

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESTERASES EM *Tribolium castaneum* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

Adriana Aparecida Sinópolis Giglioli¹, Ana Luisa Monezi Lucena², Ana Silvia Lapenta³.

RESUMO

Os insetos da espécie *Tribolium castaneum*, popularmente conhecidos como “carunchos”, são pragas secundárias que infestam produtos armazenados. O uso intensivo de inseticidas no controle desta praga tem contribuído para o desenvolvimento de resistência, por meio de mecanismos fisiológicos, comportamentais e bioquímicos. O mecanismo bioquímico talvez seja um dos mais importantes, uma vez que são realizados por enzimas, tais como as esterases. Dessa forma, este trabalho descritivo de caráter exploratório, foi realizado visando identificar e caracterizar bioquimicamente as esterases no desenvolvimento dessa espécie e analisar geneticamente este sistema enzimático. Para tanto, esterases de quatro linhagens (LU, LG, LPT e LER) destes insetos, foram estudadas por meio de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (PAGE). O sistema PAGE permitiu a identificação de 19 bandas esterásicas, atribuídas a 11 locos gênicos (EST- 1 a 11), com expressão diferencial tanto ao longo do desenvolvimento quanto entre as linhagens analisadas. Dentre esses locos, Est-1, 6 e 8 são monomórficos. Os demais são polimórficos e as esterases por eles codificadas apresentaram estrutura monomérica. A EST-5 e a EST-10 foram classificadas como β -esterases, e as demais como α -esterases. Em insetos adultos, EST-1, 2, 3, 4 e 9 foram classificadas como colinesterases e a EST-5 como carboxilesterase. Os resultados obtidos serão utilizados em estudos posteriores para verificar o envolvimento das esterases nos mecanismos de resistência aos inseticidas a fim de encontrarmos uma forma de controle mais eficiente para este inseto-praga.

Palavras-chave: *Tribolium castaneum*; esterases; resistência a inseticidas; organofosforados.

BIOCHEMICAL AND GENETIC CHARACTERIZATION OF ESTERASES IN *Tribolium castaneum* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

ABSTRACT

The insects of *Tribolium castaneum* species, popularly known in Brazil as “caruncho”, are secondary pests which infest stored-products. The intensive use of insecticides has contributed to the development of resistance through physiological, behavioural and biochemical mechanisms. The biochemical mechanism is one of the most important because they are accomplished by enzymes of the esterase groups. Thus, this descriptive study with exploratory character the aimed to identify and characterise esterases during the developmental stages of *Tribolium castaneum* and to analyze the genetic profile of this enzymatic system. Esterases from the insects of four strains (LU, LG, LPT and LER) were subjected through vertical polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The PAGE system allowed the identification of eleven esterases bands, assigned to 11 loci (EST-1 to 11), with distinguishing expression either in the stages of development or in the insect strains. Among these loci, Est-1, 6 and 8 are monomorphic. The others are polymorphic, and the codified esterases showed monomeric structure. The EST-5 and EST-10 were classified as β -esterases, and the other enzymes as α -esterases. Four esterases in the adults, EST-1, 2, 3, and 9, were classified in the cholinesterase class and EST-5 was classified in the carboxylesterase class. The results will be used in future studies to verify the involvement of esterases in insecticide resistance mechanisms in order to find a more efficient way to control this insect pest.

Keywords: *Tribolium castaneum*, rust red flour beetle, esterase, insecticide resistance; organophosphorate.

INTRODUÇÃO

As esterases são isoenzimas que apresentam atividade hidrolítica multifuncional, e em comum, catalisam a hidrólise de um grande número de ésteres (1). Com base na

sensibilidade aos substratos sintéticos que as esterases hidrolisam in vitro, dois grupos podem ser distinguidos nos insetos, as α -esterases que hidrolisam preferencialmente o α -naftil-acetato e as β -esterases que hidrolisam preferencialmente o β -naftil-acetato (2).

¹ Doutoranda do programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá -PR.

² Mestre em Genética e Melhoramento. Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá -PR.

³ Docente de Genética do Departamento de Biologia Celular e Genética, da Universidade Estadual de Maringá, Maringá -PR.

São reconhecidas quatro classes de esterases, as acetilesterases (E.C. 3.1.1.6), as arilesterases (E.C. 3.1.1.2), as carboxilesterases (E.C. 3.1.1.1) e as colinesterases que incluem as acetilcolinesterases (E.C. 3.1.1.7) e as pseudocolinesterases (E.C. 3.1.1.8) (3).

