ACF- Aracaju Controle Fêmea

ACh- Acetilcolina

AChE- Acetilcolinesterase

ACM- Aracaju Controle Macho

AT- Aracaju Tratado

ATF- Aracaju Tratado Fêmea

ATM- Aracaju Tratado Macho

DTNB- 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)

EST- Esterase

FC- Florianópolis Controle

FCF- Florianópolis Controle Fêmea

FCM- Florianópolis Controle Macho

FT- Florianópolis Tratado

FTF- Florianópolis Tratado Fêmea

FTM- Florianópolis Tratado Macho

GABA- Ácido gama-aminobutírico

GC- Grupo Controle

GT- Grupo Tratado

SN- Sistema Nervoso

TFPGA- Tools for Population Genetic Analysis

UC- Uberaba Controle

UCF- Uberaba Controle Fêmea

UCM- Uberaba Controle Macho

UPGMA- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

UT- Uberaba Tratado

UTF- Uberaba Tratado Fêmea

UTM- Uberaba Tratado Macho

Z.I - *Zaprionus indianus*

Capítulo I- Introdução e Objetivos

1. Introdução

1.1 Meio ambiente, Homem e Saúde

O Brasil exibe um cenário complexo referente às doenças transmissíveis, às pragas agrícolas e ao seu controle e as relações dessas questões com o meio ambiente. Há a implementação de vários meios de controle para as pragas e agentes patogênicos, dentre eles, o mais usual é o controle químico por inseticidas. Nesse sentido, existem mais de 100 mil agentes químicos sintéticos comercializados no mercado. As políticas de controle dos vetores com inseticidas nas cidades é similar àquelas destinadas ao manejo de pragas agrícolas (COLBORN; DUMNOSKI; MYERS, 2002; GURGEL, 2005; LONDRES, 2011; CASTRO e ROZEMBERG, 2015). Essa problemática tem originado vários debates, com o modelo insuficiente do uso de inseticidas e o modo e aonde ele é descartado e o seu acúmulo no meio ambiente. Outra questão que vem ganhando pauta atualmente é quanto tempo os inseticidas/agrotóxicos descartados ou utilizados no meio ambiente afetam a saúde dos animais que estão inseridos naquele habitat. Com isso, é necessária a criação de estratégias para o monitoramento de ambientes expostos aos inseticidas.

1.2 Taxonomia e Histórico da Introdução de *Zaprionus indianus* no Brasil

A família Drosophilidae (Diptera: Insecta) é constituída por mais de quatro mil espécies descritas (BACHLI, 2015), sendo registradas, no Brasil, 304 espécies distribuídas em 18 gêneros (GARCIA et al., 2008). Um desses gêneros é *Zaprionus*, constituído por 44 espécies predominantemente afrotropicais (TSACAS e CHASSAGNARD, 1990; CHASSAGNARD, 1996). A única espécie do gênero *Zaprionus* registrada no Brasil é *Z. indianus*. A espécie está incluída dentro do grupo *armatus* (30 espécies) e subgrupo *vittiger* (13 espécies), conforme descrito por Chassagnard e Tsacas (1993). Além desse, o subgênero *Anaprius* (OKADA, 1990) é caracterizado por espécies das regiões Oriental (OKADA; CARSON, 1983; GUPTA, 1991) e Australiana, que comporta 13 espécies.

Z. indianus (**Figura 1**) é um drosofilídeo amarelo-alaranjado e apresenta duas faixas brancas com bordas pretas da cabeça até o final do tórax, com três ‘surstilo’ (LINDE, 2010). As listras na cabeça, por sua vez, são bordeadas por uma faixa negra (Figura 1). Os adultos desses indivíduos medem entre 3mm e 4mm de comprimento. As fêmeas dispõem de uma estrutura prolongada no aparelho ovipositor denominada de “gancho de açougueiro” que não é

observada nos machos, caracterizando assim o dimorfismo sexual na espécie (LINDE et al., 2006).

Figura 1: Vista dorsal de *Zaprionus indianus*, evidenciando as listras que constituem um dos caracteres diagnósticos das espécies.



Do autor, 2019

O período de pré-oviposição é de aproximadamente 2-4 dias, com fecundidade de $1,67 \pm 0,11$ ovos/dia, com período de oviposição de $56 \pm 4,2$ dias (temperatura de 25 °C), sob condições controladas de laboratório, (KARAN; MORETEAU; DAVID, 1999; SETTA; CARARETO, 2005; PIRES; BELO, BARBOSA, 2008; ALAWAMLEH et al., 2016).

Popularmente conhecida como mosca do figo, *Z. indianus*, dispersou-se rapidamente pelo território brasileiro. A provável origem da espécie é no Continente Africano e foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1999, no município de Santa Isabel no estado de São Paulo, infestando frutos de caqui *Diospyros kaki* L. (Ebenaceae), e em Valinhos–SP associada ao figo-roxo-de-valinho (*Ficus carica* L., Moraceae) (VILELA, 1999). Posteriormente, foi detectada em vários Estados, como no Rio Grande do Sul (CASTRO; VALENTE, 2001), Santa Catarina (TONI et al., 2001), Paraíba, Pernambuco e Bahia (SANTOS et al., 2003), Distrito Federal, Maranhão, Pará e Rondônia (TIDON; LEITE; LEÃO, 2003), Minas Gerais (KATO et al., 2004), Mato Grosso e Rio de Janeiro (DAVID et al., 2005; LOH; BITNER-MATHÉ, 2005) e no Uruguai (GOÑI, 2001, GOÑI et al., 2002). Por último foi relatada no arquipélago de Fernando de Noronha (OLIVEIRA et al., 2009). Além disso, os registros de Linde e colaboradores (2006) detectaram essa espécie em alguns países da América Central e do Norte:

o Panamá, em 2003, e a Flórida, nos Estados Unidos, em 2005 (LINDE *et al.* 2006; CASTREZANA, 2007; RENKENA, 2013; JOSHI *et al.*, 2014; LINDE, 2018).

1.3 Praga do figo e Processo Bioinvasivo nas américas

O histórico apresentado a seguir ressalta a velocidade de dispersão de *Z. indianus* e sua introdução no Brasil. Provavelmente a introdução dessa espécie no Brasil tenha ocorrido por meio de alimentos oriundos de cidades africanas, seja por meio de transporte aéreo (VILELA, 1999) ou marítimo (GALEGO e CARARETO 2007, COMMAR *et al.*, 2012), e posteriormente a espécie invadiu outras áreas das Américas. Vermeij (1996) afirma que todas as questões referentes a invasões biológicas são de interesse crescente para o campo de genética e biologia evolutiva. Alguns aspectos da biologia da espécie a tornam altamente eficiente em processos de bioinvasão em regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo, dentre os quais se destacam as condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento e reprodução da espécie, a alta diversidade de plantas hospedeiras como abacate, abacaxi, mamão, goiaba, carambola e banana, ciclo de desenvolvimento curto, grande número de descendente e alto potencial biótico, ou seja, sua capacidade de reprodução, portanto aumentar seu número de indivíduos em condições favoráveis foi fundamental para a sua dispersão pelo território brasileiro (VILELA *et al.*, 2001; PIRES *et al.*, 2008; GALEGO; CARARETO, 2010a; MATA *et al.*, 2010; COMMAR *et al.*, 2012).

Em 1999, a espécie foi considerada praga da cultura do figo (VILELA, 1999). Ziar (2010) afirma que o monitoramento da densidade populacional de espécies com o status de possível praga é fundamental. *Zaprionus indianus* é considerada uma das principais pragas da cultura do figo. Os danos causados, no ano de constatação, reduziram a produção desta cultivar em 40% e a exportação em 80% (STEIN; TEIXEIRA; NOVO, 2003, TIDON; LEITE; LEÃO, 2003 e PASINI; LINK, 2011). Durante as safras seguintes, os prejuízos continuaram expressivos e sua disseminação por outros estados aumentou (RAGA; SOUZA-FILHO, 2003). Para o manejo adequado da praga, é necessário fazer buscas por sistemas eficientes de monitoramento, tornando-se base para ações de prevenção e controle (RAGA *et al.*, 2006, PASINI *et al.*, 2013).

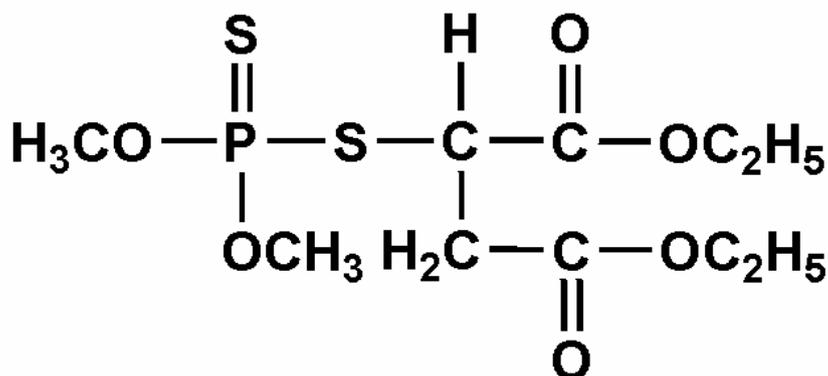
1.4 Resistência e Controle de *Zaprius indianus*

Damos o nome de resistência à capacidade de um indivíduo de uma espécie tolerar doses de substâncias tóxicas que para alguns indivíduos de uma população normal seria letal (SUBRAMANYAM; HAGSTRUM, 1996). A palavra resistência não é nova, Smith já em 1970 a usava para caracterizar espécies de insetos cuja população não podia ser mais controlada por um determinado inseticida na dose normal recomendada ou dose nenhuma. Brown, (1959) diz que a resistência não deve ser vista como uma adaptação e sim um fenômeno de pré-adaptação, uma vez que os inseticidas não induzem as mudanças hereditárias, mas somente selecionam ao curso de gerações aqueles genes incumbidos pela resistência encontrados em poucos indivíduos.

Segundo Li e colaboradores (2007) a resistência é algo estritamente genético, definida pela presença de mutações que afetam as proteínas alvos dos inseticidas e/ou o seu metabolismo.

Uma das maneiras que os agricultores utilizam para o controle dessa espécie exótica é por meio de um organofosforado não sistêmico introduzido em 1950 pela Companhia Americana Cyanamid (ANVISA, 1985), o inseticida Malathion O,O-dimetil-S-(1,2-dicarboxietil) fosforoditioato (C₁₀H₁₉O₆PS₂), cuja fórmula é apresentada na **Figura 2**.

Figura 2: Fórmula molecular do Malathion. GU, 2013.



O inseticida Malathion apresenta-se líquido e de cor amarelada quando puro e, quando o produto técnico apresenta 95% a 98% da substância ativa, o líquido apresenta-se marrom escuro com forte odor. Sua solubilidade na água é pequena (145 ppm a 20-25 °C) é solúvel na maioria dos solventes orgânicos, tal como álcool, éter, cetona, hidrocarbonatos aromáticos e óleos vegetais. Sua decomposição é fácil em meio ácido e em meio alcalino. A sua taxa de hidrólise (meia-vida) em pH 7,4, numa temperatura de 37,5 C, é aproximadamente 32 horas.

Um dos grandes problemas de armazenamento do malathion é que ele sofre decomposição quando armazenado em condições inadequadas. A melhor maneira de armazená-lo é em ambiente com pouca umidade e baixa luminosidade (LARIN, 2013).

Segundo a Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988 o organofosforado malathion é considerado moderadamente tóxico para mamíferos, com classificação toxicológica III (ANVISA, 2012). É indicado para uso agrícola e em campanhas de saúde pública, como adjuvante especificamente no controle de mosquitos, como o *Aedes aegypti* (ANVISA, 2012), porém estudo feito por Vilela e colaboradores, 2001, mostrou que alguns inseticidas vem sendo empregados para o controle de *Z. indianus* pelos produtores de figo e também citrus, contudo o inseticida tem causado uma preocupação na população urbana visto que os locais de aplicação do agrotóxico são próximo as áreas urbanas (ANVISA, 2012).

O Malathion é utilizado no controle de insetos como Diptera, *Hemiptera Coleoptera* e Lepidoptera e vetores de doenças como os Culicidae, em diversas culturas como as de algodão, arroz, trigo, cacau, café, citros, feijão, pepino, berinjela, tomate, couve, alface, repolho, morango, pêssigo, maçã e plantas ornamentais (CHEMINOVA, 2017).

Os inseticidas do grupo organofosforados, incluem os que contêm fósforo. No grupo dos organofosforados, os inseticidas são classificados em três subgrupos: os alifáticos (malathion, vapon, vidrin, etc.); os derivados de fenil (etil e metil paration, fenitrothion, etc.); e os heterocíclicos (clorpirifos, clorpirifos-metil, etc.). São largamente utilizados desde a década de 1950 em saúde pública para o controle de vetores. Embora seja eficaz, esse grupo de inseticida é responsável por causar intoxicações agudas no homem (FUNASA, 2002).

