

ANÁLISE DAS ESTERASES DURANTE AS FASES DO DESENVOLVIMENTO EM *Sitophilus oryzae* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA AO INSETICIDA MALATHION

Ana Luisa Monezi Lucena¹, Adriana Aparecida Sinópolis Giglioli¹, Ana Silvia Lapenta¹.

RESUMO

Sitophilus oryzae é considerado uma das pragas mais importantes, por ter alto potencial de infestação em grãos armazenados e notável desenvolvimento de resistência a compostos químicos. Um dos principais mecanismos de resistência deste inseto tem sido atribuído por enzimas esterásicas. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar as esterases presentes nas fases de desenvolvimento do *S. oryzae* e verificar as alterações na atividade desta enzima em insetos expostos ao inseticida malathion. Para tanto, utilizou-se de uma pesquisa descritiva de caráter exploratório. Para a obtenção dos dados utilizou-se da técnica de eletroforese de poliacrilamida a 11% de concentração em um sistema descontinuo. Foram observadas 19 bandas e sete locos gênicos, sendo seis deles polimórficos e um (Est-6) monomórfica. As EST-1 e EST-3 foram classificadas como acetilesterases e as EST-2, EST-4 e EST-5 colinesterases. A EST-1 foi visualizada apenas nas fases de larva e adulto. As esterases alteradas dos insetos expostos foram as acetilesterases EST-1 e 3 e as colinesterases EST-2 e 5. Os resultados demonstram que as esterases alteradas pode estar relacionada a resistência observada nestes insetos e a EST-1 exclusiva na fase larval e adulto, pode estar envolvida a produção do hormônio juvenil.

Palavras-chave: gorgulho do arroz; enzimas; resistência a inseticidas e organofosforado.

ESTERASE ANALYSIS DURING THE DEVELOPMENT STAGES OF *Sitophilus oryzae* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) AND ITS RELATION TO RESISTANCE TO MALATHION INSECTICIDE

ABSTRACT

The *Sitophilus oryzae* is considered one of the major pests due to its high potential of infestation in stored grains and its resistance to chemicals. One of the main mechanisms of insect resistance has been attributed to esterase enzyme. This study aimed to identify and characterize esterases present in the developmental stages of *S. oryzae* and verify changes in the activity of this enzyme in insects exposed to malathion insecticide. Thus, a descriptive and exploratory approach was applied. Data were obtained by the technique of electrophoresis in 11% polyacrylamide gel in a batch system. Were observed 19 bands and seven loci, six of them polymorphic and a (Est-6) monomorphic. EST-1 and EST-3 were classified as acetylcholinesterase and EST-2, EST-4 and EST-5 as cholinesterases. The EST-1 was seen only in larval and adult phases. Altered esterases of exposed insects were acetylcholinesterase EST-1 and EST-3 and cholinesterase EST-2 and EST-5. Results show that esterase may be related to resistance observed in these insects and EST-1 exclusively in the larval and adult phases may be involved in the production of juvenile hormone.

Keywords: rice weevil; esterase enzymes; insecticide resistance and organophosphate.

INTRODUÇÃO

A produção em grande escala de grãos necessita de armazenamento e esta é uma das condições propícias para a infestação por pragas. No Brasil, os gorgulhos são considerados as pragas mais importantes de grãos armazenados, por apresentarem alto potencial biótico, infestação cruzada, capacidade de penetração nas massas de grãos, elevado número de hospedeiros e também pelo fato de que tanto suas larvas como os adultos danificam os grãos (1).

O inseto *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), tem causado danos

a grãos de arroz, cevada, milho, trigo, sorgo e em cereais processados como o macarrão (2). A ação contínua do inseto sobre os grãos armazenados resulta no aumento da umidade e temperatura favorecendo a disseminação de fungos, redução severa de massa e, conseqüentemente, a deterioração dos produtos infestados, reduzindo tanto seu valor nutricional quanto o seu valor comercial (3).