Essas isoenzimas têm sido estudadas principalmente em insetos, devido as importantes funções metabólicas que elas desempenham em diversos representantes desta classe, tais como, participação no controle dos níveis de hormônio juvenil (4,5,6), regulação de mecanismos reprodutivos (7,8), processos digestivos (3) e mecanismos bioquímicos que conferem resistência a inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides (9).

Duas classes de esterases estão envolvidas na resistência aos inseticidas, as carboxilesterases e as colinesterases. As carboxilesterases têm sido associadas principalmente à resistência aos inseticidas organofosforados (10). Essas esterases atuam por meio da detoxificação metabólica, mecanismo pelo qual os inseticidas são modificados para formas menos tóxicas ao inseto ou eliminados rapidamente, prevenindo a sua ação no sítio alvo (11).

De modo geral, os mecanismos de resistência envolvendo carboxilesterases, são resultantes do aumento da atividade desta enzima em insetos resistentes, como demonstrado em linhagens de *Culex tarsalis* (12), *Oryzaephilus surinamensis* (13) e *Tribolium castaneum* (14,15) resistentes ao malathion.

Dentre as colinesterases envolvidas nos mecanismos de resistência, destaca-se a acetilcolinesterase, específica do sistema nervoso central dos insetos, onde regula os níveis de acetilcolina nos terminais nervosos catalisando a hidrólise deste neurotransmissor. Os inseticidas organofosforados e carbamatos têm estruturas análogas à acetilcolina, ligam-se covalentemente a um resíduo de serina no sítio ativo da acetilcolinesterase, inibindo-a por fosforilação e carbamilação, respectivamente, conduzindo a um acúmulo de acetilcolina nas sinapses o que causa a morte dos insetos por hiperexcitação (16).

Essa resistência mediada por acetilcolinesterases pode envolver a ocorrência

de uma ou mais mutações de ponto na estrutura do gene que codifica essa enzima, como demonstrado em populações de *Drosophila melanogaster* (17,18). Também pode ser devido ao aumento na sua síntese como detectado em *Drosophila* (19), ou a um nível de atividade mais elevado dessa esterase, como observado em linhagens de *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) resistentes a organofosforados (20).

O aumento da resistência aos inseticidas é um dos mais complexos problemas no controle de pragas de grãos armazenados, entre os quais destacam-se as espécies pertencentes à ordem Coleoptera, conhecidos vulgarmente como gorgulhos ou carunchos (21).

Dentre eles, o *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) é uma praga secundária que infesta grãos e sementes (amendoim, café, cacau, soja, algodão, nozes, feijão, ervilha) já danificados por outras pragas, cereais moídos (farelos, rações, farinhas, fubá) e outros subprodutos armazenados (21). Este inseto excreta compostos contaminantes que propiciam o crescimento de fungos nos produtos infestados, provocando perdas quantitativas e qualitativas na produção, gerando grandes prejuízos econômicos aos produtores e comerciantes (22).

Neste contexto, este trabalho descritivo de caráter exploratório teve como objetivos identificar e caracterizar bioquimicamente as esterases no desenvolvimento da espécie *Tribolium castaneum* de acordo com a afinidade pelo substrato e sensibilidade a diferentes tipos de inibidores, bem como, analisar geneticamente este sistema isoenzimático, verificando indiretamente os genes envolvidos e o polimorfismo protéico destes locos gênicos. Os dados obtidos serão utilizados em estudos posteriores que visam determinar o envolvimento dessas enzimas nos mecanismos de resistência aos inseticidas nesta espécie.

METODOLOGIA

1. MANUTENÇÃO DOS INSETOS EM LABORATÓRIO

Quatro linhagens de *Tribolium castaneum*

foram utilizadas neste estudo: LPT, LG, LU e LER. Estas foram obtidas em produtos processados coletados em estabelecimentos comerciais na cidade de Maringá, Paraná, Brasil, e identificadas ao microscópio estereoscópio.

As populações em estudo foram criadas em laboratório a uma temperatura constante de 30° ± 2° C e fotoperíodo de 12 horas. Os insetos foram mantidos em recipientes de vidro com aproximadamente 14 cm de altura e 27 cm de diâmetro, contendo farinha de trigo como dieta alimentar.