Estudos feitos por Brown et al.(1990), Bastos et al., (1991) e Liu et al. (2019) evidenciaram que o malathion atua na inibição da enzima acetilcolinesterase dos animais e dos seres humanos, levando a um acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas, o que desencadeia uma série de efeitos parassimpáticos.

Desde o início do século 20 os inseticidas químicos desempenham um papel crucial em programas de controle de vetores. Documentos mostraram que a resistência a inseticidas químicos já se encontra em mais de 504 espécies de artrópodes (GEORGHIOU; LAGUNES-TEJEDA; BAKER, 1983).

Alterações em alguns genes, e seus produtos proteicos (glutathione-S-transferases (GSTs), esterases (ESTs) e citocromo P450 (CYPs)) (HEMINGWAY, 2000; PERRY e COLS., 2011), podem ser responsáveis pela resistência aos inseticidas sendo *Z. indianus* portador desses genes (GALEGO et al., 2010b). Estudos feitos por (GALEGO; CARARETO, 2010b)

mostraram a presença de um locus marcador na espécie *Z. indianus* para ambientes expostos com o inseticida malathion, o que nos leva a crer que essa espécie pode ser usada como um bom modelo bioindicador para avaliar o uso abusivo de organofosforados, bem como o surgimento de eventuais padrões de resistência.

Os insetos dispõem de diversos mecanismos de resistência: fisiológicos, comportamentais e bioquímicos. Algumas enzimas como: oxidases, esterases e transferases realizam a detoxificação de alguns inseticidas como carbamatos, organofosforados e piretróides no corpo do animal. Os mecanismos fisiológicos para a redução de um inseticida no corpo do animal incluem redução do transporte e penetração do inseticida para o alvo (sistema nervoso), aumento na excreção, insensibilidade do sítio de ação (GEORGHIOU, 1972, CERUTTI e LÁZZARI, 2003).

Ceruti e Lázari (2003) discutem importância do conhecimento sobre a genética da resistência a inseticidas. Para esses autores, os conhecimentos que norteiam esse tema são fundamentais para estabelecer estratégias de manejo da resistência, porém o progresso nos estudos com resistência seria mais eficiente se houvessem marcadores moleculares ligados à resistência.

1.5 *Zaprionus indianus* como bioindicador ambiental

A família Drosophilidae vem sendo usada como um bom organismo modelo nas áreas de biologia como evolução, genética e ecologia. Em especial, as espécies *Drosophila melanogaster* Fallén, 1823 e *Z. indianus*. Alguns autores apontam o uso desses organismos como bioindicadores ambientais em ambientes diversos como Amazônia (MARTINS, 2001), Cerrado (TIDON; LEITE; LEÃO, 2003, MATA; MCGEOCH; TIDON, 2008, ROQUE; MATA; TIDON, 2013), Mata Atlântica (DE TONI et al., 2007, GOTTSCHALK et al. 2007, DÖGE et al. 2008), Caatinga (OLIVEIRA et al. 2016), e Pampa (POPPE et al., 2012, 2013, 2014, 2015), além de ambientes urbanos (GOTTSCHALK et al., 2007, GARCIA et al., 2012). Esses organismos são bioindicadores por apresentarem grandes sensibilidades a alterações ambientais, apresentarem uma vasta distribuição geográfica (fáceis colonizadoras), ciclo de vida curto e rápida resposta em nível de população (FERREIRA; TIDON, 2005, MARTINS, 1987, MCINTYRE, 2000, PARSONS, 1991, POWELL, 1988).

Um biomarcador corresponde a toda substância ou seu produto de biotransformação usado para avaliar a exposição ou a quantidade absorvida e efeitos das substâncias químicas,

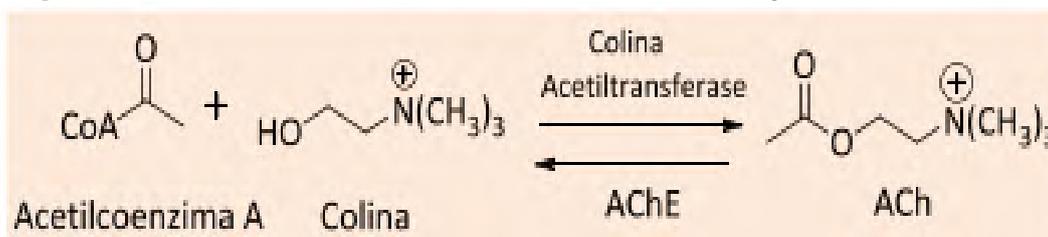
além disso, podem ser usados em monitoramentos para confirmar a exposição de uma determinada substância como, por exemplo, pesticidas (AMORIM, 2003).

Estudos feitos por Galego, Ceron e Carareto (2006) sugeriram a relação da resistência a inseticidas e o polimorfismo do loco Est3 da espécie *Z. indianus*, contudo experimentos realizados pelos mesmos autores (GALEGO e CARARETO 2010a) com *Z. indianus* e o organofosforado Malathion mostraram que o lócus Est3 pode ser um bom marcador para avaliar a ação dos inseticidas nessa espécie.

1.6 Acetilcolina e Acetilcolinesterase

A acetilcolina foi o primeiro neurotransmissor descoberto. Quando analisamos filogeneticamente sua distribuição no reino animal vemos que ele se encontra nos vertebrados e artrópodes. Esta molécula desempenha uma função importante nas sinalizações neuronais. Quimicamente, a Ach é um éster de colina sendo sintetizada no terminal pré-sináptico a partir de colina e acetil-coenzima A (acetil-CoA), sendo a reação catalisada pela enzima colina acetiltransferase (HOUGHTON et al., 2006). Outra enzima importante no Sistema Nervoso é a Acetilcolinesterase (AChE) ela tem a função de hidrolisar o neurotransmissor Ach nas sinapses colinérgicas (WESTFALL e WESTFALL, 2006) como mostra o modelo da **Figura 3** proposto por (ARAUJO; SANTOS e GONÇALVES, 2016).

Figura 3: Hidrólise da Ach- (ARAUJO; SANTOS e GONÇALVES, 2016).



Existem vários fármacos que agem na inibição ou reativação da enzima AChE. Os fármacos que agem inibindo a AChE são chamados de anticolinesterásicos (BROWN; TAYLOR, 2006). Uma vez bloqueada a AChE para a hidrólise de ACh nas fendas sinápticas o que leva esse neurotransmissor ficar ativo por um maior tempo nesses locais (TAYLOR,2006).

Nos insetos não poderiam ser diferente, como eles apresentam a AChE, a maioria dos inseticidas hoje utilizados pertence ao grupo dos organofosforados e agem, inibindo a enzima

AChE. Esses inseticidas atuam como antagonistas de canais de cloro mediadas pelo ácido γ -aminobutírico ou GABA impedindo a entrada de Cl^- nas células nervosas (GOMEZ e OMOTO, 2012).

1.7 Polimorfismos esterásicos

Esterases, além da potencial função detoxificadora, constituem um sistema heterogêneo e multifuncional de enzimas cuja função se relaciona com a hidrólise de ésteres. Tais enzimas se conservaram ao longo da evolução sendo compartilhadas em diversos grupos. Nos insetos, elas estão implicadas em vários processos metabólicos como digestão de alimentos, degradação de inseticidas, hidrólise de hormônios juvenis e também na reprodução (SPACKMAN et al., 1994, CAMPBELL et al., 2003, OAKESHOTT et al., 2001, GALEGO; CERON; CARARETO, 2006).

Estudos bioquímicos realizados por Galego, Ceron e Carareto (2006) caracterizaram a presença de seis esterases em populações de *Z. indianus* sendo algumas polimórficas (EST2 e EST3) e outras monomórficas (EST1, EST4, EST5 e EST6). Essas enzimas apresentam diferentes padrões de mobilidade eletroforética, sendo que seus polimorfismos diferem entre populações e entre espécies que habitam diferentes ambientes (SOMERO, 1978).

Galego, Ceron e Carareto (2006) classificaram as esterases de *Z. indianus* em carboxilesterases (EST2, EST3 e EST5) e colinesterase (EST6). A expressão dessas enzimas pode variar na espécie durante o estágio de desenvolvimento e sexo do indivíduo. A EST6 (acetilcolinesterase), por exemplo, é detectada na cabeça e a EST2 apenas em machos. Com isso, várias questões a respeito dessas enzimas podem ser levantadas: o polimorfismo esterásico varia conforme a exposições ao inseticida? Machos e fêmeas podem apresentar padrões polimórficos diferentes conforme a exposição ao inseticida? É possível utilizar esses padrões polimórficos como bioindicadores para exposição a inseticidas?

Nesse sentido esse trabalho é importante para entender os padrões polimórficos mediante a exposição a inseticida de machos e fêmeas além de ampliar os estudos do modelo biológico de *Z. indianus* que ainda são escassos e mostrar do porque essa espécie pode ser usada como um bioindicador em ambientes expostos a organofosforados.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar um possível papel bioindicador das esterases EST2, EST3 e EST6 em ambientes expostos a inseticidas.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os padrões polimórficos das esterases EST2 e EST3 de *Z. indianus* em indivíduos selecionados pelo inseticida malathion.
2. Analisar os polimorfismos esterásicos em fêmeas e machos de *Z. indianus* selecionados pelo malathion.
3. Identificar um possível papel da EST6 (acetilcolinesterase) como um biomarcador para resistência ao inseticida malathion.
4. Propor uma estratégia de monitoramento de contaminação por malathion utilizando os polimorfismos esterásicos de *Z. indianus*.

Capítulo II - Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Adultos da espécie *Zaprionus indianus* foram coletados em três localidades do Brasil: Aracaju- SE (10° 54' 40" S e 37° 04' 18" W), Uberaba- MG (19° 44' 54" S e 47° 55' 55" W) e Florianópolis- SC (27° 35' 48" S e 48° 32' 57" W), conforme **Figura 4**. A escolha dessas localidades se deu por conta da distância entre cada uma delas. As coletas ocorreram entre os meses de Abril a Junho de 2018, durante o período seco em áreas urbanas. Em cada área de coleta colocou-se dez armadilhas fechadas (**Figura 5**) contendo iscas de banana e fermento biológico (PENARIOL; BICUDO; MADI-RAVAZZI, 2008), distribuídas em cinco pontos de coleta por área, sendo três armadilhas por ponto. As armadilhas se dispuseram em uma distância de 1,80m a partir do chão, separadas entre si por 3m e mantidas no local por três dias, decorrido o tempo, foram transportadas para o laboratório para triagem.

Figura 4: Áreas de coleta dos indivíduos de *Z. indianus* utilizados neste estudo. Aracaju- SE (10° 54' 40" S e 37° 04' 18" W), Uberaba- MG (19° 44' 54" S e 47° 55' 55" W) e Florianópolis- SC (27° 35' 48" S e 48° 32' 57" W). Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/@-19.0482265,-52.2958668,5z>, acesso em 02/07/2018).



Do autor, 2019.

Figura 5: Armadilhas de garrafas PET utilizadas na captura dos indivíduos da espécie *Z. indianus*.



Do Autor, 2019

As coletas de Uberaba (MG) sucederam no Laboratório de Botânica, Ecologia e Zoologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), as de Aracaju no laboratório sob-responsabilidade do Prof. Dr. Bruno Lasmar Valadares na Universidade Federal de Sergipe (UFS) e as de Florianópolis no Laboratório de Drosofilídeos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Daniela Cristina de Toni. Fêmeas de *Z. indianus* ficaram mantidas individualizadas em tubo contendo meio de cultura banana-água para a produção das linhagens isofêmeas conforme descrito por David *et al.* (2005). As isolinhagens permaneceram em câmara de temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) até sua utilização nos experimentos.

4. METODOLOGIA.

4.1 Bioensaios para a seleção de indivíduos resistentes ao Malathion

Para os experimentos envolvendo bioensaios de resistência, utilizamos indivíduos oriundos da geração F1 das isolinhagens de *Z. indianus* obtidas para cada área coletada (Florianópolis-SC, Uberaba-MG e Aracaju-SE). Assim, constituíram-se dois grupos amostrais por população geográfica: o controle negativo ou grupo controle (GC) no qual não foi exposto ao inseticida e o tratado com malathion ou grupo tratado (GT). Cada grupo contou com dez réplicas e cada uma delas foi constituída por dez indivíduos de *Z. indianus* (5 machos e 5 fêmeas) escolhidos ao acaso totalizando 200 indivíduos por placa.

