

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Efeitos do Dimetoato na expressão de Esterases  
em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera,  
Meliponini)**

**Brunno Alexandre Nascimento Ribeiro**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

**Uberlândia-MG  
Dezembro/2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Efeitos do Dimetoato na expressão de Esterases  
em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera,  
Meliponini)**

**Brunno Alexandre Nascimento Ribeiro**

**Dra. Ana Maria Bonetti**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Uberlândia-MG  
Dezembro/2003**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

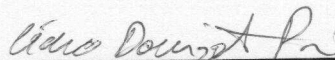
**Efeitos do Dimetoato na expressão de Esterases  
em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera,  
Meliponini)**

**Brunno Alexandre Nascimento Ribeiro**

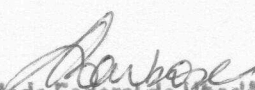
Aprovado pela Banca Examinadora em 13/12/2003 Nota 100



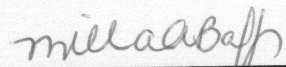
Dra. Ana Maria Bonetti  
Orientadora



MSc. Milla Alves Baffi



Universidade Federal de Uberlândia  
Prof.ª Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas



Dr. Cícero Donizete Pereira

Uberlândia, 13 de dezembro de 2003.

## AGRADECIMENTOS

*À minha família e amigos que estiveram por perto durante as horas boas e ruins e que acreditaram que eu podia chegar aonde cheguei e que continuam dizendo que chegarei ainda mais longe.*

*Àqueles que ainda virão e me encherão de alegria.*

*À minha mãe que me aturou durante todo esse tempo me amando mesmo nas horas que torno isso impossível de acontecer!!!*

*À Milla, que sem ela esse trabalho não teria saído.*

*Milla, **MUITO OBRIGADO POR TUDO!!!***

*À minha professora e orientadora Ana Maria Bonetti por ter me confiado um tema tão amplo, e acreditado que tudo daria certo.*

## RESUMO

As esterases pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam preferencialmente ésteres de ácidos carboxílicos, podendo atuar também sobre substratos que contenham ligações amidas. Estas enzimas podem estar relacionadas com várias atividades fisiológicas: degradação de inseticidas, regulação dos níveis de hormônio juvenil, processos digestivos e comportamento reprodutivo. Em abelhas sem ferrão, alguns estudos sobre o perfil esterásico foram realizados nas espécies *Melipona quadrifasciata* e *Melipona scutellaris*. Este trabalho teve por objetivo verificar o padrão esterásico em operárias de *Melipona scutellaris* submetidas à ação do dimetoato e possíveis esterases resistência-específicas. Em um recente estudo com *Apis mellifera*, foi observado que essas abelhas têm diferentes respostas, em função da idade, em contato com este inseticida. No presente trabalho, constatamos a presença de seis bandas referentes ao padrão esterásico de operárias controle, caracterizadas como acetilcolinesterases com resíduos de serina em seus sítios ativos. Duas destas esterases estão diretamente relacionadas com o inseticida dimetoato: EST-2, por ter ocorrido em todos os indivíduos dos grupos Tratados; e EST-7, por ter desaparecido de todos os indivíduos dos Grupos Tratados.

**Palavras-Chave:** *Melipona*, esterases, dimetoato

## ÍNDICE

<b>I - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>II - MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>5</b>
1. TESTE COM INSETICIDA	5
2. PADRÃO DE ESTERASES	6
3. TESTES COM INIBIDORES	7
<b>III - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>9</b>
1. PADRÃO DE BANDAS ESTERÁSICAS	9
2. EFEITO DOS INIBIDORES	11
<b>IV - CONCLUSÕES</b>	<b>20</b>
<b>V - REFERÊNCIAS</b>	<b>21</b>

## I – INTRODUÇÃO

Cerca de 23000 espécies de abelhas compõem as nove famílias da superfamília Apoidea (Ordem Hymenoptera) que apresenta grande variação de comportamento, habitats e níveis de organização. As abelhas sociais pertencem às famílias Halictidae, Anthophoridae e Apidae (ROIG-ALSINA & MICHENER, 1993).

As abelhas estão presentes em vários ambientes, exceto em lugares de temperaturas extremas, com abundância de espécies nos trópicos, onde são consideradas como um dos melhores polinizadores (WINSTON, 1992 apud OLIVEIRA-JR, 1999). A família Apidae, de comportamento *eussocial*, está subdividida em quatro subfamílias: 1) Apinae (melíferas com ferrão); 2) Meliponinae (melíferas sem ferrão); 3) Bombinae (primitivos *Bombus* sociais) e 4) Euglossinae (comportamento parassocial ou solitário). As colônias de insetos *eussociais* são caracterizadas pela divisão de trabalho entre seus membros, pela sobreposição de gerações e pela cooperação no cuidado com a cria (WILSON, 1971; ENGEL, 2001).

Cerca de 300 espécies conhecidas são nativas do Brasil, constituindo a tribo Meliponini, composta por abelhas sem ferrão. Elas se distinguem das outras tribos por algumas características peculiares tais como: atrofia do ferrão, redução e fragilidade da venação e ausência de pêlos nos olhos (MOURE, 1961; MICHENER, 1990; CARVALHO 2000; TANNUS, 2001).

As abelhas sociais apresentam a população fêmea, em cada colônia, dividida em duas castas: operárias (estéreis ou semi-estéreis) e rainhas (férteis) que fazem oviposição de ovos fertilizados, diplóides, que se desenvolvem em fêmeas e de ovos não fecundados, que

dão origem a machos haplóides. Ovos não fecundados podem ser postos, também, pelas operárias, na ausência da rainha ou em colméias muito populosas, originando machos haplóides (CAMPOS, 1979; KERR *et al.*, 1996).