2. ANÁLISE DAS ESTERASES

As esterases foram analisadas pela técnica de eletroforese em gel vertical de poli(acrilamida) (12%) (23,24) com gel de empilhamento a 4%. As amostras foram maceradas individualmente a 0 °C em 30 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,8, contendo glicerol a 10%. Após a maceração, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 45.114g em centrífuga previamente refrigerada (Sigma 3K30). Um volume de 15 mL do sobrenadante de cada amostra foi aplicado no gel. Os géis foram submetidos à eletroforese por 3 horas e 30 min, 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 inicialmente pré-incubados em 50 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,2 e após 30 minutos o tampão foi retirado e adicionou-se a solução de coloração. Esta solução é composta por tampão fosfato 0,1 M pH 6,2 (50 mL), n-propanol (5 mL), corante Fast Blue RR Salt (0,06 g) e os substratos a-naftil acetato e b-naftil acetato (0,03 g e 0,02 g, respectivamente), previamente solubilizados em acetona (1 mL). Após cerca de uma hora de incubação no escuro à temperatura ambiente, as esterases foram visualizadas nos géis como bandas pretas ou vermelhas, indicativas da presença de a e b-esterases, respectivamente.

3. CARACTERIZAÇÃO DAS ESTERASES

3.1. ESPECIFICIDADE AO SUBSTRATO

Para o teste de especificidade aos substratos os géis foram tratados com a solução de coloração usual, diferindo apenas no emprego

dos substratos. Os substratos a-naftil acetato e b-naftil acetato foram utilizados separadamente, utilizando-se 0,05 g do substrato. Simultaneamente preparou-se um gel controle com as condições usuais de coloração.

3.2. TRATAMENTO COM INIBIDORES DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

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) na concentração 0,27 mM, o sulfato de eserina e o fenilmetilsulfonila (PMSF) na concentração de 1 mM, e o malathion nas concentrações de 0,3; 0,4; 0,7 e 1,5 mM. Os inibidores malathion 500-CE e carbaril foram obtidos da Indústria Química Dipil e Química Ltda, respectivamente. Os inibidores para-cloromercuriobenzoato (pCMB), o sulfato de eserina e o fenilmetilsulfonila (PMSF) foram obtidos da Sigma Chemical Co.

Os géis foram pré-incubados e corados na presença de inibidores, sendo estes dissolvidos diretamente no tampão fosfato 0,1 mM pH 6,2 com exceção do PMSF que foi dissolvido previamente em 1 mL de metanol e então adicionado ao tampão.

4. SECAGEM DOS GÉIS

A técnica empregada para secagem dos géis foi baseada no método de Ceron et al. (25). Os géis foram banhados em solução de gelatina comercial a 5%, prensados em um bastidor entre duas folhas de papel celofane e mantidos à temperatura ambiente por três a quatro dias para secagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As esterases têm sido identificadas e caracterizadas em várias espécies, principalmente por meio da eletroforese em gel de poli(acrilamida) (PAGE), uma técnica rápida e eficiente que permite verificar indiretamente os genes para esse sistema isoenzimático e detectar diferenças qualitativas e quantitativas entre essas isoenzimas em diferentes populações ou espécies (26).

Em *Tribolium castaneum*, de acordo com a afinidade pelo substrato, velocidade de migração no gel e sensibilidade a diferentes tipos de inibidores, foi possível identificar 19 bandas esterásicas nos estágios de larva, pupa e adulto, as quais foram atribuídas à presença de pelo menos 11 locos gênicos e denominadas EST-1 a EST-11. Destas, EST-1, 2, 3, 4, 6, 7, 9,

e 11 foram classificadas como α -esterases e são coradas em preto no gel. Todas as α -esterases identificadas também são capazes de hidrolisar o β -naftil acetato na ausência do α -naftil acetato. Somente a EST-5 e a EST-10 foram classificadas como β -esterases e são coradas em vermelho nos géis (Figura 1).