Os bioensaios ocorreram em placas de Petri com diâmetro de 14,5cm forradas com papel filtro. Calculou-se a área da placa de petri utilizada tendo como valor 165,04 cm². Para a exposição seguimos o protocolo proposto por Galego e Carareto (2010b) que propõe a utilização de 0,0003 µl/cm² de malathion (500 concentrado emulsionável EC CHEMINOVA) por cm². A exposição deu-se em papeis-filtro dispostos no fundo das placas, e tratados com uma concentração de 0,0003 µl/cm² de Malathion por placa. O grupo controle os papeis filtros foram expostos a uma concentração de 0,0003ul/cm² de acetona. O tempo de exposição foi 6 horas a uma temperatura de 25+1°C. As taxas de mortalidade foram registradas para cada placa de hora em hora. Os indivíduos sobreviventes foram selecionados e posteriormente utilizados como amostras para a detecção dos polimorfismos esterásicos e para o ensaio enzimático.

4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida- PAGE

Uma vez exposto ao malathion, os indivíduos de *Z. indianus* sobreviventes foram utilizados para a detecção dos polimorfismos esterásicos. Nesse sentido, utilizou-se 10 machos e 10 fêmeas de cada localidade macerados individualmente em 15µl de tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M, pH 8,8). Desse macerado, aplicou-se, em gel de poliacrilamida, 10µl por amostra. O gel de poliacrilamida foi preparado segundo o protocolo desenvolvido por Ceron (1988) e adaptado por Galego, Ceron e Carareto (2006): em 6,6ml de solução acrilamida/bisacrilamida 8%, c=5% adicionou 5ml de Tampão Tris-HCl (1M, pH 8,8), 8ml de água destilada e, nesta ordem, 1,0 ml de solução de persulfato de amônia a 2% e 50µl de TEMED (N,N,N,N, tetrametilenodiamina). Após a polimerização do gel, as amostras foram aplicadas e submetidas à eletroforese por aproximadamente quatro horas, com voltagem constante de 150V, em tampão de corrida Tris-Glicina (0,1M, pH 8,3).

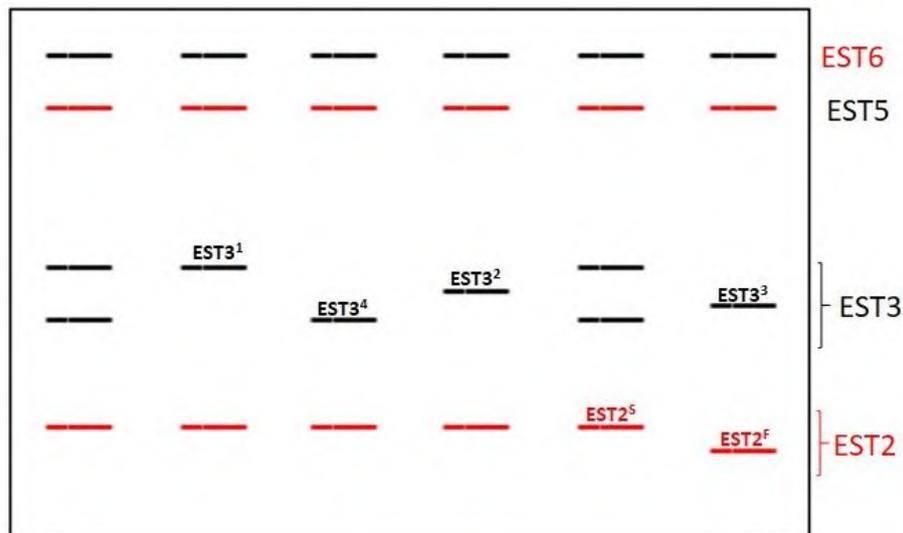
4.3 Detecção dos polimorfismos esterásicos

Para a detecção das esterase-2 e esterase-3, os géis ficaram pré-incubados por 30 minutos em 50 ml de tampão Fosfato (0,1M, pH 6,2). Transcorrido esse tempo, o tampão foi retirado, e então acrescentou uma solução de coloração 30mg de alfa-naftilacetato e 25mg de beta-naftilacetato (em 5 ml de acetona) e 60 mg de *Fast Blue* RR (em 1ml de N-propanol) e 50ml de tampão Fosfato (0,1M, pH 6,2), e 100ml de tampão Fosfato (0,1M, pH 6,2), conforme descrito por Ceron (1988) e modificado por Galego, Ceron e Carareto (2006).

Os géis foram incubados em um recipiente por 30 minutos, na ausência de luz. Logo em seguida, os géis foram tratados por 30 minutos com solução de descoloração (etanol- ácido

acético) dentro de uma cuba de vidro escuro, decorrido o tempo necessário os géis foram fixados em papel filme com gelatina (CERON; SANTOS; BICUDO, 1992). O padrão de bandas esperado, conforme descrito por Galego, Ceron e Carareto (2006), está ilustrado na **Figura 6**.

Figura 6: Zimograma com o padrão de bandas esterásicas para *Z. indianus*

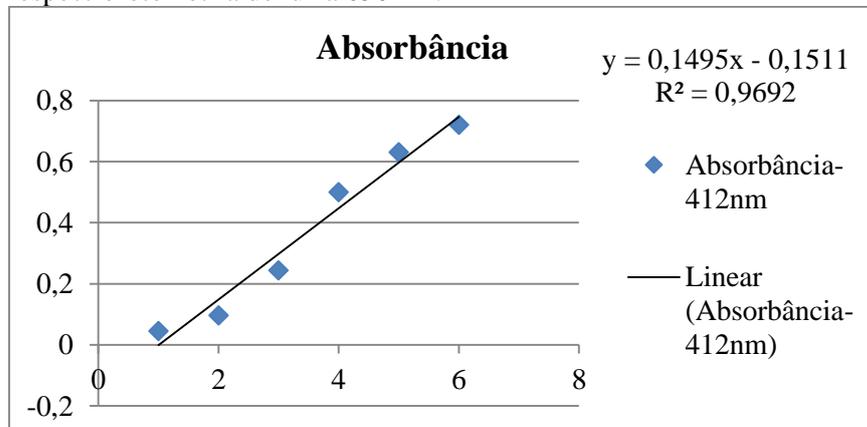


Do autor, 2019.

4.4 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 7**).

Figura 7: 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.



Do autor, 2019

4.5 Ensaio enzimático para a atividade da acetilcolinesterase

Para a realização do ensaio bioquímico para atividade da AChE foram utilizados os indivíduos sobreviventes (de cada população) após o bioensaio. Para isto, utilizou-se 20 cabeças maceradas em 200 µl de tampão de extração (Tris-HCl 8,8 0,1 M), por grupo amostral. Para cada ensaio enzimático foi preparado com a adição de 800 µl de solução de extração (Tampão Tris – HCl 8.8 0,1 M, 20% sacarose, 1 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e 0,5% Trinton x-100 (v/v)) na amostra contendo os 200 µl de tampão Tris-HCl 8,8 de extração com as cabeças totalizando 1ml. Em seguida as amostras seguiram para serem homogenizadas em agitador durante um minuto e a solução homogenizada foi centrifugada a 14.000 rpm por cinco minutos. O ensaio enzimático compôs-se de duas partes: Atividade enzimática e inibição enzimática da acetilcolinesterase, que foi medida pelo método colorimétrico de Ellman et al (1961), que permite quantificar espectrofotometricamente a hidrólise de ACh pela AChE, originando a tiocolina, que por sua vez reage com o ânion carboxilato do DNTB, formando o 2-nitrobenzoato 5- mercaptotiocolina e um ânion de coloração amarelada, o 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato, que pode ser analisada com um espectrofotômetro em comprimento de onda 412 nm e com isso medir sua atividade inibidora, indicando o efeito da exposição da enzima ao malathion.

As amostras foram divididas por cidade: Cidade de Uberaba Grupo Controle (20 cabeças machos/fêmeas escolhidas ao acaso) e Grupo Tratado (20 cabeças machos/ fêmeas escolhidas ao acaso), Cidade de Florianópolis (2 soluções de análise: Grupo Controle (20 cabeças machos/fêmeas escolhidas ao acaso) e Grupo Tratado (20 cabeças machos/fêmeas escolhidas ao acaso), Cidade de Aracaju (2 soluções de análise: Grupo Controle (20 cabeças machos/fêmeas escolhidas ao acaso) e Grupo Tratado (20 cabeças machos/fêmeas escolhidas ao acaso). Preparou-se a solução de análise com 3,0 ml de solução de tampão fosfato 0,1 M e pH 8. Como substrato utilizou-se 20 µl de Iodeto de acetilcolina 0,075 M (21,67 mg/ml), 100 µl de DTNB 0,01 M (preparado a partir de 39,6 mg de 5: 5-ditiobis-2- Nitrobenzólico dissolvido em 10ml de solução tampão Tris-HCl 8.8 0,1 M e 15 mg de bicarbonato de sódio) e 50 µl de sobrenadante homogeneizado. A amostra então foi submetida a uma leitura em um espectrofotômetro com comprimento de onda 412 nm. Foram feitas triplicatas de todas as soluções análises e as leituras decorreram em um período de 20 min com intervalo de 5 minutos para cada leitura. Para cada cidade foi feito um controle sem a presença da enzima para estimar a hidrólise espontânea do substrato. Para estimar a atividade da enzima do ponto 0 foram adicionados 50 µl de sobrenadante imediatamente antes da primeira leitura.

A atividade enzimática é medida segundo o aumento da cor amarela produzida a partir da reação da tiocolina quando reage com o DTNB. Os valores em absorbância encontrados foram convertidos em unidade de atividade (nkat ml^{-1}) que corresponde a constante catalítica da enzima como proposto por Morton e Singh (1982).

Capítulo III - Análises Estatísticas

5. Análises Estatísticas

Os resultados dos bioensaios foram comparados por ANOVA, por meio do programa R versão 3.5.3 e as comparações par-a-par foram realizadas por meio do teste de Tukey-Kramer com significância de 0,05. Os dados também foram organizados em gráficos elaborados no R e no Systat 13.

Para os polimorfismos as análises estatísticas constituíram na avaliação das frequências alélicas por loco esterásico polimórfico mediante a decodificação dos géis , bem como as heterozigosidades esperadas (H_E) e observadas (H_O), além da Distância Genética de Roger (1972, modificado por Wright, 1978), o Teste Exato de Raymond e Rousset (1995) para verificar-se a homogeneidade entre os grupos, e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg por Qui-Quadrado. Essas análises foram todas desenvolvidas por meio do programa TFPGA versão 1.3 (MILLER,1997).

Para a análise dos ensaios bioquímicos, a atividade enzimática foi calculada a partir da inclinação (coeficiente angular) da região linear da curva de cinética obtida por espectrofotometria de absorção, a qual corresponde numericamente à variação de absorbância no decorrer do tempo ($\Delta A / \Delta t$) como mostra equação abaixo:

$$Z/m = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V \times 1000}{\epsilon \times d \times v \times \rho}$$

Sendo, a atividade catalítica enzimática representada por Z/m e dada por Ug-1, ΔA variação de absorbância, V o volume do ensaio (ml), ϵ é o coeficiente de absorção do ânion 5-tio-2-nitrobenzoato 1,36 mmol-1mm), d , o caminho óptico da cubeta em nm, Δt variação do tempo do ensaio cinético (min); v , o volume da amostra utilizada no ensaio (ml) e ρ , é a concentração de enzima utilizada no ensaio dada por gL-1. Os volumes das cubetas utilizadas foram de 1 ml.

Capítulo IV- Resultados e Discussões

6. RESULTADOS

6.1 Bioensaios de Seleção

Os resultados de sobrevivência dos indivíduos de *Z. indianus* oriundos de Uberaba- MG, Florianópolis-SC e Aracaju-SE expostos ao bioensaio de seleção ao malathion são apresentados na **Tabela 1** e na **Figura 8**. A mortalidade variou significativamente entre todas as comparações entre sobreviventes dos grupos controles e tratados, sendo a maior sobrevivência obtida em todos os grupos controle, e a menor para as fêmeas tratadas de Aracaju ($58\% \pm 4,8\%$). Em todos os grupos, a sobrevivência de fêmeas foi menor do que a dos machos nos grupos tratados.

