



Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e  
Ambiente



**JÉSSICA FREITAS ARAÚJO**

**EFEITOS ISOLADOS E COMBINADOS DOS INSETICIDAS FIPRONIL E  
TIAMETOXAM PARA A ABELHA BRASILEIRA *Melipona scutellaris* Latreille, 1811  
(Hymenoptera, Apidae)**

Araras – SP  
2018

**JÉSSICA FREITAS ARAÚJO**

**EFEITOS ISOLADOS E COMBINADOS DOS INSETICIDAS FIPRONIL E  
TIAMETOXAM PARA A ABELHA BRASILEIRA *Melipona scutellaris* Latreille, 1811  
(Hymenoptera, Apidae)**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente  
como requisito para obtenção do título de  
Mestre em Agricultura e Ambiente.

Araras – SP

Março/2018

Freitas Araújo, Jéssica

EFEITOS ISOLADOS E COMBINADOS DOS INSETICIDAS  
FIPRONIL E TIAMETOXAM PARA A ABELHA BRASILEIRA *Melipona  
scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae) / Jéssica Freitas Araújo. --  
2017.

94 f. : 30 cm.

undefined

Orientador: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Banca examinadora: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, Stephan Malfitano  
Carvalho, Patrícia Andrea Monquero

Bibliografia

1. Biomarcadores. 2. Ecotoxicologia. 3. Abelhas Brasileiras. I.  
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Jessica Freitas Araujo, realizada em 24/11/2017:

---

Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli  
UFSCar

---

Prof. Dr. Stephan Malfitano Carvalho  
UFLA

---

Profa. Dra. Patricia Andrea Monquero  
UFSCar

*Dedico este trabalho a todos os meus familiares, colegas e orientadores pela colaboração e carinho na conclusão de mais uma etapa em minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli pela orientação, compreensão e atenção em todas as dúvidas e momentos difíceis, não seria possível a conclusão deste trabalho sem sua dedicação.

À CAPES/CNPq pela concessão da bolsa de mestrado para realização do presente trabalho como também à FAPESP com os Projetos Temáticos (Processos: 2012/50197-2 e 2014/12488-0) pelo suporte financeiro.

Aos colegas do mestrado, todas as etapas concluídas, juntos, foram importantes para minha formação.

À Thaís Borges por estar sempre comigo, pelo ano incrível que passamos juntas e por ser uma amiga maravilhosa.

Aos colegas do LECA/UNESP: Adna, Aline, Ana, Caio, Elisangela, Gabriela, Isabela, Lucas, Patrícia e Priscila por todos os momentos, compartilhamento de conhecimentos e por receberem-me de braços abertos para o desenvolvimento de todas as etapas.

Aos pesquisadores da UNESP/UFSCar/outras Instituições: Anne, Clara Lourenço, Cynthia Jacob, Daiana, Franco, Kayna Agostini, Osmar Malaspina, Patrícia Monqueiro, Ricardo Fujihara, Rodrigo Avelaria, Sandra, Simone Baitelo, Stephan Carvalho e entre outros que colaboraram: ontem, hoje e sempre quando precisei em diversas etapas deste e outros projetos.

À três incríveis pesquisadoras: Hellen Soares, Pâmela Décio e Tatiane Grella; estas em especial, pois todas as etapas deste projeto tiveram sua dedicação, carinho e esforço.

Aos meus pais e irmão por resistirem bravamente todos os momentos de angústia, alegria e dedicação; afinal, eu nada seria sem o brilho de cada um.

À minha irmã Vívane, pelas tardes de discussão e leitura; por acreditar em meu potencial e por todas as dúvidas em Inglês e apresentações; todas estas têm muito de sua presença.

À Raíssa Encinas, obrigada por estar comigo, confiar, discutir, acreditar, não desistir e por me mostrar que a vida tem cores lindas, mesmo em momentos difíceis; sem você, não teria conseguido finalizar diversas fases em minha vida.

À Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente da UFSCar com todos os seus integrantes: desde discentes até secretaria e também a UNESP/ Rio Claro e ao CEIS e todos os seus funcionários que proporcionaram o desenvolvimento do projeto e diretamente em minha formação.

E a Deus e todos os espíritos de Luz que me acompanharam até aqui, por me permitirem chegar a esta etapa de minha vida com força e determinação; não me permitindo desistir, nunca.

*“ A persistência é o menor caminho do êxito ”*  
*Charles Chaplin – Tempos Modernos, 1936.*

## RESUMO

Os polinizadores são responsáveis pela polinização de florestas tropicais e também tem ação direta e indireta na alimentação humana. Dentre os polinizadores, são representados, em sua maior parte pelas abelhas. Porém, estas contribuições vêm sendo afetadas por diversos fatores, dentre estes os agrotóxicos. Os inseticidas tiametoxam e fipronil, das classes dos neonicotinoides e fenilpirazois, respectivamente, apresentam diversos efeitos negativos em diferentes espécies de abelhas, inclusive alterações bioquímicas. Assim, o objetivo do trabalho foi analisar, através de técnicas bioquímicas, a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CaE) na cabeça e glutathione S-transferase no intestino de operárias da espécie *Melipona scutellaris*, expostas aos inseticidas citados, de forma isolada e combinada. Abelhas forrageiras foram coletadas e divididas em quatro grupos experimentais: Controle; Controle acetona; CL<sub>50/2</sub> (0,0226 ng i.a. tiametoxam/μL e 0,0056 ng i.a. fipronil/μL) e CL<sub>50/5</sub> (0,00906 ng i.a. tiametoxam/μL e 0,0022 ng i.a. fipronil/μL) expostas oralmente, de forma combinada e isolada, por 1, 6, 12, 24, 48 e 96 horas. Os cérebros e intestinos foram dissecados, pesados e submetidos à solução de extração tampão LS, macerados e centrifugados. As leituras de absorvância foram realizadas em comprimento de onda de 412, 410 e 340 nm, respectivamente. Os dados foram analisados pelos testes Mann – Whitney e Kruskal – Wallis. Os resultados mostraram a ocorrência de alterações na atividade tecidual de AChE para o inseticida fipronil com aumento em 1 hora (CL<sub>50/2</sub> e CL<sub>50/5</sub>), queda em 6 horas (CL<sub>50/2</sub> e CL<sub>50/5</sub>) e 12 horas (CL<sub>50/2</sub>) e novamente aumento em 96 horas (CL<sub>50/2</sub> e CL<sub>50/5</sub>). Para o inseticida tiametoxam houve diminuição em 6 horas (CL<sub>50/2</sub> e CL<sub>50/5</sub>), 12 horas (CL<sub>50/2</sub>) e 24 horas (CL<sub>50/5</sub>) e aumento em 96 horas (CL<sub>50/2</sub> e CL<sub>50/5</sub>). Já na combinação destes inseticidas observou-se diminuição da atividade de AChE CL<sub>50/2</sub> (6 e 12 horas) e CL<sub>50/5</sub> (6 e 24 horas) e, aumento em CL<sub>50/2</sub> e CL<sub>50/5</sub> (96 horas). Já para a atividade específica obteve-se diminuição em 6 horas (Fipronil CL<sub>50/2</sub> e CL<sub>50/5</sub> e Combinado CL<sub>50/2</sub>), 48 horas (Tiametoxam CL<sub>50/5</sub>) e 96 horas (Fipronil CL<sub>50/2</sub> e Combinado CL<sub>50/5</sub>). Para a atividade tecidual da enzima de desintoxicação CaE-3 foram constatados os seguintes padrões: Inseticida fipronil – diminuição em 12 horas (CL<sub>50/2</sub>) e aumento em 96 horas (CL<sub>50/2</sub>) e combinado - diminuição da atividade no grupo em CL<sub>50/5</sub> (6 horas). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas para o grupo exposto exclusivamente ao tiametoxam. Já para a atividade de GST o grupo acetona obteve aumento em 1 hora de exposição; os grupos expostos ao inseticida fipronil CL<sub>50/5</sub> (1 hora), CL<sub>50/2</sub> e CL<sub>50/5</sub> (96 horas) obtiveram diminuição e aumento na atividade desta enzima, respectivamente. Para o inseticida tiametoxam observou-se aumento na atividade em 6 horas (CL<sub>50/2</sub> e CL<sub>50/5</sub>) e em 12 horas (CL<sub>50/5</sub>); para a combinação verificou-se aumento nos grupos: CL<sub>50/2</sub> (48 e 96 horas) e CL<sub>50/5</sub> (6 e 12 horas). Com isto, podemos concluir que os inseticidas, tanto de forma isolada como combinada, afetaram as enzimas analisadas, refletindo em toxicidade destes indivíduos quando expostos a doses subletais; podendo ocasionar morte dos indivíduos e desestruturação das colmeias, impactando o ecossistema.

**Palavras-chave:** agrotóxicos, abelhas sem ferrão, biomarcadores, enzimas, toxicidade.



## ABSTRACT

**TITLE:** Isolated and combined effects of the insecticides fipronil and thiamethoxam on the brazilian bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae)

Pollinators are responsible for tropical forests polinization and also have direct and indirect action on human feeding. The pollinators are majorly represented by bees. Even though, this contribution has been affected by numerous factors, among them, agrochemicals. The tiametoxam and fipronil insecticides, from neonicotinoides and fenilpirazois classes, respectively, present numerous negative effects, including biochemical alterations, in different bees species. Therefore, the aim of this paper was to analyze, through biochemical techniques, acetilcolinesterase (AChE) and carboxilesterase (CaE) enzyme activities in the head and glutationa S-transferase in the intestines of *Melipona scutellaris* worker bees, exposed to the mentioned insecticides, combined and isolated. Bees forage were collected and divided into four experimental groups: Control, acetone control, LC<sub>50</sub>/2 (0,0226 ng i.a. tiametoxam/μL and 0,0056 ng i.a. fipronil/μL) and LC<sub>50</sub>/5 (0,00906 ng i.a. tiametoxam/μL e 0,0022 ng i.a. fipronil/μL) orally exposed, combined and isolated, for 1, 6, 12, 24, 48 and 96 hours. The brain and the intestines were dissected, weighted and submitted to LS drainage buffer solution, macerated and centrifuged. The absorbance readings were done in 412, 410, and 340 nm wavelength, respectively. The data was analyzed by the Mann – Whitney e Kruskal – Wallis tests. The results showed alterations in the AChE tissue activity to the fipronil insecticide raising in 1 hour (LC<sub>50</sub>/2 and LC<sub>50</sub>/5) and decreasing in 6 hours (LC<sub>50</sub>/2 and LC<sub>50</sub>/5) and 12 hours (LC<sub>50</sub>/2) and raising again in 96 hours (LC<sub>50</sub>/2 and LC<sub>50</sub>/5). To the tiametoxam insecticide there was a decrease at 6 hours (LC<sub>50</sub>/2 and LC<sub>50</sub>/5), 12 hours (LC<sub>50</sub>/2) and 24 hours (LC<sub>50</sub>/5) and a raise at 96 hours (LC<sub>50</sub>/2 and LC<sub>50</sub>/5). Combining these insecticides it was observed a decrease in AChE LC<sub>50</sub>/2 activity (6 and 12 hours) and LC<sub>50</sub>/5 (6 and 24 hours) and a raise in LC<sub>50</sub>/2 and LC<sub>50</sub>/5 (96 hours). In specific activity there was a decrease at 6 hours (Fipronil LC<sub>50</sub>/2 and LC<sub>50</sub>/5 and Combined LC<sub>50</sub>/2), 48 hours (Tiametoxam LC<sub>50</sub>/5) and 96 hours (Fipronil LC<sub>50</sub>/2 and Combined LC<sub>50</sub>/5). The following patterns were detected for the detoxification enzyme tissue CaE-3: Fipronil insecticide – decrease in 12 hours (LC<sub>50</sub>/2) and raise in 96 hours (LC<sub>50</sub>/2) and combined – activity decrease in CL<sub>50</sub>/5 group (6 hours). Differences statistically relevant weren't identified in groups exposed exclusively to tiametoxam insecticide. Considering the GST activity, the acetone group obtained raise in one hour exposure; groups exposed to the fipronil insecticide LC<sub>50</sub>/5 (1 hour), LC<sub>50</sub>/2 and LC<sub>50</sub>/5 (96 hours) obtained decrease and raise in this enzyme activity, respectively. Considering tiametoxam insecticide it was observed a raise in the activity at 6 hours (LC<sub>50</sub>/2 and LC<sub>50</sub>/5) and at 12 hours (LC<sub>50</sub>/5); there was increase in the combination for the groups: LC<sub>50</sub>/2 (48 and 96 hours) and LC<sub>50</sub>/5 (6 and 12 hours). This way, we can conclude that the insecticides, combined or isolated, affect the analyzed enzymes, reflecting in the toxicity of these individuals when exposed to sublethal doses; they may cause death of the individuals, hives destructure, and impact ecosystem directly.

**Key-words:** agrochemicals, stingless bees, biomarkers, enzymes, toxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**FIGURA 1:** Representantes da colmeia de *M. scutellaris*.

**FIGURA 2:** Estrutura molecular do inseticida Tiametoxam.

**FIGURA 3:** Estrutura molecular do inseticida Fipronil.

**FIGURA 4:**

**A** – Meliponário do CEIS;

**B** – Caixas de *M. scutellaris*;

**C** – Entrada/saída da colônia.

**FIGURA 5:**

**A e B** – Entrada/Saída de abelhas *M. scutellaris* da colônia;

**C** – Gaiola de coleta posicionada na entrada/saída da colônia.

**FIGURA 6:** Esquema de disposição dos extratos dos grupos experimentais em microplaca.

**FIGURA 7:** Curva Padrão Albumina Bovina (95%) de acordo com o método descrito por Bradford (1976).

**FIGURA 8:** Atividade tecidual da acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de fipronil (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

**FIGURA 9:** Atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de fipronil (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

**FIGURA 10:** Atividade tecidual da acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de tiametoxam (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

**FIGURA 11:** Atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de tiametoxam (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína, sendo que o asterisco indica resultados significativos em

comparação com grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

**FIGURA 12:** Atividade tecidual da acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de forma combinada (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade de tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

**FIGURA 13:** Atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de forma combinada (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade de proteína, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

**FIGURA 14:** Atividade tecidual da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de fipronil (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

**FIGURA 15:** Atividade específica da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de fipronil (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína e as siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

**FIGURA 16:** Atividade tecidual da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de tiametoxam (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido e as siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

**FIGURA 17:** Atividade específica da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de tiametoxam (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína e as siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

**FIGURA 18:** Atividade tecidual da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de forma combinada (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados

significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam  $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ , respectivamente.

**FIGURA 19:** Atividade específica da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de forma combinada ( $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ ). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína e as siglas CL2 e CL5 representam  $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ , respectivamente.

**FIGURA 20:** Atividade tecidual da glutathione S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de fipronil ( $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ ). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam  $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ , respectivamente.

**FIGURA 21:** Atividade específica da glutathione S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de fipronil ( $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ ). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína e as siglas CL2 e CL5 representam  $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ , respectivamente.

**FIGURA 22:** Atividade tecidual da glutathione S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de tiametoxam ( $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ ). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam  $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ , respectivamente.

**FIGURA 23:** Atividade específica da glutathione S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de fipronil ( $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ ). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína e as siglas CL2 e CL5 representam  $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ , respectivamente.

**FIGURA 24:** Atividade tecidual da glutathione S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de forma combinada ( $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ ). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam  $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ , respectivamente.

**FIGURA 25:** Atividade específica da glutathione S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de forma combinada ( $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ ). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína e as siglas CL2 e CL5 representam  $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$ , respectivamente.

**FIGURA 26:** Atividade tecidual da Acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/2 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo combinado ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 representa CL<sub>50</sub>/2.

**FIGURA 27:** Atividade específica da Acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/2 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo combinado ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 representa CL<sub>50</sub>/2.

**FIGURA 28:** Atividade tecidual da Acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/5 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo combinado ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL5 representa CL<sub>50</sub>/5.

**FIGURA 29:** Atividade específica da Acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/5 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo combinado ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL5 representa CL<sub>50</sub>/5.

**FIGURA 30:** Atividade tecidual da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/2 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido e as siglas CL2 representa CL<sub>50</sub>/2.

**FIGURA 31:** Atividade específica da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/2 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo combinado ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 representa CL<sub>50</sub>/2.

**FIGURA 32:** Atividade tecidual da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/5 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido e as siglas CL5 representa CL<sub>50</sub>/5.

**FIGURA 33:** Atividade específica da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/5 de forma comparativa entre os inseticidas. Os

resultados são expressos como a média de atividade por proteína sendo que as siglas CL5 representa CL<sub>50</sub>/5.

**FIGURA 34:** Atividade tecidual da glutathiona S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/2 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo combinado ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 representa CL<sub>50</sub>/2.

**FIGURA 35:** Atividade específica de glutathiona S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/2 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína sendo que as siglas CL2 representa CL<sub>50</sub>/2.

**FIGURA 36:** Atividade tecidual da glutathiona S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/5 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo combinado ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL5 representa CL<sub>50</sub>/5.

**FIGURA 37:** Atividade específica de glutathiona S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/2 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína sendo que as siglas CL2 representa CL<sub>50</sub>/2.

*O presente trabalho segue as Normas da ABNT – NBR 14724/2011 disponível na Biblioteca Comunitária UFSCar.*

## LISTA DE ABREVIATURAS

AChE- Acetilcolinesterase;

AcSCH.I - Iodeto de Acetilcolina;

*Ad libitum* – alimento à vontade;

B.O.D - Biochemical Oxygen Demand ou Demanda Bioquímica de Oxigênio;

BSA – Albumina de Soro Bovino;

BW284c51 – 1,5 – bis (4-allyldimethylammonium-phenyl) pentan-3-one- dibromide (Inibidor da Acetilcolinesterase);

CaE- Carboxilesterase;

CaE-3- Carboxilesterase isoforma 3;

CCEs – Grupo enzimático Carboxil colinesterases;

CDNB - 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno;

CEIS - Centro de Estudos de Insetos Sociais/Departamento de Biologia;

DTNB – Ácido 5,5´ditiobis (2-nitrobenzóico);

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético;

GABA – Ácido gama-aminobutírico;

GSH- L-glutationa reduzida;

GST- Glutationa S-transferase;

LECA - Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas;

LS- Low Salt - Solução de Extração Enzimática;

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development/Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico;

$\rho$ -NPA – $\rho$ - Nitrofenil Acetato;

PCR – Polymerase Chain Reaction/Reação em Cadeia da polimerase;

UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita campus Rio Claro.

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{L}$  – Microlitro;

g - Força Gravitacional (Rotação);

kg i.a./ha – Quilograma de ingrediente Ativo/Hectare;

mg – miligrama;

mg/ $\mu\text{L}$  – miligrama/microlitro;

mL – Mililitro;

mm – milímetros;

mM – Milimol;

ng i. a. – Nanogramas de Ingrediente Ativo;

$^{\circ}\text{C}$  – Graus Celsius;

pH – Potencial Hidrogeniônico;

v/m – Volume/Massa;

v/v - Volume/Volume;

$\Delta\text{Abs}$  – Velocidade média da absorbância.



## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 19 |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | 21 |
| 2.1 Polinização.....  | 21 |
| 2.2 <i>Melipona scutellaris</i> .....   | 21 |
| 2.3 Ecotoxicologia e as abelhas .....   | 23 |
| 2.4 Inseticida Tiametoxam.....  | 24 |
| 2.5 Inseticida Fipronil .....   | 26 |
| 2.6 Mistura de agrotóxicos.....   | 28 |
| 2.7 Atividade Enzimática.....   | 30 |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....   | 33 |
| 3.1 GERAIS .....  | 33 |
| 3.2 ESPECÍFICOS .....   | 33 |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 33 |
| 4.1. Coleta das abelhas.....  | 33 |
| 4.2. Exposição das abelhas aos inseticidas .....  | 34 |
| 4.3. Extração enzimática das cabeças e intestinos .....   | 36 |
| 4.4. Ensaio de atividade enzimática .....   | 36 |
| 4.4.1 Dosagem total de proteínas .....  | 37 |
| 4.4.2 Acetilcolinesterase – AChE .....  | 38 |
| 4.4.3 Carboxilesterase 3 - CaE-3.....   | 38 |
| 4.4.4 Glutathiona S-Transferase – GST .....   | 38 |
| 4.5 Delineamento Experimental e Análise dos dados.....  | 39 |
| <b>5. RESULTADOS</b> .....  | 39 |
| 5.1 Acetilcolinesterase .....   | 39 |
| 5.2 Carboxilesterase-3.....   | 45 |
| 5.3 Glutathiona S-transferase.....  | 51 |
| 5.4 Combinação entre inseticidas .....  | 57 |
| <b>6. DISCUSSÃO</b> .....   | 69 |
| <b>7. CONCLUSÃO</b> .....   | 78 |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 79 |
| <b>APÊNDICES</b> .....  | 93 |
| <b>Apêndice A:</b> Atividades tecidual e específica das enzimas AChE, CaE-3 (cabeça) e GST (intestino) para grupo Controle acetona. Os símbolos ↑ e ↓representam aumento e diminuição significativa em relação ao controle (p<0,05) e o símbolo = indica ausência de alteração significativa..... | 93 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Apêndice B:</b> Atividades tecidual e específica das enzimas AChE, CaE-3 (cabeça) e GST (intestino) para grupo CL <sub>50</sub> /2. Os símbolos ↑ e ↓ representam aumento e diminuição significativa em relação ao controle (p<0,05) e o símbolo = indica ausência de alteração significativa.....                | 94 |
| <b>Apêndice C:</b> Atividades tecidual e específica das enzimas AChE, CaE-3 (cabeça) e GST (intestino) para grupo CL <sub>50</sub> /5. Os símbolos ↑ e ↓ representam aumento e diminuição significativa em relação ao controle (p<0,05) e o símbolo = indica ausência de alteração significativa.....                | 96 |
| <b>Apêndice D:</b> Atividades tecidual e específica das enzimas AChE, CaE-3 (cabeça) e GST (intestino) para grupo CL <sub>50</sub> /2. Os símbolos ↑ e ↓ representam aumento e diminuição significativa em relação aos inseticidas combinados (p<0,05) e o símbolo = indica ausência de alteração significativa..... | 97 |
| <b>Apêndice E:</b> Atividades tecidual e específica das enzimas AChE, CaE-3 (cabeça) e GST (intestino) para grupo CL <sub>50</sub> /5. Os símbolos ↑ e ↓ representam aumento e diminuição significativa em relação aos inseticidas combinados (p<0,05) e o símbolo = indica ausência de alteração significativa..... | 98 |

## 1. INTRODUÇÃO

Os serviços de polinização prestados pelas abelhas garantem a variabilidade genética e aumentam a produtividade de culturas e a qualidade dos frutos. Segundo Ricketts et al. (2008) os polinizadores são responsáveis por 90% da manutenção das árvores tropicais, sendo assim, estão diretamente ligados aos sistemas de coevolução, fluxo gênico, evolução dos sistemas sexuais e estabilidade da comunidade.

A alimentação humana depende, de forma tanto direta como indireta, dos serviços de polinização; estes acarretam diretamente o aumento de produtividade. Gallai et al. (2009) estimaram em aproximadamente 180 bilhões de dólares o serviço de polinização prestados por abelhas, representando em torno de 10% do PIB agrícola mundial, no ano de 2005.

No Brasil, Giannini et al. (2015) observaram que dos 141 cultivos avaliados, 85 dependiam da polinização de insetos - 85% representada por abelhas; sendo que, para um terço, variaram entre alta e total dependência. A partir desses dados, os autores calcularam a contribuição econômica na produção agrícola anual destas culturas, totalizando aproximadamente US\$ 12 bilhões de dólares.

Segundo Michener (2007) existem cerca de 20.000 a 30.000 espécies de abelhas distribuídas mundialmente e o Brasil possui a maior diversidade com mais de 2.500 espécies identificadas, dentre elas a espécie *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae).

Entretanto, a diversidade de espécies de abelhas vem sofrendo ameaças devido a fragmentação e degradação de habitats naturais e consequente diminuição de recursos florais e oportunidade de nidificação (AIZEN; FEISINGER, 1994; MARTINS, 2013), a exposição à patógenos (TEIXEIRA et al., 2013), a alterações nas temperaturas globais (WILLIAMS; OSBORNE, 2009), ao uso incorreto e/ou excessivo de agrotóxicos (NOCELLI et al., 2012; JOHNSON, 2015) e entre outros fatores.