Verifica-se, na colônia, subdivisão de trabalho entre as operárias, baseada na *idade* (*polietismo etário*); na *especialização* de determinadas tarefas, com frequência bem maior por alguns indivíduos do que por outros; na *homeostase* da colônia, isto é, a colônia regula suas condições internas (tais como a quantidade de alimento estocado, temperatura, umidade, etc); na *plasticidade* da colônia em resposta a mudanças internas e externas e, por fim, na ação de *resposta em massa*, em situações de emergência (WILSON, 1985; BESHES & FEWELL, 2001).

Em recente estudo com *Apis mellifera*, SESSO *et al* (2002) constataram que essas abelhas têm diferentes respostas, em função da idade, em contato com o dimetoato, substância de referência para testes toxicológicos com inseticidas.

Os principais grupos de inseticidas utilizados em agricultura são: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides e inibidores do desenvolvimento dos insetos. Estes últimos estão divididos em dois grupos: hormonais e não hormonais. Inibidores hormonais são análogos aos hormônios dos insetos e provocam atraso no desenvolvimento das larvas e sua morte. Os não hormonais agem sobre a formação do exoesqueleto dos insetos (FERREIRA, 1999).

Os organofosforados e os carbamatos, inseticidas mais comuns, atuam como inibidores da enzima acetilcolinesterase, ligando-se, covalentemente, ao seu sítio ativo. A acetilcolinesterase é um tipo de esterase que promove a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. O acúmulo de acetilcolina promove excesso de impulso nervoso, provocando a morte do inseto por hiper-excitação (RITZ, 1997).



As esterases pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam preferencialmente ésteres de ácidos carboxílicos, podendo atuar também sobre outros substratos que contenham ligações amidas (OAKESHOTT *et al.*, 1993). Estas enzimas são classificadas, com base na sensibilidade a diferentes inibidores, em quatro classes:

1. Arilesterases: inibidas somente por agentes sulfidrílicos e cátions metálicos bivalentes como  $Hg^{+2}$  e  $Cu^{+2}$  e, geralmente, preferem substratos aromáticos;
2. Carboxilesterases: inibidas somente por organofosforados, com preferência por ésteres alifáticos de cadeia longa;
3. Colinesterases: inibidas por organofosforados e carbamatos, com preferência por substratos carregados (como ésteres de colina).
4. Acetilesterases: não são afetadas por nenhum dos inibidores e, geralmente, preferem substratos alifáticos, derivados do ácido acético.

As carboxilesterases e as colinesterases são as esterases mais bem caracterizadas dentro do grupo e têm sido muito estudadas na avaliação da resistência a pesticidas organofosforados, carbamatos, piretróides e organoclorados. A resistência baseada em carboxilesterases foi descrita para mais de 30 espécies de insetos de importância médica, veterinária e agrícola (HEMINGWAY e KARUNARATNE, 1998). Na mosca *Lucilia cuprina* (CAMPBELL *et al.*, 1998) e no mosquito *Culex tarsalis* (WHYARD *et al.*, 1994), altos níveis de resistência ao Malathion foram relacionados com carboxilesterases. Estudos com vários insetos têm demonstrado a relação de aumento da atividade da acetilcolinesterase em função da resistência a organofosforados e carbamatos (GUERRERO *et al.*, 1999). A resistência envolvendo carboxilesterases (HERNANDEZ *et al.*, 2000; 2001; 2002) e acetilcolinesterases (WRIGHT e AHRENS, 1988; BAXTER e BARKER, 1998; 2002) também foi verificada no carrapato bovino *Boophilus microplus*.

Estas enzimas podem, também, estar relacionadas com outras atividades fisiológicas, como a regulação dos níveis de Hormônio Juvenil (HIDAYAT e GOODMAN, 1994), processos digestivos (ARGENTINE & JAMES, 1995) e no comportamento reprodutivo (LABATE *et al.*, 1990).

Os dados de literatura mostram que essas enzimas têm sido detectadas em todas as fases do desenvolvimento e em muitos tecidos dos insetos, o que demonstra a importância desta classe de enzimas no desenvolvimento normal desses organismos e reforça a relevância de novos estudos nesta área (BONETTI, 1982; CERON, 1988; RITZ, 1997).

Em abelhas, alguns estudos sobre o padrão de esterases durante o desenvolvimento foram conduzidos como, por exemplo, nas espécies *Melipona quadrifasciata* (BONETTI, 1990) e *Melipona scutellaris* (REZENDE, 1997).

O presente trabalho teve por objetivo verificar o padrão esterásico em *Melipona scutellaris* submetidas ao Dimetoato e verificar a ocorrência de possíveis esterases resistência-específicas nestes indivíduos.

## II - MATERIAL E MÉTODOS

O material biológico utilizado foi a espécie *Melipona scutellaris* (abelhas sem ferrão) proveniente da Bahia – Chapada Diamantina (12° 34' S, 41° 23' W) e Catu (12° 21' S, 38° 23' W) e mantidas no Meliponário Uberlândia (S 18° 55', W 48° 17' – Uberlândia, MG).

A pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

### 1. TESTE COM INSETICIDA

Para o experimento foram utilizadas abelhas *M. scutellaris* (campeiras).

Os indivíduos foram capturados na entrada da colméia ao saírem a campo. As abelhas foram anestesiadas com dióxido de carbono (vazão de 10 L/min durante 5 minutos) e transferidas para Placas de Petri (50 x 100mm) forradas com papel filtro e contendo recipientes com água e mel. Grupos de 10 abelhas, foram preparados, para cada concentração do inseticida e para controle. Cada procedimento experimental foi repetido por 02 vezes.