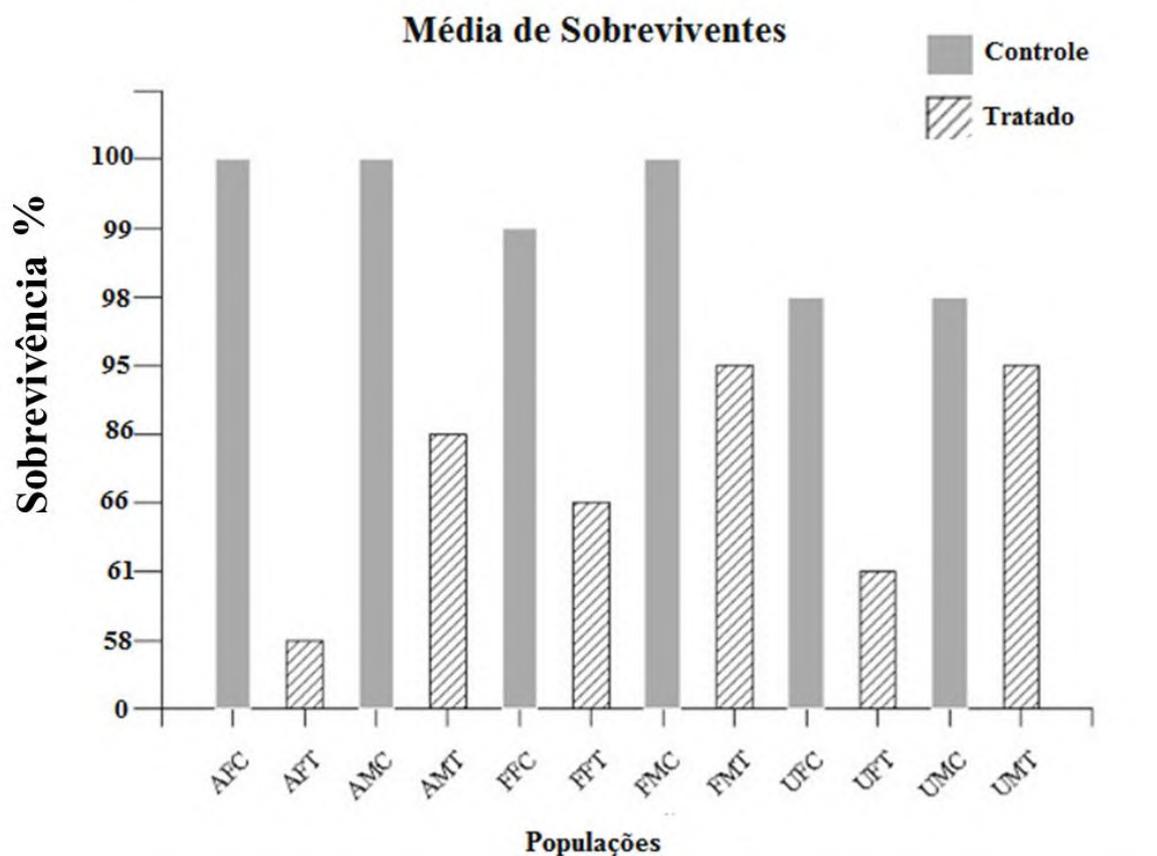
As comparações realizadas pela análise de variância (**Figura 9**) indicaram diferenças significativas para a sobrevivência entre os grupos controle e tratado, bem como entre os sexos nos grupos tratados em cada população geográfica experimental. A população de Aracaju (Figura 8 e Tabela 1) apresentou 100% de sobrevivência nos grupos controle, independente do sexo, enquanto essa taxa (em %) foi $86,0\% \pm 3,3$, para machos e $58,0 \pm 4,8$, para fêmeas (ControleXTratado, $F_{1,76}=93,10$; $p<0,05$); entre sexos no grupo Tratado: $F_{1,76}=23,75$; $p<0,05$). Os dados para Florianópolis (Figura 9), por sua vez, indicaram uma sobrevivência similar entre machos e fêmeas no grupo controle (100% e 99%, respectivamente), porém estatisticamente diferentes no tratado, com machos apresentando sobrevivência de $95\% \pm 3,2$ e fêmeas de $66\% \pm 5,6$ (TratadoXControle: $F_{1,76}=36,17$; $p<0,05$; entre os sexos, no Tratado: $F_{1,76}=20,00$; $p<0,05$). Por fim, Uberaba (Figura 8) não, apresentou diferenças significativas na sobrevivência dos machos entre os grupos controle e tratado (98% e 100%, respectivamente), mas estas foram significativas nas comparações entre os grupos de fêmeas (controle: $99\% \pm 1,0$; tratado: $66\% \pm 5,6$, $F_{1,76}=53,710$; $p<0,05$) e entre machos e fêmeas no grupo Tratado ($F_{1,76}=38,806$; $p<0,05$).

Tabela 1: Média da sobrevivência (%) e desvio padrão (σ) de *Z. indianus* em populações experimentais submetidas ou não ao malathion

Amostras	Controle	Tratado	t
<i>Aracaju Machos</i>	100,0 \pm 0,0	86,0 \pm 3,3	4,27***
<i>Aracaju Fêmeas</i>	100,0 \pm 0,0	58,0 \pm 4,8	11,88***
TOTAL	100,0 \pm 0,0	72,0 \pm 4,0	
t	NS	4,71***	
<i>Florianópolis Machos</i>	100,0 \pm 0,0	95,0 \pm 3,2	1,72*
<i>Florianópolis Fêmeas</i>	99,0 \pm 1,0	66,0 \pm 5,6	7,13***
TOTAL	99,5 \pm 0,5	80,5 \pm 4,4	
t	NS	5,35***	
<i>Uberaba Machos</i>	98,0 \pm 1,4	100,0 \pm 0,0	NS
<i>Uberaba Fêmeas</i>	99,0 \pm 1,0	66,0 \pm 5,6	7,13***
TOTAL	98,5 \pm 1,2	83,0 \pm 2,8	
t	NS	7,78***	
F	1,03	23,38***	

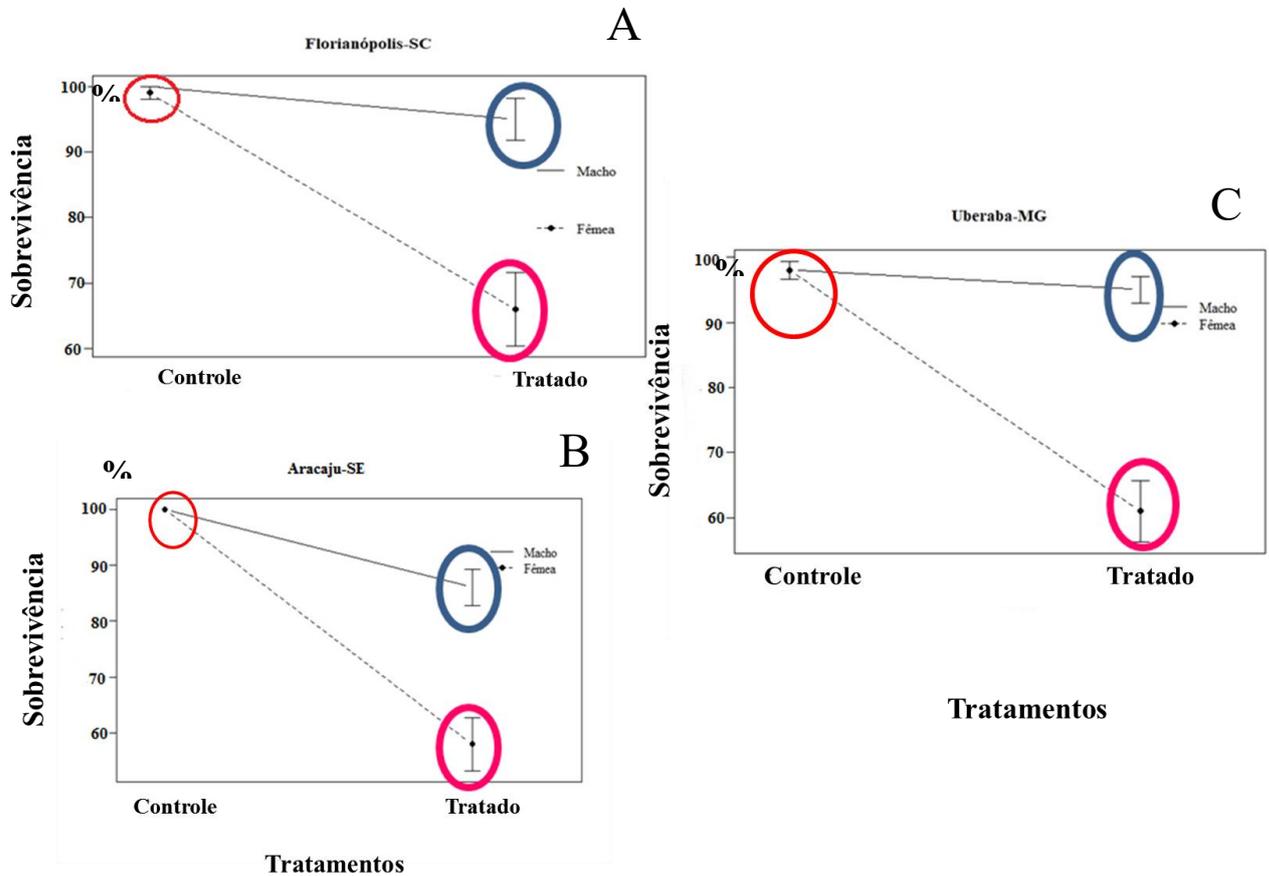
*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; NS- Não significativo; F- Teste F, t Tukey-Kramer.

Figura 8: Média de sobrevivência (%) de *Z. indianus* em populações experimentais submetidas ou não ao malathion.



*, AFC (Aracaju fêmeas controle), AFT (Aracaju fêmeas tratadas), AFT (Aracaju fêmea controle), AMT (Uberaba machos Tratados), FFC (Florianópolis fêmeas controle), FFT (Aracaju fêmeas tratadas), FMC (Florianópolis machos controle), FMT (Florianópolis machos Tratados), UFC (Uberaba fêmeas controle), UFT (Uberaba fêmeas tratadas), UMC (Uberaba machos controle), UMT (Uberaba machos Tratados).

Figura 9: Comparações entre a sobrevivência de machos e fêmeas de *Z. indianus* oriundas de Florianópolis (A), Aracaju (B) e Uberaba (C) em grupos controle e tratado com malathion.



6.2 Polimorfismos esterásicos

Aqui, foram analisados os resultados dos polimorfismos esterásicos de *Z. indianus* oriundos das três cidades de estudo Uberaba-MG, Florianópolis-SC e Aracaju-SE. A **Tabela 2** apresenta as frequências alélicas obtidas para os loci polimórficos da Est2 e Est3 bem como as heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) para a distribuição desses alelos nos genótipos.

Os resultados indicam que a H_o e H_e dos genótipos do loco Est3 diferiram nos grupos tratados e controle. Em Aracaju-SE, os machos controles apresentaram a frequência da $H_o < H_e$ já os tratados com inseticida a H_o foi significativamente inferior a H_e ($H_o < H_e$) ($X^2=6,63$, d.f. 1, $p < 0,01$). Para as fêmeas controle a $H_o > H_e$, contudo para as fêmeas tratadas houve uma grande perda de heterozigosidade sendo $H_o < H_e$ ($X^2=7,88$, d.f. 1, $p < 0,001$). Na cidade de Florianópolis os machos controle e tratados tiveram a $H_o < H_e$ e quando comparamos o controle com o tratado vemos uma perda de heterozigosidade significativa do controle para o tratado ($X^2=6,63$, d.f. 1,

p<0,01). Já as fêmeas quando comparamos o valor da H_o e H_e vemos que não houve perda da heteroziguidade ($X^2=3,84$, d.f. 1, $p>0,05$). A cidade de Uberaba-MG os controles apresentaram a $H_o<H_e$. Quando comparamos controle com tratados vimos que os machos apresentaram uma diferença significativa $H_o<H_e$ ($X^2=3,84$, d.f. 1, $p<0,05$) e as fêmeas controle e tratadas a $H_o<H_e$ ($X^2=3,84$, d.f. 1, $p<0,05$). Observamos, portanto uma tendência de perda de heteroziguidade nas populações tratados com o organofosforado, ou seja, a pressão de seleção do inseticida favorece os indivíduos homozigotos portadores dos genes de resistência ao organofosforado.

Tabela 2: Frequências alélicas, Heteroziguidade observada (H_o) e esperada (H_e) dos locos Est2 e Est3 de *Z. indianus* expostos ao malathion.