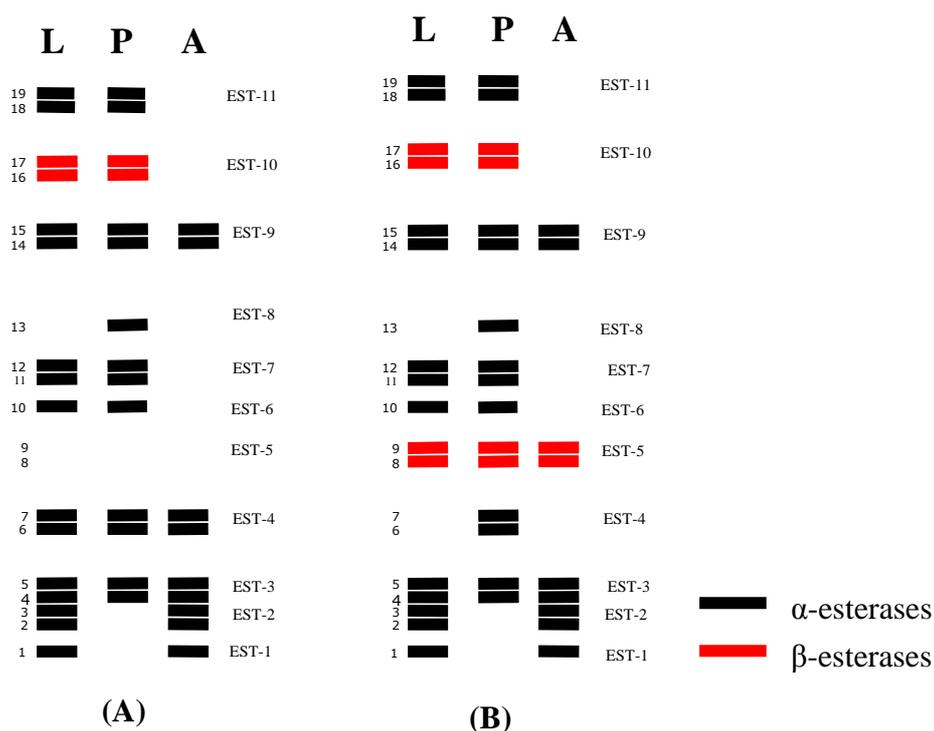


Figura 1. Zimograma das esterases detectadas em larvas (L), pupas (P) e adultos (A) de *Tribolium castaneum*. (A) Linhagens LPT, LG e LU; (B) Linhagem LER.

Um grande número de genes para esterases tem sido identificado em várias espécies de insetos. Em *Lasioderma serricorne* foram detectadas 25 bandas atribuídas à presença de 14 locos gênicos para esterases (27). Em indivíduos adultos de *Drosophila buzzatti* foram identificadas 20 bandas e 11 locos gênicos esterásicos (28), enquanto que um total de 22 esterases foram identificadas em quatro linhagens de *Drosophila melanogaster* (3). Em quatro linhagens de *Megaselia scalaris* foram verificadas 45 bandas esterásicas determinadas por 20 locos gênicos. Um total de 23 esterases, produtos de 8 locos gênicos, foi identificado em *Aedes aegypti* (29).

A existência de um grande número de esterases nos insetos está associada às várias funções fisiológicas que desempenham como a participação na regulação dos níveis de hormônio juvenil (30), em processos digestivos (3), em mecanismos reprodutivos dos machos (7,8), na quimiotaxia e metabolismo de lipídeos (31), bem como, em mecanismos de resistência aos inseticidas (13, 26, 15,32).

Uma vez que a expressão enzimática reflete a atividade dos genes, o polimorfismo ou a variabilidade nestes padrões isoenzimáticos permite identificar e caracterizar a variabilidade genômica do

organismo estudado. Em *Tribolium castaneum*, dentre os 11 locos gênicos para esterases que foram identificados, somente Est-1, Est-6 e Est-8 são monomórficos, os demais são polimórficos e representados por duas bandas nos géis, indicativos da presença de dois alelos para cada loco (Figura 1 e Tabela 1). A frequência desses alelos pode depender da influência de fatores externos, como por exemplo, a temperatura (33) ou pode estar relacionada ao processo de seleção natural (34).

A presença de indivíduos heterozigotos permite classificar as enzimas quanto as suas estruturas em monoméricas (uma única cadeia polipeptídica) e oligoméricas (duas ou mais cadeias polipeptídicas unidas). Nem sempre todas as cadeias que constituem as estruturas oligoméricas, contribuirão igualmente para a sua atividade, devido a uma baixa taxa de síntese, baixa estabilidade ou tendência de degradação antes da incorporação a estrutura proteica final (35).

Em *Tribolium castaneum*, a presença de polimorfismo nos locos Est- 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10 e 11 permitiu classificar as esterases por eles codificadas como monoméricas em relação a sua estrutura (Tabela 1). Em muitos insetos estudados, as esterases têm sido classificadas como monoméricas ou diméricas.

Dentre as monoméricas tem-se as EST-6, 8 e 9 em *Lasioderma serricorne* (27) e dentre as diméricas tem-se a EST-8 de *Drosophila mulleri* (36).

esterases podem ser expressos de modo diferencial durante o desenvolvimento de uma espécie (Figura 1 e Tabela 1). Nas linhagens LG, LPT, LU e LER analisadas, EST-1 e 2 aparecem em larvas e adultos, as EST-6, 7, 10 e 11 em larvas e pupas e as EST-3 e 9 estão presentes em todas as fases do desenvolvimento, sendo que a EST-3 encontra-se mais fortemente corada em larvas e adultos. Somente EST-8 é específica do estágio pupal em todas as linhagens analisadas. Em outros insetos foram verificadas esterases específicas para fases do desenvolvimento, como a EST-L de *Drosophila mulleri* e *D. arizonensis* (36), e EST-5 e a EST-7 específicas para as fases de larvas e adultos, respectivamente, em *Lasioderma serricorne* (27).