Falhas no controle da propagação populacional dos insetos-pragas são evidentes quando observado o desenvolvimento da resistência destes aos diferentes compostos químicos que são utilizados para sua erradicação (4). Em geral, os mecanismos de resistência de insetos a inseticidas se deve a

¹ Departamento de Biologia Celular e Genética - Universidade Estadual de Maringá.

três fatores: 1) redução da penetração do inseticida na cutícula do inseto; 2) redução da sensibilidade no sítio de ação do inseticida pelo sistema nervoso e 3) detoxificação ou metabolização do inseticida por enzimas (5,6).

A metabolização ou detoxificação é provavelmente o mecanismo de resistência de insetos a inseticidas mais estudados. Este mecanismo permite ao inseto modificar ou detoxificar o inseticida a uma taxa suficiente o bastante para prevenir a ação no sítio alvo (7).

Em uma grande variedade de insetos, a atividade elevada das esterases tem sido reportada como o principal mecanismo de resistência aos inseticidas organofosforados (7). Esta atividade é resultante de uma superprodução de esterases não específicas, as quais capturam a molécula do inseticida antes que a mesma alcance seu alvo: a acetilcolinesterase (8).

O envolvimento de enzimas nos processos de resistência em insetos pragas tem sido investigado continuamente. Recentemente López et al. (9), realizaram um estudo da seleção da tolerância de três insetos pragas (*Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha Dominica* e *Cryptolestes pusillus*) à oito monoterpenóides (linalool, camphor, γ - terpinene, S- carvone, geraniol, estragole, E- anethole, e fenchone). Os autores observaram que *S. oryzae* foi o inseto praga que apresentou maior tolerância a linalool, S- carvone e estragole, obtendo uma alta atividade de esterases. O comportamento do gene de esterases e seu papel na resistência (themephos) foi também analisado em *Aedes aegypti*, dos cinco loci para α e β -esterases e onze alelos detectados, observaram uma alta atividade esterásica no loci 1, sendo obtido a maior superexpressão das esterases na linhagem Recife- resistente na qual, segundo o autor possivelmente pode ser a responsável pela resistência (10).

As esterases abrangem um conjunto amplo de enzimas que desempenham funções diversificadas em um organismo, são diferenciadas em quatro classes, as carboxilesterases (EC 3.1.1.1), as acetilesterases (EC 3.1.1.6), as arilesterases (EC 3.1.1.2) e as colinesterases que são classificadas em duas subclasses, a acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) e pseudocolinesterase (EC 3.1.1.8). A definição de cada classe é baseada na especificidade ao substrato e quanto à sensibilidade a diferentes

tipos de inibidores da atividade enzimática (incluindo os reagentes sulfidricos, os organofosforados e carbamatos) (11).

Nos insetos podem ser distinguidos dois grupos de esterases, com base na análise do substrato hidrolisado *in vitro*: o grupo das α -esterases e o grupo das β -esterases. Estas hidrolisam substratos como α -naftil acetato e β -naftil acetato, respectivamente. O grupo das α -esterases inclui carboxilesterases, colinesterases e acetilesterases, e o das β -esterases inclui apenas caboxilesterases e colinesterases (11).

Levando em consideração que cada organismo possui seu próprio padrão eletroforético de enzimas, e este pode mudar durante o desenvolvimento, o estudo isoenzimático permite determinar a ação gênica diferencial e o momento em que um gene específico entra em atividade na síntese da enzima correspondente (12). Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar as esterases presentes nas fases de larva, pupa e adulto de *S. oryzae* e verificar as alterações na atividade das esterases deste inseto quando expostos ao inseticida organofosforado malathion.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho trata-se de uma pesquisa de caráter exploratório.

Os insetos foram criados em recipientes de vidro com aproximadamente 14 cm de altura e 27 cm de diâmetro, contendo como dietas alimentares o grão de trigo e macarrão. Foram mantidos em laboratório a uma temperatura constante de $30^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C e fotoperíodo de 12 horas. Os bioensaios para o estudo da sensibilidade ao malathion foram realizados em recipientes de cultura contendo 50 g de grão de trigo e diferentes concentrações de malathion adicionado à acetona como solvente. Para cada concentração de malathion testada ($1,0 \times 10^{-5}$ mL/g, $1,5 \times 10^{-5}$ mL e $2,0 \times 10^{-5}$ mL/g), foi preparada uma cultura controle contendo apenas acetona. Foram realizadas X repetições para cada concentração testada. No meio de cada bioensaio foram colocados 25 insetos, que permaneceram por 24 horas. Após esse período os insetos sobreviventes foram separados para análise eletroforética das esterases.