Amostra	Est3						Est2			
	$Est3^1$	$Est3^2$	$Est3^3$	$Est3^4$	H_o	H_e	$Est2^S$	$Est2^F$	H_o	H_e
<i>Controle</i>										
Aracaju Machos	0,15	0,15	0,35	0,35	0,40	0,71	0,40	0,60	0,00	0,48
Aracaju Fêmeas	0,44	0,11	0,17	0,28	0,89	0,68	--	--	--	--
<i>Total</i>	0,29	0,13	0,26	0,32	0,63	0,73	0,40	0,60	0,00	0,48
<i>Tratado</i>										
Aracaju Machos	0,05	0,00	0,18	0,77	0,09	0,36	0,20	0,80	0,00	0,32
Aracaju Fêmeas	0,15	0,00	0,20	0,65	0,10	0,51	--	--	--	--
<i>Total</i>	0,10	0,00	0,19	0,71	0,09	0,44	0,20	0,80	0,00	0,32
<i>Controle</i>										
Florianópolis Machos	0,15	0,10	0,45	0,30	0,60	0,67	0,95	0,05	0,10	0,095
Florianópolis Fêmeas	0,50	0,00	0,00	0,50	0,27	0,50	--	--	--	--
<i>Total</i>	0,33	0,05	0,22	0,40	0,42	0,67	0,95	0,05	0,10	0,095
<i>Tratado</i>										
Florianópolis Machos	0,05	0,00	0,70	0,75	0,10	0,44	0,75	0,25	0,10	0,37
Florianópolis Fêmeas	0,68	0,00	0,00	0,31	0,63	0,43	--	--	--	--
<i>Total</i>	0,38	0,00	0,10	0,33	0,38	0,66	0,75	0,25	0,10	0,37
<i>Controle</i>										
Uberaba Machos	0,25	0,35	0,20	0,20	0,80	0,73	0,35	0,65	0,10	0,45
Uberaba Fêmeas	0,27	0,18	0,23	0,32	0,54	0,73	--	--	--	--
<i>Total</i>	0,26	0,26	0,22	0,26	0,66	0,74	0,35	0,65	0,10	0,45
<i>Tratado</i>										
Uberaba Machos	0,37	0,13	0,31	0,19	0,50	0,71	0,37	0,62	0,00	0,46
Uberaba Fêmeas	0,35	0,05	0,25	0,35	0,00	0,46	--	--	--	--
<i>Total</i>	0,36	0,08	0,28	0,28	0,61	0,70	0,37	0,62	0,00	0,46

O equilíbrio de Hardy- Weinberg (EHW) entre as H_e e H_o (**Tabela 3**) mostrou que não houve diferenças significativas para o locus Est3 nas cidades de Florianópolis-SC e Uberaba-MG. Entretanto foram observadas diferenças significativas para a população de Aracaju-SE, contudo o Est2 foi o que mais respondeu a pressão de inseticidas mostrando que existem forças evolutivas agindo sobre esse locus.

Tabela 3: Verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) entre as heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) para os locos Est3 e Est2 de populações de *Z. indianus*. As comparações foram realizadas pelo teste de Qui-quadrado.

Grupos Amostrais	Teste Exato para o TEHW	
	Est3	Est2
<i>Controle</i>		
Aracaju Machos	**	**
Aracaju Fêmeas	NS	--
<i>Total</i>	*	**
<i>Tratado</i>		
Aracaju Machos	**	**
Aracaju Fêmeas	**	--
<i>Total</i>	***	**
<i>Controle</i>		
Florianópolis Machos	NS	NS
Florianópolis Fêmeas	NS	--
<i>Total</i>	*	NS
<i>Tratado</i>		
Florianópolis Machos	**	*
Florianópolis Fêmeas	NS	--
<i>Total</i>	***	*
<i>Controle</i>		
Uberaba Machos	NS	*
Uberaba Fêmeas	**	--
<i>Total</i>	NS	*
<i>Tratado</i>		
Uberaba Machos	NS	**
Uberaba Fêmeas	NS	--
<i>Total</i>	NS	**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, N.S não significativo, -- ausente.

Em geral, as populações que não foram expostas ao organofosforado apresentaram uma baixa frequência do alelo Est3³. Por exemplo, a frequência do alelo Est3³ para UMC foi de 0,20 e UMT foi de 0,31 ($X^2=3,84$, d.f. 1, $p < 0,05$). Já UFC apresentou uma frequência de 0,23 e UFT 0,25 ($X^2=3,84$, d.f. 1, $p < 0,05$). A população de Florianópolis observou que FMC uma frequência de 0,45 e FMT 0,70 ($X^2=3,84$, d.f. 1, $p < 0,05$). Já FFC e FFT não houve diferença entre tratamentos sendo a frequência de ambas 0,0. $X^2=3,84$, d.f. 1, $p > 0,05$). Aracaju não houve um aumento do alelo Est3³ para os machos sendo 0,35 para AMC e 0,18 para AMT ($X^2=3,84$, d.f. 1, $p < 0,05$), contudo as fêmeas apresentaram um ligeiro aumento, porém não significativo AFC

0,17 e AFT 0,20 ($X^2=3,84$, d.f. 1, $p>0,05$). Ao analisarmos a frequência do alelo Est3⁴ vemos um aumento significativo da frequência dos AMC 0,35 para AMT 0,77 ($X^2=3,84$, d.f. 1, $p>0,05$) e nas AFC 0,28 e AFT 0,65 ($X^2=3,84$, d.f. 1, $p>0,05$).

Ao analisarmos as frequências do alelo Est2 vemos que o locus Est2^F na cidade de Aracaju aumentou ligeiramente sua frequência sendo o AMC 0,60 e o AMT 0,80. Em Uberaba a frequência para o grupo UMC foi 0,45 e UMT 0,63. Por sua vez, Florianópolis foi a cidade que mais teve aumento na frequência sendo o controle 0,05 e o tratado 0,25.

6.3 Distâncias Genéticas

As Tabelas 4 e 5 bem como as Figuras 10 e 11 mostram a distância genética obtida pelo software TFPGA-Tools for Population Genetic Analyses (MILLER, 1997) das três localidades. As distâncias foram calculadas pelo parâmetro de Roger (1972, modificado por Wright, 1978). Observamos que a maior distância genética foi registrada entre as populações de FC e AT, sendo a distância 0,357. Já a menor distância foi entre UT e AC 0,032 (Tabela 4).

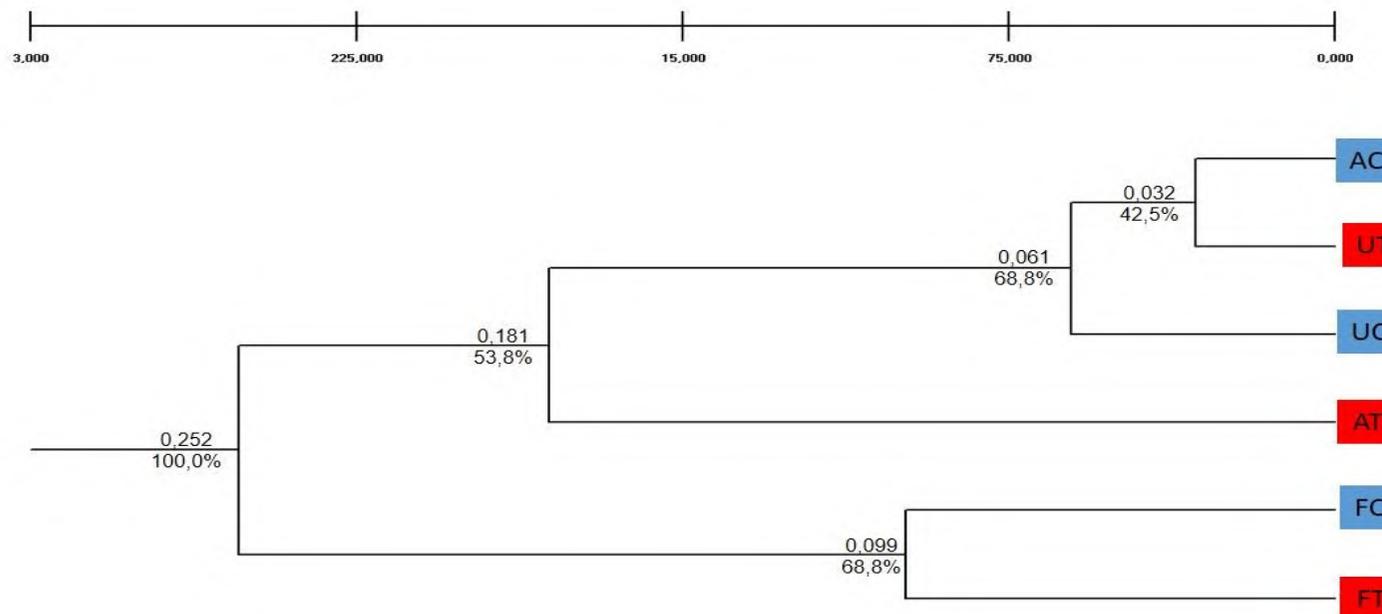
Tabela 4: Teste Exato (Est3/Est2) e Distância Genética de Roger (1972), modificado por Wright (1978) das populações tratadas ou não com o inseticida malathion.

	AC	AT	FC	FT	UC	UT
AC	--	***NS	NS/**	NS/*	NS/NS	NS/NS
AT	0,173	--	***NS	NS/**	NS/NS	NS/NS
FC	0,249	0,357	--	NS/NS	**NS	NS/NS
FT	0,166	0,298	0,106	--	***/**	NS/**
UC	0,052	0,186	0,281	0,204	--	NS/NS
UT	0,032	0,183	0,261	0,170	0,068	--

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, N.S não significativo, -- ausente. AC- Aracaju Controle, AT- Aracaju Tratado, FC- Florianópolis controle, FT- Florianópolis Tratado, UC- Uberaba Controle, UT- Uberaba Tratado.

Como podemos observar as análises de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) para as populações analisadas considerando a distância genética de Roger (1972, modificado por Wright, 1978) para os polimorfismos esterásicos de *Z.indianus* vemos que as populações de AC e AT e UC e UT ficaram agrupadas em um mesmo clado, porém AT ficou em um ramo externo no clado. As distâncias genéticas foram similares para AC e UT. A população de UC apresentou uma distância genética um pouco maior que os outros dois grupos de AC e UT. Contudo as populações de AT foram dentro do clado as que apresentaram uma maior distancia genética. As populações de FC e FT ficaram em outro clado mais externo e com a distância genética maior comparada as demais. O fato da população de Florianópolis estar em um clado separado sugere que existem pressões seletivas diferentes agindo sobre essas populações.

Figura 10: Análise de UPGMA para as distâncias genéticas de Roger (1972, modificado por Wright, 1978) calculado dos a partir dos polimorfismos esterásicos da Est2 e Est3 oriundas de populações de *Z. indianus* expostas e não ao inseticida malathion. A distância genética é apresentada na parte superior do ramo, enquanto o bootstrap na inferior. A cor azul representa o grupo controle e a vermelha o grupo tratado.



*AC (Aracaju controle), AT (Aracaju tratado), UC (Uberaba controle), UT (Uberaba tratado), FC (Florianópolis controle), FT (Florianópolis tratado).