As concentrações de Dimetoato utilizadas foram 16, 32, 62, 100, 320 e 620 mg/L, diluído em água e aplicado, com pipeta ajustável (GILSON P20), 1 µL da solução na superfície dorsal do tórax de cada abelha, segundo SESSO *et al* (2002).

O inseticida Agritoato (AGRIPEC) foi usado como fonte do princípio ativo Ditiofosfato de 0,0-dimetil-S-(N-metil)-carbamoil-metil DIMETOATO 400g/L.

O Grupo Controle foi composto por abelhas igualmente manipuladas, anestesiadas com CO<sub>2</sub> (vazão de 10 L/min durante 5 minutos) e tratadas somente com solvente (água) e mantidas em Placa de Petri.

## 2. PADRÃO DE ESTERASES

O padrão de esterases foi analisado em operárias campeiras dos Grupos de Tratamento e Controle.

A análise foi processada em eletroforese, utilizando-se géis de poliacrilamida: 12% (30:0,8, acrilamida:bisacrilamida) em tampão Tris-HCl, 1,5M, pH 8,8, para separação e 4% (30:1,6, acrilamida:bisacrilamida) em tampão Tris-HCl, 0,5M, pH 6,8, para empilhamento. As amostras foram maceradas individualmente, em cadinhos, com auxílio de bastão de vidro, em nitrogênio líquido e solubilizadas em 500µl de tampão de amostra (fosfato de sódio 0,01M, pH 6,5, contendo glicerol a 10%, azul de bromofenol a 0,001%, sacarose a 20%, EDTA 0,001M e Triton X-100 a 0,5%) submetidas à centrifugação a 15000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado, e 20µl foram aplicados em gel. Anteriormente à aplicação em gel, foi feita a dosagem de proteínas em espectrofotômetro HITACHI, pelo método de Microbiureto a 310nm (ITZACHI & GILL, 1964) para padronização das amostras. Os géis foram submetidos à eletroforese por 3 horas a voltagem constante de 200V em tampão de corrida Tris - Glicina (0,012M - 0,096M) pH 8,3.

A identificação das regiões com atividade esterásica foi baseada no método de coloração descrito por CERON (1988). Após a eletroforese, os géis foram pré-incubados

por cerca de 45 minutos à temperatura ambiente, em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5. Em seguida, submetidos à coloração com  $\alpha$  e/ou  $\beta$  naftil acetato, como substratos. As atividades das alfa e beta esterases foram visualizadas nos géis como bandas de coloração preta e vermelha, indicando a hidrólise preferencial do alfa ou do beta naftil acetato, respectivamente.

### 3. TESTES COM INIBIDORES

Para a caracterização bioquímica das Esterases, quatro inibidores foram, individualmente, usados: solução de malathion 0,4mM, sulfato de eserina 1,0mM, sulfato de cobre a 1,0mM e solução de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF – Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride) a 1,0 mM. O PMSF foi previamente diluído em 1 mL de metanol. Sulfato de eserina e sulfato de cobre foram adicionados diretamente às soluções de pré-incubação e de coloração.

Cada inibidor foi adicionado ao tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5, na pré-incubação e, posteriormente, na solução de coloração. Paralelamente, como controle, géis contendo as mesmas amostras foram corados na ausência de inibidores. Com base nestes testes, as bandas correspondentes às esterases foram classificadas como:

- Carboxilesterases - aquelas inibidas pelo Malathion;
- Colinesterases - inibidas tanto pelo Malathion como pelo sulfato de eserina;
- Arilesterases - inibidas pelo sulfato de cobre e
- Acetilesterases - não afetadas por nenhum destes inibidores.

Além disso, as bandas observadas em gel, inibidas pelo PMSF, um inibidor específico de serino-proteases e de serino-esterases (serino-hidrolases), são identificadas como serino-esterases.

### III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 1. PADRÃO DE BANDAS ESTERÁSICAS

Sete regiões com atividade esterásica foram detectadas em indivíduos da população de *Melipona scutellaris* analisada, as quais foram numeradas como EST-1 a EST-7, a partir da extremidade anódica do gel, sendo a banda correspondente à EST-1 a de migração mais rápida (Figura 1), utilizando-se o  $\alpha$  naftil-acetato como substrato. Géis corados utilizando-se o  $\beta$  naftil-acetato como substrato mostram o mesmo padrão de esterases dos corados com  $\alpha$  naftil-acetato, não ocorrendo bandas com atividade específica (Figuras 2A e 2B). Estes resultados indicam que essas enzimas são  $\alpha$ - $\beta$  esterases.

Todos os indivíduos, com exceção dos indivíduos do Grupo Controle morreram em um intervalo máximo de 06 horas. Os indivíduos do Grupo Controle foram congelados logo após a morte do último indivíduo dos Grupos Tratados. O quadro do tempo de vida dos indivíduos após a aplicação do Dimetoato é mostrado na Tabela II.

Nos indivíduos controle foram observadas seis das sete bandas: EST-1 e de EST-3 a EST-7 (Figura 3). A EST-2 ocorreu em todos os indivíduos tratados com Dimetoato, porém não ocorreu no Grupo Controle (Figura 3). Pode-se sugerir que essa Esterase seja uma chaperonina, relacionada com a resistência ao stress químico, a qual foi expressa em resposta à exposição ao Dimetoato. SANDERS *et al.* (1994) observaram diferenças tecido-específicas no acúmulo de proteínas relacionadas ao stress (chaperoninas) em *Mytilus edulis* expostos a diferentes concentrações de sulfato de cobre.