A técnica de eletroforese foi realizada em gel vertical de poliacrilamida em um sistema

descontínuo. Para tanto, foram utilizados géis de resolução a 10% de concentração (acrilamida e bisacrilamida) acompanhados de géis de empilhamento a 4% de concentração.

As amostras foram maceradas individualmente a 0°C em 30 µL (Tris-HCl 0,1 M pH 8,8 e glicerol a 10%). Após a maceração, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos em centrífuga previamente refrigerada e um volume de 10 µL do sobrenadante de cada amostra foi aplicada no gel.

Os géis foram submetidos à eletroforese por 5 horas, a uma voltagem constante de 200 V, utilizando-se para o preenchimento dos compartimentos superiores e inferiores da cuba, o tampão Tris-glicina 0,1 M pH 8,3.

Para a identificação das esterases os géis foram pré-incubados em 50 mL de tampão fosfato (0,1 M pH 6,2). Após 30 minutos o tampão foi retirado e adicionado a solução de coloração (50 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,2; 5 mL de n-propanol, 0,06 g do corante Fast Blue RR Salt e os substratos α -naftil acetato e β -naftil acetato 0,02 g e 0,03 g, respectivamente e previamente solubilizados em 1 mL de acetona). Após cerca de uma hora de incubação no escuro à temperatura ambiente, as esterases foram visualizadas nos géis indicando a presença de α e β -esterases.

Já para o teste com inibidores, foram feitos simultaneamente, géis tratados e géis controle contendo as mesmas amostras. Foram utilizados como inibidores o para-cloromercuriobenzoato (pCMB) um reagente sulfídrico na concentração 0,1 mM, o

organofosforado malathion nas concentrações 1mM e 1,6 mM do carbaril um reagente carbamato. Os inibidores malathion 500-CE e carbaril foram obtidos da Indústria Química Dipil e Química Ltda, respectivamente. O inibidor para-cloromercuriobenzoato (pCMB) foi obtido da Sigma Chemical Co. Os géis foram pré-incubados e corados na presença dos inibidores, sendo estes dissolvidos diretamente no tampão fosfato 0,1 M pH 6,2.

RESULTADOS

A análise eletroforética revelou a presença de 19 bandas e sete locos gênicos distribuídas nas quatro fases de desenvolvimento (larva, pupa, imago e adulto) do inseto praga *Sitophilus oryzae*. As esterases foram denominadas como EST-1 a EST-7 e estão mostradas na figura 1.

As diferentes fases do desenvolvimento foram caracterizadas e comparadas quanto ao padrão de esterases. Somente a EST-1, foi visualizada apenas nas fases de larva e adulto. As demais esterases apareceram em todas as fases do desenvolvimento analisadas (Figura 1). A análise dos padrões de esterases nos imagos mostrou que apesar da presença de todas as enzimas, exceto a EST-1, todas as bandas apresentaram-se pouco coradas. Dentre os sete locos esterásicos identificados, seis foram considerados polimórficos, sendo detectados até quatro alelos e apenas a Est-4 foi considerado monomórfico.

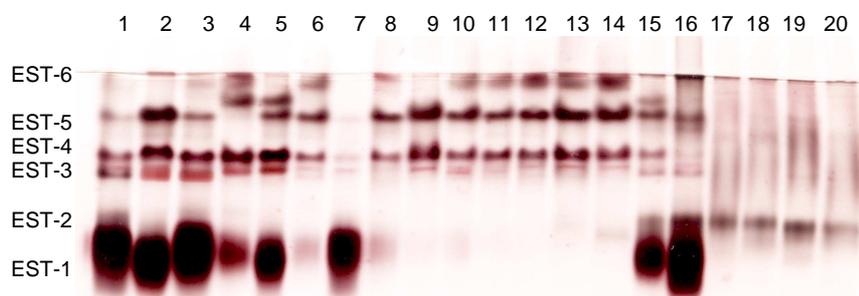


Figura 1. Padrão das esterases ao longo do desenvolvimento do inseto-praga *Sitophilus oryzae*. Amostras: 1 ao 7 larvas, 8 a 14 pupas, 15 e 16 adultos e do 17 ao 20 imagos.