No Brasil o consumo de agrotóxicos é apontado como um dos maiores do mundo, fator diretamente relacionado à prática em ambiente tropical; ocasionando maior ocorrência e severidade em pragas e doenças comparativamente as regiões temperadas (BRASIL, 2009; SINDIVEG, 2015).

Dentre as áreas que mais utilizam agrotóxicos estão as culturas de grãos, café, hortaliças, frutas e cana-de-açúcar; isto representa em torno de 96,8% do total de produtos comerciais obtidos no país (SINDIVEG, 2015). A partir desta porcentagem, 25% das vendas de agrotóxicos

são representados por inseticidas estando contido o tiametoxam e o fipronil; inseticidas de interesse na presente pesquisa.

Embora importantes agentes polinizadores, as abelhas podem ser expostas a diferentes substâncias aplicadas nas áreas de cultivo no momento do forrageio; através do consumo de pólen e néctar contaminados. Estes podem acarretar, conseqüentemente, variáveis danos que afetam diretamente o funcionamento da colônia (MALASPINA et al., 2008).

Os efeitos acarretados por agrotóxicos em abelhas são de importância crucial para compreensão das implicações de mortalidade e/ou comportamento; estes são realizados através de análises à nível celular, molecular e bioquímico (CATAE et al., 2014; COSTA et al., 2015; DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; TAVARES et al., 2015). Portanto, são realizados testes de toxicologia de inseticidas que tem por finalidade determinar, tanto doses letais médias ( $DL_{50}$ ) quanto concentrações letais médias ( $CL_{50}$ ), observando fatores relacionados a toxicidade aguda e gerando um parâmetro para doses subletais e de toxicidade crônica (MALASPINA et al., 2008).

Contudo, em campo, as abelhas são expostas, tanto de forma isolada como combinada, à diferentes substâncias como: carboidratos tóxicos e fenóis (JOHNSON, 2015), fungicidas (PETTIS et al., 2013), herbicidas (JUMARIE; ARAS; BOILY, 2017), inseticidas (LONG; KRUPKE, 2016) e metais (ABDALLA; DOMINGUES, 2015). Portanto, entender os efeitos através de biomarcadores enzimáticos da AChE, responsável por degradar a acetilcolina, e das desintoxicadoras CaE – pertencente a classe das esterases – e GSTs – da classe das transferases nos ajudam a entender os possíveis impactos causados nestes indivíduos.

Outro aspecto importante referente a estes impactos são os estudos realizados com abelhas brasileiras, dos pesquisadores Lourenço et al. (2012a, b); Jacob et al. (2013); Costa et al. (2015) e Soares et al. (2015), pode-se concluir que estas abelhas são mais sensíveis aos neonicotinoides e fenilpirazois do que a espécie modelo *A. mellifera*, apresentando suma importância no contexto ecotoxicológico e para o presente trabalho.

Os biomarcadores têm se mostrado importantes ferramentas para a avaliação dos efeitos de compostos tóxicos em estudos, sendo que somente parâmetros de mortalidade têm mostrado-se limitado na compreensão dos inseticidas e abelhas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Polinização

As atividades ligadas principalmente ao bem-estar humano dependem inteira ou parcialmente de serviços ecossistêmicos diversos. Daily (1997) conceituou serviços ecossistêmicos como condições e processos dos ecossistemas naturais e as espécies que o compõe, que garantem a sustentação e satisfação da vida humana.

Os benefícios obtidos por meio dos serviços ecossistêmicos, conforme a Avaliação Ecossistêmica do Milênio (2005), são divididos em quatro focos principais: abastecimento ou provisão, cultural, suporte e regulação. Associados diretamente a função regulatória dos ecossistemas, temos os serviços obtidos pela polinização – relacionada direta e indiretamente com reprodução vegetal e produtividade agrícola (ANDRADE; ROMEIRO, 2009; FAO, 2016; IPBES, 2016).

Estudos realizados em áreas agrícolas indicam um aumento de produtividade em culturas frutíferas (GRIBEL, 2008; VENTURIERI, 2009), olerícolas (DE MARCO; COELHO, 2004; VEDDELER et al., 2008) e produtoras de óleo (RIZZARDO et al., 2008) pela ação dos serviços de polinização (AIZEN; HARDER, 2009). Um levantamento realizado por Klein et al. (2007) chegou à conclusão que 75% dos produtos utilizados na alimentação humana dependem direta ou indiretamente dos serviços de polinização.

Estes serviços são organizados em diferentes sistemas, cada um adaptado ao tipo de flor e ao ecossistema do qual faz parte. Estes sistemas são atribuídos a vetores abióticos realizados principalmente pela ação dos ventos e vetores bióticos exercidos por animais ou até mesmo pela ação humana. Ollerton; Winfree; Tarrant (2011) apontaram que 87,5% das plantas com flores em todo o mundo são polinizadas por vetores animais que são, portanto, a chave principal para todos os ecossistemas (KLEIN et al., 2007).

Dentre os polinizadores animais podemos citar diversas classes com grande representatividade: aves, mamíferos e insetos (MALERBO-SOUZA; HALAK, 2014). Dentro da classe Insecta, as abelhas são apontadas como os principais e mais especializados agentes polinizadores, o que se deve às estruturas adaptadas para a coleta e transporte do pólen (AGOSTINI, 2014).

### 2.2 *Melipona scutellaris*

Espécie eussocial, membro da ordem Hymenoptera, família Apidae, tribo Meliponini, conhecida como abelhas sem ferrão, é um dos representantes das 40 espécies do gênero *Melipona*. Suas colônias contêm de 4.000 a 6.000 abelhas sendo divididas em operárias, fêmeas

com potencial para rainhas, machos e larvas coordenadas por uma única rainha (SILVA et al., 2014).

A espécie *M. scutellaris* possui operárias que medem de 10 a 12 mm, de corpo robusto e cabeça de coloração marrom e preta, vértice marrom-amarelado com pelos amarelo-ruivos e dourados; seu abdômen apresenta dorso preto com borda cinza-amarelada clara com cinco segmentos, conforme Figura 1 (VIANA, 2010).

Figura 1 – Representantes da colmeia de *M. scutellaris*.



Fonte: WebBee, 2010.

Segundo Lima e Rocha (2012) e Silva et al. (2014) as principais culturas agrícolas que esta espécie poliniza são: o abacate (*Persea americana*), o açaí (*Euterpe oleracea*), o guaraná (*Paullinia cupana*), a melância (*Citrullus lanatus*), o pimentão (*Capsicum annum*) e a pitanga (*Eugenia uniflora*). Entretanto, diversas espécies de plantas possuem capacidade atrativa para *M. scutellaris*, dentre estas temos o eucalipto cinzento (*Eucalyptus moluccana*), eucalipto limão (*Eucalyptus citriodora*), ipê-amarelo (*Tabebuia alba*), sibipiruna (*Poincianella pluviosa*) dentre outras espécies.

Esta espécie, principal representante das regiões úmidas e quentes, distribui-se desde o nível do mar até de altitudes com 1200m. Popularmente conhecida como “uruçu” ou “uruçu nordestina”, endêmica do nordeste brasileiro, é apontada como produtora de mel de alta qualidade e fácil manejo, sendo, portanto um dos meliponíneos mais manipulados pelo homem (ALVES et al., 2010; CARVALHO et al., 2001; IMPERATRIZ-FONSECA; SARAIVA; DE JONG, 2006; KERR et al., 2001).

Segundo o IBGE, foram produzidas 37,8 mil toneladas de mel em nosso país, somente no ano de 2015; sendo que, o Estado de São Paulo apresenta-se como sexto maior produtor;

status representativo corroborado pela produção de mel da espécie *M. scutellaris* (BELO HORIZONTE, 2017).

### **2.3 Ecotoxicologia e as abelhas**

A intoxicação das abelhas por agrotóxicos pode ocorrer através de dois principais modos: contato e ingestão. Independentemente da rota, a exposição pode ocasionar diferentes danos, podendo estes, a longo prazo, ocasionar alterações no funcionamento da colônia, diminuição na longevidade dos indivíduos e morte por toxicidade aguda (MALASPINA et al., 2008).

Há métodos clássicos de avaliação da toxicidade realizada em laboratório, sendo estes os testes de dose letal média ( $DL_{50}$ ) e de concentração letal média ( $CL_{50}$ ). A  $DL_{50}$  corresponde à dose única da substância capaz de matar 50% da população testada em condições experimentais e a  $CL_{50}$  representa a concentração da substância necessária, contida no alimento ou no ambiente, que provoca morte de 50% da população experimental (RORTAIS et al., 2005).

Os testes de doses letais médias ( $DL_{50}$ ) e concentrações letais médias ( $CL_{50}$ ), assim como suas doses subletais, são de suma importância, pois permitem estabelecer as doses que podem comprometer o comportamento de voo e retorno para a colmeia, visão, orientação, funções biológicas, metabólicas, percepção olfativa e atividade locomotora das abelhas, sendo estas essenciais ao estabelecimento e sobrevivência da colônia (BRITAIN; POTTS, 2011; CATAE et al., 2014; COSTA et al., 2015; DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; LOURENÇO et al., 2012a, b; NOCELLI, 2012; ROAT et al., 2013; TAVARES et al., 2015).

Frequentemente, há a divulgação que o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo; entretanto, diversos fatores devem ser analisados previamente ao título (MENTEN, 2015 - SINDIVEG). Ao analisarmos o quesito o faturamento, em 2001, o consumo de agrotóxicos totalizou US\$ 2 bilhões de dólares e saltou para US\$ 8 bilhões no ano de 2011; demonstrando crescimento deste insumo agrícola no fator analisado (MILHORANCE, 2016).

Em relação a comercialização de produtos, segundo a SINDIVEG em 2015, foram vendidas aproximadamente 887,6 mil toneladas de produtos comerciais, sendo que 395,6 mil toneladas são de ingrediente ativo; onde aproximadamente 25%, da totalidade de produtos comercializados, foram representados por inseticidas.

No Brasil, as culturas de grãos, café, cana, frutas e hortaliças consomem aproximadamente 4,99 kg i.a./ha, neste fator, o Brasil representa a sexta posição em relação aos países: Holanda (20,8 kg i.a./ha); Japão (17,5 kg i.a./ha); Bélgica (12,0 kg i.a./ha); França (6,0 kg i.a./ha) e Inglaterra (5,8 kg i.a./ha) (SINDIVEG, 2015).

Nesta realidade, há quatro estados que lideram a venda de agrotóxicos: Mato Grosso, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul; juntos estes representam 54,4% de todos os agrotóxicos comercializados no país. Sendo que o estado de São Paulo lidera a produção de cana-de-açúcar e ocupa a segunda posição em vendas deste insumo agrícola (BOMBARDI; PENHA, 2016).

De acordo com a UNICA (União da Indústria de Cana-de-açúcar), em 2015 o Brasil plantou 10.870.64 hectares (ha) com cana-de-açúcar, sendo a região Centro-Sul do país responsável por 9.621.715 ha e o Estado de São Paulo – maior produtor – 5.728.285 ha. Com isto, os incentivos governamentais e os produtos gerados, proporcionaram o aumento na produção da cana-de-açúcar e conseqüentemente de insumos agrícolas, dentre estes, os agrotóxicos (BRASIL, s.d.; UNICA, 2017).

Os inseticidas são considerados de suma importância no combate a diversas pragas do cultivo de cana-de-açúcar, tais como cigarrinha-das-raízes, cupins, larvas de lepidópteros e formigas cortadeiras. Diversas são as classes de inseticidas registradas para a cultura de cana-de-açúcar no Brasil, como os neonicotinóides e fenilpirazóis (OLIVEIRA; FARARETO; ANTUNES, 2013).

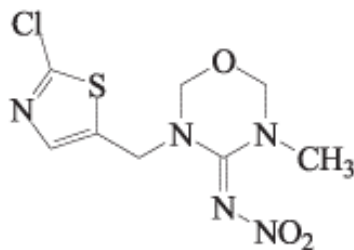
A natureza sistêmica dos neonicotinóides, independentemente da forma de aplicação, acarretam absorção e translocação por todas as partes da planta, possuindo amplo espectro de atuação; já os fenilpirazóis tem liberação lenta do princípio ativo, podendo afetar os indivíduos por longo espaço de tempo. Com isto, indivíduos não alvo, como as abelhas, podem ser expostas a estes produtos e seus metabólitos através de contato e/ou consumo de pólen, néctar e água (SIMON-DELSO et al., 2014; VAN DER SLUIJS et al., 2015).

#### **2.4 Inseticida Tiametoxam**

De acordo com a Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); o inseticida tiametoxam possui composição química 3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine e fórmula bruta  $C_8H_{10}ClN_5O_3S$  (Figura 2) – informações contidas na base de dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2003a).



Figura 2: Estrutura Molecular do inseticida Tiametoxam



Fonte: OLIVEIRA et al., 2009

Apresenta as seguintes características físico-químicas – fatores importantes na compreensão do comportamento ambiental dos agrotóxicos: coeficiente de distribuição octanol-água ( $K_{ow}$ ) de -0,13; solubilidade em água de 4,1 g/L<sup>-1</sup> (20°C); constante de adsorção ao carbono orgânico do solo ( $K_{oc}$ ) de 32 a 35 mL g<sup>-1</sup> e pressão de vapor de 6,60x10<sup>-6</sup> mPa m<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> (OLIVEIRA, 2007; WEBER et al., 2009 - <http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n9/v32n9a03>).

Podendo formar até 14 metabólitos diferentes e com valores de  $K_{oc}$  entre 57 a 80 mL g<sup>-1</sup>, característica que aponta alta mobilidade no solo, representa que tanto o inseticida como os seus metabólitos possuem alto potencial contaminante no ambiente (ROBINSON, 2001; WEBER et al., 2009). Outra característica importante são os valores de meia-vida, para o tiametoxam, os valores são superiores a 173 dias, principalmente em condições de solo anaeróbicas e com pouca incidência luminosa. (CASTRO et al., 2008; SALLES, 2000; URZEDO et al., 2006).

Em culturas agrícolas, este inseticida tem diversas formas de aplicação: no solo, foliar e até mesmo em tratamento de sementes. As culturas autorizadas para utilização deste produto são olerícolas de importância comercial, como batata e tomate; e frutíferas, principalmente citros e *commodities*, como a cana-de-açúcar. Há uma gama de insetos combatidos por este produto: cochonilhas, larvas, moscas de raízes, psilídeos, pulgões e cigarrinhas de variadas espécies (BRASIL, 2003a).

Pertence à classe III em parâmetros de classificação toxicológica, determinando-o medianamente tóxico a partir de dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2003a); na especificação referente à periculosidade ambiental possui também classe III, definindo-o assim como perigoso ao meio ambiente (BRASÍLIA, 2013).

Os neonicotinoides atuam como agonistas da acetilcolina, ou seja, imitam este neurotransmissor excitatório e acabam competindo pelos mesmos receptores nicotínicos. A ação da enzima acetilcolinesterase, apresenta-se inerte a substância em questão, gerando desta

forma ativação prolongada e contínua dos impulsos nervosos. Com isto, ocasiona um colapso no sistema nervoso central, resultando consequentemente em tremores e convulsões ocasionados pela hiperexcitação e, posteriormente, a morte do inseto (CARILLO et al., 2013; FARIA, 2009; HOPWOOD et al., 2012).

Estudos apontam uma variedade de efeitos ocasionados pelos neonicotinoides em diversas espécies de abelhas. Tavares et al. (2015) expuseram larvas de *A. mellifera* a CL<sub>50</sub> do inseticida tiametoxam e observaram a morte celular precoce na região do cérebro da abelha. Oliveira et al. (2014), com o mesmo inseticida e mesma espécie de abelha, observaram alterações morfológicas nas estruturas cerebrais e aumento da eliminação celular na região ventricular.

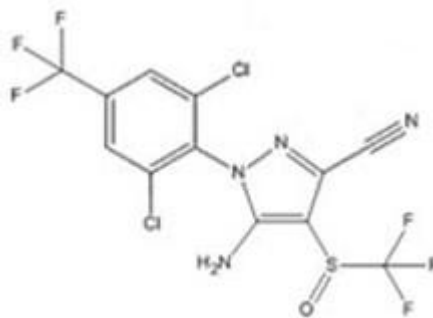
Efeitos negativos desta classe de inseticidas também foram apontados para abelhas brasileiras. Após tratamento com a CL<sub>50</sub> do inseticida tiametoxam as espécies *Tetragonista fiebrigi* (Schwarz, 1938) e *Tetragonista angustula* (Latreille, 1811) apresentaram alterações celulares especificamente na estrutura da cromatina, interferindo diretamente na síntese de proteínas (STUCHI, 2009).

Estudos com outros inseticidas neonicotinoides verificaram que o inseticida imidacloprido é mais tóxico para as abelhas brasileiras das espécies *M. scutellaris* (COSTA et al., 2015) e *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (SOARES et al., 2015), quando os dados da DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> são comparados com o híbrido *A. mellifera* africanizada, demonstrando assim a maior suscetibilidade das espécies brasileiras em relação à espécie modelo.

## **2.5 Inseticida Fipronil**

Outro inseticida largamente utilizado, o fipronil, pertencente ao grupo químico de inseticidas fenilpirazois, possui composição química, determinada pela IUPAC, por 5-amino-1-(2,6-dichloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoro-methylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile e fórmula bruta C<sub>12</sub>H<sub>4</sub>C<sub>12</sub>F<sub>6</sub>N<sub>4</sub>OS – Figura 3 (BRASIL, 2003b; BRASIL, 2007; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2009).

Figura 3: Estrutura molecular do inseticida Fipronil.



Fonte: National Pesticide Information Center, 2009.

Como características físico-químicas, este apresenta: coeficiente de distribuição octanol-água ( $K_{ow}$ ) de 3,8; solubilidade em água de  $0,0024 \text{ g/L}^{-1}$  ( $20^\circ\text{C}$ ); constante de adsorção ao carbono orgânico do solo ( $K_{oc}$ ) de  $801 \text{ mL g}^{-1}$  e pressão de vapor de  $0,00000027 \text{ mPA m}^3 \text{ mol}^{-1}$  (NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER, 2009; FACCIO et al., 2015).

De forma contrária ao tiametoxam, este inseticida apresenta baixa tendência a solubilidade em água, representado pelos fatores de  $K_{ow}$  e  $K_{oc}$  e, portanto, altamente solúvel em solventes orgânicos, sendo pouco transportado no ambiente. Com isto, apresenta meia-vida de 122 a 128 dias, variando conforme o ambiente aplicado (TINGLE et al., 2000 - [http://piat.org.nz/uploads/PIAT\\_content/pdfs/Fipronil%20Info/Tingle%20Fipronil%20Health%20and%20envi%20fx%20UK.pdf](http://piat.org.nz/uploads/PIAT_content/pdfs/Fipronil%20Info/Tingle%20Fipronil%20Health%20and%20envi%20fx%20UK.pdf); NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER, 2009).

Este inseticida é registrado para uso em diversas culturas agrícolas como algodão, cana-de-açúcar, eucalipto, milho e soja. Possui aplicação via solo, foliar, em tratamentos de sementes e por irrigação; para controle de bicudos, brocas, curuquerês, larvas alfinete, tripes e amplamente utilizado no combate de cupins e formigas cortadeiras. Além do uso agrícola, há também aplicabilidade em áreas urbanas para controle de baratas e formigas, como também de pulgas e carrapatos em animais domésticos (BRASIL, 2007; COUTINHO et al., 2005).

Este inseticida possui classe II nos dois parâmetros, sendo considerado muito perigoso ao meio ambiente a partir da classificação de periculosidade ambiental (BRASÍLIA, 2015) e altamente tóxico, de acordo com a classificação toxicológica da ANVISA (2007).

Os fenilpirazóis atuam principalmente no sistema nervoso central dos insetos, agindo sobre o receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA) bloqueando os canais de cloro. O GABA é responsável pela inibição da atividade neural ocasionando a prevenção de estímulos nervosos excessivos e evitando a hiperexcitabilidade do sistema nervoso. Com o bloqueio deste

sistema regulador, ocorre a hiperexcitação neural, paralisia e, posteriormente, morte do inseto (TINGLE et al., 2000).

Estudos apontam efeitos dos fenilpirazois em abelhas, tanto na híbrida *A. mellifera* africanizada quanto em espécies brasileiras. Oliver et al. (2015) observaram efeitos em *A. mellifera*, nas funções motoras e de locomoção, modificando seu comportamento quando exposto a classe de inseticida.

Em estudo com *S. postica*, Jacob et al. (2014) observaram, a partir dos corpos pedunculados, alterações celulares no núcleo e em diferentes organelas; sendo levantada a hipótese de apoptose ou necrose celular quando expostas a tratamentos com doses abaixo, igual e acima da DL<sub>50</sub> do inseticida fipronil.

Lourenço et al. (2012a, b) e Jacob et al. (2013) apontaram, respectivamente, que o fipronil é altamente tóxico para abelhas *M. scutellaris*, a partir dos dados de DL<sub>50</sub>, e para abelhas *S. postica*, com base nos dados de DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>. Os dados mostram valores de DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> inferiores nas abelhas brasileiras quando comparados aos obtidos para *A. mellifera* com o mesmo inseticida, deste modo as abelhas brasileiras apresentam maior sensibilidade do que a espécie modelo.

## **2.6 Mistura de agrotóxicos**

A associação de agrotóxicos, ou comumente conhecida como mistura de tanques, têm por finalidade a associação de agrotóxicos e afins no equipamento aplicador imediatamente antes a aplicação em campo. Sua utilização na agricultura está diretamente relacionada ao combate, em cultivos agrícolas, provenientes de plantas daninhas, pragas e até mesmo doenças; já que os agrotóxicos não possuem espectro de ação capaz de controlar este conjunto de problemas, principalmente por acometerem-se de forma simultânea, o emprego desta técnica mostrou-se uma alternativa em diversos países (CASTRO, 2009; GAZZIEIRO, 2015a).

Previamente ao ano de 1980 às indicações técnicas recomendavam a utilização de misturas de produtos, contudo, em 1985 a partir do Ministério da Agricultura e à ANDEF foram retiradas todas as instruções de uso e recomendações sobre mistura de tanque; sendo compreendida sua proibição na agricultura (GAZZIEIRO, 2015b; LIMA, 1997).

Entretanto, segundo Gazzieiro (2015a, b), através de um levantamento realizado em território nacional, constatou que 97% dos entrevistados utilizam mistura de tanque e, dentre estes, 95% variam de 2 a 5 agrotóxicos por tanque. Entretanto, poucos são os dados efetivos referentes aos resultados destas misturas determinando: efeitos sinérgicos, aditivos ou

antagônicos e quais são as concentrações que prejudicariam, efetivamente, as espécies não alvo quando expostas a combinação destes agrotóxicos.

Em resposta aos levantamentos realizados pelos pesquisadores, os órgãos governamentais atribuíram, pela Portaria nº 148, em 2017, os critérios relacionados a mistura de agrotóxicos. Pela recomendação, somente instituições públicas e privadas; cooperativas ou empresas registrantes de agrotóxicos podem encaminhar para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) os pedidos de inclusões nos portais governamentais com as precedidas pesquisas e comprovações em literatura; assim como a responsabilidade de risco referente a saúde humana e meio-ambiente sobre o mesmo (BRASIL, 2017).

Aquém destas determinações, a seguinte portaria determinou que informações como: ingredientes ativos; tipos de formulações; incompatibilidades físico-químicas; toxicidade e ecotoxicidade; precauções, cuidados e advertências de uso adicionais devem constar para inclusão; como também ambos os ingredientes devem estar cadastrados para a cultura de aplicação (BRASIL, 2017). Visto esta modificação, ocasionada tão somente pelos levantamentos bibliográficos na realidade brasileira, obtivemos modificação nos fatores e misturas que modificarão completamente a realidade agrícola pelos próximos anos.

Johnson (2015) relatou em uma revisão bibliográfica que há nas colônias diversas substâncias – carboidratos, fenóis e xenobióticos dos mais variados – ocasionando efeitos tóxicos nestes insetos. A combinação de inseticida tem sido utilizada na agricultura e no cultivo de cana-de-açúcar, principalmente para combate de nematoides e insetos-praga que causam grandes perdas na produção; Tavares et al. (2009) pesquisou a combinação de subdoses dos inseticidas fipronil, tiametoxam e imidacloprido para combate de nematoides no cultivo citado.