A EST-7 ocorre apenas no Grupo Controle (Figura 3). A aplicação de Dimetoato, em todas as concentrações estudadas, provoca o desaparecimento total dessa Esterase. É possível levantar duas hipóteses: o Dimetoato pode ter agido diretamente sobre essa enzima, inibindo-a, ou essa Esterase teria sido consumida na tentativa de metabolizar o inseticida. Como o processo fisiológico e de desenvolvimento são dinâmicos, e o material foi processado logo em seguida à morte da abelha, não é possível afirmar a partir de qual momento essa esterase começa a desaparecer na abelha e se é um produto diretamente resultante da aplicação do Dimetoato ou a expressão de um subproduto gênico relacionado a esse inseticida. De qualquer forma, a metabolização não foi eficiente para impedir a morte do indivíduo.

Em todas as amostras do Grupo Tratado, houve uma diminuição na intensidade das regiões esterásicas quando comparadas ao Grupo Controle (sem qualquer tratamento), reforçando a hipótese de que Esterases, de alguma forma, estão relacionadas ao inseticida (Figura 3).

O envolvimento de enzimas esterásicas no desenvolvimento de resistência a pesticidas tem sido estudado em vários artrópodes (STUMPF *et al.*, 2001). Em mosca do chifre (*Haematobia irritans*), GUERRERO *et al.* (1999) identificaram uma acetilcolinesterase insensível a organofosforados em moscas resistentes ao Diazinon. Nos mosquitos *Lucilia cuprina*, *Culex* e *Anopheles gambiae*, vários trabalhos relatam a relação de acetilcolinesterases e carboxilesterases envolvidas na metabolização e no seqüestramento de moléculas de inseticidas (NEWCOMB, *et al.*, 1997; HEMINGWAY & KARUNARATNE, 1998; HEMINGWAY *et al.*, 2002).

A Figura 4 e a Tabela I apresentam quadros das Esterases que ocorrem no adulto de *Melipona scutellaris* submetidas ou não ao tratamento com Dimetoato. Observa-se que:



- EST-1 ocorre em todos os indivíduos (Controle e Tratados);
- EST-2 ocorre em todos os Grupos Tratados;
- EST-3 ocorre em todos os indivíduos (Controle e Tratados);
- EST-4 em indivíduos do Grupo Controle e em tratados com 100mg/L e 320mg/L;
- EST-5 em indivíduos do Grupo Controle e em Tratados com 16mg/L, 62mg/L, 100mg/L, 320mg/L e 620mg/L;
- EST-6 em indivíduos do Grupo Controle e em Tratados com 16mg/L e 100mg/L;
- EST-7 somente em indivíduos do Grupo Controle.

O presente estudo mostra a relação do inseticida Dimetoato com a ocorrência, desaparecimento e/ou alteração de intensidade de Esterases no adulto de *Melipona scutellaris*.

## **2. EFEITO DOS INIBIDORES**

Os resultados dos testes de inibição mostram que o sulfato de cobre na concentração de 1mM não apresentou efeito inibitório sobre nenhuma das bandas detectadas. Quando os géis foram submetidos ao tratamento com o malathion 0,4mM ou com sulfato de eserina 1,0mM, verificou-se que todas as esterases foram inibidas por estes inseticidas, indicando que podem se tratar de Colinesterases (Figura 5).

O inibidor PMSF, por sua vez, age em Esterases que contém Serina em sítio ativo. Como ocorreu leve inibição das Esterases, aqui estudadas, por esse composto, é possível

inferir que elas apresentam tal resíduo de serina. Sugerimos, portanto, que se tratam de Acetilcolinesterases com resíduos de Serina no sítio ativo.