O comportamento das esterases na presença dos substratos α e β -naftil acetato, permitiu a identificação de α -esterases, β -esterases e $\alpha\beta$ -esterases. As β -esterases são enzimas que hidrolisam o substrato β -naftil acetato e apresentam uma coloração vermelha. Inclui-se no grupo das β -esterases a EST-3 que foi considerada β -específica por não ter a capacidade de hidrolisar o α -naftil acetato mesmo quando ausente o β -naftil acetato. As enzimas consideradas do grupo das α -esterases, que hidrolisam o α -naftil

acetato e coram-se de preto, foram a EST-2, EST-4 e EST-6. A EST-2 foi considerada α -específica por hidrolisar apenas o α -naftil acetato; já a EST-6 pode hidrolisar com o β -naftil acetato na ausência do α -naftil acetato, sendo, portanto, considerada α -preferencial. As EST-1, EST-5 e EST-7 foram consideradas $\alpha\beta$ -esterases por hidrolisarem tanto o α -naftil acetato como o β -naftil acetato, estando eles juntos como nas condições usuais ou separados (Tabela1).

Tabela 1. Classificação das esterases de *Sitophilus oryzae*, quanto afinidade pelos substratos e a presença ao longo do desenvolvimento.

| Esterases | Alelos | Grupos | Fase do desenvolvimento |
|-----------|-------------|---------------|-------------------------|
| EST-7 | 17,18,19 | $\alpha\beta$ | L, P, I e A |
| EST-6 | 13,14,15,16 | αp | L, P, I e A |
| EST-5 | 11,12 | $\alpha\beta$ | L, P, I e A |
| EST-4 | 10 | NT | L, P, I e A |
| EST-3 | 7,8,9 | βe | L, P, I e A |
| EST-2 | 5,6 | αe | L, P, I e A |
| EST-1 | 1,2,3,4 | $\alpha\beta$ | L e A |

L- larvas, P- pupas, I- imago, A- adultos, NT não testado, αe , α - específica; βe , β - específica; $\alpha\beta$ - preferencial; αp α -preferencial.

Para melhor caracterização das esterases, estas foram submetidas a diferentes inibidores da atividade enzimática. Os géis tratados com o malathion, inibidor de carboxilesterases e colinesterases, inibiu completamente a atividade da EST-5, parcialmente a EST-6 e EST-2. O tratamento dos géis com o pCMB, inibidor de arilesterases, mostrou uma parcial inibição na EST-5 e uma leve inibição na EST-6. O tratamento dos géis com o carbaril, composto que inibe seletivamente as colinesterases, permitiu verificar a inibição completa da EST-5

e EST-4 e uma leve inibição na EST-2 (Tabela 2).

Com base na sensibilidade as diferentes classes de inibidores, as esterases EST-1 e EST-3 foram classificadas como acetilcolinesterases por não terem sido inibidas por nenhum dos compostos utilizados, a EST-2, EST-4 e EST-5 como colinesterases os quais foram inibidas pelo malathion e pelo carbaril, A EST-6 não se enquadrou nos critérios de classificação (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação e alteração das esterases dos insetos adultos, através do tratamento com Inibidores.

| Classificação | Esterase | Malathion | pCMB ¹ | Carbaril |
|----------------|----------|-----------|-------------------|----------|
| * | EST-7 | NT | NT | NT |
| * | EST-6 | ++ | + | — |
| Colinesterase | EST-5 | +++ | ++ | +++ |
| Colinesterase | EST-4 | NT | — | +++ |
| Acetilesterase | EST-3 | — | — | — |
| Colinesterase | EST-2 | ++ | — | + |
| Acetilesterase | EST-1 | — | — | — |

¹pCMB (ácido para - cloromercúriobenzoato). Grau de inibição: — sem inibição; + leve inibição; ++ parcialmente inibida; +++ completamente inibida; * enzimas que não se enquadraram no critério de classificação de Holmer & Máster.