Na literatura, poucos são os dados referentes a combinação entre inseticidas principalmente quando relacionamos com os seus efeitos em insetos não alvos. Parmentier et al. (2014) avaliaram a toxicidade do inseticida neonicotinoide imidacloprido e do biopesticida formulado pelos esporos do fungo *Metarhizium anisopliae*, de forma isolada e combinada, em abelhas da espécie *Bombus terrestris* (Latreille, 1802). Estes observaram aumento da mortalidade e diminuição na reprodução na combinação destes agrotóxicos, comparado à aplicação isolada.

Earaerts et al. (2015) expuseram, em condições de semi-campo, zangões da espécie *B. terrestris*, aos inseticidas imidacloprido e *lambda* cialotrina, de forma combinada e isolada, e apontaram aumento dos efeitos de mortalidade, interferência no comportamento de forrageio

da espécie na forma combinada; demonstrando importância da compreensão dos efeitos dos inseticidas combinados.

### **2.7 Atividade Enzimática**

Os agrotóxicos, entre outros produtos químicos, podem alterar a expressão de enzimas, principalmente aquelas com papel importante nos processos de desintoxicação e identificação de substâncias endógenas e exógenas nos organismos (BARATA et al., 2005; STONE; JEPSON; LASKOWSKI, 2002; YU; ROBINSON; NATION, 1984).

Assim como na classe Mammalia, Aves e Pisces, as abelhas possuem complexos sistemas enzimáticos, vitais para a sobrevivência e envolvido em diversos processos como: digestão e absorção de nutrientes, transporte, estresse oxidativo e até mesmo a desintoxicação (GILBERT; WILKINSON, 1974; CHAPMAN, 2013).

Estes complexos enzimáticos participam de transformações metabólicas de xenobióticos, resultando em alterações de compostos químicos complexos em substâncias polares e/ou derivados solúveis em água, que posteriormente são excretados pelo organismo (ABOU-DONIA, 2014).

Há diversos metabólitos, produzidos até mesmo pelo próprio organismo, que podem resultar em alterações na atividade e estrutura celular, como também a inibição de algumas enzimas (KORLSLOOT; VAN GESTEL; VAN STRAALLEN, 2004). Esses metabólitos são chamados de peróxidos e radicais livres e são representados pelo:  $O_2$ ,  $OH^\cdot$ ,  $NO^\cdot$  e  $H_2N_2$ ; seu acúmulo leva a alterações nos organismos a partir dos fatores citados acima (BARREIROS; DAVID, 2006).

Portanto, a eliminação destes compostos é apontada como uma das mais importantes funções realizadas pelo sistema enzimático. Estas são realizadas por enzimas como catalase, carboxilesterases, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, dentre outras (BARREIROS; DAVID, 2006).

Importante enzima utilizada como biomarcador, a acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela hidrólise da acetilcolina, agindo nas sinapses colinérgicas e, desta forma, controlando e modulando as transmissões neurais (BADIOU; MELED; BELZUNCES, 2008; LUKASZEWICZ-HUSSAIN, 2010). Apontada como biomarcadora de toxicidade, ela possui importante papel na identificação de exposição a diversos produtos químicos neurotóxicos (FULTON; KEY, 2001; MATOZZO; TOMEI; MARIN, 2005; SOUZA, 2015).

Em insetos, as formas moleculares da AChE podem ser divididas em hidrofílica e anfifílica, representando respectivamente 3 a 6% e 94 a 97% da atividade desta enzima (BELZUNCES; TOUTANT; BOUNIAS, 1988; BADIOU; MELED; BELZUNCES, 2008). Em

abelhas, sua principal localização é no cérebro, especialmente nos olhos compostos, nas fibras visuais, e nos ocelos (KRAL, 1980; KRAL; SCHNEIDER, 1981; BADIOU; MELED; BELZUNCES, 2008).

Boily et al. (2013) analisaram a atividade enzimática da AChE em abelhas *A. mellifera* expostas a doses subletais dos inseticidas neonicotinoides imidacloprido e clotianidina, e ao herbicida glifosato; os resultados mostraram elevação desta atividade nos indivíduos expostos aos neonicotinoides e uma leve queda quando expostos ao herbicida glifosato.

Badiou; Meled; Belzunces (2008) expuseram abelhas *A. mellifera* a doses subletais do inseticida deltrametrina, pertencente à classe dos piretróides, e obtiveram resultados que indicam alterações na AChE quando expostas ao inseticida. Desta forma, dados referentes a diferentes substâncias químicas, principalmente em insetos benéficos e não-alvos, como as abelhas, são fatores de suma importância e de grande interesse.

Outra enzima analisada no mesmo trabalho foi a carboxilesterase (CaE), pertencente ao grupo enzimático das Carboxil Colinesterases ou CCEs. As CCEs são conhecidas por estarem envolvidas em processos de biossíntese, sinalização de genes, desintoxicação de xenobióticos e resistência metabólica a inseticidas (GILBERT; WILKINSON, 1974; DEBRAUWER; BELZUNCES, 2004; CLAUDIANOS et al., 2006).

As enzimas carboxilesterase (CaE) possuem diferentes isoformas, entretanto as mais comumente estudadas em abelhas são as isoformas CaE – 1, CaE - 2 e CaE – 3 e estão envolvidas em diversos processos metabólicos. Atribuída como fase I no processo de desintoxicação, principalmente de moléculas apolares, esta fase é responsável pela produção e neutralização de radicais livres e transformações de xenobióticos. Enzima atuante na inativação de xenobióticos, as ferramentas químicas utilizadas como a hidrólise e o sequestro destas substâncias através da ligação da enzima à região ativa do substrato, transformando este num complexo irreversível e inativo (YU; ROBINSON; NATION, 1984; STONE; JEPSON; LASKOWSKI, 2002; DARY et al., 1990).

Em espécies de vertebrados e invertebrados, a atividade da CaE ocorre em tecidos diversificados (LEINWEBER, 1987). Com importante ação de desintoxicação, a indução desta enzima é ressaltada como mecanismo envolvido na resistência da classe Insecta a inseticidas (TERRIERE, 1984; MAXWELL, 1992; GUNNING; MOORES; DEVONSHIRE, 1997).

A família das glutathione S-transferases (GSTs), enzimas de ampla diversidade em insetos, contribuem principalmente para a fase II do processo de desintoxicação. As enzimas

de fase II são encarregadas da solubilização e transporte dos produtos obtidos da fase I (BERENBAUM; JOHNSON, 2015).

Importante sub-classe de enzimas pela alta capacidade catalítica, as GSTs possuem inúmeras formas químicas em variados organismos (CLARK, 1989). Em insetos, a mesma é apontada como primordial na resistência a agrotóxicos e em abelhas localiza-se predominantemente no intestino (TERRIERE, 1984; HYNE; MAHER, 2003; DIAO et al., 2006).

Yu; Robinson; Nation (1984) expuseram abelhas *A. mellifera* a doses subletais do inseticida permetrina, um piretróide, o que ocasionou aumento na atividade enzimática tanto da CaE quanto da GST. Badiou-Bènèteau et al. (2012) também expuseram abelhas *A. mellifera* a doses subletais do inseticida tiametoxam, o que resultou em alterações nas diferentes isoformas das enzimas CaE e aumento na atividade de GST.

A partir dos dados apresentados, pudemos constatar que, as enzimas apresentam papel importante como biomarcadores, sendo assim, optamos por escolher uma enzima para cada região examinada no presente trabalho; desta forma, as informações que se seguem são justificativas para a escolha das enzimas AChE e CaE serem estudadas no cérebro como a GST no intestino.

Estas possuem como classificação: Reações de Fase I ou Pré-Sintética e Reações de Fase II ou Sintéticas ou de Conjugação. A Fase I responsável pela oxidação, redução e hidrólise modificam a estrutura química através da adição dos seguintes grupos funcionais: -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH ou -COOH. A Fase II é encarregada do processo de conjugação e, portanto, a geração de compostos altamente polarizados e hidrossolúveis com maior facilidade para excreção (BERENBAUM; JOHNSON, 2015; JOHNSON, 2015).

Os inseticidas estudados possuem como sítios de ação primário: receptores nicotínicos de acetilcolina – tiametoxam, e os canais de cloro, mediados pelo GABA – fipronil. Estes inseticidas atuam de maneira agonista em funções do sistema nervoso, sendo assim, optamos por investigar as enzimas AChE e CaE no cérebro.

Representante da Fase I, a enzima CaE, possui três isoformas principais estudadas em abelhas: CaE - 1, CaE - 2 e CaE - 3, sendo a última a escolhida para avaliação neste experimento pela experiência do laboratório de ecotoxicologia e conservação de abelhas, onde o trabalho foi desenvolvido, com esta isoforma. A CaE - 3 possui afinidade pelo substrato p-Nitrofenil Acetato, que foi utilizado como meio reacional de análise.



Representante da Fase II a enzima GST apresenta seis subfamílias funcionais na espécie *A. mellifera*, sendo comumente presente na classe dos insetos. Dentre estas subfamílias podemos citar a  $\Delta$  (delta) e  $\epsilon$  (épsilon) – em menor quantidade em abelhas e  $\Sigma$  (sigma), classe mais representativa neste inseto (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; FOURNIER et al., 1992; RANSON et al., 2004).

Portanto, a utilização de biomarcadores de toxicidade, tem o objetivo de auxiliar na compreensão dos efeitos toxicológicos dos inseticidas fipronil e tiametoxam, de forma isolada e combinada. O aumento dos estudos em espécies nativas, dentre estas *M. scutellaris*, visam auxiliar na elaboração de sistemas mais eficientes de avaliação de risco e proteção das abelhas.

Desta forma, a exposição desta espécie de abelhas aos inseticidas, de forma isolada, apresentaria alterações principalmente nas enzimas de desintoxicação CaE e GST e, para o inseticida fipronil, alterações na atividade de AChE. Já para a combinação, a exposição em menor tempo, já ocasionaria efeitos em todas as presentes enzimas, demonstrando maior toxicidade a esta combinação realizada em campo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAIS**

Avaliar efeitos dos inseticidas fipronil e tiametoxam, tanto na forma isolada como combinada, sobre a abelha brasileira *M. scutellaris* (Latreille, 1811), a partir de biomarcadores enzimáticos.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

1. Analisar os efeitos tóxicos a partir das concentrações subletais  $CL_{50/2}$  e  $CL_{50/5}$  por meio de métodos bioquímicos enzimáticos;
2. Avaliar as alterações nas atividades das enzimas Acetilcolinesterase e Carboxilesterase extraídos da cabeça e, Glutathione S-transferase obtida no intestino.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. Coleta das abelhas**

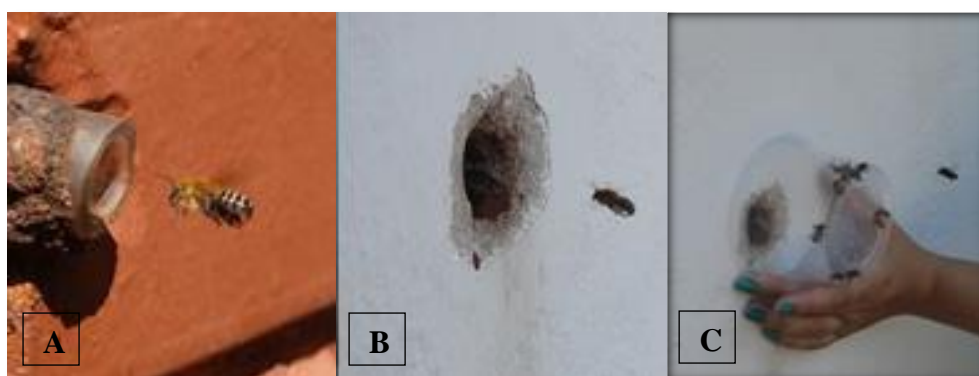
Abelhas campeiras da espécie *M. scutellaris* foram coletadas no meliponário do Centro de Estudo de Insetos Sociais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus Rio Claro (Figuras 4 A, B e C). O meliponário possui colônias de diferentes parentais genéticos, com estoque de alimentos e atividade de forrageamento constantes.

Figura 4: A- Meliponário do CEIS; B- Caixas de *M. scutellaris*; C- Entrada/Saída da colônia.



As coletas foram realizadas em três colônias distintas com o auxílio de gaiolas experimentais constituídas por potes plásticos de polipropileno de 250 mL previamente furados viabilizando a entrada de ar. Cada gaiola experimental foi posicionada na entrada/saída das colônias para coleta de 12 abelhas (Figuras 5 A, B e C). O alimento (açúcar cristal e água 1:1 m/v), com ou sem inseticidas, foi oferecido a partir de tubos plásticos de 2mL furados e acondicionados nas gaiolas experimentais.

Figura 5: A e B- Entrada/Saída de abelhas *M. scutellaris* da colônia; C- Gaiola de coleta posicionada na entrada/saída da colônia para coleta.



#### 4.2. Exposição das abelhas aos inseticidas

Os ensaios de exposição aos inseticidas foram realizados com base nas diretrizes internacionais da Organization for Economic Cooperation and Development 213 (OECD, 1998), com adaptações de temperatura para espécie *M. scutellaris*.

Os grupos experimentais expostos ao fipronil e tiametoxam, nas formas isoladas e combinadas, receberam dieta contendo o inseticida em concentrações subletais, portanto abaixo da concentração letal média ( $CL_{50}$ ), sendo o valor de  $CL_{50}$  dos inseticidas determinados para *M. scutellaris* por Lourenço et al. (2012b) e Miotelo et al. (2015).

O inseticida fipronil (produto técnico Sigma Aldrich com 95% de pureza, lote: 20060301) foi solubilizado em acetona e, posteriormente, sucessivas diluições foram realizadas

em xarope para obtenção das concentrações oferecidas às abelhas: 0,0056 ng i. a./ $\mu$ L (valor da  $CL_{50}$  dividido por dois) e 0,0022 ng i. a./ $\mu$ L (valor da  $CL_{50}$  dividido por cinco).

O inseticida tiametoxam (produto técnico Sigma Aldrich com 98,3% de pureza, lote: SGO8A003E) foi solubilizado, inicialmente, em acetona para posterior realização de sucessivas diluições no alimento até atingir as concentrações fornecidas às abelhas, sendo estas: 0,0226 ng i. a./ $\mu$ L ( $CL_{50}/2$ ) e 0,00906 ng i. a./ $\mu$ L ( $CL_{50}/5$ ).

Para combinação do fipronil e tiametoxam, realizou-se diluição de ambos os inseticidas, separadamente, até atingir as concentrações da  $CL_{50}$  e, em seguida, as soluções dos inseticidas foram misturadas - 10.000  $\mu$ L  $CL_{50}$  fipronil + 10.000  $\mu$ L  $CL_{50}$  tiametoxam determinando o grupo Fipronil  $CL_{50}/2$  + Tiametoxam  $CL_{50}/2$  e 4.000  $\mu$ L  $CL_{50}$  fipronil + 4.000  $\mu$ L  $CL_{50}$  tiametoxam + 12.000  $\mu$ L xarope determinando o grupo Fipronil  $CL_{50}/5$  + Tiametoxam  $CL_{50}/5$  - sendo ofertadas às abelhas *M. scutellaris*.

As abelhas do grupo Controle passaram pelos mesmos procedimentos experimentais que as demais, porém receberam alimento sem inseticida. As abelhas do grupo Controle Solvente tiveram acetona acrescida ao alimento na proporção de 1%, compatível com a maior quantidade de acetona utilizada nas diluições oferecidas.

Dessa forma, na tabela 1 estão resumidos os grupos experimentais que compuseram este trabalho.

Tabela 1: Resumo dos grupos experimentais de trabalho

| <b>Grupo experimental</b> | <b>Concentração de fipronil (ng i. a./<math>\mu</math>L)</b> | <b>Concentração de tiametoxam (ng i. a./<math>\mu</math>L)</b> |
|---------------------------|--|--|
| Controle                  | 0  | 0  |
| Controle Acetona          | 0  | 0  |
| Fipronil $CL_{50}/2$      | 0,0056   | 0  |
| Fipronil $CL_{50}/5$      | 0,0022   | 0  |
| Tiametoxam $CL_{50}/2$    | 0  | 0,0226   |
| Tiametoxam $CL_{50}/5$    | 0  | 0,00906  |
| Combinado $CL_{50}/2$     | 0,0056   | 0,0226   |
| Combinado $CL_{50}/5$     | 0,0022   | 0,00906  |

O experimento teve início a partir do momento em que as dietas foram oferecidas às abelhas de cada grupo experimental, sendo que estas ficaram disponíveis *ad libitum*. As gaiolas foram mantidas em estufa B.O.D à temperatura de  $28\pm 2^{\circ}C$  e umidade relativa de  $70\pm 10\%$ .

A obtenção do número amostral adequado foi baseada no método descritos nos trabalhos de Badiou-Bènèteau et al. (2012) e Carvalho et al. (2013); sendo considerado adequado para as posteriores análises. Cada grupo experimental foi composto de 3 repetições (uma repetição por colônia), dos quais foram coletadas 3 abelhas nos tempos de 1, 6, 12, 24, 48 e 96 horas após o oferecimento dos alimentos. Os indivíduos foram devidamente identificados e congelados inteiros em freezer -80°C até a dissecação para processamento e análise de dados.

#### **4.3. Extração enzimática das cabeças e intestinos**

As abelhas foram removidas do freezer -80°C e mantidas em gelo para a retirada do intestino e da cabeça. Com o auxílio de pinças e tesouras específicas para dissecação, foram seccionadas primeiramente a cabeça das abelhas, separando-a do restante do corpo; logo após, extraiu-se o intestino médio dos indivíduos puxando a última seção do gáster.

Os órgãos foram acondicionados em microtubos plásticos de 2mL, devidamente identificados. Para determinação da quantidade necessária de solução de extração (LS), cada tubo foi pesado previamente e posteriormente à deposição dos órgãos.

A solução de extração enzimática (LS), foi constituída por: Tampão da solução fosfato de sódio 40 mM e pH 7,4; Solução de Cloreto de Sódio 10 mM e 1% de Triton. Em cada tubo plástico foram adicionados solução tampão LS a 10% (m/v) dos órgãos dissecados (TAVARES et al., 2017).

Após a adição do tampão de extração, realizou-se a maceração das cabeças e dos intestinos com homogeneizador de amostras elétrico durante aproximadamente 30 segundos. Em seguida, os extratos brutos foram centrifugados por 20 minutos com uma rotação de 15.000g a 4°C. Posteriormente, houve a coleta e armazenamento dos sobrenadantes em freezer -20°C (BOLDYREV et al., 2001).

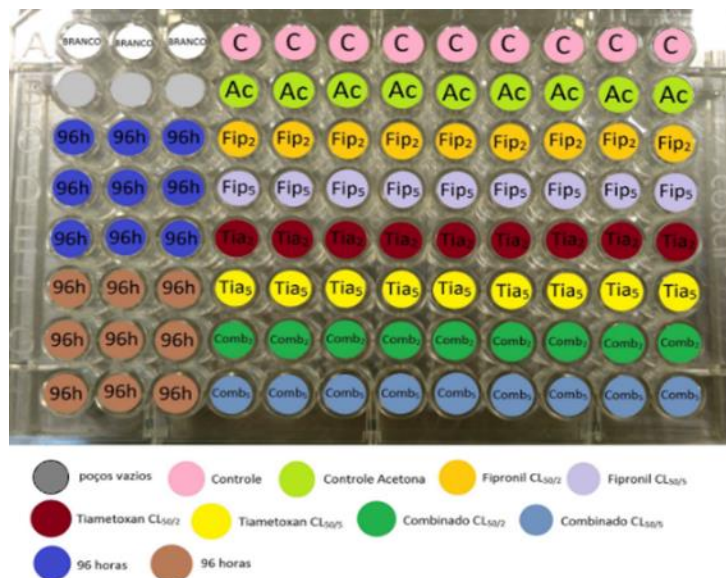
Os ensaios bioquímicos para análise enzimática foram baseados no método adotado por Carvalho et al. (2013). Nestes foram verificadas as atividades enzimáticas da acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase-3 (CaE-3) para o cérebro e da glutathione-S-transferase (GST) para o intestino.

#### **4.4. Ensaio de atividade enzimática**

As análises foram realizadas utilizando-se o espectrofotômetro leitor de microplacas (Figura 6) Molecular Devices modelo Versa Max® com auxílio do software de análise de dados Soft Max 6.3® e a temperatura mantida, durante as leituras, de 25±0,5°C.

Para cada tempo de análise e enzima avaliada, foram montadas microplacas as quais tiveram os grupos experimentais dispostos conforme a Figura 6.

Figura 6: Esquema de disposição dos extratos dos grupos experimentais em microplaca.

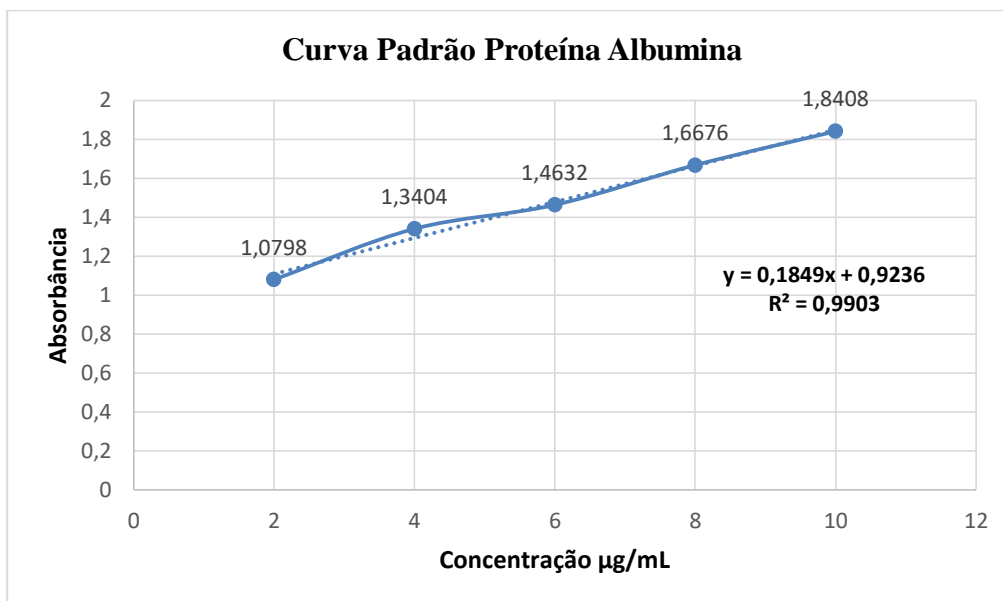


#### 4.4.1 Dosagem total de proteínas

Os teores de proteínas das amostras foram precedidos pela realização da Curva Padrão com reagente BSA (Figura 7) de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Através deste método, foi obtida uma curva-padrão ( $y = 0,1849 x + 0,9236$ ), onde a incógnita  $y$  determina a quantificação de proteínas totais em mg/mL e a incógnita  $x$  representa a variação da absorbância por minuto ( $\Delta Abs$ ), sendo possível, desta forma, mensurar a quantidade total de proteínas para cada grupo experimental de trabalho.

Para análise das amostras foram utilizados 2  $\mu$ L de extrato dos órgãos por poço, adicionando-se 198  $\mu$ L do reagente de Bradford Protein Assay (Bio-Rad), este constituído de água destilada e reativo de Bradford concentrado (4:1 v/v); aguardou-se reação por 5 minutos e executou-se as medições em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

Figura 7: Curva Padrão Albumina Bovina (95%) de acordo com o método descrito por Bradford (1976).



#### 4.4.2 Acetilcolinesterase – AChE

A determinação da atividade de AChE foi feita em uma solução composta por: tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7; 1,5 mM de DTNB; 0,3 mM de AcSCH.I dispostas em cada célula da microplaca (TAVARES et al., 2017).

Para análise foram adicionados 5 µL de solução LS para amostra do branco, e 5 µL de cada respectivo extrato da cabeça, sendo estas completadas com 195 µL da solução descrita acima. A reação foi monitorada a 412 nm de comprimento de onda no espectrofotômetro.

#### 4.4.3 Carboxilesterase 3 - CaE-3

Para presente enzima, utilizaram-se os produtos de reação: tampão fosfato de sódio 100 mM e pH 7; 0,01 mM BW284c51, com intuito de inibição da AChE e 0,1 mM de p-NPA tendo maior afinidade com a isoforma de CaE-3(TAVARES et al., 2017).

Para análise foram adicionados na amostra do branco 5 µL de solução LS, e nas demais amostras 5 µL do respectivo extrato da cabeça sendo estas completadas com 195 µL da solução descrita acima. A reação foi monitorada a 410 nm de comprimento de onda.