Controle

16mg/L

EST-7

EST-6

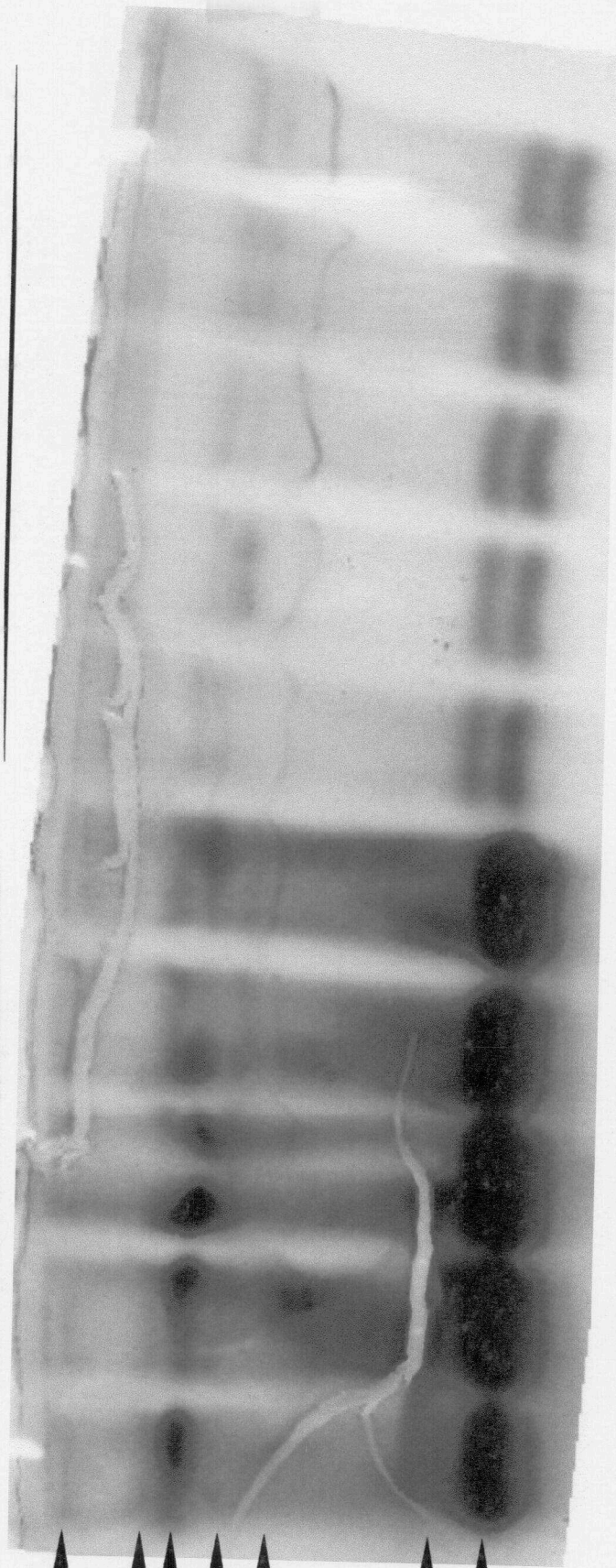
EST-5

EST-4

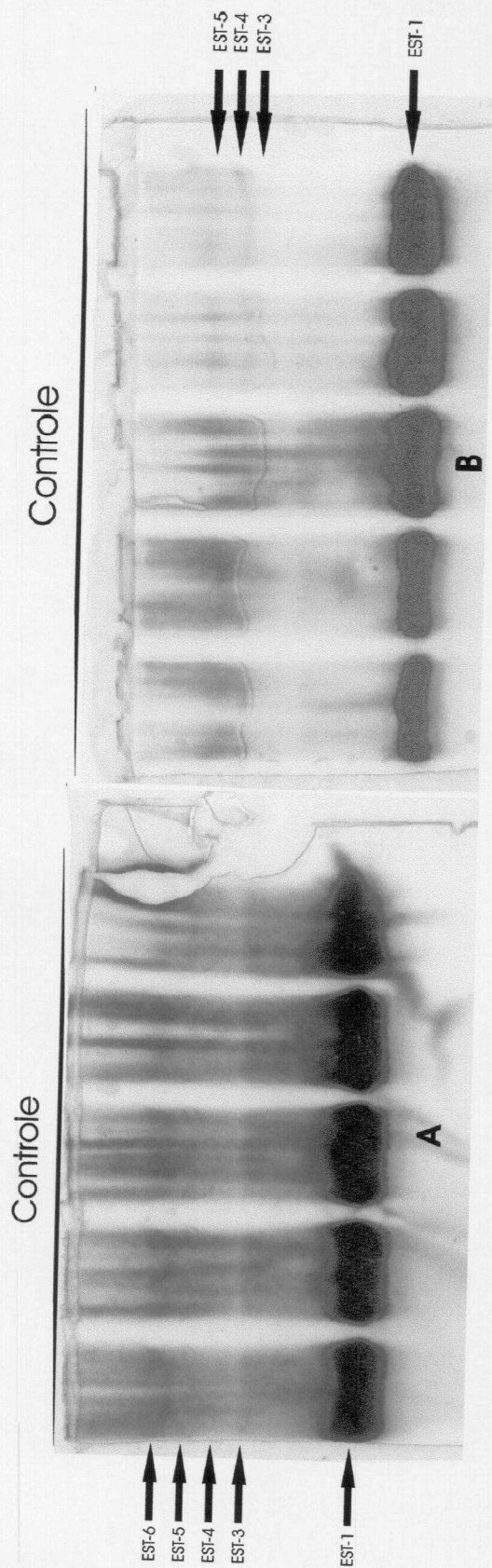
EST-3

EST-2

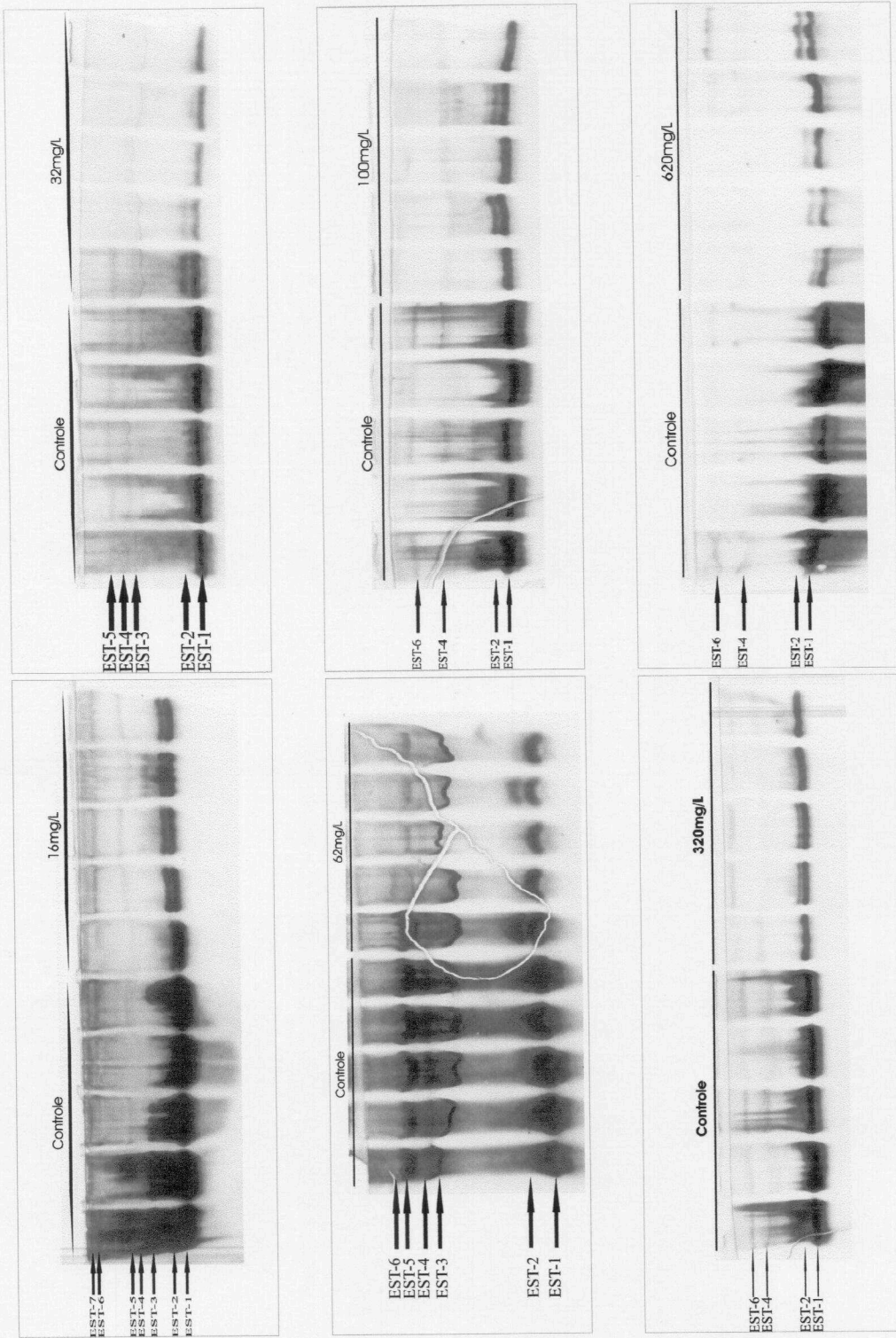
EST-1



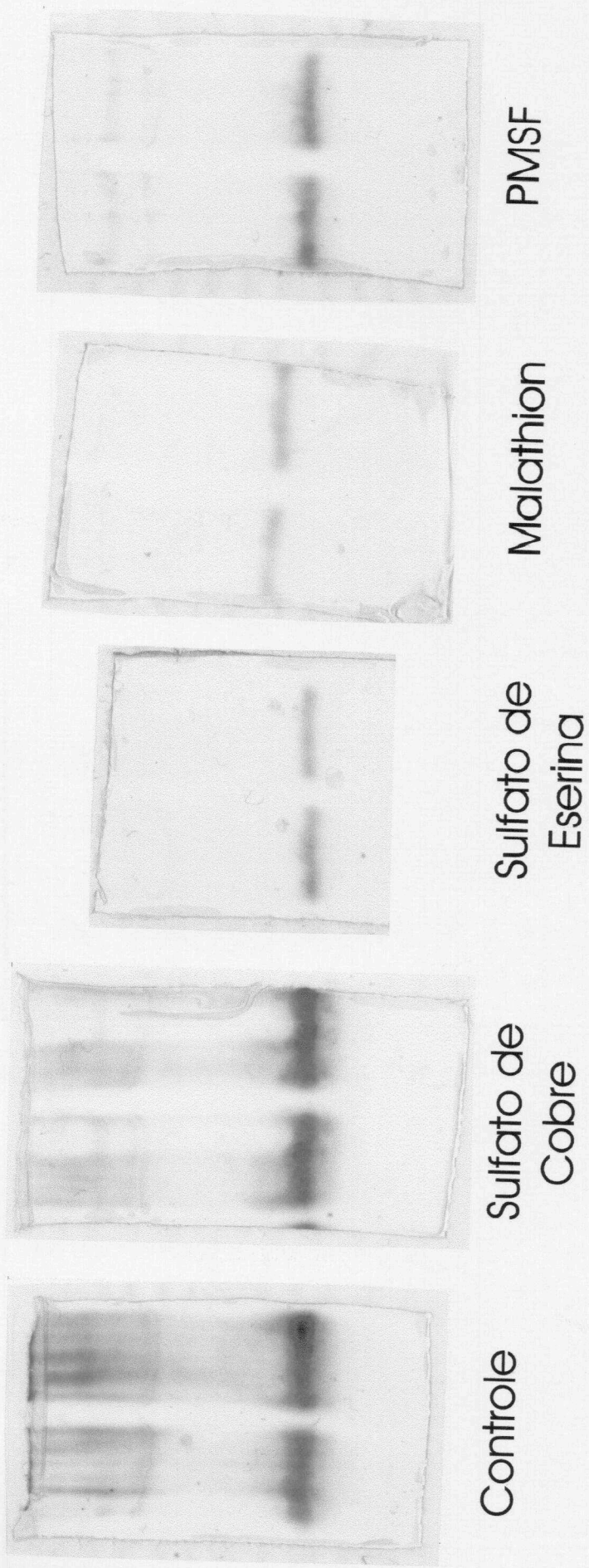
**Figura 1** – Padrão de Esterases de amostras do Grupo Controle e do Grupo Tratado com 16mg/L de Dimetoato, em *Melipona scutellaris*. Gel de separação 12% e empilhamento 4%. Tampão TRIS-Glicina, pH 8,3.