A alteração das esterases dos insetos expostos às diferentes concentrações do inseticida malathion, apresentados na tabela 3, demonstra que a concentração de $1,5 \times 10^{-5}$ mL/g foi o valor, no qual ocorre inibição na maioria das esterases detectadas. As EST-2 e

EST-5 foram as únicas completamente inibidas nas concentrações de $1,5 \times 10^{-5}$ mL/g e $1,0 \times 10^{-5}$ mL/g respectivamente, sendo que a alteração da EST-5 foi observada em todas as concentrações testadas, enquanto que uma leve inibição foi detectada nas EST-1 e EST-3.

Tabela 3. Alteração das esterases de *Sitophilus oryzae* expostos as diferentes concentrações do inseticida Malathion

| Esterases alteradas | Concentrações | | |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | $1,0 \times 10^{-5}$ mL/g | $1,5 \times 10^{-5}$ mL/g | $2,0 \times 10^{-5}$ mL/g |
| EST-1 | – | + | + |
| EST-2 | – | +++ | – |
| EST-3 | – | + | – |
| EST-4 | – | – | * |
| EST-5 | +++ | ++ | ++ |
| EST-6 | – | – | – |
| EST-7 | * | * | * |

Graus de Inibição: ++ inibição parcial, +++ inibição total, – ausência de inibição.

DISCUSSÃO

A existência de um número grande de genes para o sistema isoenzimático em esterases tem sido verificada em várias espécies de insetos. Por exemplo, em *Megaselia scalaris*, foram detectadas em quatro linhagens, 45 bandas esterásicas determinadas por 20 locos gênicos (13). Em *Tribolium castaneum*, Gigliolli et al. (14) utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida identificaram 19 bandas esterásicas nos estágios de larva, pupa e adulto, as quais foram atribuídas à presença de pelo menos 11 locos gênicos. A técnica empregada no presente trabalho permitiu a observação de 19 bandas nas diferentes fases do desenvolvimento e pelo menos sete locos gênicos para esterases em *S. oryzae*. No estudo de Pintureau et al. (15) para três diferentes espécies de *Sitophilus* (*S. oryzae*, *S. zeamais* e *S. granarius*) adultos, coletados de diferentes regiões geográficas, atribuiu-se apenas quatro locos esterásicos.

A presença ou ausência de determinada enzima em certa fase do desenvolvimento indica a atuação de mecanismos reguladores que permitem que o gene correspondente se expresse ou não, desempenhando papel específico de acordo com a fase do desenvolvimento. No caso dos insetos holometábolos (assim como os *Sitophilus*), onde a transição de um estágio para o outro está sob controle hormonal, pode-

se sugerir uma relação entre esterases estágios específicas e metamorfose. Esterases associadas aos níveis de hormônio juvenil foram propostas por diversos autores (16, 21).

Em *Apis mellifera* os títulos de hormônios diferiram consideravelmente durante o seu desenvolvimento. Foi verificado que o pico da expressão do gene da esterase do hormônio juvenil (EHJ) esteve presente nos estágios que antecederam a metamorfose no final dos períodos de pupa e adulto e após este período ocorreu uma diminuição da expressão do gene em pré-pupas e pupas jovens (22). Em *Sitophilus oryzae* foi verificada a ausência da EST-1 em estágios do desenvolvimento de imagos e pupas e a presença em adultos e larva.

A presença da EST-1 somente em larvas e adultos pode ser explicada pela provável relação das esterases nos processos de regulação dos níveis do hormônio juvenil. A produção deste hormônio é estimulada durante o estágio larval, inibido durante o período de transição para a idade adulta, e reativada após o adulto estar pronto para a reprodução.