#### 4.4.4 Glutationa S-Transferase – GST

Para avaliação das amostras, preparou-se um meio reacional composto por tampão fosfato de sódio/fosfato de potássio 100 mM pH 7,4; 1 mM de EDTA; 2,5 mM de GSH e 1 mM CDNB (TAVARES et al., 2017).

Para análise foram adicionados 5 µL de solução LS para amostra do branco, e 5 µL do respectivo extrato do intestino sendo estas completadas com 195 µL da solução descrita acima para os demais poços. A reação foi monitorada a 340 nm de comprimento de onda.

#### **4.5 Delineamento Experimental e Análise dos dados**

O delineamento experimental foi de blocos casualizados com quatro tratamentos diferentes com três diferentes colônias e três repetições; sendo que os resultados obtidos em absorvância por minuto ( $\Delta$ Abs) foram utilizados para estimar a atividade tecidual ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) e atividade específica ( $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína).

Os dados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism® 7.0. (GRAPHPAD PRISM SOFTWARE, 2016). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e logo após, os resultados foram comparados estatisticamente utilizado o teste Mann – Whitney; Kruskal – Wallis, sendo os valores de  $p \leq 0,05$  considerados significativos.

### **5. RESULTADOS**

Os dados obtidos demonstraram que as doses subletais dos inseticidas fipronil (0,0056 ng de i.a./µL e 0,0022 ng de i.a./µL), tiametoxam (0,0226 ng de i.a./µL e 0,00906 ng de i.a./µL) e suas combinações foram capazes de induzir alterações na atividade das enzimas AChE, CaE-3 na cabeça e GST no intestino em diferentes tempos de exposição.

Nos Apêndices A, B e C estão resumidas as atividades teciduais e específicas das enzimas avaliadas.

#### **5.1 Acetilcolinesterase**

O inseticida fipronil (Figura 8) induziu alterações na atividade tecidual nos tempos de 1, 6, 12 e 96 horas. No tempo de 1 hora observou-se aumento, em relação grupo controle, da atividade tecidual nos grupos expostos CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5 (19,63 e 22,87  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido, respectivamente). Já em 6 horas, as abelhas expostas as concentrações CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5 apresentaram diminuição da AChE, comparativamente ao controle, apresentando respectivamente os valores de 9,76  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  e 8,35  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido. Para o grupo CL<sub>50</sub>/2, a atividade tecidual de AChE diminuiu, ainda, em 12 horas de exposição (7,92  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ). Para 96 horas foram observados aumento nos grupos expostos à CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, quando comparado ao controle (18,11 e 14,98  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ , respectivamente).

Em relação a atividade específica (Figura 9) na região da cabeça, o fipronil induziu a alterações significativas em comparação com o controle, sendo que as duas concentrações levaram a uma diminuição desta atividade em 6 horas (7,68 para CL<sub>50</sub>/2 e 6,64 para CL<sub>50</sub>/5

nmol/min/mg de proteína), enquanto que a CL<sub>50</sub>/5 ocasionou diminuição em 96 horas (13,17 nmol/min/mg de proteína).

Figura 8: Atividade tecidual da acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de fipronil (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

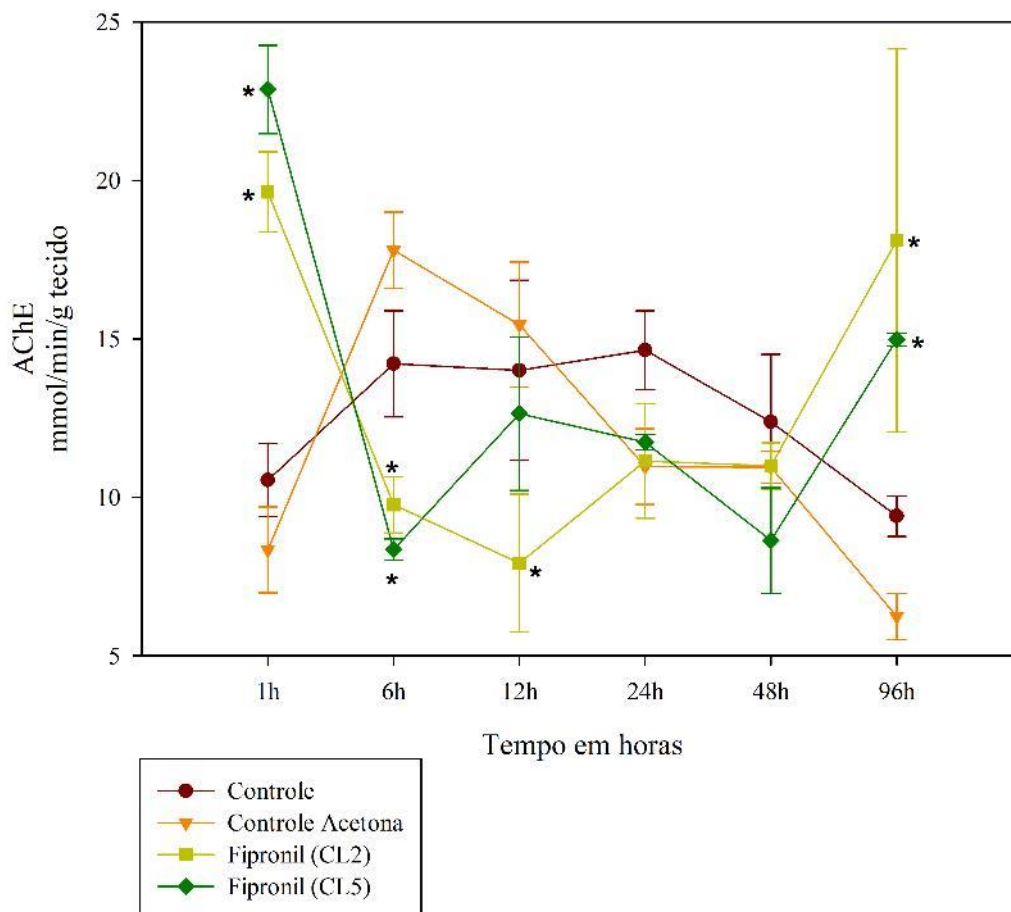
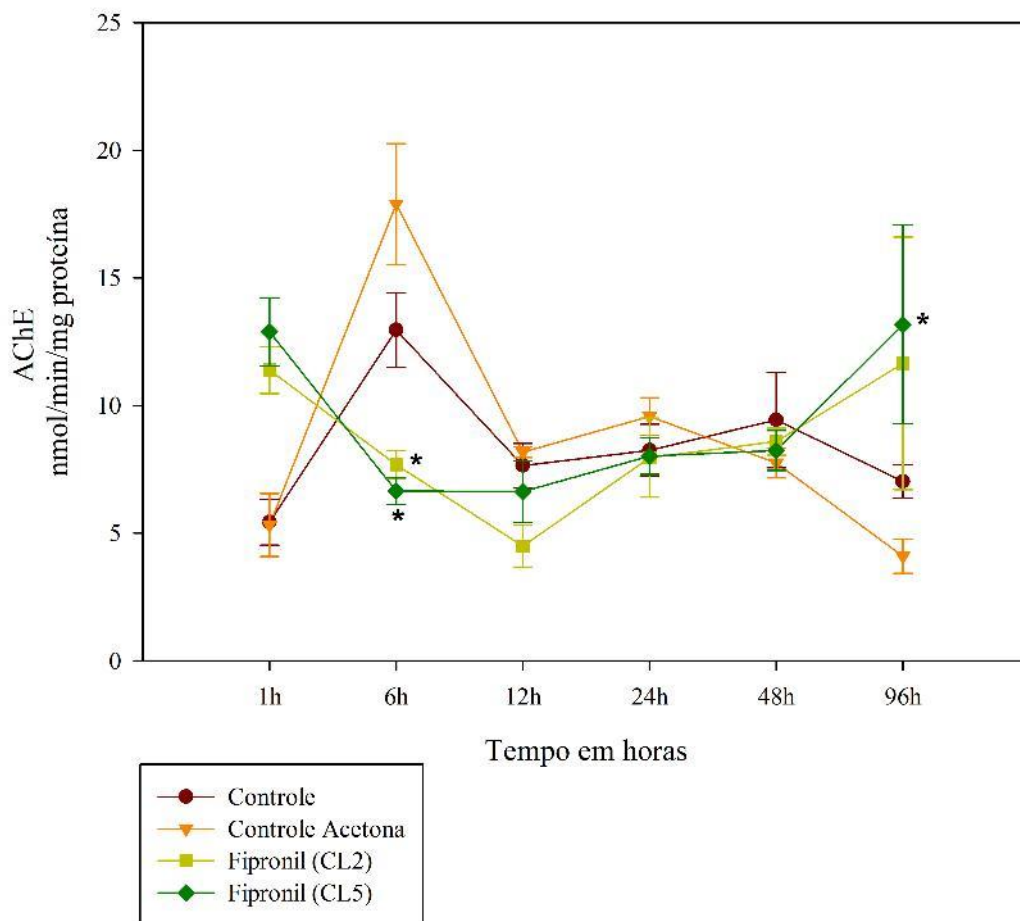




Figura 9: Atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de fipronil (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.



Identificou-se alterações na atividade enzimática para abelhas expostas ao inseticida tiametoxam para os tempos de 6, 12, 24 e 96 horas. No presente inseticida (Figura 10), somente os grupos expostos obtiveram significância na atividade tecidual.

Em 24 horas o grupo exposto ao tiametoxam na concentração CL<sub>50</sub>/5 apresentou aumento significativo da atividade tecidual de AChE em comparação ao grupo controle (9,97  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido). No tempo de 6 horas foram observadas diminuições na atividade da AChE para as duas concentrações de tiametoxam em relação ao grupo controle, sendo 8,59  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido para CL<sub>50</sub>/2 e 8,92  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido para CL<sub>50</sub>/5. Entretanto em 96

horas, para as ambas concentrações, notou-se elevação significativa na atividade tecidual representada por 18,29 e 21,33  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido, em comparação com o controle.

Apenas as abelhas expostas a  $\text{CL}_{50}/5$  de tiametoxam tiveram alteração na atividade específica de AChE que foi de 18,97  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, comparativamente superior à média do grupo controle que foi de 12,37  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína (Figura 11).

Figura 10: Atividade tecidual da acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de tiametoxam ( $\text{CL}_{50}/2$  e  $\text{CL}_{50}/5$ ). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam  $\text{CL}_{50}/2$  e  $\text{CL}_{50}/5$ , respectivamente.

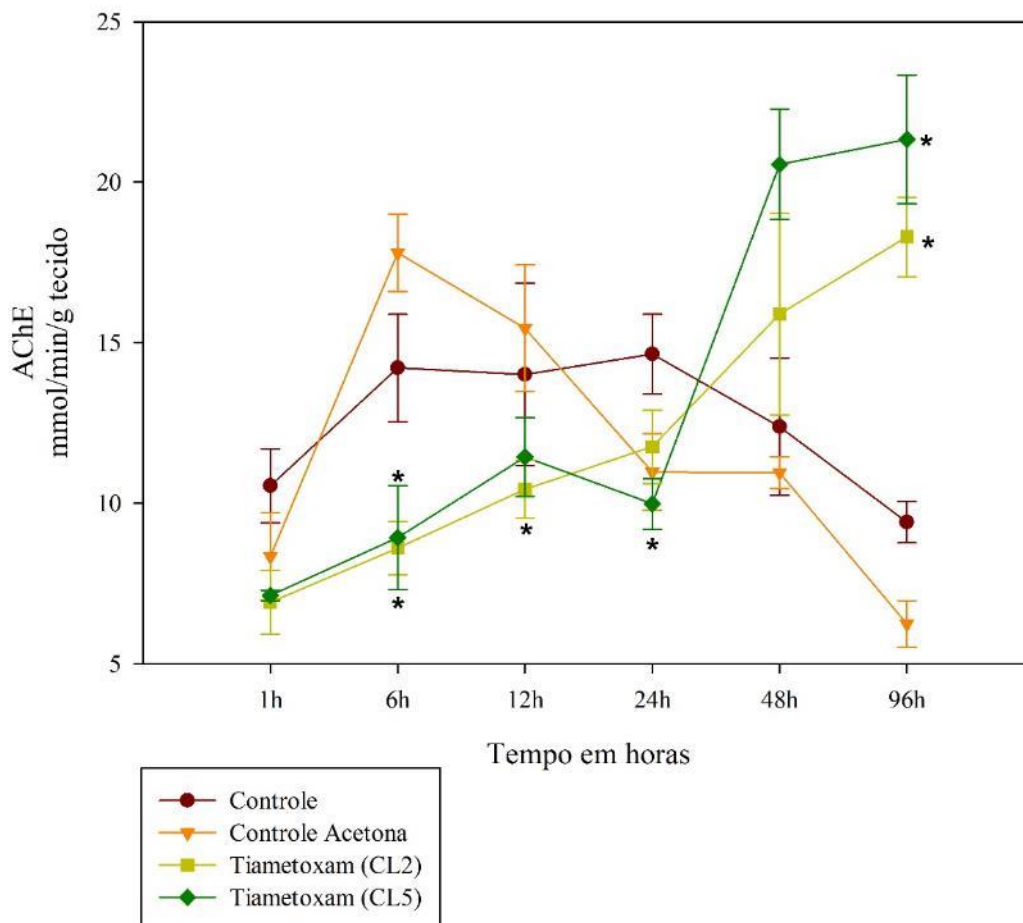
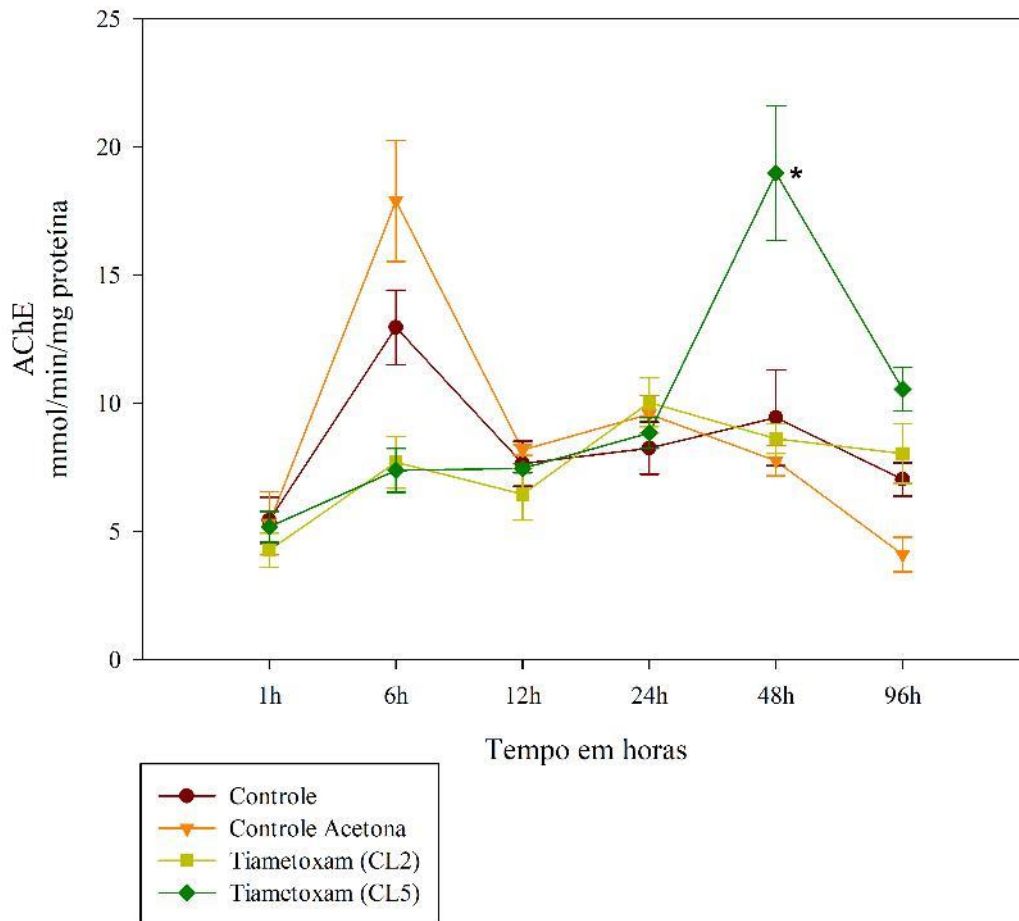


Figura 11: Atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de tiametoxam (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.



As abelhas expostas a combinação dos inseticidas em questão apresentaram alterações nas atividades teciduais nos tempos de 6, 48 e 96 horas (Figura 12).

Em 6 horas pode-se observar diminuição significativa na atividade dos grupos Combinado CL<sub>50</sub>/2 (8,75  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido) e Combinado CL<sub>50</sub>/5 (9,02  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido), comparativamente ao controle (14,21  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido). Em 48 horas constatou-se aumento na atividade tecidual de AChE, em relação ao controle, para o grupo exposto a CL<sub>50</sub>/5 (9,08  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido). De forma díspar, após 96 horas de exposição, os grupos expostos às duas concentrações obtiveram aumento na atividade tecidual representados por 22,47  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido para Combinado CL<sub>50</sub>/2 e por 20,07  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido para Combinado CL<sub>50</sub>/5.

Considerando a atividade específica (Figura 13) de AChE para os inseticidas quando combinados, observou-se alterações para os tempos de 6 e 96 horas de exposição. Em 6 horas, houve diminuição da atividade para grupo Combinado CL<sub>50</sub>/2 (7,60 nmol/min/mg de proteína); já em 96 horas verificou-se o aumento da atividade para o grupo Combinado CL<sub>50</sub>/5 (39,93 nmol/min/mg de proteína), ambos tiveram sua atividade comparada ao grupo controle.

Figura 12: Atividade tecidual da acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de forma combinada (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade de tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

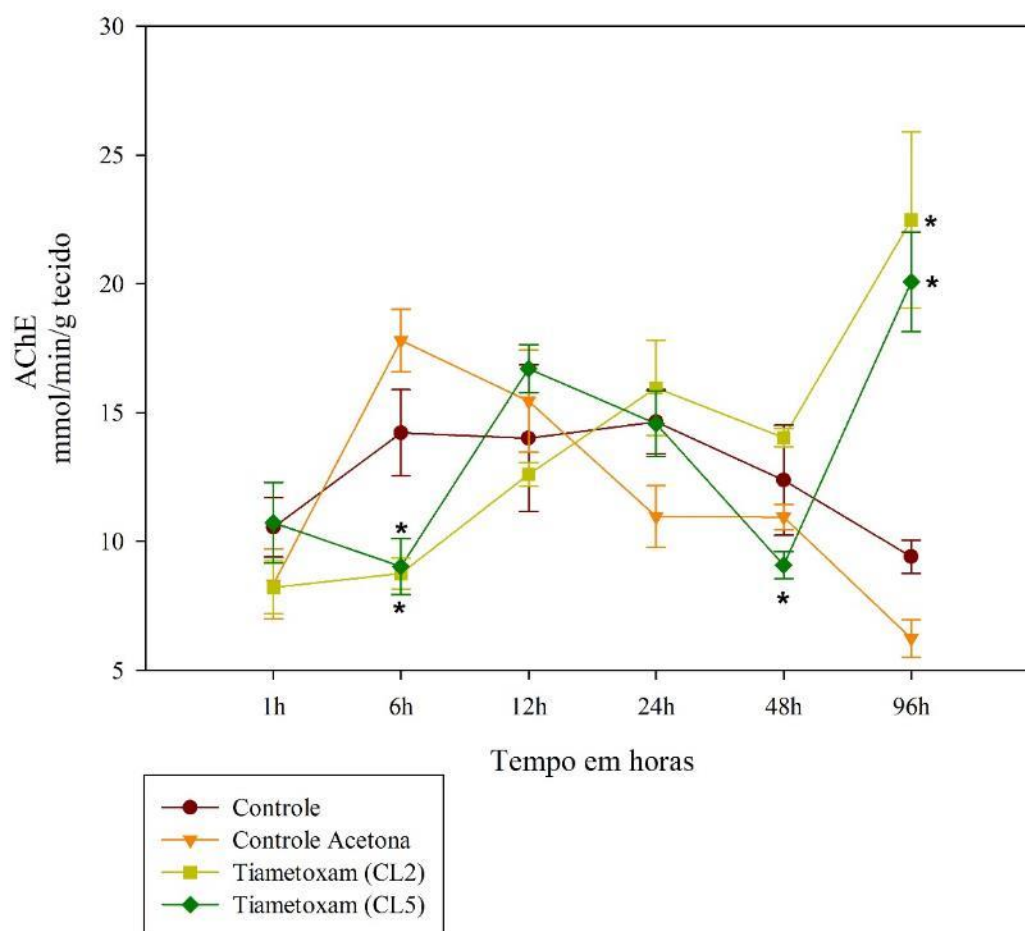
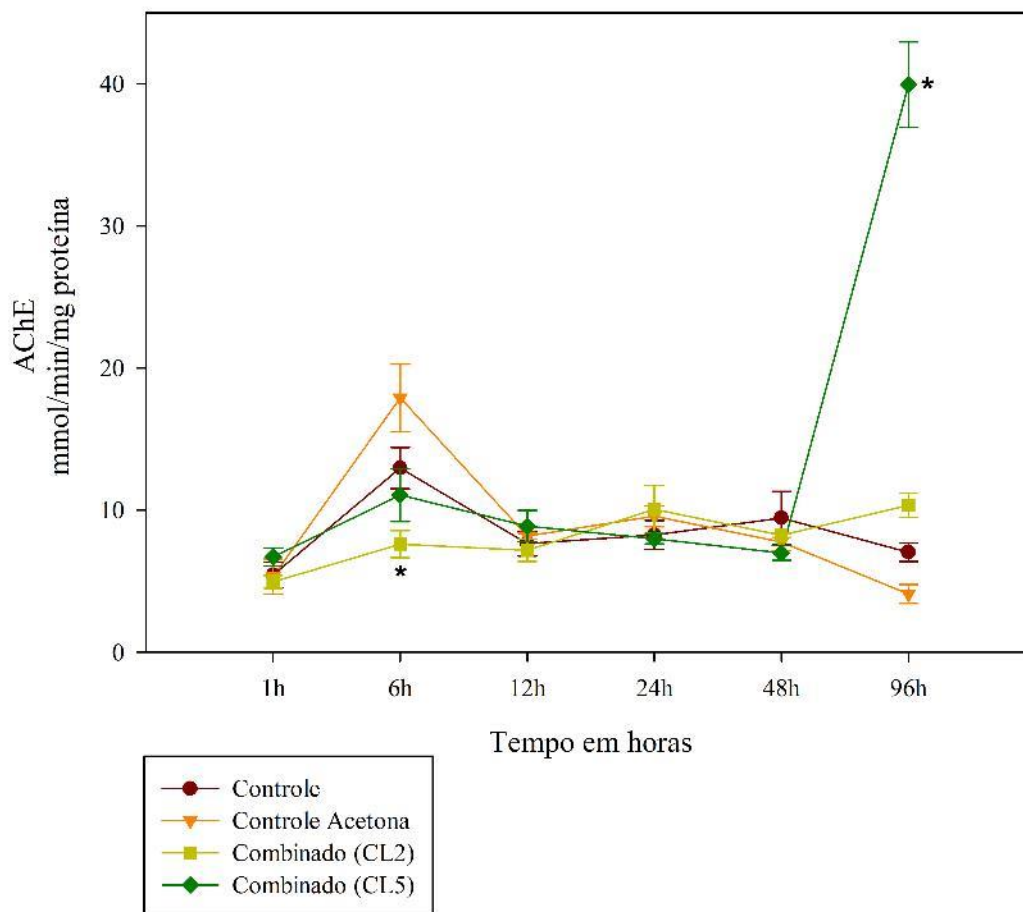


Figura 13: Atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de forma combinada (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade de proteína, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.



### 5.2 Carboxilesterase-3

No presente trabalho, foram analisadas as reações da enzima CaE na isoforma 3 a partir das cabeças da espécie *M. scutellaris*. Os resultados obtidos estão evidenciados na Figura 14, Figura 16 e Figura 18 para atividade tecidual e Figuras 15, 17 e 19 para atividade específica.

Analisando-se a exposição ao fipronil individualmente, após 12 horas foram observadas diminuição na atividade tecidual da CaE-3 com valor de 0,66  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  para o grupo exposto a CL<sub>50</sub>/2. Em 96 horas a mesma concentração levou a um aumento na atividade (2,83  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ), em relação ao controle.