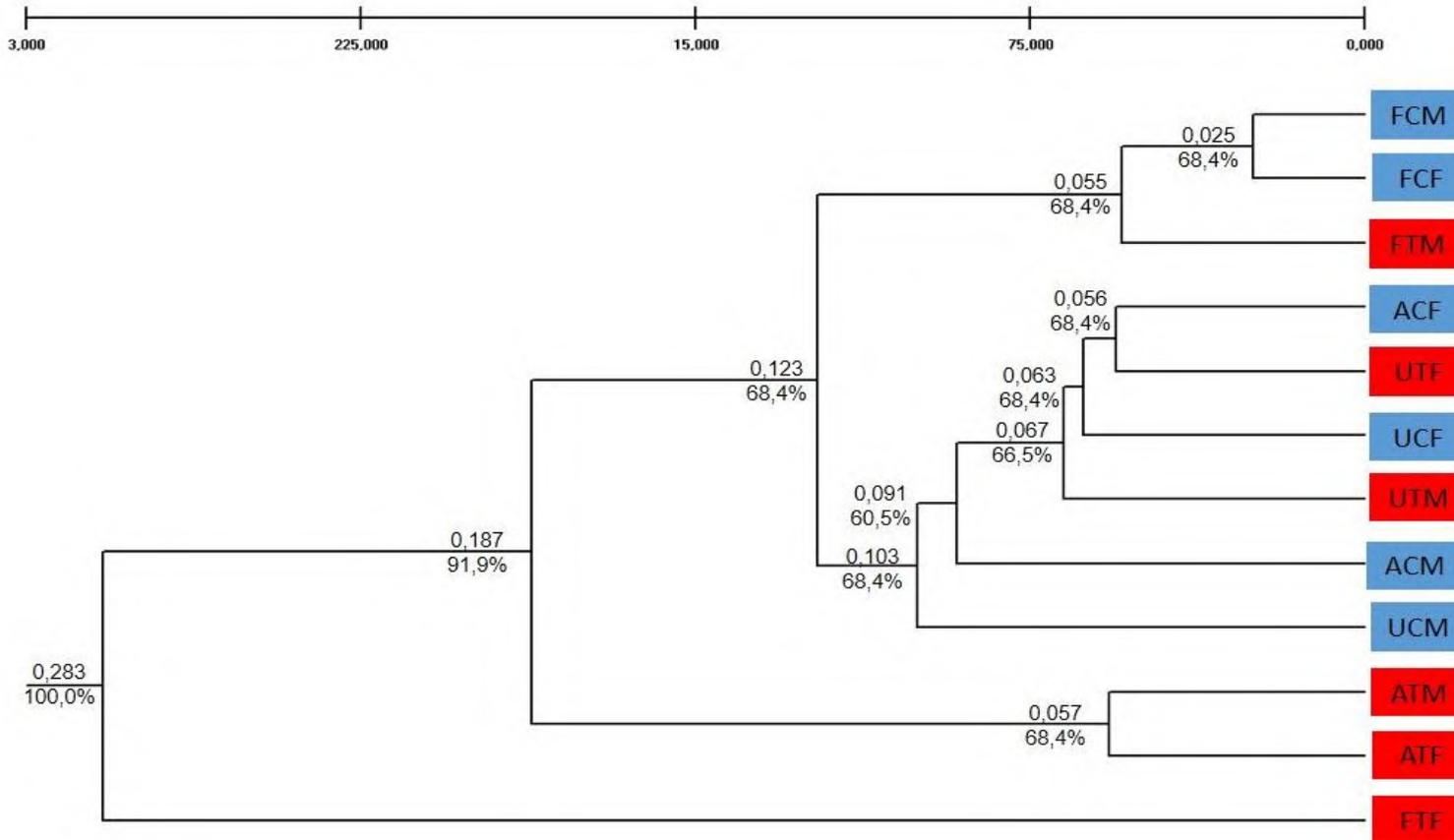
Do autor, 2019

Tabela 5: Teste Exato (Est3/Est2) e Distância Genética Roger (1972), modificado por Wright (1978) das populações de *Z.indianus* machos e fêmeas tratadas ou não com o inseticida malathion.

	ACM	ACF	ATM	ATF	FCM	FCF	FTM	FTF	UCM	UCF	UTM	UTF
ACM	--	NS/--	**/NS	NS/--	NS/***	NS/--	NS/*	***/--	NS/NS	NS/--	NS/NS	NS/--
ACF	0,126	--	--/***	--/**	--/NS	--/***	--/***	--/***	--/NS	NS/--	--/NS	--/NS
ATM	0,179	0,228	--	NS/--	NS/NS	NS/--	***/***	*/--	NS/NS	NS/--	***/NS	**/--
ATF	0,130	0,172	0,057	--	*/--	--/***	--/***	--/NS	--/***	--/**	--/**	--/NS
FCM	0,250	0,144	0,379	0,156	--	NS/--	NS/NS	NS/--	NS/NS	NS/--	NS/NS	NS/--
FCF	0,190	0,107	0,198	0,152	0,216	--	--/NS	--/NS	--/NS	--/***	--/**	--/**
FTM	0,202	0,238	0,338	0,229	0,128	0,372	--	NS/--	NS/**	--/***	**/*	--/***
FTF	0,231	0,110	0,283	0,232	0,248	0,090	0,334	--	NS/--	--/***	--/***	--/**
UCM	0,100	0,112	0,231	0,204	0,294	0,198	0,271	0,213	--	--/NS	NS/NS	--/NS
UCF	0,063	0,070	0,191	0,140	0,094	0,145	0,197	0,177	0,073	--	--/NS	--/NS
UTM	0,089	0,065	0,233	0,191	0,272	0,168	0,235	0,167	0,089	0,0689	--	--/NS
UTF	0,086	0,055	0,186	0,130	0,103	0,117	0,195	0,148	0,125	0,0558	0,067	--

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, **NS** não significativo, - ausente. **ACM**- Aracaju Controle Macho, **ACF**- Aracaju Controle Fêmea, **ATM**- Aracaju Tratado Macho, **ATF**- Aracaju Tratado Fêmea, **FCM**- Florianópolis controle Macho, **FCF** - Florianópolis controle Fêmea, **FTM**- Florianópolis Tratado Macho, **FTF**- Florianópolis Tratado Fêmea, **UCM**- Uberaba Controle Macho, **UCF**- Uberaba Controle Fêmea, **UTM**- Uberaba Tratado Macho. **UTF**- Uberaba Tratado Fêmea.

Figura 11: Análise de UPGMA para as distâncias genéticas de Roger (1972, modificado por Wright, 1978) calculado dos a partir dos polimorfismos esterásicos da Est2 e Est3 oriundas de populações *Z. indianus* machos e fêmeas expostas e não ao inseticida malathion. A distância genética é apresentada na parte superior do ramo, enquanto o bootstrap na inferior. A cor azul representa o grupo controle e a vermelha o grupo tratado.



*AFC (Aracaju fêmeas controle), AFT (Aracaju fêmeas tratadas), AMC (Aracaju machos controle), AMT (Aracaju machos tratados), FFC (Florianópolis fêmeas controle), FFT (Florianópolis fêmeas tratadas), FMC (Florianópolis machos controle), FMT (Florianópolis machos tratados), UFC (Uberaba fêmeas controle), UFT (Uberaba fêmeas tratadas), UMC (Uberaba machos controle), UMT (Uberaba machos tratados).

Ao analisarmos o Teste Exato (Est3/Est2) de equilíbrio de Hardy-Weinberg levando em consideração o sexo vemos que a maior distância genética foi registrada entre as populações de Florianópolis-SC macho controle e Florianópolis-SC fêmeas tratadas sendo a distância 0,372. Já a menor distância foi entre Uberaba-MG tratado fêmea e Aracaju-SE controle fêmea sendo a distância entre elas 0,055 o observamos também que o (EHW) para a Est2 foi bem significativo e de fato quando observamos os dados UPGMA para as populações analisadas considerando a distância genética de Roger (1972, modificado por Wright, 1978) para os polimorfismos esterásicos de *Z.indianus* de machos e fêmeas observamos a formação de três cladogramas. As populações de Florianópolis Macho e Fêmea (C) e macho (T), Aracaju (C) fêmea, Uberaba (T) fêmea, Uberaba (C) fêmea, Uberaba (T) macho, Aracaju (C) macho e Uberaba(C) macho ficaram em um mesmo clado. As populações (T), de Aracaju machos e fêmeas ficaram em outro clado. Por fim, no terceiro clado mais externo temos Florianópolis (T), fêmeas. Ao observamos as distâncias genéticas vemos uma similaridade das populações controle de machos e fêmeas de Florianópolis. As populações de Aracaju (C) fêmea e Uberaba (T) fêmea também apresentaram similaridade nas distâncias genéticas e também as populações (T) macho e fêmea de Aracaju. A maior distância genética foi registrada na população de Florianópolis fêmea (T). Esse fato aponta para possíveis forças evolutivas como seleção natural, deriva genética agindo sobre as populações de Florianópolis-SC.

6.4 Ensaio enzimático para a atividade da acetilcolinesterase

Os resultados obtidos na dosagem de proteínas evidenciaram que todas as amostras apresentaram resultados dentro do intervalo de 69 a 81 µg de proteína/ml totais (**Tabela 6**).

Tabela 6- Média e desvio padrão da concentração de dosagens de proteínas totais nos grupos tratados ou não com malathion.

Localidades	Média µg/ml e Desvio Padrão
AC	77,0±8,77
AT	69,3±8,32
FC	72,1±8,49
FT	77,4±8,79
UC	81,7±9,03
UT	77,8±8,82

*AC- Aracaju Controle, AT-Aracaju Tratado, FC- Florianópolis Controle, FT- Florianópolis Tratado, UC-Uberaba Controle, UT- Uberaba Tratado.

Portanto, os resultados da atividade da acetilcolinesterase dos grupos tratados ou não com inseticida de cada população (**Tabela 7**) tem a referência de unidades µg de proteína/ml

por meio da curva padrão utilizando a albumina. Assim, a análise de variância mostrou que houve diferenças da atividade entre os grupos controle e tratado com o inseticida malathion nas populações de Aracaju controle ($0,181 \pm 0,011$) e variação interna do grupo de 16% e Aracaju tratado ($0,114 \pm 0,023$) e variação de 20%. A população de Florianópolis apresentou variação da atividade dentro do grupo controle na escala de 3% ($0,460 \pm 0,016$) e do tratado foi de 7% ($0,395 \pm 0,027$) o teste t mostrou diferenças significativas entre os dois grupos ($p < 0,05$). Os indivíduos de Uberaba, por sua vez, não apresentaram diferenças significativas na atividade da acetilcolinesterase. Podemos observar então que em geral houve uma diminuição da atividade da acetilcolinesterase em populações expostas ao organofosforado. A resposta metabólica frente à exposição a um inseticida é que cada molécula da enzima é capaz de sequestrar uma molécula do inseticida, reduzindo a quantidade de inseticida disponível para interagir com a acetilcolinesterase.

Tabela 7: Média e erros-padrão da atividade enzimática da EST6 de *Z. indianus* em $\mu\text{g/ml}$ após 20 minutos de aferição, conforme a origem geográfica e a seleção (Tratado) ou não (Controle) com malathion. As comparações estatisticamente significativas para Teste t e para ANOVA (F) estão em negrito. CV: Coeficiente de Variação.

Localidade	Atividade Enzimática $\bar{X} \pm \text{EP}$		Teste t
	Controle	Tratado	
Aracaju – SE CV	$0,181 \pm 0,011$ 16%	$0,114 \pm 0,023$ 20%	2,78**
Florianópolis – SC CV	$0,460 \pm 0,016$ 3%	$0,395 \pm 0,027$ 7%	2,09*
Uberaba – MG CV	$0,126 \pm 0,002$ 1,6%	$0,163 \pm 0,036$ 22%	-0,76
ANOVA (F _{2;24})	83,68***	29,34***	

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

7. DISCUSSÃO

Como observado, os resultados dos bioensaios mostraram que em populações da mesma origem geográfica houve diferenças significativas na sobrevivência das moscas fêmeas e machos tratados com o inseticida malathion, este fato pode ser explicado por duas hipóteses. A primeira é a questão histórica da aplicação de inseticidas nas cidades (CARVALHO, 2017) e a segunda é a hipótese biológica das esterases na resistência aos inseticidas (KARUNARATNE et al., 1995; HEMINGWAY, 2000; HEMINGWAY et al., 2004; GALEGO e CARARETO, 2010b; GRIGORAKI et al., 2017). A segunda hipótese é a mais provável esta relacionada com o papel das esterases na resistência a inseticidas. Evidências apontam para um possível papel da aloenzima Est3³ na detoxificação por malathion em populações experimentais expostas a esse organofosforado (GALEGO; CERON; CARARETO, 2006). Além disso, tais estudos evidenciaram que Est2 é expressa exclusivamente em machos e que a expressão desse gene ocorre nos tecidos reprodutores de *Zaprionus indianus*. A amplificação de alguns genes de carboxilesterases em mosquitos *Aedes albopictus* culmina em ações metabólicas que contribuem para a resistência a inseticidas (GRIGORAKI et al., 2017). Em *Helicoverpa armigera* as carboxilesterases agem no auxílio da detoxificação de alguns inseticidas como piretróides e organofosforados (BAI et al., 2019). Dessa forma a ausência de expressão da carboxilesterases Est2 em fêmeas poderiam torna-las mais suscetíveis a organofosforados como o malathion explicando assim sua baixa sobrevivência.

Os resultados para a frequência do alelo Est2 mostram que a medida que a latitude aumenta a frequência do locus Est2^F também aumenta sua frequência em populações expostas a organofosforados e de fato trabalhos feitos por Lourenço (2001) em *Drosophila mulleri* mostram um aumento da frequência da Est5^S em regiões de altas temperaturas e que esse valor poderia decair a medida que descemos nos trópicos conforme a pressão de seleção, ou seja existe uma distribuição diferencial em alelos de esterases em função da latitude e temperatura como observado nos trabalhos de Cooke e Oakeshott (1989) e Balakirev et al. (2002) na EST6 de *D. melanogaster* que é análoga a EST2 de *Z. indianus*. Como observamos aqui existe uma diminuição da frequência do locus Est2^F nos grupos controle sendo a ordem de maior frequência nas cidades de Aracaju>Uberaba> Florianópolis regiões de maior temperatura para menor temperatura. Porém quando analisamos o efeito da pressão seletiva do inseticida vemos que a frequência do locus vai diminuindo. Esses resultados poderiam explicar a manutenção do alelo F nas populações, pois a vantagem seletiva depende das condições ambientais, que ora favorece um alelo, ora outro.