A variabilidade genética identificada pelos seis locos polimórficos detectados e apenas um monomórfico a Est-4, de algum modo pode estar envolvida nos processos de resistência deste inseto, já que a maioria dos locos polimórficos respondeu a ação do inseticida malathion. A frequência dos alelos desses locos pode depender da influência de

fatores externos, como por exemplo, a temperatura ou pode estar relacionada ao processo de seleção natural (11, 23).

Segundo os critérios de Holmes & Máster (24) quando as esterases foram submetidas a três classes de inibidores (organofosforados, reagentes sulfidrílicos, e carbamatos) foi possível classificá-las, em colinesterases e acetilesterases, sendo, portanto, a EST-2, EST-4 e EST-5 colinesterases e a EST-1 e EST-3 como acetilesterases. Utilizando critérios similares, em *Drosophila melanogaster* foram identificadas 22 esterases, sendo 10 carboxilesterases, seis colinesterases e três acetilesterases (25). Em *Aedes aegypti*, das 23 bandas esterásicas presentes, seis foram classificadas como carboxilesterases e três como colinesterases (26). Em *Tribolium castaneum* foram classificados cinco esterases, (EST-1, 2, 3, 4 e 9), como colinesterases e uma (EST-5) como carboxilesterase (14) e enquanto que em *Oryzaephilus mercator* duas acetilesterases, duas carboxilesterases e três colinesterases foram detectadas (27).

Quanto ao comportamento das esterases em *S. oryzae* expostos ao malathion, verificou-se que das sete esterases presentes, ocorreu à alteração em quatro delas, duas delas, as colinesterases alteradas (EST-2 e 5), pode estar envolvida no mecanismo de resistência dos insetos avaliados submetidos ao inseticida malathion, uma vez que as enzimas do tipo colinesterases são enzimas alvo para o ataque de pesticidas (28), estes compostos agem no sistema nervoso central do inseto, inibindo as enzimas colinesterases. Porém em alguns casos pode ocorrer alterações reduzindo a sensibilidade de acetilcolinesterase (AChE) às substâncias inibidoras da sua ação, conferindo resistência aos inseticidas organofosforados e carbamatos (29). Mutero *et al.* (30) mostraram os efeitos combinados de mutações no gene responsável pela codificação da AChE acarretando o desenvolvimento de resistência a inseticidas organofosforados em *Drosophila melanogaster*, o mesmo acontecendo em *Aedes aegypti* (31). No caso do afídio *Nasonovia ribisnigri*, ocorreu resistência a inseticidas do grupo dos carbamatos pela modificação no sítio da AChE (32).

Desse modo, a sensibilidade observada em esterases de *S. oryzae* e em diferentes classes de insetos é dependente da intensidade e duração de exposição aos

inseticidas. Segundo Poly (33), sua consequência sobre o genoma do organismo pode ser manifestada em curto prazo por meio do aumento ou diminuição na quantidade e na atividade de enzimas, ou em longo prazo resultar no efeito de seleção e alteração das frequências alélicas.

Portanto, o conhecimento genético e bioquímico da resistência é fundamental para a elaboração de estratégias de manejo que visam a prevenir, retardar ou reverter à evolução desses mecanismos de resistência aos inseticidas (34). Assim, visando o papel das esterases nestes mecanismos de resistência o estudo com outros tipos de inseticidas, nos mostrará ferramentas para alcançar tais estratégias, uma vez que o alto potencial de infestação em grãos armazenados e notável desenvolvimento de resistência a diferentes compostos químicos são detectados frequentemente em insetos-pragas, gerando grandes prejuízos econômicos aos produtores e comerciantes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitiram concluir que dos sete locos gênicos esterásicos identificados em *S. oryzae*, seis foram polimórficos. A alteração observada de quatro locos esterásicos (EST-1, 3 e especialmente as colinesterases EST-5 e 2), dos insetos expostos ao inseticida malathion, tem uma grande importância no desenvolvimento de resistência. A presença das esterases detectadas nas diferentes fases de desenvolvimento, destacando a EST-1 que esteve presente nas fases de larva e adulto, pode revelar que esta enzima esteja envolvida como uma intermediadora nos níveis do hormônio juvenil. Contudo, os resultados obtidos no presente trabalho, indicam que as esterases detectadas devem ainda ser alvo de um estudo mais aprofundado antes que essas hipóteses sejam confirmadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de iniciação científica concedida durante a realização deste projeto.