Diferente do mostrado para a atividade tecidual, o fipronil não ocasionou diferenças significativas nas atividades específicas dos diferentes grupos experimentais para CaE-3.

Figura 14: Atividade tecidual da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de fipronil (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

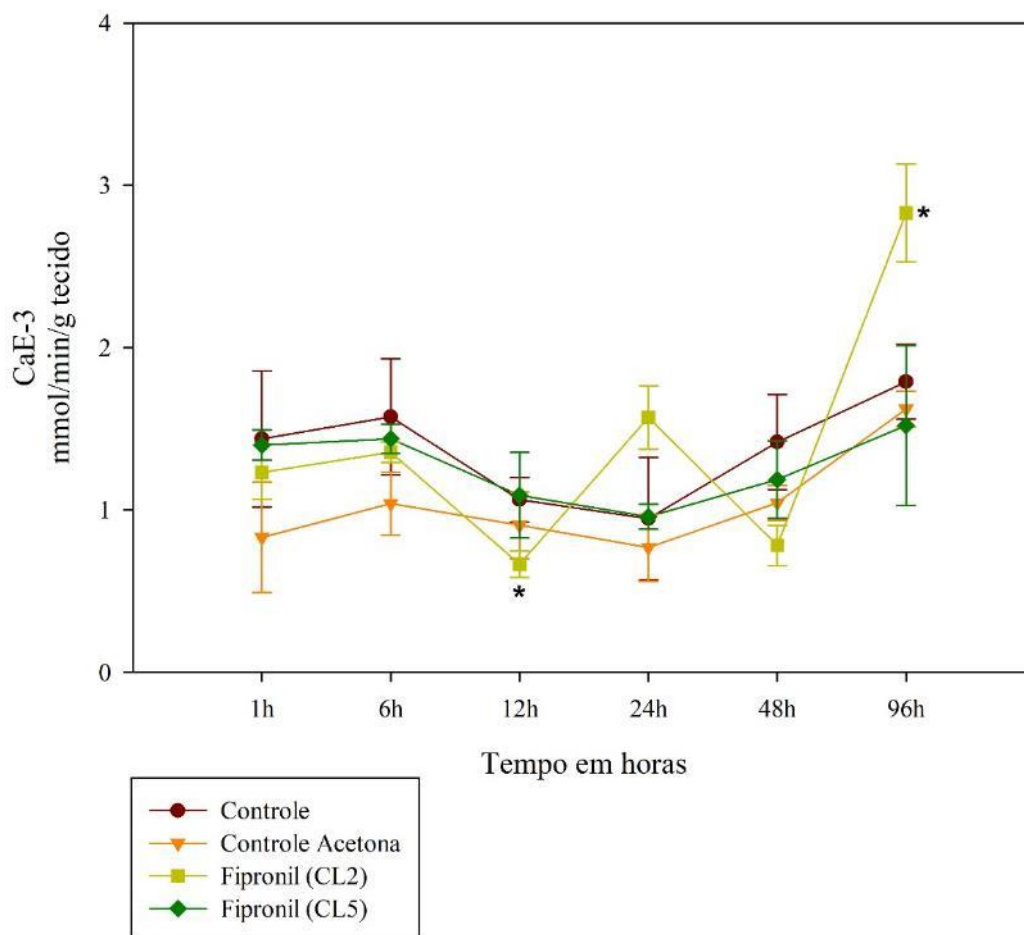
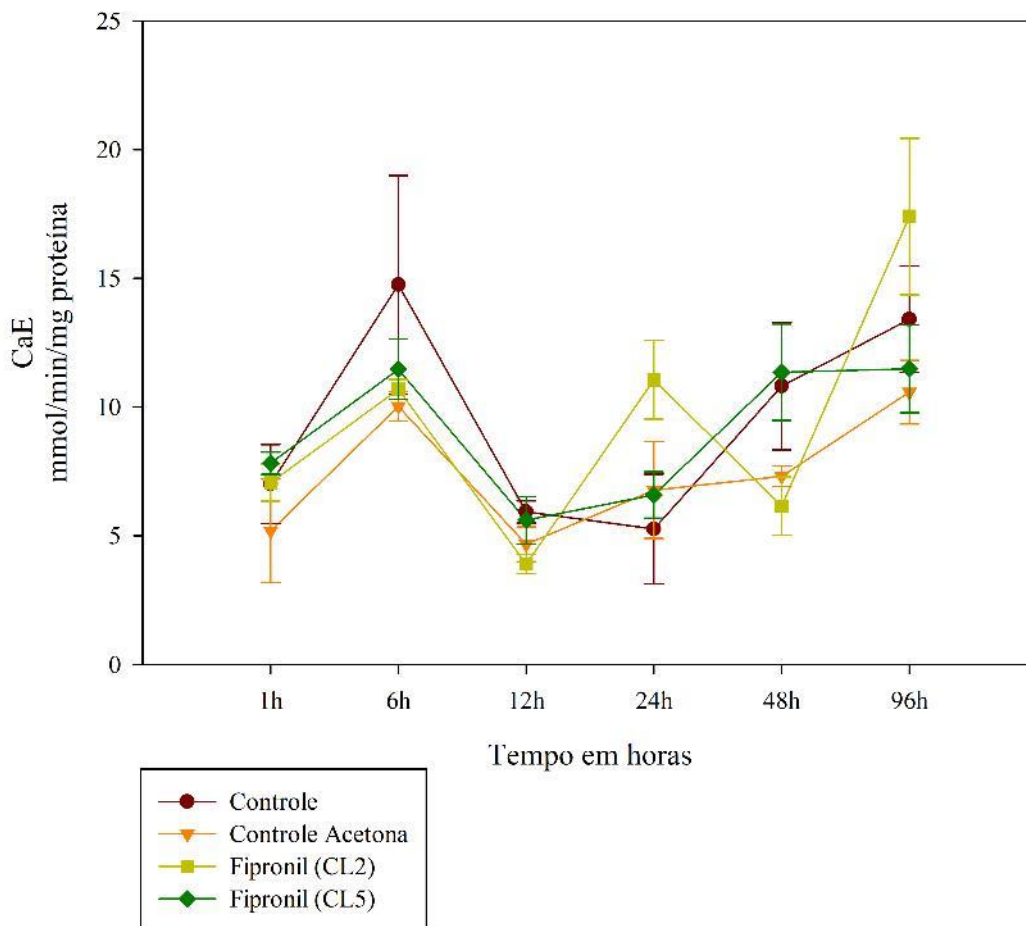


Figura 15: Atividade específica da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de fipronil (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína e as siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.



A exposição às concentrações CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5 do inseticida tiametoxam isoladamente (Figuras 16 e 17), não ocasionou diferenças estatísticas em nenhum dos tempos de exposição, comparativamente ao grupo controle; tanto para a atividade tecidual quanto para a atividade específica de CaE na isoforma 3.

Figura 16: Atividade tecidual da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de tiametoxam (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido e as siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

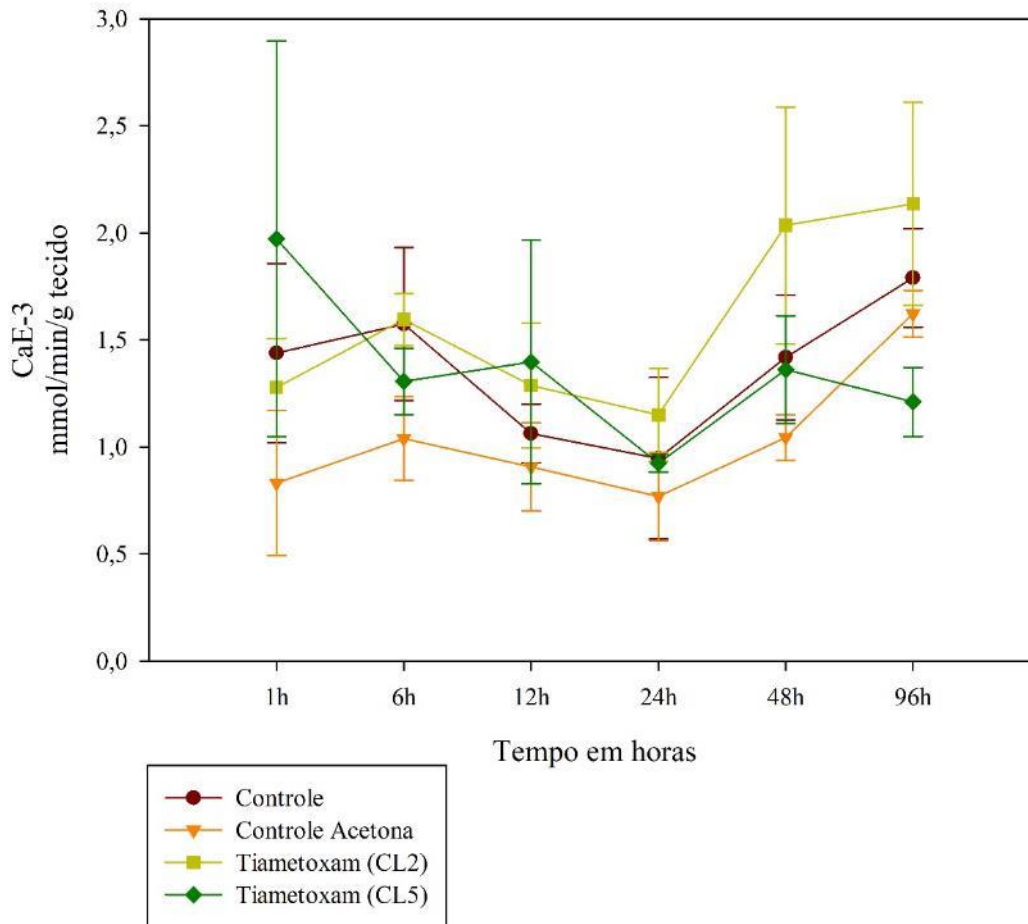
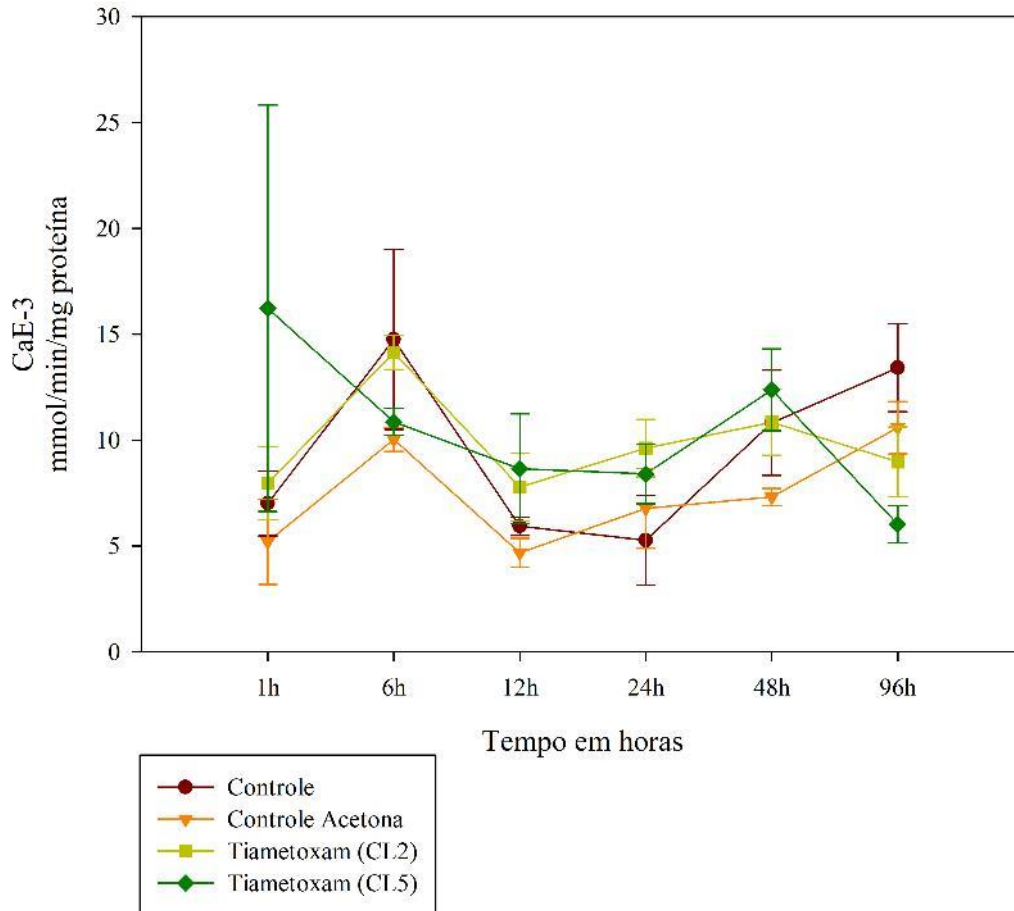




Figura 17: Atividade específica da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de tiametoxam (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína e as siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.



Já no grupo de abelhas expostas a combinação dos inseticidas, os resultados mostraram alterações de atividade somente em 6 horas de exposição (Figura 18). Neste tempo, o grupo Combinado CL<sub>50</sub>/5 apresentou valor de 0,74  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido, comparativamente inferior ao valor tecidual do grupo controle de 1,57  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ . Porém, para a atividade específica, não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais em nenhum dos tempos de exposição (Figura 19).

Figura 18: Atividade tecidual da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de forma combinada (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

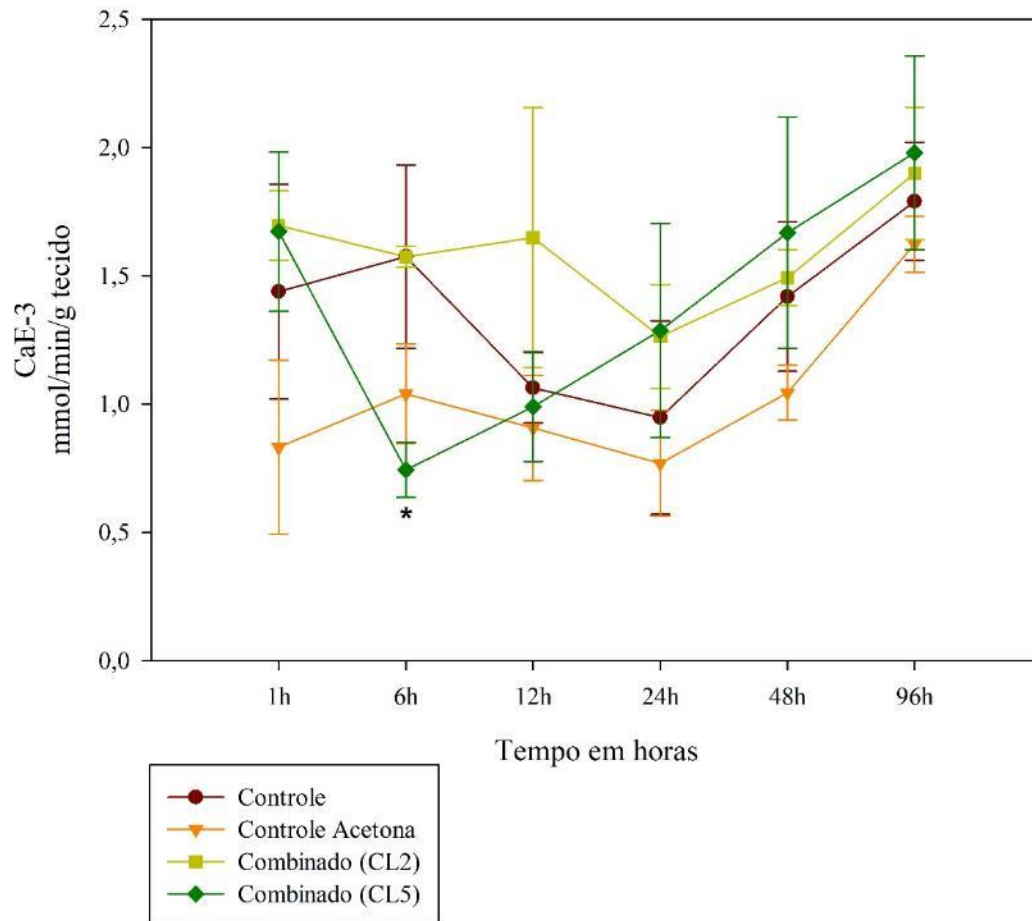
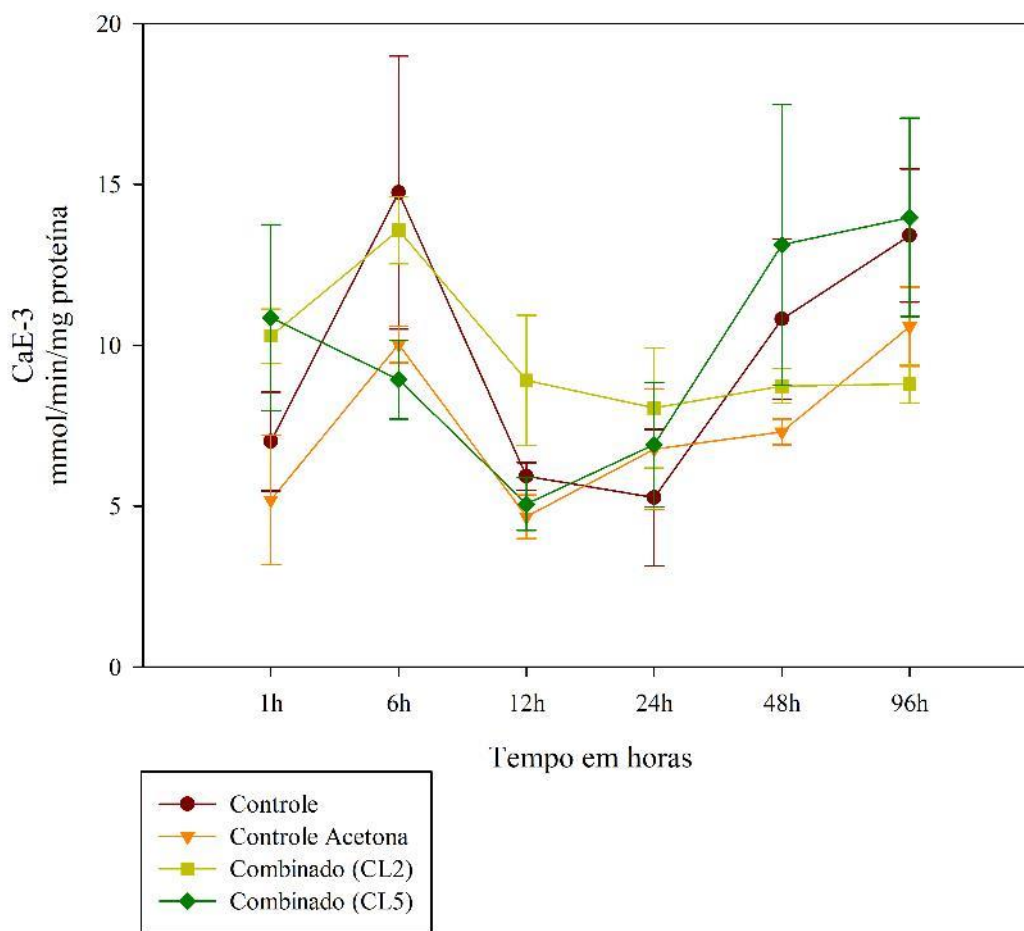


Figura 19: Atividade específica da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de forma combinada (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína e as siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.



### 5.3 Glutathiona S-transferase

Os resultados da enzima GST nos intestinos das abelhas estão expressos nas figuras 20, 22 e 24 para atividade tecidual e figuras 21, 23 e 25 de atividade específica.

Os resultados obtidos da exposição ao inseticida fipronil (Figura 20) mostraram alterações na atividade tecidual de GST somente nos tempos de 1 e 96 horas. Em 1 hora, em comparação ao grupo controle, notou-se o aumento da atividade de GST para o grupo controle acetona (19,48  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido) e diminuição no grupo exposto CL<sub>50</sub>/5 (8,02  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido). Entretanto, em 96 horas, houve o aumento na atividade tecidual em ambos os grupos expostos ao fipronil quando comparados ao controle, sendo 17,28  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  para CL<sub>50</sub>/2 e

28,49  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  para  $\text{CL}_{50}/5$ . Porém, para a atividade específica, não houve diferença significativa dos grupos experimentais em relação ao grupo controle (Figura 21).

Figura 20: Atividade tecidual da glutathiona S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de fipronil ( $\text{CL}_{50}/2$  e  $\text{CL}_{50}/5$ ). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam  $\text{CL}_{50}/2$  e  $\text{CL}_{50}/5$ , respectivamente.

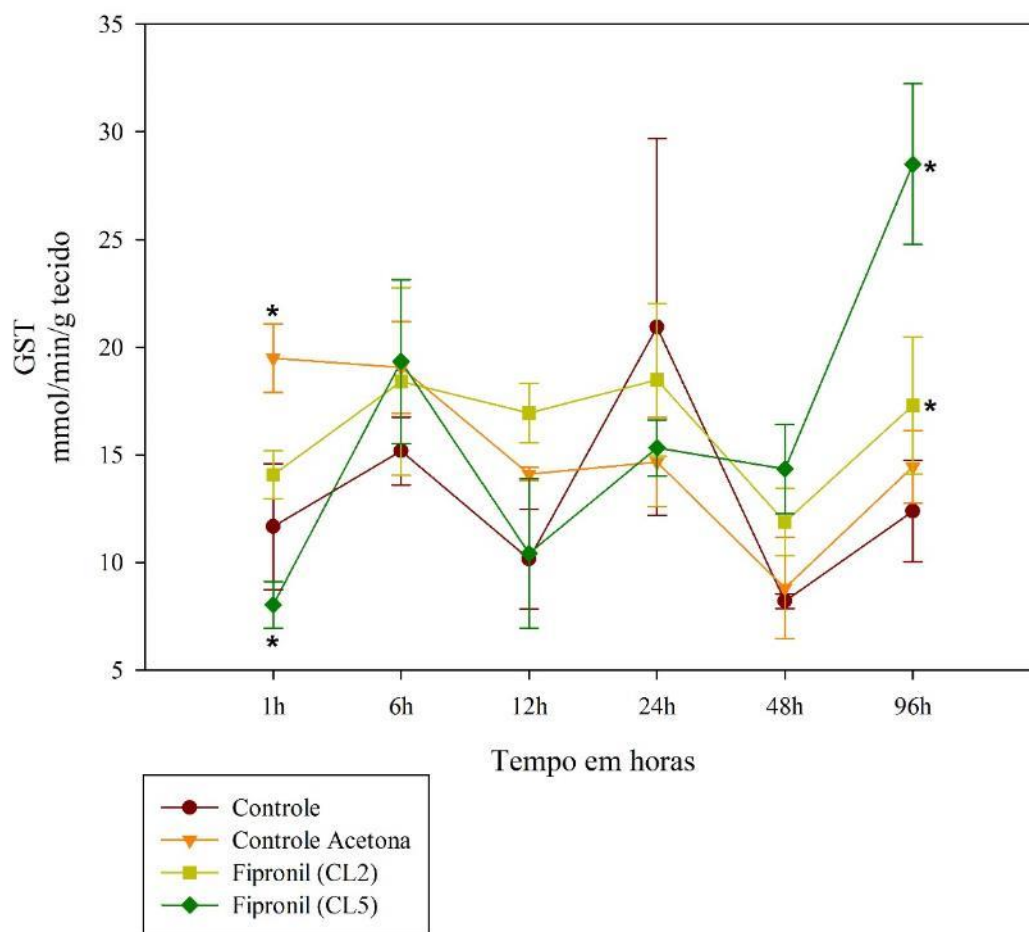
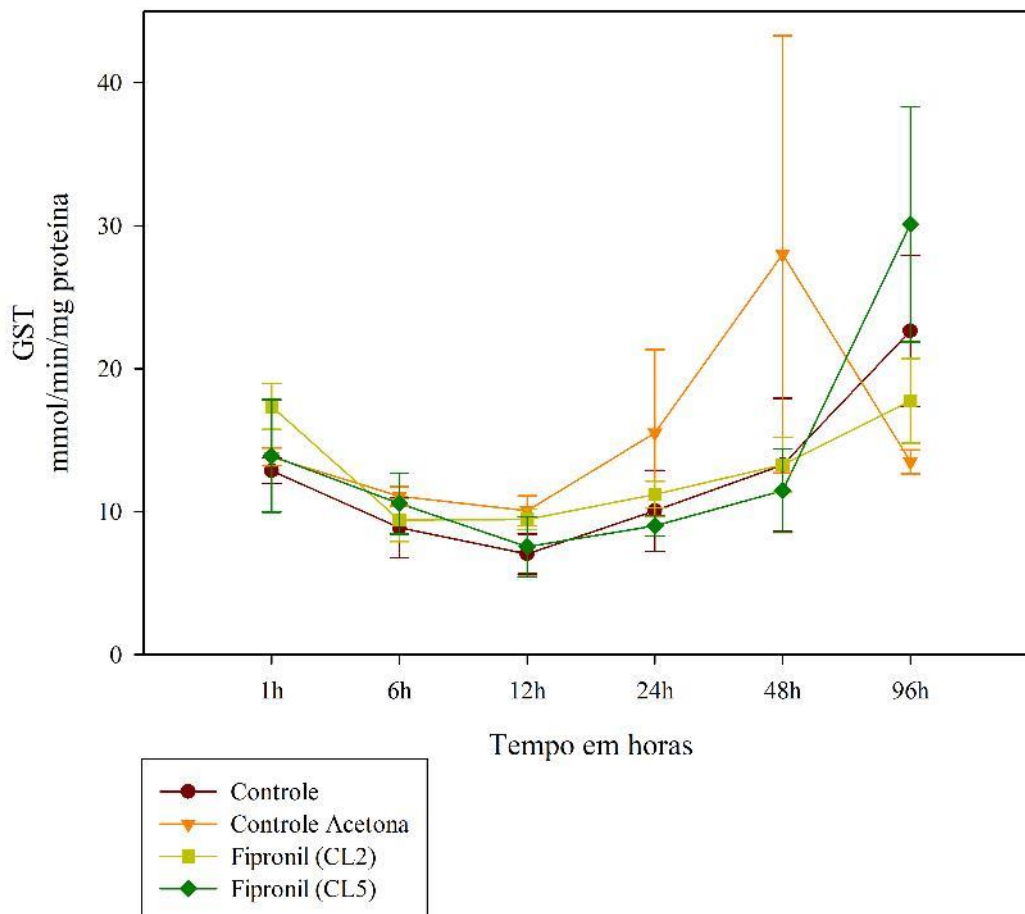


Figura 21: Atividade específica da glutatona S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de fipronil (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína e as siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.