Como vimos nos resultados houve um aumento na frequência do alelo Est3³ em populações tratadas com o malathion. Esse aumento da frequência do alelo Est3³ em populações tratadas com o organofosforado malathion foi relatado por Galego e Carareto (2010b) em populações expostas do estado de São Paulo (Ibirá, Mirassol e Olímpia) e quando analisamos três regiões diferentes do Brasil observamos o mesmo padrão. O fato dos indivíduos fêmeas da cidade de Florianópolis expostos ao inseticida apresentarem uma frequência 0,00 do alelo Est3³ pode estar ligado a sua alta taxa de mortalidade nos bioensaios e a alta pressão de seleção ao organofosforado e o aumento da frequência do locus Est2^F apontando a relação das esterases (MONTELA, SHAMA e VALE, 2019, NAQQASH et al., 2016) e o alelo Est3³ com a resistência ao inseticida.

Como podemos observar através de nossos testes de atividade enzimática, essa diminuição de atividade pode ser devido ao efeito do inseticida utilizado: o malathion um organofosforado que como mostra alguns estudos atua na inibição da dessa enzima (FISHEL, 2009, OLIVEIRA, 2009, ARAÚJO, 2016). Contudo não observamos essa diminuição da atividade da acetilcolinesterase na população de Uberaba tratada com o organofosforado. Essa resposta frente ao inseticida observada na população de Uberaba pode estar relacionada com o fato dos indivíduos serem mais resistentes a resposta desse inseticida, fato que pode estar relacionado ao histórico de aplicação do inseticida na cidade que ocorreu entre os meses de março e maio de 2019 segundo a Secretaria de meio ambiente de Uberaba para prevenção de focos do mosquito *Aedes aegypti*.

Vemos que cada população de *Z.indianus* do presente trabalho pode ser visto como um caso específico de estudo, em virtude de que cada uma delas apresenta padrões de resistência distintos e que esses padrões dependem de inúmeros fatores como tipo de mutação envolvida, frequência dos genes ligados à resistência e o histórico de aplicações do inseticida e o nível de sensibilidade ao composto (HEMINGWAY et al., 2004).

Existem diversos estudos mostrando o potencial biomarcador da acetilcolinesterase para avaliação de águas contaminadas em diversos grupos como peixes (FLAMARION et al., 2002), e crustáceos como a *Daphnia* (PRINTES, 2006). Nos drosofilídeos, os trabalhos com acetilcolinesterase se restringem quase a *D.melanogaster* observamos na literatura uma escassez de trabalhos da AChE, da EST2 e EST3 dentro do gênero *Zaprionus*, fazendo-se assim necessário mais estudos do modo de ação/resposta da EST2, EST3 e EST6, de *Z.indianus*, frente a inseticidas.

Capítulo V - Conclusões

8. Conclusões

1. As esterases propostas como biomarcador no presente estudo EST2, EST3 e EST6 responderam positivamente ao organofosforado malathion sendo essa resposta avaliada por meio da frequência alélica ou atividade da enzima AChE.
2. Houve um aumento na frequência do alelo Est3³ e do alelo Est2^F nas populações expostas ao inseticida.
3. Os padrões polimórficos da EST2 e EST3 podem variar conforme o sexo dos indivíduos selecionados pelo inseticida.

Assim, as esterases de *Z.indianus* podem ser promissoras para bioindicadores em ambientes expostos a inseticidas organofosforados, sendo os polimorfismos de Est2 e Est3 bem como a atividade enzimática da EST6 marcadores adequados para esse propósito.

Referências

- ALAWAMLEH, Amani et al. Biological studies on the african fig fly, *zaprionus indianus* gupta (diptera: drosophilidae). The Journal "agriculture And Forestry, [s.l.], v. 62, n. 4, p.65-71, 15 dez. 2016. Journal Agriculture and Forestry.
- AMORIM, Leliane Coelho André. The use of biomarkers in the assessment of occupational exposure to chemical substances. Revista Brasileira de Medicina do Trabalho, Belo Horizonte, v. 1, n. 2, p.124-132, out. 2003.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Nº 10/ SNVS, Relação de substâncias com ação tóxica sobre animais ou plantas, cujo registro pode ser autorizado no Brasil, em atividades agropecuárias e em produtos domissanitários e determina outras providências. Brasília: 1985.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 2.475 de 08/06/12,ÍNDICE MONOGRAFICO DE MALATHION. Disponível em<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/M01%2B%2BMalationa.pdf/abfcd7f8-da29-4c99-8586-054cbfbae2e9>>. Acesso em: 27 jul. 2019.
- ARAÚJO, C. R. M. et al. Acetilcolinesterase - AChE: uma enzima de interesse farmacológico. Revista Virtual Química, Niteroi, v. 8, n. 6, p.1818-34, 2016.
- BÄCHLI, G. Es. This study was supported by Universal-CNPq 14/2013, process numbers 471174/2013-0 and 472973/2013-4. References Bächli, G., 2015. TaxoDros: The Database on Taxonomy of Drosophilidae. 2015. Disponível em: <<https://www.taxodros.uzh.ch/>>. Acesso em: 25 jul. 2019.
- BAI, Li-sha et al. Identification and biochemical characterization of carboxylesterase 001G associated with insecticide detoxification in *Helicoverpa armigera*. Pesticide Biochemistry And Physiology, [s.l.], v. 157, p.69-79, jun. 2019.
- BASTOS, V.I.f. Cunha et al. Brain acetylcholinesterase as an in vitro detector of organophosphorus and carbamate insecticides in water. Water Research, Estados Unidos, v. 25, n. 7, p.835-840, jul. 1991. Elsevier BV.
- Belkhir, K.; et al. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations1996-2004. Disponível em : <<http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm>> Acesso em: 24 jul. 2018.
- BROWN, Linda Morris et al. Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. American Association for Cancer Research, Estados Unidos, v. 50, n. 20, p.6585-6591, 15 out. 1990.
- BROWN, A. W. A. Insecticide resistance in arthropods. Geneva, World Health Organization, 148 p. 1958.
- Brown, J. H.; Taylor, P. Em Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica, 10a. Ed.; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., eds.; Mc Graw Hill, 2006, cap.7.
- COLBORN, T.; DUMNOSKI, D.; MYERS, J. P. O futuro roubado. Porto Alegre: L&PM, 2002.

CAMPBELL, P. M. et al. Developmental expression and gene/enzyme identifications in the alpha esterase gene cluster of *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*, [s.l.], v. 12, n. 5, p.459-471, out. 2003.

CASTREZANA, Sergio. New records of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) in North America and a key to identify some *Zaprionus* species deposited in the *Drosophila* Tucson Stock Center. *Drosophila Information Service*, Oklahoma, v. 90, n. 2, p.34-36, 01 dez. 2007.

CASTRO, L Flabeano; VALENTE, Vera L S. *Zaprionus indianus* is invading Drosophilid communities in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Drosophila Information Service*, [s. L.], v. 84, p.15-17, 2001.

CASTRO, Jane Silva Maia; ROZEMBERG, Brani. Propaganda de inseticidas: estratégias para minimização e ocultamento dos riscos no ambiente doméstico. *Saúde e Sociedade*, [s.l.], v. 24, n. 1, p.308-320, mar. 2015. FapUNIFESP (SciELO).

CERON, Roberto. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in embroiderin hoop. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v. 15, p.201-203, 1992.

CERON, Roberto. Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos. Ph.D. Thesis (Biological Sciences – Genetics), p.28-33, 1988.

CERUTI, Fabiane Cristina; LÁZZARI, Sonia Maria Noemberg. Utilização de bioensaios e marcadores moleculares para detecção da resistência de coleópteros de produtos armazenados a inseticidas. *Revista Brasileira de Entomologia*, [s. L.], v. 43, n. 3, p.447-453, 2003.

CHASSAGNARD, Marie. Thérèse, TSACAS, Leonidas. Le sous-genre *Zaprionus* s. str. Définition de groupes d'espèces et révision du sous goup vittiger (Diptera: Drosophilidae). *Annales Société Entomologique de France*, v.29, n.2, p.195-194,1993.

CHASSAGNARD, Marie. Thérèse. Les espèces africaines du sous-genre *Zaprionus* s. str. À six bandes thoraciques (Diptera: Drosophilidae). *Annales Société Entomologique de France*, v.32, n.1, p.159-65, 1996.

CHEMINOVA ,Ltda Brasil. MALATHION 1000 EC CHEMINOVA. 2017. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/MALATHION1000E CCHEMINOVA.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2018.

COMMAR, Leliane Silva et al. Taxonomic and evolutionary analysis of *Zaprionus indianus* and its colonization of Palearctic and Neotropical regions. *Genetics And Molecular Biology*, São Paulo, v. 35, n. 2, p.395-406, 2012.

COOKE, P. H.; OAKESHOTT, J. G.. Amino acid polymorphisms for esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 86, n. 4, p.1426-1430, 1 fev. 1989.

DAVID, J R et al. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity*, [s.l.], v. 94, n. 1, p.3-12, 25 ago. 2005.

ELLMAN, George L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, [s.l.], v. 7, n. 2, p.88-95, jul. 1961.

- FERREIRA, Leão. Barbára, TIDON, Rosana. Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. *Biodiversity and Conservation*, v.14, p.1809-1821, 2005.
- FLAMMARION, P; NOURY, P; GARRIC, J. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution*, [s.l.], v. 120, n. 2, p.325-330, dez. 2002
- FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. Controle de vetores: procedimentos de segurança. Ministério da Saúde, Brasília, 2002.
- GALEGO, Luís Gustavo da Conceição; CARARETO, Claudia Marcia Aparecida. Scenario of the spread of the invasive species *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) in Brazil. *Genetics And Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 33, n. 4, p.767-773, 24 set. 2010a.
- GALEGO, Luís Gustavo da Conceição; CARARETO Claudia Marcia Aparecida. Variation at the Est3 locus and adaptability to organophosphorous compounds in *Zaprionus indianus* populations. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, [s.l.], v. 134, n. 1, p.97-105, jan. 2010b.
- GALEGO, Luís Gustavo da Conceição; CERON, Roberto; CARARETO Claudia Marcia Aparecida. Characterization of Esterases in a Brazilian Population of *Zaprionus Indianus* (Diptera: Drosophilidae). *Genetica*, [s.l.], v. 126, n. 1-2, p.89-99, jan. 2006.
- GALEGO, Luís Gustavo Conceição; CARARETO, Claudia Márcia A.. Analysis of the drosophilid *Zaprionus indianus* introduction in Brazil: contribution of esterase loci polymorphisms. *Drosophila Information Service*, [s. L.], v. 90, p.79-84, dez. 2007.
- GARCIA, Ana Cristina L. et al. Two decades of colonization of the urban environment of Porto Alegre, southern Brazil, by *Drosophila paulistorum* (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia. Série Zoologia*, [s.l.], v. 98, n. 3, p.329-338, set. 2008.
- GEORGHIOU, G P. The Evolution of Resistance to Pesticides. *Annual Review Of Ecology And Systematics*, [s.l.], v. 3, n. 1, p.133-168, nov. 1972.
- GEORGHIOU, George P.; LAGUNES, Angel; BAKER, Jack D.. EFFECT OF INSECTICIDE ROTATIONS ON EVOLUTION OF RESISTANCE. *Mode Of Action, Metabolism And Toxicology*, [s.l.], p.183-189, 1983.
- GRIGORAKI, Linda et al. Carboxylesterase gene amplifications associated with insecticide resistance in *Aedes albopictus*: Geographical distribution and evolutionary origin. *Plos Neglected Tropical Diseases*, [s.l.], v. 11, n. 4, p.1-13, 10 abr. 2017.
- GOÑI, Beatriz et al. First record of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) in southern localities of Uruguay. *Drosophila Information Service, Estados Unidos*, v. 84, p.61-65, dez. 2001.
- GOÑI, Beatriz et al. Increased frequencies of *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera, Drosophilidae) in Uruguay. *Drosophila Information Service*, [s. L.], v. 85, p.75-80, dez. 2002.
- GU, Congying et al. Near-Infrared Spectroscopy Coupled with Kernel Partial Least Squares-Discriminant Analysis for Rapid Screening Water Containing Malathion. *American Journal Of Analytical Chemistry*, [s.l.], v. 04, n. 03, p.111-116, 2013.

GUPTA, K.K, GUPTA ,J.P. Four new and two unrecorded species of Drosophilidae from India (Insecta, Diptera) Proc Zool Soc Calcuta, v.44, p.110–126 . 1991.

GURGEL, I. G. D. Saúde dos trabalhadores que atuam no controle de endemias vetoriais. In: AUGUSTO, L. G. S.; CARNEIRO, R. M.; MARTINS, P. H. (Org.). Abordagem ecossistêmica em saúde: ensaios para o controle do dengue. Recife: Universitária UFPE,. p. 227-234. 2005.