Ana Luisa Monezi Lucena , Adriana Aparecida Sinópolis Gigliolli,
Ana Silvia Lapenta.

Endereço para correspondência: UEM. Departamento de Biologia celular e
Genética. Avenida Colombo, 5790, Bloco H67 (11)
Maringá - PR
87020-900
E-mail: analapenta@uol.com.br

Recebido em 18/05/2010

Revisado em 07/12/2011

Aceito em 07/05/2012

REFERÊNCIAS

- (1) GALLO, D.; O. NAKANO, S. S.; NETO, R. P. L.; CARVALHO, G.C.; BATISTA, E. B. FILHO, J. R. P.; PARRA, R. A.; ZUCCHI, S. B.; ALVES, J. D.; VENDRAMIM, L. C.; MARCHINI, J. R. S.; LOPES & C. OMOTO. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. p.920.
- (2) ATHÉ, I; PAULA, D. C. **Insetos de grãos armazenados: aspecto biológico e identificação**. São Paulo: livraria varela, 2002. p.244.
- (3) PINTO, JR. R.; KOZLOWSKI, L.; AMANTINI, E. C.; FURIATTI, R. S. Variation of the nutritional components of stored maize, due to the influence of insects from the *Sitophilus* complex (*S. oryzae* and *S. zeamais*) infestation and resultant fungal development. In: Proceedings of **9^a International Working Conference on stored Product Protection**. Campinas- SP- Brasil, 2006. p. 93-98.
- (4) OMOTO, C.; SALMERON, E. Caracterização da resistência de *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae) a Deltametrina e Clorpirifós e relações de resistência cruzada com fipronil. **Netropical Entomology**, v.325, p.177-181, 2003.
- (5) LORINI, I. & H. S. BECKEL. Mecanismos de resistência das pragas de grãos armazenados, p. 555–568. In: Lorini, L. H. Miike & V. M. Scussel, Bio Geneziz, (ed.) **Armazenagem de Grãos**, Campinas, SP. 2002. p.983.
- (6) HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, p.1009-1015, 2000.
- (7) BECKEL, H.S.; LORINI, I.; LAZZARI, S.M.N. Efeito do sinergista butóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitrotiom. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.50, n.1, 2006.
- (8) HAWKES, N. J.; HEMINGWAY, J. Analysis of the promoters for the β -esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Acta**, v. 1574, p.51-62, 2002.
- (9) LÓPEZ, M.D; CONTRERAS, J.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Selection for tolerance to volatile monoterpenoids in *Sitophilus oryzae* (L.), *Ryzopertha dominica* (F.) and *Cryptolestes pusillus* (Shönherr). **Journal**

of stored Products Research, v. 46, p.52-58, 2010.

(10) PAIVA, M.H.S. **Monitoramento do gene que codifica a esterase, envolvido na resistência a inseticidas organofosforado em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil**. 2006. 89f. Dissertação: (Mestre em saúde Pública) - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

(11) OAKESHOTT, J.G.; PAPPENRECHT, E.A.; BOYCE, T.M.; HEALY, M.J.; RUSSEL, R.J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterase. **Genética**, v. 90, p.239-268, 1993.

(12) WAGNER, R.P.; SELANDER, R.K. Isozymes in insects and their significance. **Ann.Rev.Entomol.**, v. 19, p.117-138, 1974.

(13) LAPENTA, A.; BICUDO H. E. M. C.; CERON, C. R.; CORDEIRO, J. A. Esterase patterns and relationships of species and strains included in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios**, v. 96, p.95-107, 1998.

(14) GIGLIOLLI, A. A. S.; LUCENA, A. L. M.; LAPENTA A. S. Identificação e caracterização das esterases em *Tribolium castaneum* (coleoptera: tenebrionidae). **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, Campo Mourão, v.6, n.1, p.25-35, jan./abr. 2011.

(15) PINTUREAU, B.; GRENIER, A.M.; NARDON, P. Polymorphisms of esterase in three species of *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 27, p.141-151, 1991.