Nos insetos, a expressão diferencial durante o desenvolvimento, provavelmente se deve a atuação de mecanismos regulatórios, os quais atuam diretamente nos genes para esterases ou na via entre estes e os seus produtos finais, para que sejam expressos e essas enzimas sintetizadas na medida em que são requeridas para as funções metabólicas que desempenham num organismo durante o seu ciclo de vida (29). O padrão de esterases também pode variar entre populações. A figura 2, representa a expressão dessas enzimas em larvas (1 e 2), pupas (3 e 4) e adultos (5 e 6) nas linhagens LG, LPT e LU (2A) e LER (2B) de *Tribolium castaneum*. A EST-5 que está presente em larvas e adultos nas linhagens LG, LPT e LU, é ausente em LER.

Tabela 1. Caracterização das esterases em *Tribolium castaneum*. ¹ α = α -esterase / β = β -esterase. ² L- larva, P- pupa, A- adulto. ³ - sem definição

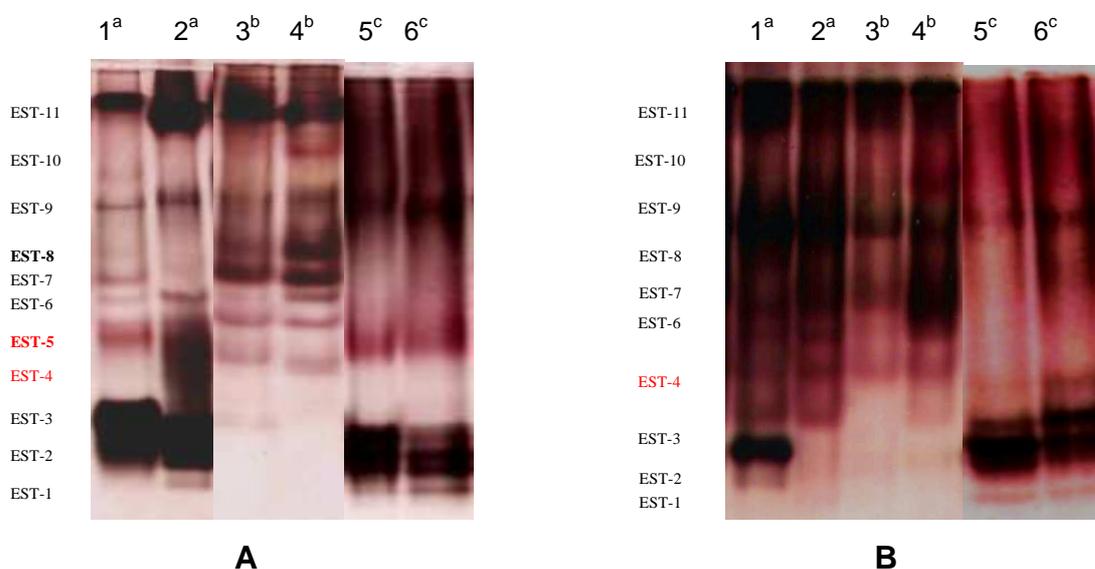
ESTERASES	BANDAS	GRUPO ¹	FASE DO DESENVOLVIMENTO ²	ESTRUTURA ³
EST-11	18, 19	α	L, P	Monomérica
EST-10	16, 17	β	L, P	Monomérica
EST-9	14, 15	α	L, P, A	Monomérica
EST-8	13	α	P	-
EST-7	11, 12	α	L, P	Monomérica
EST-6	10	α	L, P	-
EST-5	8, 9	β	L, A	Monomérica
EST-4	6, 7	α	P, A	Monomérica
EST-3	4, 5	α	L, P, A	Monomérica
EST-2	2, 3	α	L, A	Monomérica
EST-1	1	α	L, A	-

¹ α = α -esterase / β = β -esterase. ² L- larva, P- pupa, A- adulto. ³ - sem definição

Já a EST-4, presente somente na fase de pupa em LG, LPT e LU foi observada em todas as fases de desenvolvimento de LER.

Segundo Alfenas (35), com essas variações isoenzimáticas é possível analisar a

diferenciação genética intra-específica e verificar a relação entre o nível e a distribuição da variabilidade genética com a história natural, evolução das espécies e com os fatores ecológicos que controlam o fluxo gênico dentro das populações.



^a 1 e 2 – Larvas; ^b 3 e 4 – Pupas; ^c 5 e 6 - Adultos

Figura 2. Análise eletroforética da expressão diferencial das esterases entre as linhagens. Padrão de esterases nas linhagens LPT, LG e LU (A) e linhagem LER (B).