HEMINGWAY, Janet. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. Insect Biochemistry And Molecular Biology, [s.l.], v. 30, n. 11, p.1009-1015, nov. 2000.

HOUGHTON, Peter J.; REN, Yuhao; HOWES, Melanie-jayne. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. Natural Product Reports, [s.l.], v. 23, n. 2, p.181-199, 2006.

JOSHI, Neelendra K. et al. First Report of *Zaprionus indianus*(Diptera: Drosophilidae) in Commercial Fruits and Vegetables in Pennsylvania. Journal Of Insect Science, [s.l.], v. 14, n. 1, p.259-259, 1 jan. 2014.

KARAN, Dev; MORETEAU, Brigitte; DAVID, Jean R. Growth temperature and reaction norms of morphometrical traits in a tropical drosophilid: *Zaprionus indianus*. Heredity (edinb), [s. L.], v. 83, p.398-407, out. 1999.

KATO, Carlos Massaru et al. Ocorrência de *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) no estado de Minas Gerais. Ciência e Agrotecnologia, [s.l.], v. 28, n. 2, p.454-455, abr. 2004.

LARIN, Lourival. Toxicologia dos Praguicidas. São Paulo: Manole, 2013. 230 p.

LI, Xianchun; SCHULER, Mary A.; BERENBAUM, May R.. Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. Annual Review Of Entomology, [s.l.], v. 52, n. 1, p.231-253, jan. 2007.

LINDE, Kim van Der. *Zaprionus indianus*: species identification and taxonomic position. Drosophila Information Service, [s. L.], v. 93, p.95-98, jan. 2010.

LINDE, Kim 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, [s.l.], v. 89, n. 3, p.402-404, set. 2006.

LINDE, Kim van Der. *Zaprionus indianus* distribution in the United States. 2018. Disponível em: <<http://www.kimvdlinde.com/professional/Zaprionus%20distribution%20US.php>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

LIU, Lumei et al. Three-dimensional (3D) brain microphysiological system for organophosphates and neurochemical agent toxicity screening. Plos One, [s.l.], v. 14, n. 11, p.224-229, 8 nov. 2019. Public Library of Science (PLoS).

LOH, Roberta; BITNER-MATHÉ, Blanche Christine. Variability of Wing Size and Shape in Three Populations of a Recent Brazilian Invader, *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae), from Different Habitats. Genetica, [s.l.], v. 125, n. 2-3, p.271-281, nov. 2005.

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

- LOURENÇO, Marcelo Ferreira; CERON, Roberto Carlo; CARARETO, Claudia Marcia. Evaluation of fitness components in strains of *Drosophila mulleri* carrying different genotypes for an esterase. *Cytobios*, Estados Unidos, v. 106, p.125-138, 2001
- MATA, Renata Alves da; MCGEOCH, Melodie; TIDON, Rosana. Drosophilid assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the Brazilian Savanna. *Biodiversity And Conservation*, [s.l.], v. 17, n. 12, p.2899-2916, 7 maio 2008.
- MATA, Renata Alves da et al. Invasive and flexible: niche shift in the drosophilid *Zaprionus indianus* (Insecta, Diptera). *Biological Invasions*, [s. L.], v. 12, n. 5, p.1231-1241, maio 2010.
- MCINTYRE, Nancy E.. Ecology of Urban Arthropods: A Review and a Call to Action. *Annals Of The Entomological Society Of America*, [s.l.], v. 93, n. 4, p.825-835, 1 jul. 2000.
- MONTELLA, Isabela Reis; SCHAMA, Renata; VALLE, Denise. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, [s.l.], v. 107, n. 4, p.437-449, jun. 2012.
- NAQQASH, Muhammad Nadir et al. Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitology Research*, [s.l.], v. 115, n. 4, p.1363-1373, 13 jan. 2016.
- OAKESHOTT, J.g. et al. An episode of accelerated amino acid change in *Drosophila* esterase-6 associated with a change in physiological function. *Genetica*, [s.l.], v. 110, n. 3, p.231-244, dez. 2000.
- OKADA, Toyohi. New taxonomic changes in the family Drosophilidae. *Japanese Journal Of Entomology*, Japão, v. 58, n. 1, p.154-154, 25 mar. 1990.
- OKADA, Toyohi; CARSON, Hampton L. The genera *Phorticella* DUDA and *Zaprionus* COQUILLET (Diptera, Drosophilidae) of the Oriental region and New Guinea. *Japanese Journal Of Entomology*, Japão, v. 51, n. 4, p.539-553, 25 dez. 1983.
- OLIVEIRA, Geórgia Fernanda et al. First record of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in Fernando de Noronha, an Oceanic Island of Pernambuco State, Brazil. *Drosophila Information Service*, [s. L.], v. 92, p.18-20, dez. 2009.
- OLIVEIRA, Magda Lúcia Félix de; BURIOLA, Aline Aparecida. Gravidade das intoxicações por inseticidas inibidores das colinesterases no noroeste do estado do Paraná, Brasil. *Revista Gaúcha de Enfermagem*, [s.l.], v. 30, n. 4, p.648-655, dez. 2009.
- PASINI, Mauricio Paulo Batistella; LINK, Dionísio. Efficiency of different traps to capture *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) in fig orchard in Santa Maria county, Rio Grande do Sul state, Brazil. *Journal Of Agricultural Science And Soil Science*, [s. L.], v. 1, n. 8, p.349-354, out. 2011.
- PASINI, Mauricio Paulo Batistella et al. Soluções atrativas para o monitoramento populacional de *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) em pomar de figo. *Pesquisa Agropecuaria Tropical*, Goiânia, v. 4, n. 3, p.272-277, set. 2013.
- PARSONS, Peter A.. Biodiversity Conservation Under Global Climatic Change: The Insect *Drosophila* as a Biological Indicator?. *Global Ecology And Biogeography Letters*, [s.l.], v. 1, n. 3, p.77-83, maio 1991.

- PENARIOL, Leiza; BICUDO, Hermione Elly Melara de Campos; MADI-RAVAZZI, Lilian. On the use of open or closed traps in the capture of drosophilids. *Biota Neotropica*, [s.l.], v. 8, n. 2, p.47-51, jun. 2008.
- PERRY, Trent; BATTERHAM, Philip; DABORN, Phillip J.. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochemistry And Molecular Biology*, [s.l.], v. 41, n. 7, p.411-422, jul. 2011.
- PIRES, Débora de Jesus; BÉLO, Muracy; BARBOSA, José Carlos. LIFE HISTORY ESTIVATIVES IN TWO GEOGRAPHIC STRAINS OF *ZAPRIONUS INDIANUS* GUPTA, 1970 (DIPTERA: DROSOPHILIDAE). *Biodiversidade, Rondonópolis*, v. 7, n. 1, p.42-55, 2008.
- PRINTES, L.b.; CALLAGHAN, A.. Atividade de Acetilcolinesterase em *Daphnia* Um Bom Biomarcador de Avaliação Ambiental. *Journal Of The Brazilian Society Of Ecotoxicology*, [s.l.], v. 1, n. 1, p.89-92, 2006.
- POWELL, Jeffrey R.. Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* Model. Oxford University Press, [s. L.], v. 73, n. 3, p.349-350, set. 1988.
- RAGA, Adalton; SOUZA FILHO, Miguel Francisco de. Captura de *Zaprionus indianus*(Gupta) (Dip.: Drosophilidae) em frascos de plásticos com iscas alimentares na cultura do figo. *Brazilian Journal Of Agriculture - Revista de Agricultura, Piracicaba*, v. 78, n. 3, p.323-329, 2003.
- RAGA, Adalton et al. Eficácia de atrativos alimentares na captura de moscas-das-frutas em pomar de citros. *Bragantia, Campinas*, v. 65, n. 2, p.337-345, 2006.
- RAYMOND, Michel; ROUSSET, Francois. An Exact Test for Population Differentiation. *Evolution*, [s.l.], v. 49, n. 6, p.1280-1283, dez. 1995.
- 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. Journal Of The Entomological Society Ontario, Canadá*, v. 144, p.125-130, 2013.
- ROQUE, Francisco; MATA, Renata Alves da; TIDON, Rosana. Temporal and vertical drosophilid (Insecta; Diptera) assemblage fluctuations in a neotropical gallery forest. *Biodiversity And Conservation*, [s.l.], v. 22, n. 3, p.657-672, 14 fev. 2013.
- SANTOS, J F et al. Colonization of Northeast Region of Brazil by the drosophilid flies *Drosophila malerkotliana* and *Zaprionus indianus*, a new potential insect pest for Brazilian fruitculture. *Drosophila Information Service*, [s. L.], v. 86, p.18-20, 2003.
- SPACKMAN, Merrin E. et al. A cluster of esterase genes on chromosome 3R of *Drosophila melanogaster* includes homologues of esterase genes conferring insecticide resistance in *Lucilia cuprina*. *Biochemical Genetics*, [s.l.], v. 32, n. 1-2, p.39-62, fev. 1994.
- SETTA, Nathalia de; CARARETO, Cláudia M. A.. Fitness components of a recently-established population of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in Brazil. *Iheringia. Série Zoologia*, [s.l.], v. 95, n. 1, p.47-51, mar. 2005.
- SMITH, R. F. 1970. Pesticides: their use and limitations in pest management, p. 103-113 In: Concepts of pest management. Raleigh, North Carolina State University.

- SOLÉ, Montserrat; RIVERA-INGRAHAM, Georgina; FREITAS, Rosa. The use of carboxylesterases as biomarkers of pesticide exposure in bivalves: A methodological approach. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, [s.l.], v. 212, p.18-24, out. 2018.
- SOMERO, G N. Temperature Adaptation of Enzymes: Biological Optimization Through Structure-Function Compromises. *Annual Review Of Ecology And Systematics*, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-29, nov. 1978.
- SOSA-GÓMEZ, Daniel Ricardo; OMOTO, Celso. RESISTÊNCIA A INSETICIDAS E OUTROS AGENTES DE CONTROLE EM ARTRÓPODES ASSOCIADOS À CULTURA DA SOJA. In: CAMPO, Clara Beatriz Hoffmann et al. Soja: manejo integrado de insetos e outros Artrópodes-praga. Brasília: Embrapa, 2012. p. 673-723. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/artropodes/Capitulo10.pdf>>. Acesso em: 07 mar. 2019.
- SUBRAMANYAM, Bhadriraju.H; HAGSTRUM, David. W. Resistance measure and management, p. 331-397. In: BH. SUBRAMANYAM & D. W. HAGSTRUM (Eds.). *Integrated management of insects in stored products*. New York, Marcel Dekker Inc. 1996.
- STEIN, Cesar Pagotto; TEIXEIRA, Edson Possidônio; NOVO, José Polese Soares. Fitness components of a recently-established population of *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae) in Brazil. *entomotropica*, Venezuela, v. 18, n. 3, p.219-221, jan. 2003.
- TSACAS, Leonidas ; CHASSAGNARD, Marie. Thérèse. Les espèces du genre *Zaprionus* à fémurs antérieurs spinuleux (Diptera: Drosophilidae). *Annales Société Entomologique de France*, v.26, p.461-487, 1990.
- TIDON, Rosana; LEITE, Denise Ferreira; LEÃO, Bárbara Ferreira Dobbin. Impact of the colonisation of *Zaprionus* (Diptera, Drosophilidae) in different ecosystems of the Neotropical Region: 2 years after the invasion. *Biological Conservation*, [s.l.], v. 112, n. 3, p.299-305, ago. 2003.
- TONI, Daniela Cristina de; HOFMANN, Paulo R. P.; VALENTE, Vera Lúcia S.. 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.
- TUKEY, J.W. The problem of multiple comparisons. *Mimeographs PrincetonUniversity*, Princeton, N.J., 1953.
- VERMEIJ, Geerat J.. An agenda for invasion biology. *Biological Conservation*, [s.l.], v. 78, n. 1-2, p.3-9, out. 1996.
- VILELA, Carlos Ribeiro; TEIXEIRA, E P; STEIN, C. P. Mosca-africana-do-figo, *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). In: *Histórico e impactos das pragas introduzidas no Brasil*[S.l: s.n.], 2001.
- VILELA, Carlos Ribeiro. Is *Zaprionus indianus* Gupta 1970 (Diptera, Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical region? *Drosophila Information Service*, Estados Unidos, v. 82, p.37-39, jul. 1999.
- ZAR, Jerrold H. **Biostatistical Analysis**. 5. ed. New Jersey: Pearson, 2010. 945 p.

Westfall, T. C.; Westfall, D. P. Em Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 10a. Ed.; Brunton, L. L.; Lazo, J.S.; Parker, K. L., eds.; Mc Graw Hill, 2006, cap.6.