(16) BERGER, E.; CANTER, R. The esterases of *Drosophila*: I. The anodal esterases and their possible role in eclosion. **Developmental Biology**, v. 33, p.48-55, 1973.

(17) KOROCHKIN, L.I.; MATVEEVA, N.M. Genetics of esterases in *Drosophila* of the virilis group. II. Sequential expression of paternal and maternal esterases in ontogenesis. **Biochem Genet.**, v. 12, p.1-7, 1974.

(18) RAUSCHENBACH, I.Y.; GOLOSHEIKINA, L.B.; KOROCHKINA, L.S.; KOROCHKIN, L.I. Genetics of esterases in *Drosophila* V. Characteristics of the "pupal" esterase in *D. virilis*. **Biochem Genet.**, v. 15, p.531-48, 1977.

(19) ZOUROS, E.; DELDEN, W.; ODENSE, R.; DIJK, H. An esterase duplication in *Drosophila*: differences in expression of duplicate loci within and among related species. **Biochem. Genet**, v. 20, p.929-942, 1982.

(20) CERON, C.R. **Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos**.1988.142f. Tese (Doutorado em ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1988.

(21) MATEUS, R.P.; BICUDO, H.E.M.C.; CERON, C. R. Caracterização da esterase larval em diversas espécies de *Drosophila* do complexo *mulleri* (grupo *repleta*). **Bras. J. Genet.**, v. 19, p.263, 1996.

(22) SOUZA, M.; NOGUEIRA- COUTO, R.H; COUTO, L.A.; SOUZA, J.C. Atrativo para abelhas *Apis mellifera* e polinização em café (Coffe arábica L.). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p.272-278, 2003.

(23) BAKER, J. E. Sequential gel electrophoretic analysis of esterase-2 in two populations of *Drosophila buzzatii*. **Genetics**, v. 92, p. 165-175, 1994.

(24) HOLMES, R. S. & MASTERS, C. J. The developmental multiplicity and isoenzyme status of avian esterases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 132, p.379-399, 1967.

(25) HEALY, M. J.; DUMANCIC, M. M.; OAKESHOTT, J. G. Biochemical and Physiological Studies of Soluble Esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Genetics**, v.29, 385-387, 1991.



- (26) CATELANI, A. R. A. L.; CERON, C. R.; BICUDO, H. E. M. Variation of genetics expresión during development, revealed by esterase patterns in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Biochemical genetics**, v.42, p. 69-84, 2004.
- (27) SILVA, G. A. R. **Esterases em *Oryzaephilus mercator* e *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). Caracterização e envolvimento com a resistência a inseticidas**, 2007, 40f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.
- (28) SHI, M.A.; LOUGARRE, A.; ALIES, C.; FREMAUX, I.; TANG, Z.H.; STOJAN, J.; FOURNIER, D. Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. **B M C evolut. Boil.**, v. 4, p.1-8, 2004.
- (29) GUEDES, R. N. C.; LIMA, J. O.; SANTOS, J.; CRUZ, C. D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 31, p.145-150, 1995.
- (30) MUTERO, A., M. PRALAVORIO, J. M. BRIDE AND D. FOURNIER. Resistance-associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, p.5922-5926, 1994.
- (31) VAUGHAN, A.; CHADEE, D.D.; FFRENCH-CONSTANT, R. Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. **Med Vet Entomol**, v. 12, p.318-321, 1998.
- (32) RUFINGIER, C., PASTEUR, N., LAGNEL, J., MARTIN, C., NAVAJAS, M. Mechanisms of insecticide resistance in the aphid *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Homoptera: Aphididae) from France. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 29, p.385-391, 1999.
- (33) POLY, W. J. Nongenetic variation, genetic-environmental interactions and altered gene expression. II. Diase, parasite and pollution effects. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 117, n. B(1), p. 61-74, 2007.
- (34) CERUTI, F. C., LÁZZARI, S. M. N. Utilização de bioensaios e marcadores moleculares para detecção da resistência de coleópteros de produtos armazenados a inseticidas. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 3, p. 447-453, 2003.