A caracterização bioquímica das esterases em insetos pode ser determinada com base na sensibilidade dessas isoenzimas a inibidores da atividade enzimática, tais como o malathion, sulfato de eserina, para-cloromercuriobenzoato (pCMB) e fenilmetilsulfonila fluorídrico (PMSF), as esterases podem ser classificadas em quatro classes: colinesterases, carboxilesterases, arilesterases e as acetilesterases (3).

De acordo com os testes de inibição realizados em insetos adultos desta espécie, as EST-1, 2, 3, 4 e 9 foram inibidas pelo sulfato de eserina e pelo malathion sendo caracterizadas como colinesterases. Já a EST-

5, foi inibida somente pelo malathion, caracterizando uma carboxilesterase. O pCMB não inibiu nenhuma das esterases testadas.

Como critério adicional de classificação, foi utilizado o composto fenilmetilsulfonila (PMSF) que indica a presença de um resíduo de serina no sítio ativo da enzima, porém, o tratamento com este composto não resultou na alteração da atividade de nenhuma das esterases testadas (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade das esterases com a utilização de inibidores e classificação das esterases em insetos adultos.

ESTERASES	Organofosforado (Malathion)	Sulfato de eserina	pCMB ¹	PMSF ²	Classificação
EST-9	+++	+++	-	-	Colinesterase
EST-5	+	-	-	-	Carboxilesterase
EST-4	+++	+++	-	-	Colinesterase
EST-3	++	+++	-	-	Colinesterase
EST-2	+++	+++	-	-	Colinesterase
EST-1	+++	+++	-	-	Colinesterase

¹pCMB (ácido para-cloromercúriobenzoato)

²PMSF (fenilmetilsulfonila fluorídrico).

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

Utilizando critérios similares, em *Drosophila melanogaster* foram identificadas 22 esterases, sendo 10 carboxilesterases, seis colinesterases e três acetilesterases (3). Em *Aedes aegypti*, das 23 bandas esterásicas presentes, seis foram classificadas como carboxilesterases e três como colinesterases (29). Em *Lasioderma serricorne*, foram observadas duas acetilesterases, seis colinesterases e uma carboxilesterase (37) e em *Oryzaephilus mercator* duas acetilesterases, duas carboxilesterases e três colinesterases (38).

As carboxilesterases e as colinesterases são isoenzimas bastante frequentes em insetos, possivelmente porque desempenham papéis fundamentais na detoxificação de compostos xenobióticos, participando da resistência aos inseticidas em diversos representantes desta classe, os quais têm evoluído, devido à utilização extensiva de organofosforados e carbamatos no controle (39).

Com relação aos organofosforados, esses mecanismos envolvem o aumento na detoxificação metabólica por hidrólise ou sequestro destes compostos (13, 40-41) ou alterações estruturais na acetilcolinesterase, alvo primário para esta classe de inseticida (42).

Dependendo da intensidade e duração de exposição aos inseticidas, a consequência sobre o genoma do organismo pode ser manifestada a curto prazo por meio do aumento ou diminuição na quantidade e na

atividade de enzimas, ou a longo prazo resultar no efeito de seleção e alteração das frequências alélicas (43).

Sendo assim, o conhecimento da base genética e bioquímica da resistência é fundamental para a elaboração de estratégias de manejo que visam prevenir, retardar ou reverter a evolução desses mecanismos de resistência aos inseticidas (44), minimizando os prejuízos econômicos aos produtores e comerciantes de grãos e subprodutos armazenados.

CONCLUSÕES

Em *Tribolium castaneum* foram observadas 19 bandas correspondentes a 11 esterases (EST-1 a EST-11), atribuídas à presença de pelo menos 11 locos gênicos, com expressão diferencial ao longo do desenvolvimento e entre as linhagens analisadas. Dentre esses locos, Est-1, Est-6 e Est-8 mostraram-se monomórficos e os demais polimórficos, indicando uma estrutura monomérica para as enzimas por eles codificadas.

De acordo com a especificidade aos substratos, EST-1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, e 11 foram classificadas como α -esterases, e, EST-5 e a EST-10 como β -esterases. Dentre elas, EST-1, 2, 3, 4 e 9 foram classificadas como colinesterases e a EST-5 como carboxilesterase, a partir de testes de inibição enzimática.

O conhecimento genético e a caracterização das esterases em *Tribolium castaneum* obtidos neste trabalho, servirão de subsídios para estudos posteriores que visam determinar a relação deste sistema enzimático com os mecanismos biológicos que tornam os insetos resistentes aos inseticidas, o que nos permite monitorar e retardar o aparecimento de genótipos resistentes e a propagação destes em populações de insetos-praga.