Identificou-se alterações na atividade tecidual de GST para abelhas tratadas com o inseticida tiametoxam (Figura 22) para os tempos de 1, 6 e 12 horas. Transcorrida 1 hora de exposição, foi observado aumento na atividade da GST para o grupo controle acetona em relação ao controle (19,48  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido). Em 6 horas verificou-se aumento da atividade tecidual para os grupos expostos ao tiametoxam nas concentrações de CL<sub>50</sub>/2 (19,46  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido) e CL<sub>50</sub>/5 (31,13  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido) em comparação com o grupo controle. Entretanto, para o tempo de exposição de 12 horas, o aumento da atividade tecidual de GST foi mantido somente foi observado apenas para o grupo exposto CL<sub>50</sub>/5 (18,78  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido) em relação ao controle.

A atividade específica da GST, não mostrou alteração significativa entre os grupos experimentais e o controle para nenhum dos tempos avaliados (Figura 23).

Figura 22: Atividade tecidual da glutatona S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de tiametoxam (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

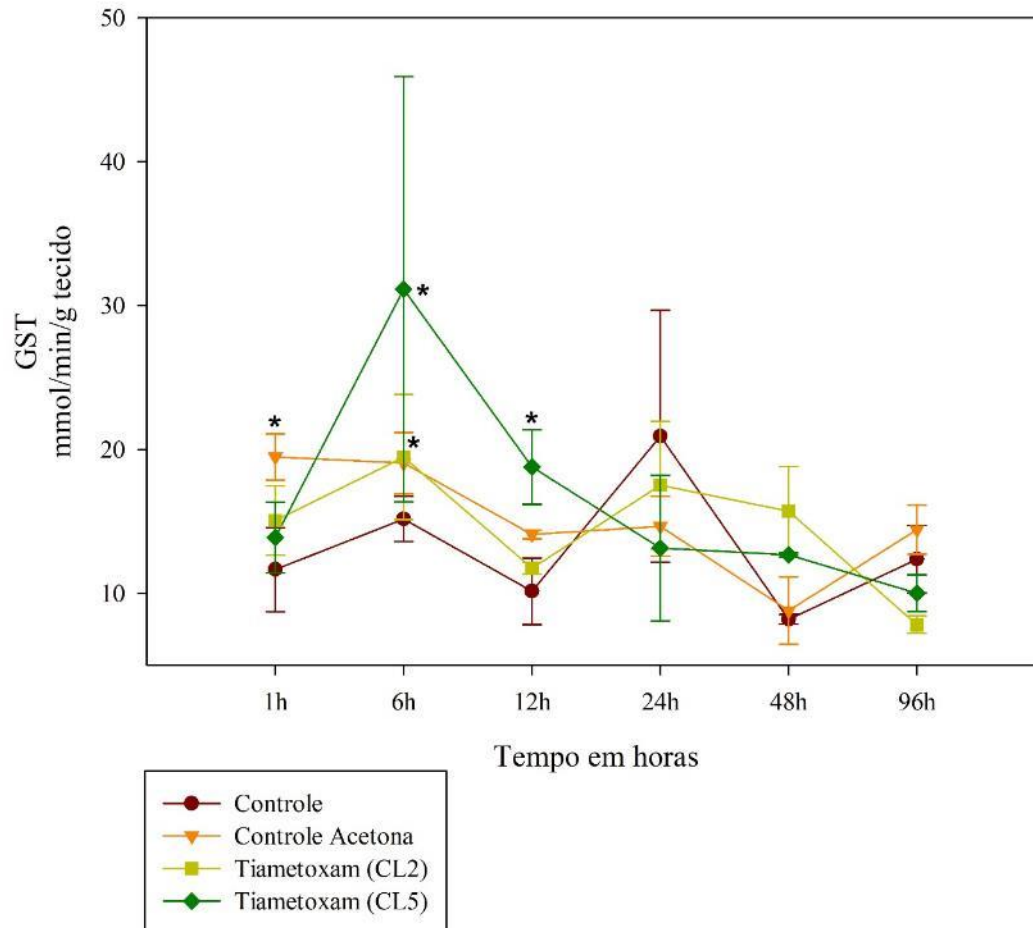
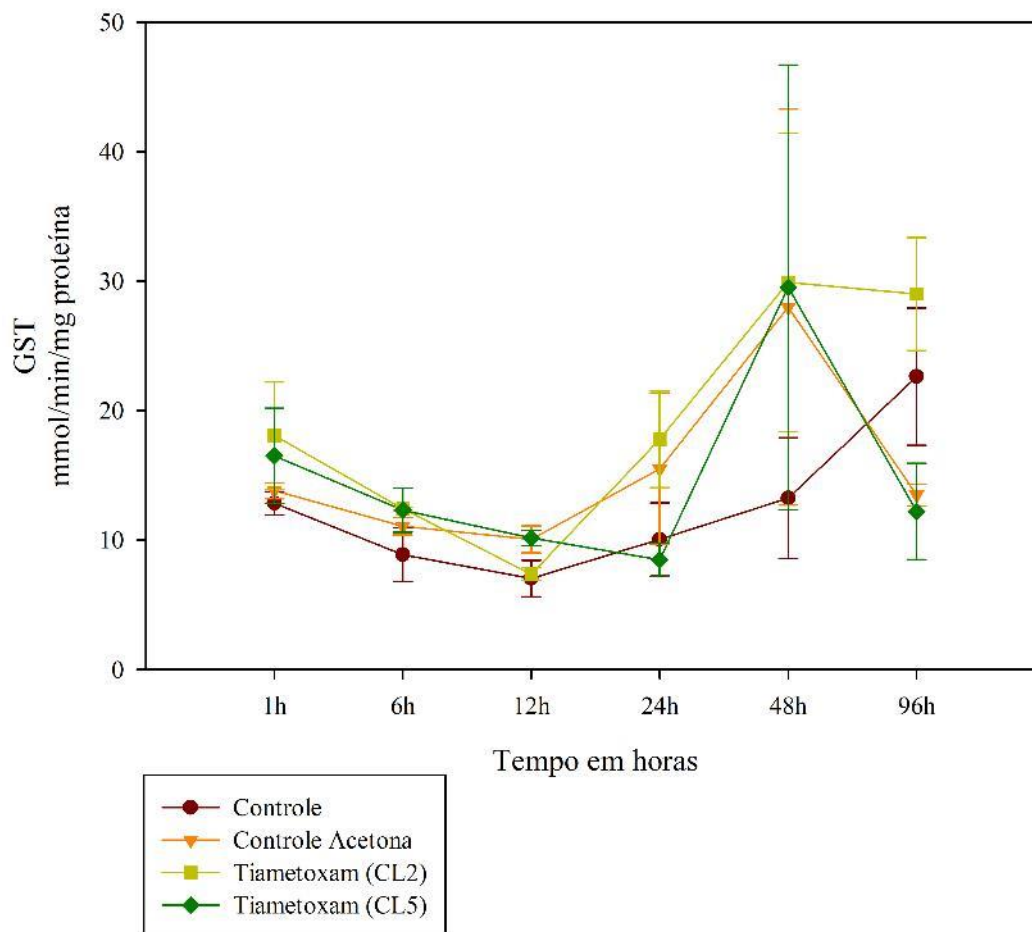


Figura 23: Atividade específica da glutatona S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de fipronil (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína e as siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.



Já os grupos de abelhas que foram expostas à combinação dos inseticidas apresentaram alterações em quase todos os tempos avaliados (Figura 24). Pode-se observar aumento significativo na atividade tecidual da GST no grupo Combinado CL<sub>50</sub>/5 (médias 29,07 e 19,01  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido) em 1 e 6 horas e no grupo Controle acetona (média 19,48  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido) em 1 hora, em relação ao controle. Em 48 e 96 horas, somente foi constatado aumento da atividade tecidual desta enzima no grupo Combinado CL<sub>50</sub>/2, demonstrada pelas médias 24,66 e 18,61  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido, respectivamente, comparados ao grupo controle.

Contudo, a atividade específica da enzima GST para a combinação dos inseticidas não mostrou-se significativa quando comparados os grupos expostos com o grupo Controle, divergindo do encontrado para a atividade tecidual (Figura 25).

Figura 24: Atividade tecidual da glutatona S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de forma combinada (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.

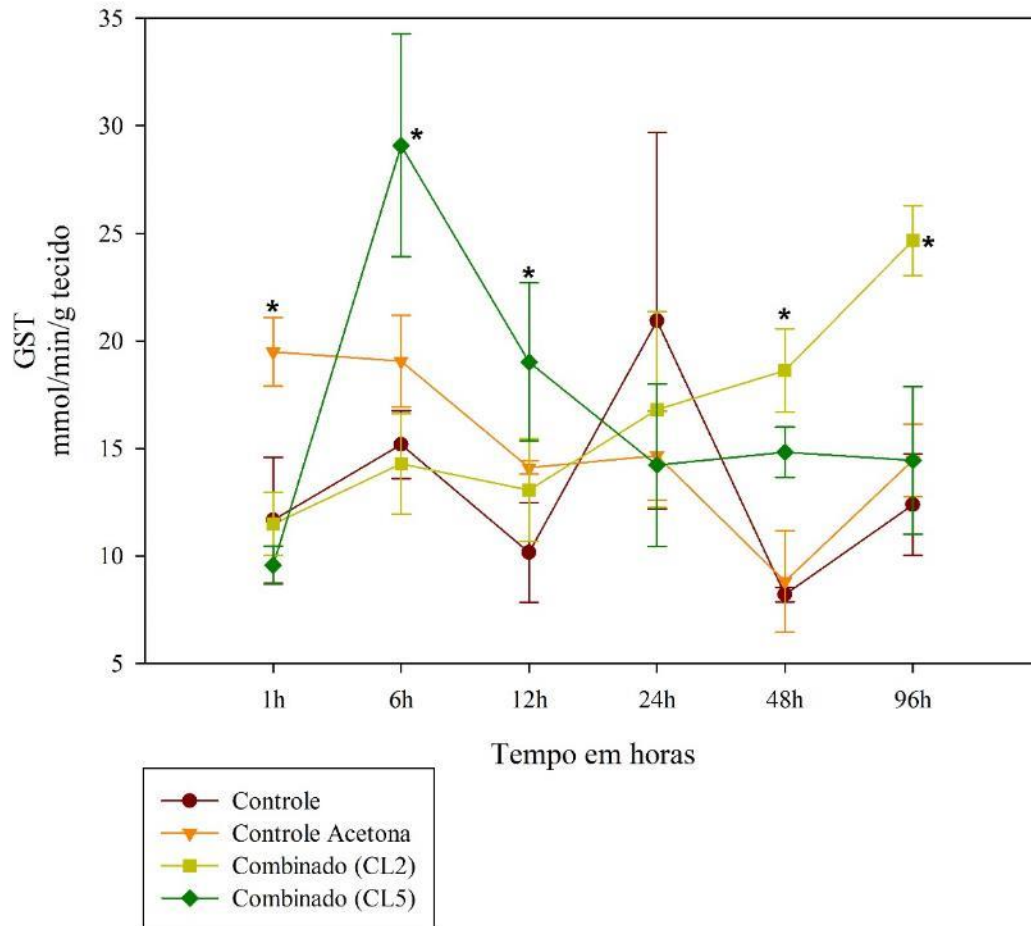
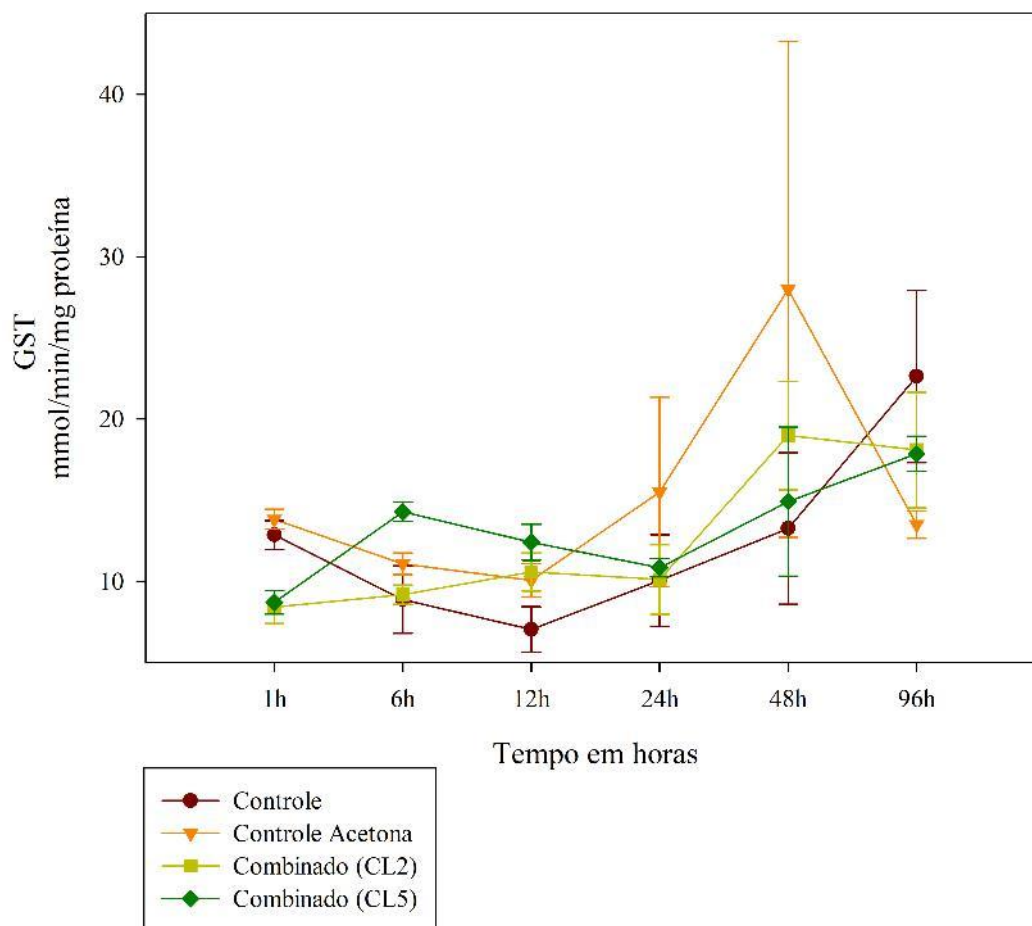




Figura 25: Atividade específica da glutatona S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais de forma combinada (CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5). Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína e as siglas CL2 e CL5 representam CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, respectivamente.



#### 5.4 Combinação entre inseticidas

Em última análise, realizamos comparação entre os grupos isolados e a combinação destes a partir de análises estatísticas para cada enzima. Os resultados obtidos estão evidenciados nas Figuras 26 e 28 – Atividade Tecidual CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5 e Figuras 27 e 29 Atividade Específica CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5 todos para atividade de AChE; nas Figuras 30 e 32 – Atividade Tecidual CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5 e Figuras 31 e 33 Atividade Específica CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5 todos para atividade de CaE-3 e Figuras 34 e 36 – Atividade Tecidual CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5 e Figuras 35 e 37 Atividade Específica CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5 todos para atividade de GST.

As Figuras 26 e 27 apresentaram, em 1 hora observaram-se aumento na atividade tecidual e específica do inseticida Fipronil CL<sub>50</sub>/2 com os respectivos valores 19,64 µmol/min/g de tecido e 11,39 nmol/min/mg de proteína.

Figura 26: Atividade tecidual da Acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/2 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo combinado ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 representa CL<sub>50</sub>/2.

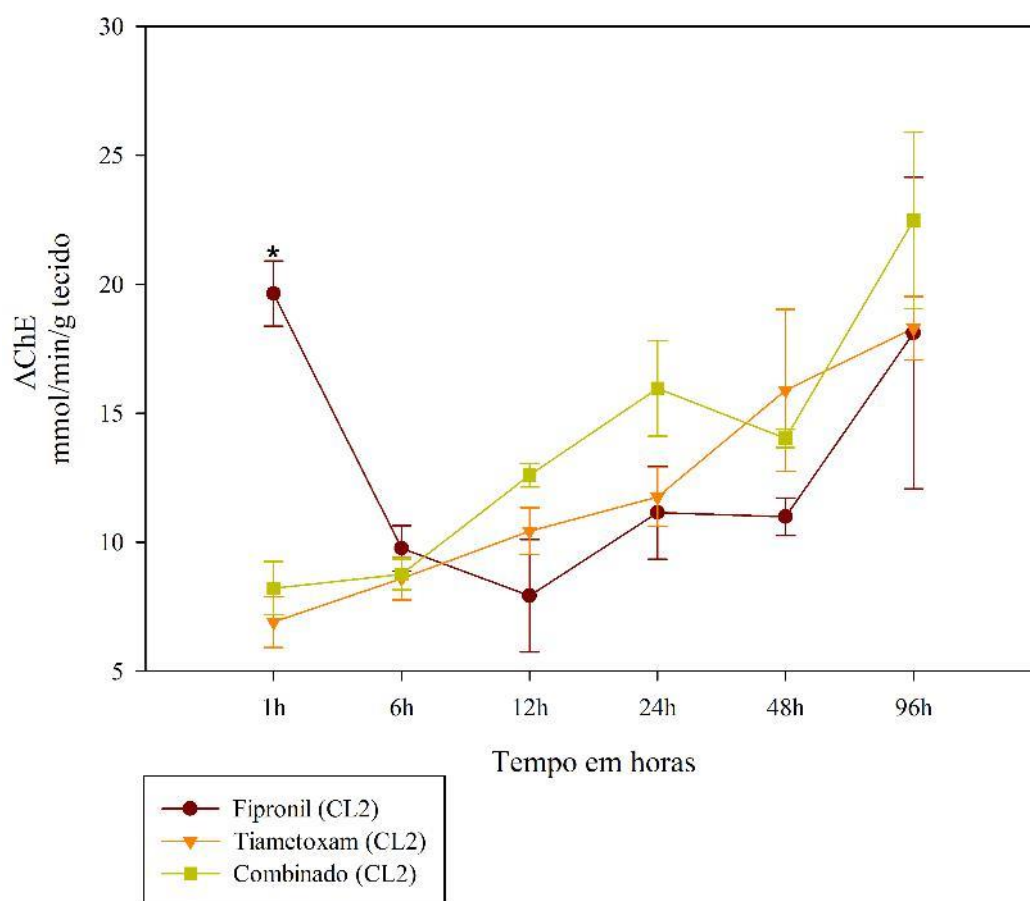
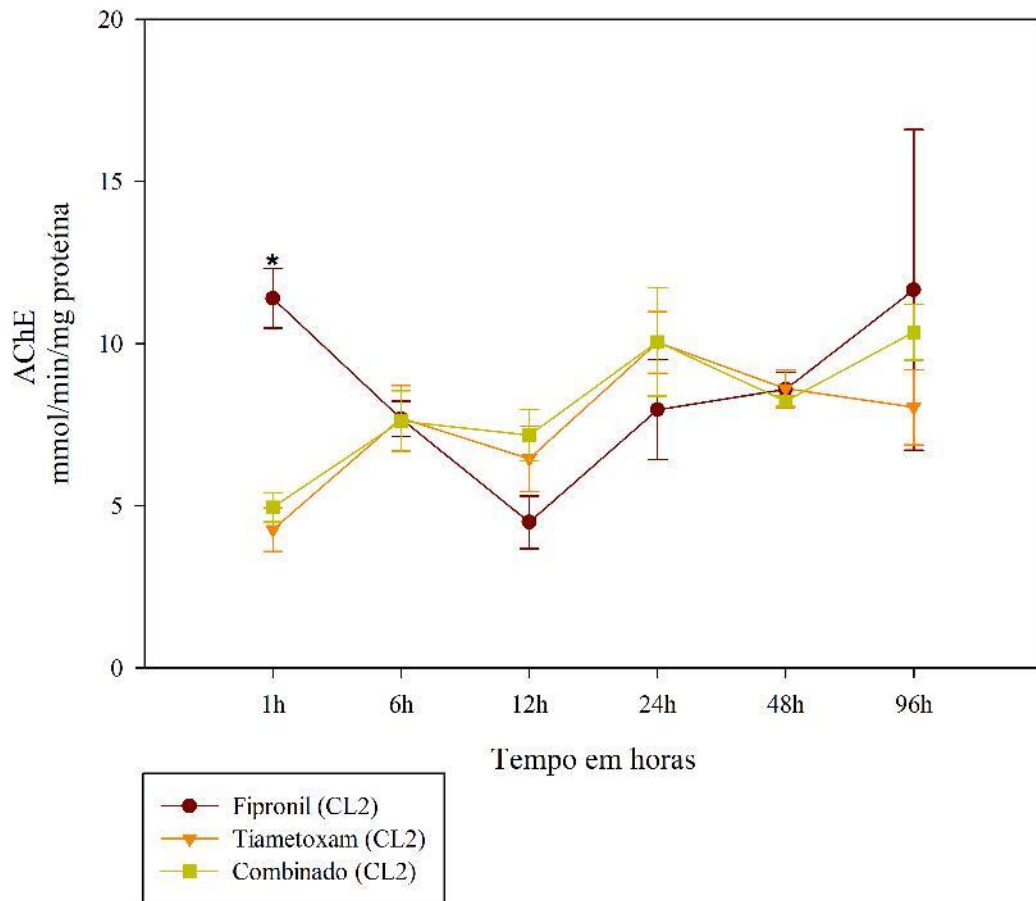


Figura 27: Atividade específica da Acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/2 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo combinado ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 representa CL<sub>50</sub>/2.



As figuras 28 e 29 apresentaram as seguintes diferenças nas concentrações de CL<sub>50</sub>/5: para 1 hora obteve-se aumento na atividade tecidual e específica para inseticida fipronil 22,88  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido e 12,89  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; diminuição inseticida tiametoxam em 24 horas com valor de 9,98  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido; aumento atividade tecidual e específica para inseticida tiametoxam em 48 horas (20,56  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido e 18,98  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína) e aumento na atividade específica de tiametoxam e fipronil com valores 13,18 e 10,55  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína em 96 horas de exposição.

Figura 28: Atividade tecidual da Acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50/5</sub> de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo combinado ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL5 representa CL<sub>50/5</sub>.