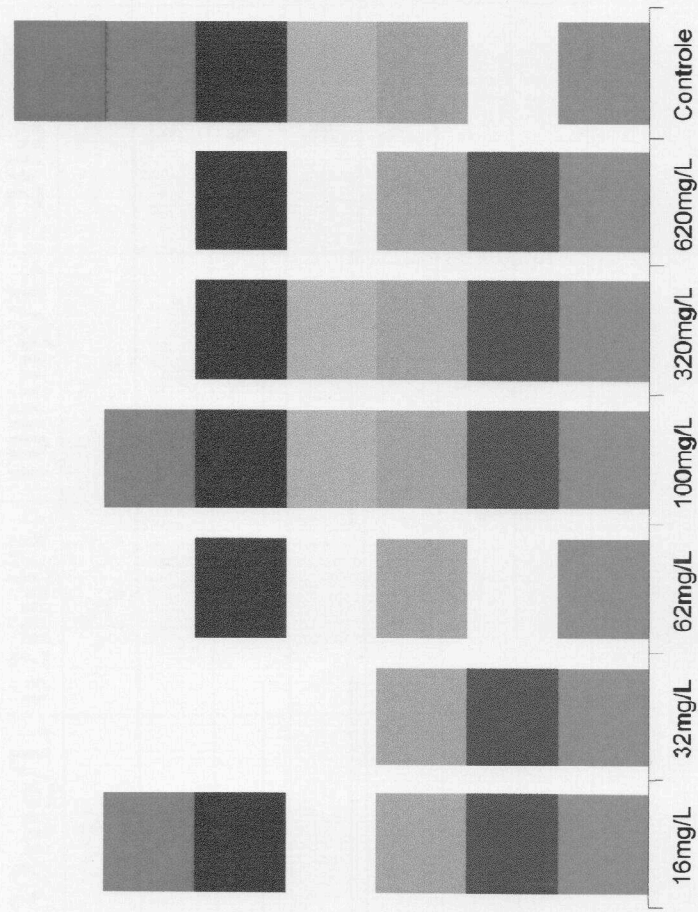
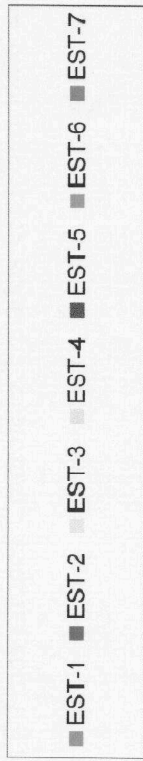
**Figura 2** - Padrão de Esterases de amostras do Grupo Controle de *Melipona scutellaris* corados com  $\alpha$ -naftil acetato (A) e  $\beta$ -naftil acetato (B).  
 Gel de separação 12% e empilhamento 4%. Tampão TRIS-Glicina, pH 8,3.



**Figura 3** - Padrão de Esterases de amostras de *Melipona scutellaris* demonstrando a diminuição da intensidade das bandas dos Grupos Tratados em comparação ao Grupo Controle. Gel de separação 12% e empilhamento 4%. Tampão TRIS-Glicina, pH 8,3.



**Figura 5** – Padrões de Inibição de Esterases em *Melipona scutellaris*. Gel de separação 12% e empilhamento 4%. Tampão TRIS-Glicina, pH 8,3.



**Figura 4** – Ocorrência de Esterases nos Grupos Tratados e Controle de *Melipona scutellaris*.

## IV – CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho, pudemos chegar às seguintes conclusões:

- Presença de seis regiões, em gel, referentes ao padrão esterásico de indivíduos controle de operárias de *Melipona scutellaris*, assim como obtido por REZENDE, (1997). Essas enzimas foram classificadas aqui como Acetilcolinesterases com resíduos de Serina em seus sítios ativos, em função de seu comportamento frente a inibidores.
- O inseticida Dimetoato foi responsável pelo aparecimento de uma Esterase, EST-2, de ocorrência apenas nos Grupos de Tratamento. Devido a isso, sugere-se que essa Esterase pode estar relacionada à resistência do inseto ao stress químico.
- Ocorrência da EST-7 no Grupo Controle e desaparecimento nos Grupos Tratados. A EST-7 pode estar sendo consumida na tentativa de metabolizar o inseticida ou está sendo inibida pelo Dimetoato.



## V – REFERÊNCIAS

ARGENTINE, J. A., JAMES, A. A. 1995. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **25**, 621-630.

BAXTER, G. D., BARKER, S. C. 1998. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick , *Boophilus microplus* : characterization and role in organophosphate resistance. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **28**, 581-589.

BAXTER, G. D., BARKER, S. C. 2002. Analysis of the sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and resistant cattle ticks. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **32**, 815-820.

BESHERS, S. N. & FEWELL, J. H. (2001). Models of division of labor in social insects. **Annu. Rev. Entomol.** **46**: 413-440.

BONETTI, A. M. (1982). **Ação do Hormônio Juvenil Sobre a expressão gênica em *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Ribeirão Preto-SP, Faculdade de Medicina, *Tese de Mestrado*. USP, 165p.

BONETTI, A. M. (1990). **Genética de determinação de casta em *Melipona*. Ação do Hormônio Juvenil sobre esterases e *corpora allata* e durante o desenvolvimento pós-embriônico.** Ribeirão Preto-SP, Faculdade de Medicina, *Tese de Doutorado*. USP, 165p.

CAMPBELL, P. M., NEWCOMB, R. D., RUSSEL, R. J., OAKESHOTT, J. G. 1998. Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorous insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **28**, 139-150.

CAMPOS, L. A. de O. (1979). Determinação do sexo nas abelhas XIV. Papel no hormônio juvenil na diferenciação das castas na subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Bras. Biol.**, **39**(4): 965-971.

CARVALHO G.A (2000) Contribuição à reprodução da *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e suas consequências. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP. 109p.

CERON, C. R. (1988). **Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonae* e seus híbridos.** São Paulo-SP, *Tese de Doutorado*. USP, 142p.

ENGEL, M. S. (2001). Monophyly and extensive extinction of advanced eusocial bees: insights from an unexpected Eocene diversity. **P. N. A. S.** **98**(4): 1661-1664.