Recebido em 16/06/2010

Revisado em 13/08/2010

Aceito em 03/12/2010

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Centro Nacional de Tecnologia e Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo Suporte Financeiro e ao Departamento de Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá.

Adriana Aparecida Sinópolis Gigliolli, Ana Luísa Monezi Lucena, Ana Sílvia Lapenta.

Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia Celular e Genética, Av. Colombo, 5.790, Jd. Universitário, Maringá - Paraná - Brasil, CEP 87020-900. E-mail: analapenta@uol.com.br

REFERÊNCIAS

- (1) WALKER, C.H.; MACKENESS, M.I. Esterases: problems of identification and classification. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 32, n. 22, p. 3265-3269, nov.1983.
- (2) OAKESHOTT, J.G.; WILSON, S.R.; KNIBB, W.R. Selection affecting enzyme polymorphisms in confined populations of *Drosophila* living in a natural environment. **The Proceedings of the National Academy of Sciences Online**, Washington, v. 85, n. 1, p. 293-297, jan.1988.
- (3) HEALY, M.J.; DUMANCIC, M.M.; OAKESHOTT, J.G. Biochemical and Physiological Studies of Soluble Esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Genetics**, New York, v. 29, n. 7/8, 385-387, Ago.1991.
- (4) COUNDRON, T.A.; DUNN, P.E.; SEBALLOS, H.L.; WHAREN, R.E.; SANBURG, L.L.; LAW, J.H. Preparation of homogeneous juvenile hormone specific esterase from the haemolymph of tobacco hornworm, *Manduca Sexta*. **Insect Biochemistry**, Bristol, v. 11, n. 4, p. 453-461, 1981.
- (5) BOWNES, M. The role of juvenile hormone ecdysone and ovary in the control of *Drosophila* vitellogenesis. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 35, n. 5. p. 409-413, 1989.
- (6) YAMAMOTO, K.; CHADAREVIAN, A.; PELLEGRINI, M. Juvenile hormone action mediated in male accessory glands of *Drosophila* by calcium and Kinase C. **Science**, Los Angeles, v. 239, n. 4842, p. 916-919, fev. 1988.
- (7) VERMUT A.M.; KOOPMANSCHAP A.B.; VLAK J.M.; KORT C.A. Evidence for two juvenile hormone esterase-related genes in the Colorado potato beetle. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 327-336, nov. 1998.
- (8) MIKHAILOV, A.T.; TORRADO, M. Carboxylesterases moonlight in the reproductive tract: a functional shift pivotal for male fertility. **Frontiers in Bioscience**, Searington, v. 5, p. 53-62, jul. 2000.
- (9) SUBRAMANYAN, B. H.; HAGSTRUM, D. W. Resistance measure and management. In: **Integrated management of insects in**

stored products. New York: Marcel Dekker Inc. 1996, p. 331-397.

(10) CONYERS, C.M.; MACNICOLL, A.D.; PRICE, N.R. Purification and characterization of an esterase involved in resistance to organophosphorus insecticides in the sawtoothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 435-448, jul. 1998.

(11) 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 fenitroton. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 50, n. 1, jan./mar. 2006.

(12) WHYARD, S.; DOWNE, A.E.; WALKER, V.K. Characterization of a novel esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 29, n. 4, p. 329-342, Jan. 1995.

(13) LEE, S.E.; LEES, E.M. Biochemical mechanisms of resistance in strains of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) resistant to malathion and chlorpyrifos-methyl. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 94, n. 3, p. 706-713, jun. 2001.

(14) SUBRAMANYAM, B.; HAREIN, P.K.; CUTKOMP, L.K. Organophosphate resistance in adults of red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and sawtoothed grain beetle (Coleoptera: Cucujidae) infesting barley stored on farms in Minnesota. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 82, n. 5, p.1263-1269, out.1989.

(15) HAUBRUGE, E.; AMICHOT, M.; CUANY, A.; BERGE, J.B.; ARNAUD, L. Purification and characterization of a carboxylesterase involved in malathion-specific resistance from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, n. 9, p. 1181-1199, set. 2002.

(16) KONO, Y.; TOMITA, T. Amino acid conferring insecticide insensitivity in *Aceparalogous* acetylcholinesterase. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 85, n. 3, p.123-132, jul. 2006.

(17) FOURNIER, D.; BRIDE, J.M.; HOFFMANN, F.; KARCH, F. Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 20, p. 14270-14274, jul. 1992.

(18) MENOZZI, P.; SHI, M.A.; LOUGARRE, A.; TANG, Z.H.; FOURNIER, D. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 4, p. 1-7, fev. 2004.