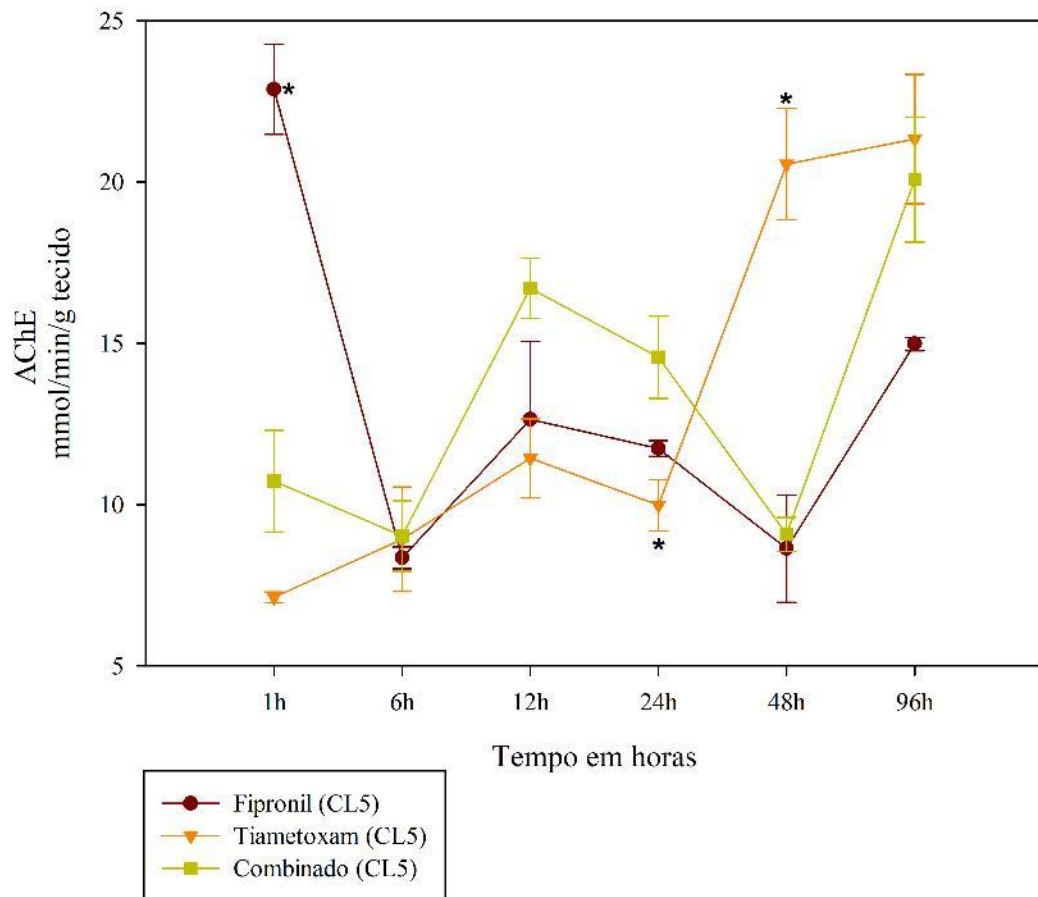
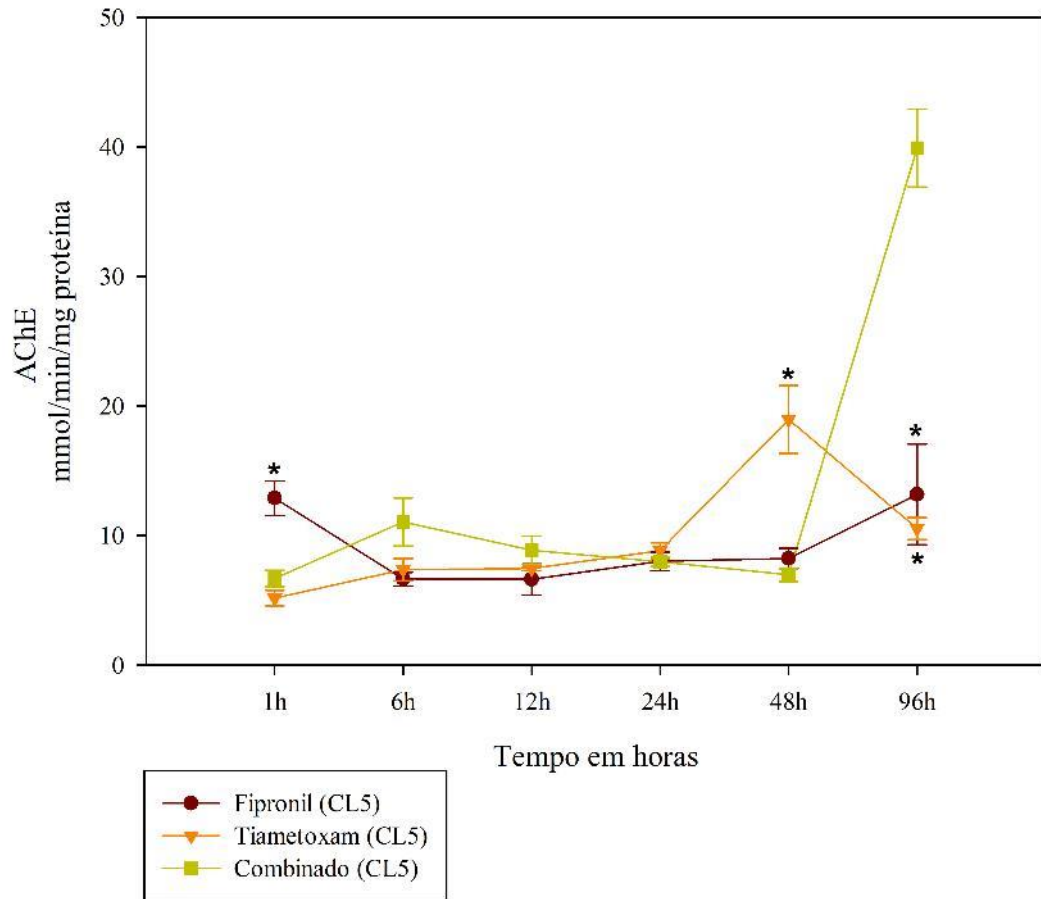


Figura 29: Atividade específica da Acetilcolinesterase (AChE) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50/5</sub> de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo combinado ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL5 representa CL<sub>50/5</sub>.



As Figuras 30, 32 e 33 não apresentaram diferença estatísticas e, portanto, estão anexadas ao trabalho somente de forma representativa. Já para a Figura 31, o inseticida fipronil apresentou em 96 horas de exposição aumento atividade com valor de 17,41 nmol/min/mg de proteína.

Figura 30: Atividade tecidual da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais  $CL_{50}/2$  de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido e as siglas CL2 representa  $CL_{50}/2$ .

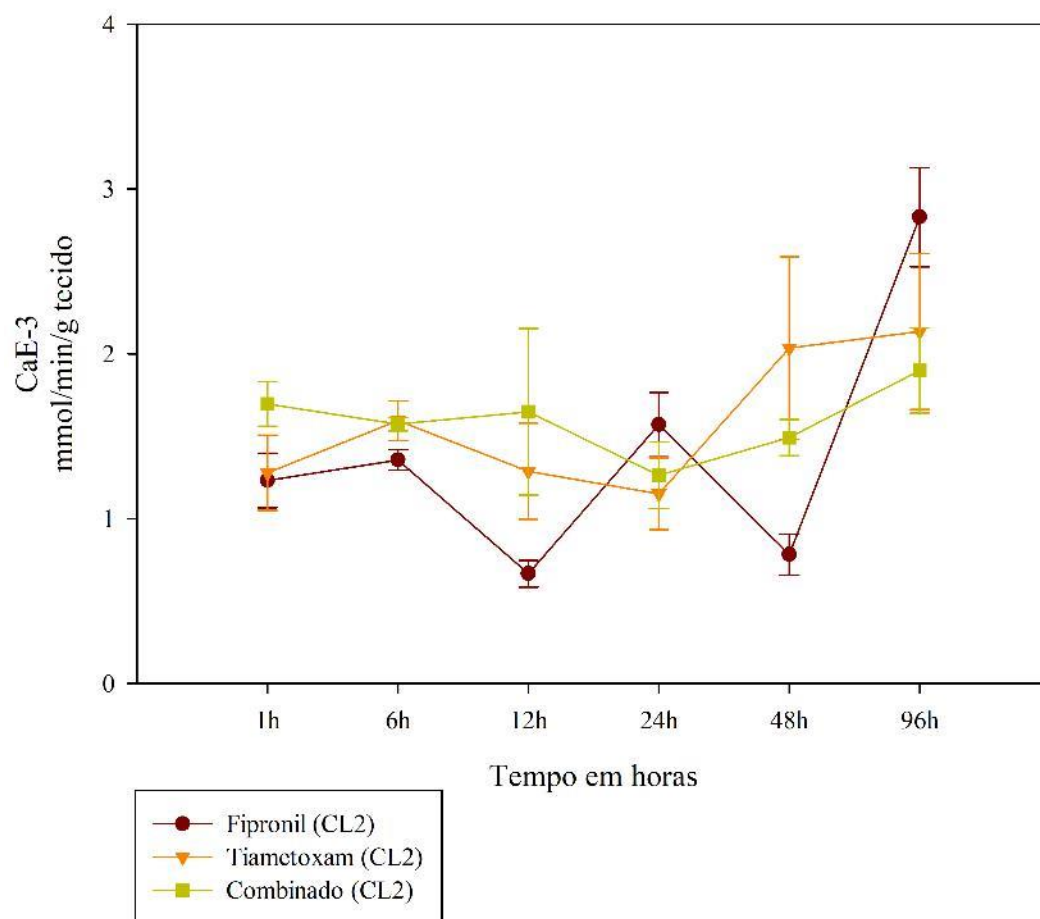


Figura 31: Atividade específica da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/2 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo combinado ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 representa CL<sub>50</sub>/2.

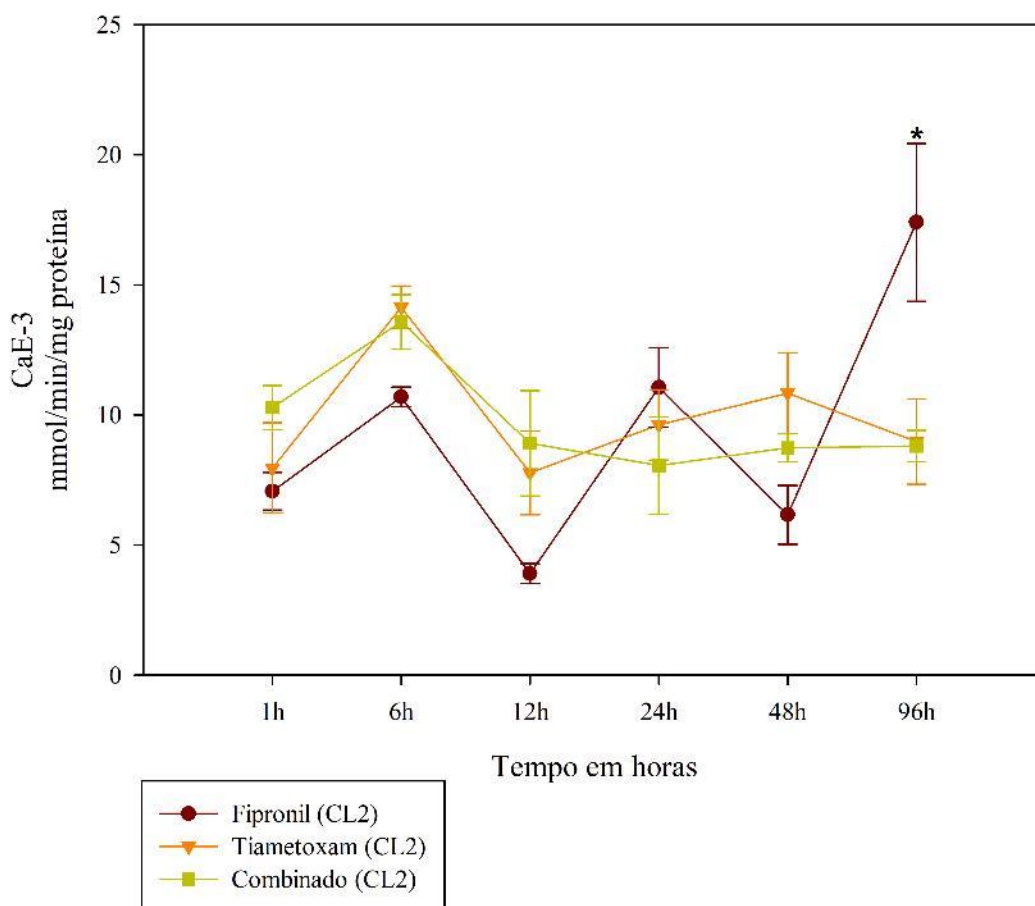


Figura 32: Atividade tecidual da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50/5</sub> de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido e as siglas CL5 representa CL<sub>50/5</sub>.

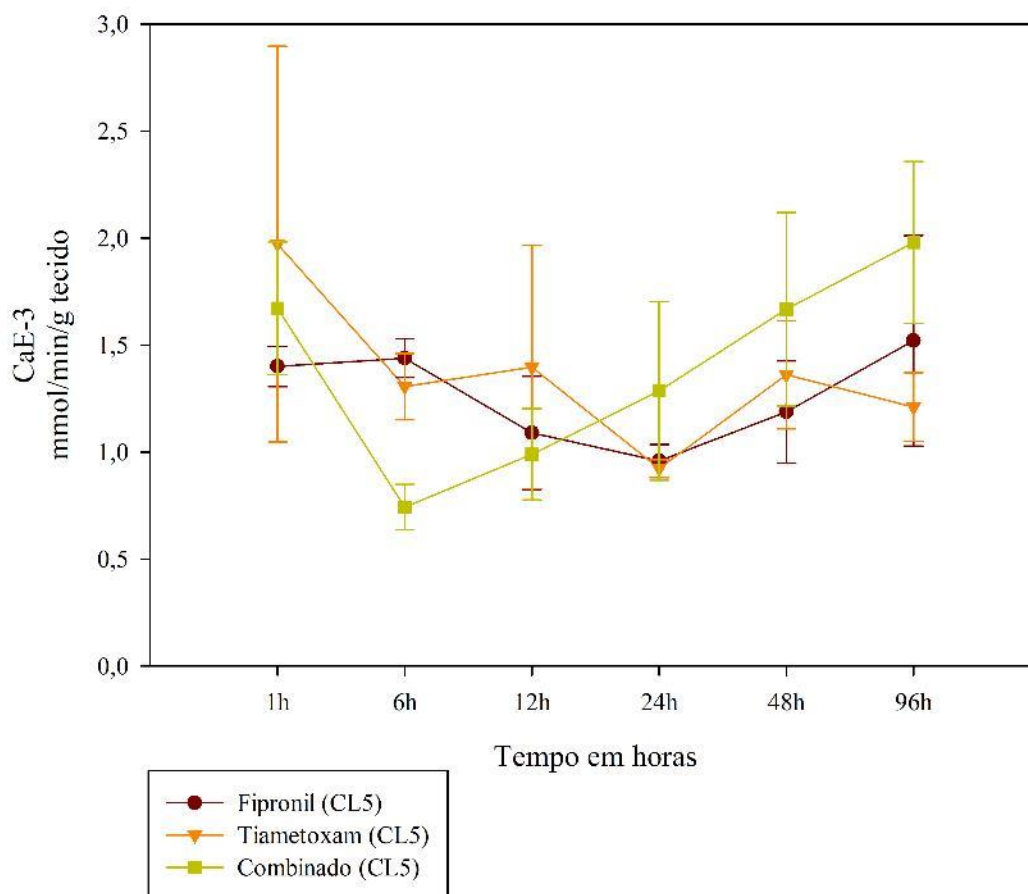
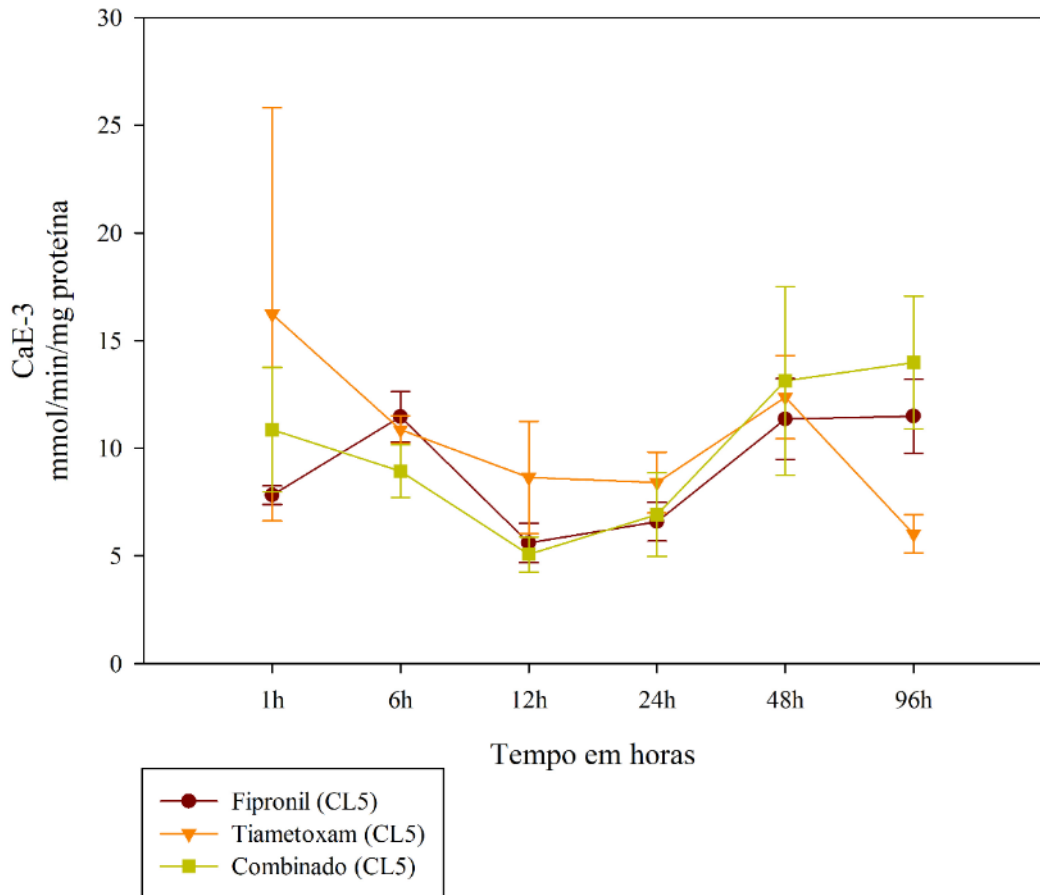




Figura 33: Atividade específica da carboxilesterase de isoforma 3 (CaE-3) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/5 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína sendo que as siglas CL5 representa CL<sub>50</sub>/5.



As Figuras 34 e 36 apresentaram, em 96 horas observaram-se diminuição na atividade tecidual do inseticida Tiametoxam CL<sub>50</sub>/2 (7,82  $\mu$ mol/min/g de tecido) e aumento na atividade do inseticida Fipronil CL<sub>50</sub>/5 (28,49  $\mu$ mol/min/g de tecido); entretanto para a atividade específica não apresentou diferença estatística.

Figura 34: Atividade tecidual da glutatona S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50</sub>/2 de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo combinado ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL2 representa CL<sub>50</sub>/2.

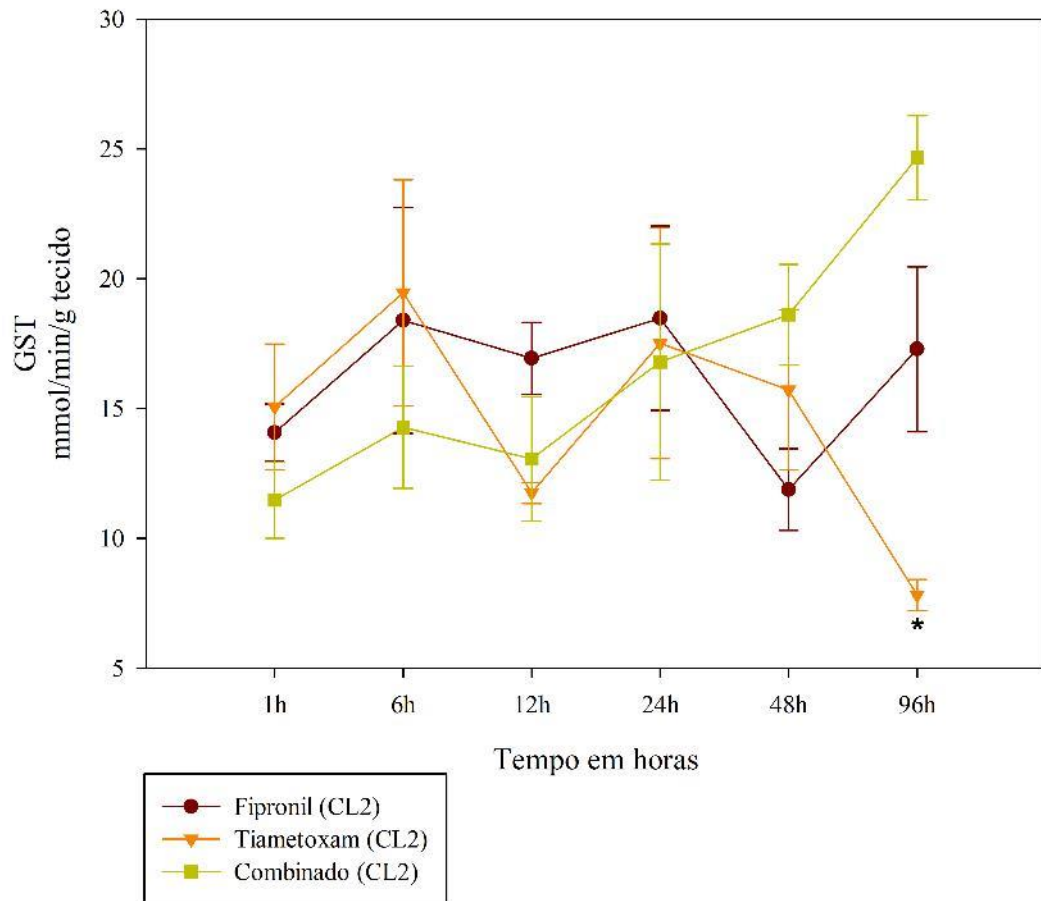


Figura 35: Atividade específica de glutatona S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais  $CL_{50}/2$  de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína sendo que as siglas CL2 representa  $CL_{50}/2$ .

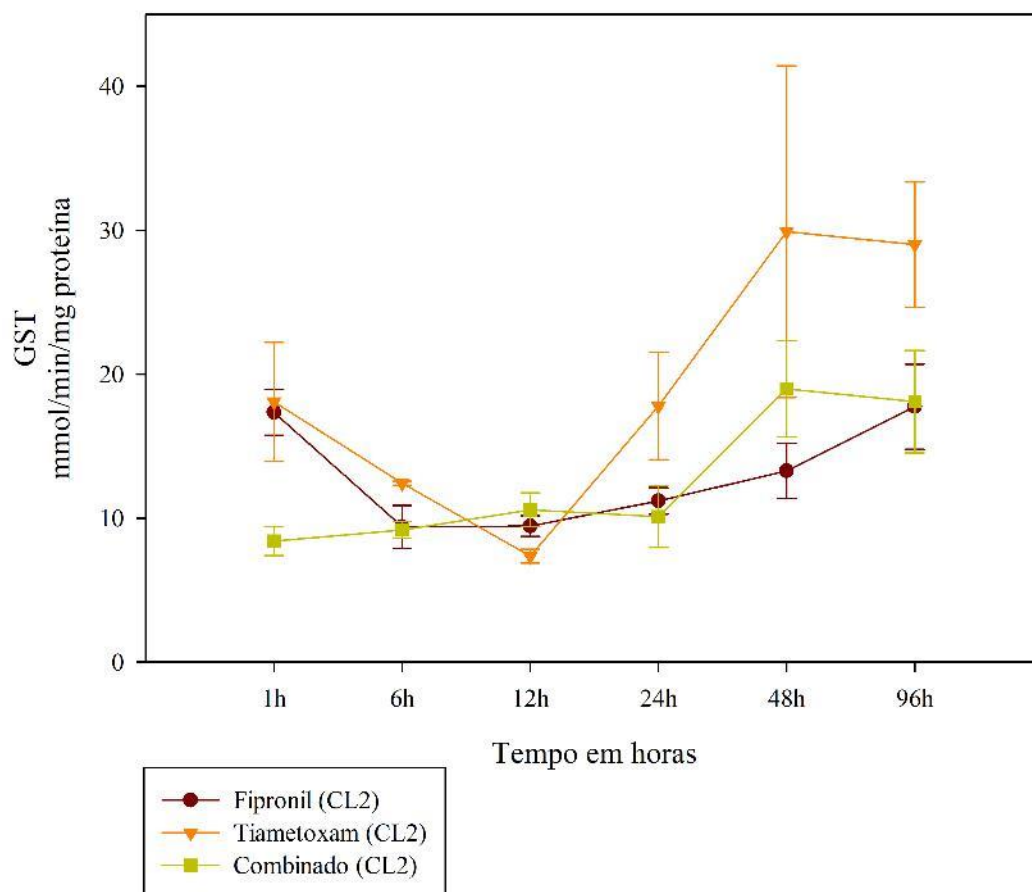


Figura 36: Atividade tecidual da glutatona S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais CL<sub>50/5</sub> de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade no tecido, sendo que o asterisco indica resultados significativos em comparação com o grupo combinado ( $p \leq 0,05$ , Kruskal-Wallis). As siglas CL5 representa CL<sub>50/5</sub>.