FERREIRA, W. L. B. (1999). Inseticidas de uso domiciliar e controle de vetores de doenças. p. 403-452. **In:** MARICONI, F. A. M. (Ed.) **Insetos e outros invasores de residências**. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, vol.6, Piracicaba, SP, Brasil.

GUERRERO, F. D., PRUETT, J. H., KUNZ, S. E., KAMMLAH, D. M. 1999. Esterase profiles of diazinon-susceptible and resistant horn flies (Diptera, Muscidae). **J. Econ. Entomol.** **92(2)**, 286-292.

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

HEMINGWAY, J., FIELD, L., VONTAS, J. 2002. An overview of insecticide resistance. **Science** **298**, 96-97.

HEMINGWAY, J., KARUNARATNE, S. H. P. P. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Med. Vet. Entomol.** **12**, 1-12.

HERNANDEZ, R; GUERRERO, F. D; GEORGE, J. E., WAGNER, G.G. 2002. Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **32**, 1009-1016.

- HERNANDEZ, R; HE, H.; CHEN, A.C., IVIE, G.W. WAGHELA, S. D., GEORGE, J. E., WAGNER, G.G. 2000. Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **30**, 969-977.
- HERNANDEZ, R; HE, H.; CHEN, A.C., IVIE, G.W., GEORGE, J. E., WAGNER, G.G. 1999. Cloning and sequencing of a putative acetylcholinesterase cDNA from *Boophilus microplus*. **J. Med. Entomol.** **36(6)**, 764-770.
- HIDAYAT, P., GOODMAN, W. G. 1994. Juvenile hormone and hemolymph juvenile hormone binding protein titers and their interaction in the hemolymph of fourth stadium *Manduca sexta*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **24 (7)**, 709-715.
- ITZHAKI, R. F., GILL, D. M. 1964. A Micro-biuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.** **9**, 401-410.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A. & NASCIMENTO, V. A. (1996). **Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte, MG, Ed. Fundação Acangaú, 144 p.
- KETTERMAN, A. J., JAYAWARDENA, K. G. I., HEMINGWAY, J. 1992. Purification and characterization of a carboxylesterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Biochem. J.** **287**, 355-360.

- LABATE, B., GAME, Y., COOKE, H., OAKSHOTT, J. G. 1990. The number and distribution of esterase 6 alleles in populations of *Drosophila melanogaster*. **Heredity** **63**, 203-208.
- MICHENER, C.D. 1990. **Classification of the Apidae (Hymenoptera)** **54(4):** 75-164, Univ. Kansas Sci Bll.
- MOURE, J.S. 1961. A preliminary supra-specific classification of the Old World Meliponine bee (Hymenoptera, Apoidea). **Stud. Entomol.** **4(1-4):** 181-242.
- NEWCOMB, R. D., CAMPBELL, P. M., OLLIS, D. L., CHEAH, E., RUSSEL, R. J., OAKSHOTT, J. G. 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorous hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. **P. N. A. S.** **94**, 7464-7468.
- OAKESHOTT, J. G., VAN PAPERRECHT, E. A., BOYCE, T. M., HEALY, M. J., RUSSEL, R. J. 1993. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetica** **90**, 239-268.
- OLIVEIRA-JR., W. P. de (1999). **Análise da expressão gênica diferencial na divisão de trabalho em *Apis mellifera* LINNAEUS, 1758 (Hymenoptera, Apidae)**. Uberlândia-MG. Tese Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia. 57 p.

- REZENDE, S. H. M. S. de. (1997). **Padrão de esterases durante o desenvolvimento pós-embriônico de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Uberlândia-MG. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Uberlândia. 51p.
- RITZ, F. R. C. (1997). **Padrão de esterases em *Megaselia scalaris***. São José do Rio Preto-SP. *Tese de Doutorado*, UNESP – São José do Rio Preto. 126p.
- ROIG-ALSINA A & MICHENER C.D. (1993). Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera Apoidea). *The University of Kansas Science Bulletin* 55(4): 123-162.
- SANDERS B. M., MARTIN L. S., HOWE S. R., NELSON W. G., HEGRE E. S. AND PHELPS D. K. 1994. Tissue-Specific Differences in Accumulation of Stress proteins in *Mytilus edulis* Exposed to a Range of Copper Concentrations. **Toxicol. Ap. Pharmacol.** 125 (2), 206-213.
- SESSO, J. N.; PERINA, V. C. F.; MARCHINI, L. C. & ALMEIDA, D. de. (2002). **Comparação da Sensibilidade da Abelha *Apis mellifera* africanizada em diferentes idades**. Manaus – AM, Anais do 19º Congresso Brasileiro de Entomologia
- STUMPF, N., ZEBITZ, C. P. W., KRAUS, W., MOORES, G. D., NAUEN, R. 2001. Resistance to organophosphates and biochemical genotyping of acetylcholinesterases in *Tetranychus urticae* (Acari, Tetranychidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 69, 131-142.

- TANNUS-NETO J. (2001) Morfologia comparada de operárias, machos e rainhas de abelhas urucu do nordeste, *Melipona scutellaris*, Latreille, 1811. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia. 197p.
- WHYARD, S., DOWNW, A. E. R., WALKER, V. K. 1994. Isolation of an esterase confereing insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **24**, 819-827.
- WILSON, E. O. (1971). **The insect's societies**. Mass. Belknap Press of Harvard University Press Cambridge.
- WILSON, E. O. (1985). The sociogenesis of insect colonies. **Science** **228**: 1489-1495.
- WRIGHT, F. C., AHRENS, E. H. 1988. Cholinesterase insensitivity: a mechanism of resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* against coumaphos. **J. Med. Entomol.** **25(4)**, 234-239.