(19) FOURNIER, D.; MUTERO, A.; PRALAVORIO, M.; BRIDE, J.M. *Drosophila* acetylcholinesterase mechanisms of resistance to organophosphates. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 87, n. 1-3, p. 233-238, jun.1993.

(20) GUEDES, R.N.C., KAMBHAMPATI, S., DOVER, B.A., ZHU K.Y. Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzopertha domminica* (Coleoptera: Bostrichidae) populations from the United States and Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 87, n. 6, p. 581-586, 1997.

(21) ATHIÉ, I.; PAULA, D. C. **Insetos de grãos armazenados: aspectos biológicos e identificação**. São Paulo: Livraria Varela, 2ª ed. 2002.

(22) SMIDERLE, O. Manejo integrado de pragas de grãos armazenados: identificação e controle (2007). Disponível em: <http://www.infobibos.com/artigos/2007_2/pragasraos/Index.htm>. Acesso em: 06 mar. 2008

(23) DAVIS, B.J. Disc electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 721, p. 404-427, 1964.

(24) LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 377-384, ago.1970.

(25) CERON, C.R.; SANTOS, J.R.; BICUDO, H.E.M.C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. **Revista Brasileira de**

- Genética**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 201-203, 1992.
- (26) ROSSITER, L.C.; CONYERS, C.M.; MACNICOLL, A.D.; ROSE, H.A. Two qualitatively different B- esterases from two organophosphate- resistant strains of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) and their roles in fenitrothion and chlorpyrifos-methyl resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 69, n. 2, p. 118-130, fev. 2001.
- (27) RISSATO, D. F. **Identificação e caracterização das esterases e sua relação com a resistência ao malathion em *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae)**, 2004. 36f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.
- (28) LAPENTA, A.S.; CAMPOS BICUDO, H.E.M.; CERON, C.R.; CORDEIRO, J.A. Esterase patterns and phylogenetic relationships of species and strains included in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios**, v. 96, p. 95-107, 1998.
- (29) CATELANI, A.R.A.L.; CERON, C.R.; BICUDO, H.E.M. Variation of genetics expression during development, revealed by esterase patterns in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Biochemical genetics**, New York, v. 42, n. 3-4, p. 69-84, abr. 2004.
- (30) YOO, C.M.; BAK, B.C.; LEE, C.H. Substrate and inhibitor specificities of esterase in *Lucilia illustris*, meigen. **Korean Journal of Zoology**, v. 39, n. 2, p.110-117, abr. 1996.
- (31) ZHU, K.Y.; BRINDLEY, W.A. Properties of esterases from *Lygus Hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) and the roles of the esterases in insecticide resistance. **Journal of Economical Entomology**, College Park, v. 83, n. 3, p. 725-727, jun. 1990.
- (32) BARATA, C.; SOLAYAN, A.; PORTE, C. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 25-139, fev. 2004.
- (33) OAKESHOTT, J.G., WILSON, S.R., KNIBB, W.R. Selection affecting enzyme polymorphisms in confined populations of *Drosophila* living in a natural environment. **The Proceedings of the National Academy of Sciences Online**, Washington, v. 85, n. 1, p. 293-297, jan. 1988.
- (34) BAKER, J.E. Sequential gel electrophoretic analysis of esterase-2 in two populations of *Drosophila buzzatii*. **Genetica**, s'-Gravenhage, v. 92, n. 3, p. 165-175, jan.1994.
- (35) ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Universidade Federal de Viçosa: Editora UFV, 1998.
- (36) CERON, C.R. **Padrão das esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos**. 1988. 142f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas e Genética) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.
- (37) RISSATO, D.F. **Estudos bioquímicos e fisiológicos de esterases solúveis em *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) e sua relação com a resistência aos inseticidas**. 2006. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006
- (38) 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.
- (39) GEORGHIOU, G.P. The evolution of resistance to pesticides. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 3, n. 1, p. 133-168, nov. 1972.
- (40) HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 30, n. 11, p. 581-586, nov. 2000.
- (41) CUI, F.; QU, H.; CONG, J.; LIU, X.-L.; QIAO, C.L. Do mosquitoes acquire organophosphate resistance by functional changes in carboxylesterases? **FASEB**

Journal, Bethesda, v. 21, n. 13, p. 3584–3591, nov. 2007.

(42) HSU, J.C.; HAYMER, D.S.; WU, J.W.; FENG, H.T. Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated to organophosphorus insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular biology**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 396-402, mai. 2006.

(43) POLY, W.J. Nongenetic variation, genetic-environmental interactions and altered gene expression. II. Diase, parasite and pollution effects. **Comparative Biochemistry Physiology**, London, v. 117, n. B (1), p. 61-74, mai. 2007.

(44) 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**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 447-453, 2003.