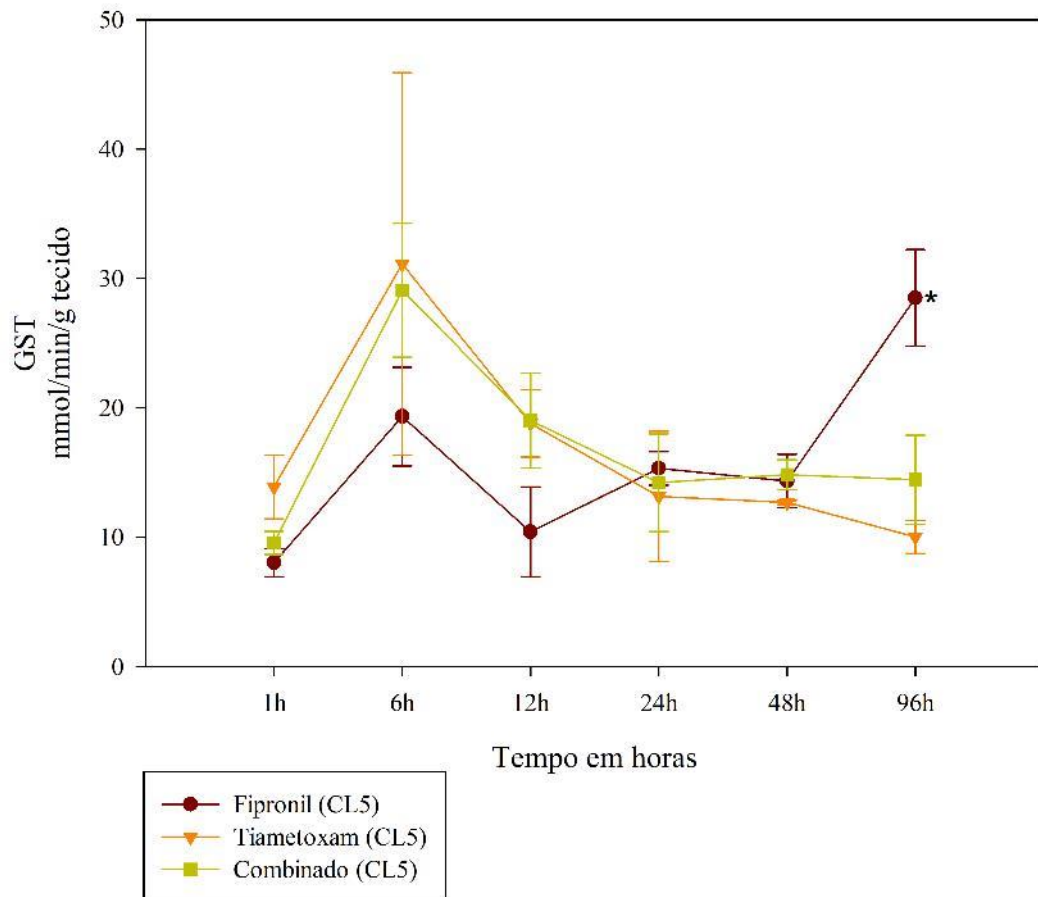
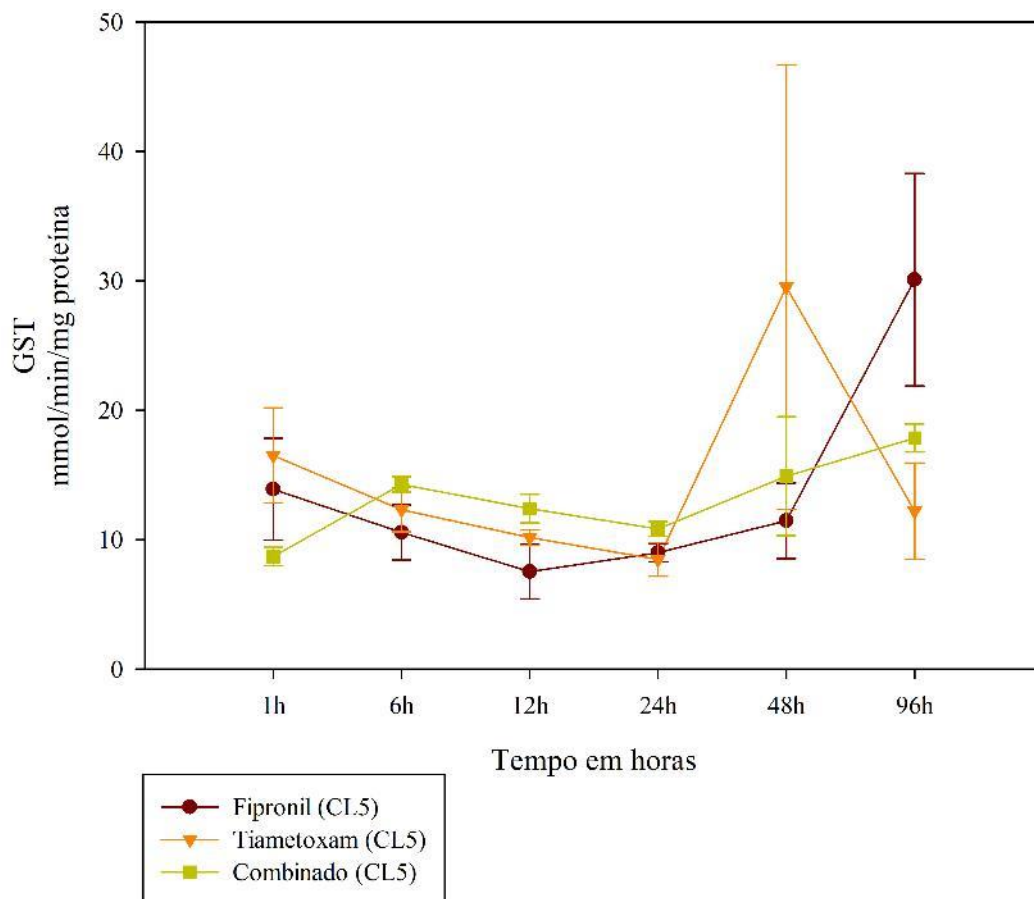


Figura 37: Atividade específica de glutatona S-transferase (GST) em *M. scutellaris* expostas as concentrações subletais  $CL_{50}/2$  de forma comparativa entre os inseticidas. Os resultados são expressos como a média de atividade por proteína sendo que as siglas CL2 representa  $CL_{50}/2$ .



## 6. DISCUSSÃO

Uma vez que as variações enzimáticas podem ocorrer em função de mudanças sazonais, condições ambientais, estágio do desenvolvimento fisiológico ou metabólico do indivíduo, sexo, dentre outros (BELZUNCES, GAUTHIER, COLIN, 1992; THOMPSON, 1996), as quantificações enzimáticas são importantes técnicas moleculares aplicada em diversas áreas de estudo, como estudos toxicológicos em abelhas, principalmente na espécie modelo *A. mellifera* (PAPADOPOULOS et al., 2004; BADIOU- BÉNÉTEAU et al., 2012; BOILY et al., 2013; CARVALHO et al., 2013; BADAWY; NASR; RABEA, 2014; AL NAGAR et al., 2015).

Para a quantificação enzimática, os parâmetros de atividade tecidual e atividade específica são utilizados para observação de toxicidade de diferentes espécies aos xenobióticos. Sendo que a atividade tecidual mostra a real variação da atividade de determinada enzima em

um tecido, enquanto a atividade específica indica quantificação total de proteína; na literatura dos últimos anos o parâmetro de atividade tecidual tem sido mais utilizado (STRYER, 1988; BIANCONI, 2001; SUCHAIL et al. 2004; BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012; CARVALHO et al., 2013).

Nesta pesquisa, tanto o fipronil quanto o tiametoxam e suas combinações levaram a alterações na atividade tecidual de AChE, sendo que houve uma tendência a diminuição desta em 6, 12, 24 e 48 horas. Porém em 1 e 96 horas as concentrações de ambos os inseticidas, isoladas ou combinadas, aumentaram esta atividade.

A diminuição da atividade tecidual poderia ser decorrente dos efeitos tóxicos dos inseticidas, esta inibição foi observada no presente trabalho para todas as exposições, comprovando a ação dos inseticidas nas abelhas *M. scutellaris*; portanto, podem ocasionar sintomas de neurotoxicidade que acarretam, conseqüentemente, problemas de coordenação, hiperexcitação e, até mesmo, paralisia do inseto.

Badiou; Meled; Belzunces (2008) em estudo com a deltametrina – um piretróide com mecanismo de ação de bloqueio dos canais  $\text{Na}^+$  diretamente relacionado com as membranas das células nervosas, discutem que a diminuição de AChE poderia ter ocorrido devido a apoptose parcial de células do sistema nervoso central. O inseticida fipronil, que têm como mecanismo de ação o receptor GABA e bloqueiam os canais de cloro ocasionando alterações neste sistema regulador de impulsos nervosos, pode ocasionar alterações enzimáticas devido à processos de alta afinidade do inseticida e/ou de seus metabólitos aos sítios de ação; mecanismo de compensação ou possível apoptose parcial celular – semelhantemente ao abordado pelos pesquisadores.

Para o inseticida tiametoxam, um neonicotinoide, há hipótese de diminuição da atividade, principalmente tecidual, visto que tem como sítio de ação os receptores nicotínicos de acetilcolina e afetam, diretamente a enzima AChE; observadas no presente trabalho. Badawy, Nasr e Rabea (2014) também observaram redução da atividade da AChE na espécie *A. mellifera*, quando exposta aos inseticidas acetamiprido e dinotefuran, pertencentes a classe dos neonicotinoides.

Nos tempos e concentrações citados acima, com administração de concentrações subletais dos inseticidas isolados, observou-se a diminuição nas atividades enzimáticas, entretanto, quando realizada combinação das concentrações subletais, através das proporções apresentadas nos métodos deste trabalho, observou-se alteração de efeito. Isso pode estar relacionado diretamente à combinação destes xenobióticos, afetando a especificidade dos

mecanismos de ação (BADIOU; MELED; BELZUNCES; 2008); com isto, no presente trabalho, somente obtivemos diminuição da enzima AChE em 6 e 48 horas.

Entretanto, o aumento na atividade enzimática, que é adverso tanto para o inseticida fipronil quanto tiametoxam, podem ter efeitos decorrentes dos metabólitos destes inseticidas, ocasionando um efeito gatilho na presente enzima. Os metabólitos do inseticida fipronil são comumente ocasionados pelo dissulfínil e sulfona, que exercem atividades adversas nos organismos e podem ocasionar alterações a nível celular e molecular, possibilitando morte celular (CABONI; SAMMELSON; CASIDA, 2003); já para o tiametoxam, tanto a clotianidina quanto o N-desmetil-tiametoxam, têm capacidade toxicológica aumentada, visto que há maior afinidade aos receptores nicotínicos e, conseqüentemente, maior dificuldade de metabolização (NAUEN et al., 2003).

Diferente das atividades descritas, para o tempo de 96 horas de exposição, obtivemos o aumento da atividade enzimática de AChE, para os tratamentos com os inseticidas isolados e combinados. Este aumento, mesmo que incomum, pode ser reflexo do mecanismo de ação e/ou metabólitos dos inseticidas que levaram a alterações do sistema nervoso, resultando no aumento da acetilcolinesterase como tentativa de cessar o impulso nervoso. Corroborando com as conclusões apresentadas, Boily et al. (2013) também constataram elevação da atividade da AChE no tecido cerebral de adultos de *Apis mellifera*, sendo afetada após exposição de doses letais médias dos inseticidas imidacloprido e a clotianidina, ambos pertencentes à classe dos neonicotinoides.

Os resultados das pesquisas citadas apontam que os inseticidas que atuam no sistema nervoso central dos insetos e, conseqüentemente ocasionam hiperexcitação neural, alteram a atividade tecidual da enzima AChE. Isto foi observado porque os inseticidas possuem como sítios de ação primário os receptores nicotínicos de acetilcolina – neonicotinoides, os canais de cloro, mediados pelo GABA – fenilpirazois – e até a degradação da acetilcolinesterase – organofosforados; levando a possível colapso da atividade cerebral do indivíduo (CHAPMAN, 1998; FARIA, 2009; TINGLE et al., 2000; HOPWOOD et al., 2012; CARILLO et al., 2013).

Todas as alterações na atividade enzimática cerebral observadas podem comprometer as funções neuronais e prejudicar o desempenho de aprendizagem e memória deste organismo (LAMBIN et al., 2001; DECOURTYE et al., 2005; BENZIDANE et al., 2010; BELZUNCES; TCHAMITCHIAN; BRUNET, 2012). Com isto, uma vez comprometido o equilíbrio do sistema, poderá desestruturar o desempenho do inseto e afetará diretamente na sua sanidade e,

consequentemente, sua sobrevivência dependendo da extensão dos danos causados pelos inseticidas.

Um dos principais processos realizados pelas enzimas é a biotransformação de diversas substâncias – também conhecida como metabolização e/ou desintoxicação. Esta tem como função principal um conjunto de alterações químicas e/ou estruturais, transformando-as em derivados mais polares, tendo como foco principal o aumento na velocidade de excreção e, consequentemente, menor permanência no organismo (JOHNSON, 2015).

De modo geral, a desintoxicação de xenobióticos é realizada pela conversão de substâncias lipossolúveis para solúveis em água através das enzimas esterases e citocromo P450, facilitando assim a metabolização e excreção pelo organismo (MIOTA et al., 1998; SCHARF et al., 1999). Estes processos são divididos em três fases principais que iremos discutir ao longo deste trabalho: Fase I – Funcionalização; Fase II – Conjugação; e Fase III – Excreção (BERENBAUM; JOHNSON, 2015). Para compreendermos o processo de desintoxicação dos diferentes xenobióticos nos organismos devemos compreender como ocorre o processo de metabolização através das enzimas envolvidas, desencadeando os processos citados anteriormente.

Segundo Scharf et al. (2000), na metabolização do inseticida fipronil, ocorrem dois processos principais: a oxidação do componente tioéter, formando o composto sulfonado, mediado pela enzima P450 ou a desalogenização, ocasionada pela conjugação com as GTS's. Inseticidas que possuem o composto orgânico tioéter, mesmo após sua metabolização inicial, têm como característica continuar apresentando efeitos toxicológicas em organismos, nos fazendo compreender os altos níveis de toxicidade deste inseticida.

Já os neonicotinoides, segundo Casida (2011), possuem dois metabólitos formados em comum, gerados por estes inseticidas nos diferentes organismos: cloropiridínio (CP) e/ou clotiazioil (CT), sendo estes importantes marcadores em análises por envenenamento e intoxicação. Na presente pesquisa, ressaltou-se que a principal preocupação é identificar os metabólitos gerados pela Fase I, visto os múltiplos locais de ataque inicial realizados nesta; sendo que pode ocorrer a transformação em compostos bioativos e, consequentemente, em compostos mais tóxico e/ou a formação em substâncias conjugadas através da Fase II, que geralmente são desintoxicantes e corroboram para a excreção.

No inseticida tiametoxam, o processo de metabolização é inicialmente realizado através de três reações: desmetilação em desmetil-tiametoxam; nitro redução transformando-o em nitrocompostos ou clivagem gerando a clotianidina; estes compostos sofrem variadas reações



de conjugação com glicina e ácido glucurônico, sendo assim acetilados e excretados (Casida, 2011). Sendo importante ressaltar o fator acometido pelos processos descritos na metabolização pela citocromo P450 e formação de N-desmetil-tiametoxam ou clotianidina, são os possíveis efeitos tóxicos ocasionados por esta substância prejudiciais aos organismos, pois possuem característica de inseticidas potentes e/ou ação agonistas nos insetos (NAUEN et al., 2003), gerando compostos bioativos muitas vezes mais nocivos do que outros com que estes insetos tiveram contato.

Entre os processos descritos, a enzima estudada carboxilesterase (CaE), representante da Fase I, tem função hidrolítica, que significa adicionar uma molécula de água separando a substância em dois fragmentos ou moléculas menores, sendo um fragmento ligado ao grupo hidroxila e outra ao hidrogênio (BERENBAUM; JOHNSON, 2015; JOHNSON, 2015).

Em comparação a outras espécies de insetos, as abelhas apresentam menor efetividade nos processos de desintoxicação dos xenobióticos, refletindo maior suscetibilidade destes insetos. Isto porque, de acordo com Claudianos et al. (2006), na espécie *A. mellifera*, existem 24 membros ativos da família enzimática das carboxil colinesterases, enquanto *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) possui 35 e *Anopheles gambiae* (Giles, 1926) possui 51; sendo que dados sobre a espécie *M. scutellaris* ainda não estão presentes em literatura.

Em comparação a outras espécies de insetos, as abelhas apresentam menor efetividade nos processos de desintoxicação dos xenobióticos, refletindo maior suscetibilidade destes insetos. Isto porque, de acordo com Claudianos et al. (2006), na espécie *A. mellifera*, existem 24 membros ativos da família enzimática das carboxil colinesterases, enquanto *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) possui 35 e *Anopheles gambiae* (Giles, 1926) possui 51.

Com aumento do interesse nos estudos com abelhas brasileiras, entre estas a *M. scutellaris*, pesquisas com intuito de esclarecer a história evolutiva do gênero *Melipona* vêm sendo apresentadas em literatura. Silverio et al. (2014) apresentaram a caracterização mitocondrial da presente espécie e puderam apresentar genes de codificações de proteínas, passo importantíssimo para o avanço em pesquisas e complementação à trabalhos com biomarcadores.

Nos grupos Fipronil  $CL_{50}/2$  em 12 horas e, de forma mais rápida para Combinado  $CL_{50}/5 - 6$  horas, constatou-se uma diminuição significativa na atividade tecidual da CaE-3. Entretanto, o tiametoxam não levou a alterações nesta isoforma enzimática, diferentemente do apresentado por Badiou-Bénéteau et al. (2012) para diminuição na atividade na atividade das isoformas CaE-1 e CaE-3.

A ausência de alteração da atividade da CaE ou sua diminuição quando as abelhas foram expostas aos inseticidas isolados ou combinados podem ser explicadas pela existência de seis distintas isoformas descritas que apresentam diferentes especificidades aos substratos (BITONDI; MESTRINER, 1983). Com isto, estudos futuros devem ser realizados para maior esclarecimento do processo de desintoxicação através de CaE em abelhas *M. scutellaris*, assim como as principais isoformas envolvidas neste procedimento.

Outros fatores, que podem estar diretamente relacionados a estes resultados, são que os inseticidas podem ser metabolizados por diferentes enzimas e transformado em diferentes compostos (NARAHASHI et al., 2010). Fatores como via de exposição, dose e moléculas envolvidas, tempo de exposição e espécies podem influenciar no processo e ação das enzimas de desintoxicação; gerando assim metabólitos que interferem na atividade das enzimas de desintoxicação e diminuindo a capacidade de realizar suas funções (ZALUSKI et al., 2015).

A constituição do genoma para espécie *M. scutellaris* não apresenta dados em literatura e, portanto, não sabemos exatamente quantas isoformas de carboxilesterase estão presentes nesta espécie. Yu; Robinson; Nation (1984) quantificaram e apresentaram alterações na atividade da enzima CaE de forma generalista e, portanto, sem diferenciação de suas isoformas, por não obter dados do genoma desta espécie na época; esta poderia ser uma alternativa utilizada para análise de CaE em abelhas *M. scutellaris*.

Ressalta-se ainda que as médias das atividades enzimática teciduais e específicas determinadas para *M. scutellaris*, até mesmo do grupo Controle, foi inferior ao descrito na literatura para *A. mellifera* (YU; ROBINSON; NATION, 1984; BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012; CARVALHO et al., 2013). Isso poderia indicar menor efetividade nos processos de desintoxicação dos inseticidas para a presente abelha, fato este que explica a maior vulnerabilidade das espécies de abelhas sem-ferrão quando comparadas a espécie modelo (LOURENÇO et al., 2012a, b; JACOB et al., 2013).

Muitos estudos vêm demonstrando que os agrotóxicos são extremamente prejudiciais às abelhas, sendo que um dos possíveis fatores está relacionado à constituição do seu genoma, uma vez que esta apresenta certa deficiência nas famílias gênicas relacionadas às enzimas de desintoxicação (HOLT et al., 2002; CLAUDIANOS et al., 2006), entre elas a família das GSTs. Claudianos et al. (2006) comprovaram que existem 10 genes funcionais para a enzima de desintoxicação GST na espécie *A. mellifera*, sendo esta representativamente inferior a outras espécies de insetos.

Para o tempo de uma hora de exposição, observou-se o aumento na atividade tecidual da enzima GST para o grupo Controle acetona; este fator pode estar diretamente relacionado ao processo de conjugação realizado por esta enzima e, portanto, a geração de compostos altamente polarizados e hidrossolúveis com maior facilidade para excreção (BERENBAUM; JOHNSON, 2015); com isto, o aumento pode estar envolvido em um processo de desintoxicação de fase II, para eliminação deste composto.

Na mesma enzima, para o inseticida fipronil, observou-se aumento na atividade tecidual somente em 96 horas de exposição em ambas concentrações subletais através das médias 17,28  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  para  $\text{CL}_{50}/2$  e 28,49  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  para  $\text{CL}_{50}/5$ ; demonstrando possível ativação do processo de desintoxicação. De forma análoga, Roat et al. (2016) também não observaram para espécie *A. mellifera* alterações na atividade tecidual e específica para a enzima GST em 48 horas de exposição ao inseticida fipronil.

Já para o inseticida tiametoxam, foi constatado um aumento na atividade tecidual de GST a partir de concentrações subletais com 1 ( $\text{CL}_{50}/2$  e  $\text{CL}_{50}/5$ ) e 12 horas ( $\text{CL}_{50}/5$ ) de exposição; similarmente detectado por Badiou-Bénéteau et al. (2012), que analisaram os efeitos das doses subletais deste inseticida sobre espécie *A. mellifera*, observando aumento da atividade tecidual (25  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tecido) após 48 horas. Portanto, esta enzima é apontada como um marcador precoce para a espécie *M. scutellaris*, pois apresentou ação rápida com intuito de desintoxicação e proteção celular comparativamente a abelha *A. mellifera*.

Quando os inseticidas são combinados na menor concentração (Combinado  $\text{CL}_{50}/5$ ) a atividade da GST aumenta em 6 e 12 horas, entretanto a combinação dos inseticidas na maior concentração ( $\text{CL}_{50}/2$ ) levou a um aumento somente em 48 e 96 horas. Este processo pode ser chamado sistema hormesis, apresentando respostas mais rápidas dos biomarcadores quando os indivíduos são expostos a doses mais baixas de inseticidas, e inversamente observado em doses mais altas, que obtêm menor atividade resposta (SUCHAIL et al., 2000; SUCHAIL et al., 2001; SUCHAIL et al., 2004; CALABRESE, 2008; BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012).

Nesta mesma linha, Suchail et al. (2001) observaram toxicidade em abelhas *A. mellifera*, a partir da contaminação com variação de doses da  $\text{CL}_{50}$  e  $\text{DL}_{50}$  do inseticida neonicotinoide imidacloprido, com resultados de mortalidade aumentada em baixas doses e em doses altas, sendo que em doses altas a mortalidade foi adiada. Os pesquisadores explicam que, possivelmente, em doses altas a mortalidade pode estar relacionada com a quantidade de metabólitos tóxicos e a saturação do metabolismo de pesticidas pelas enzimas; nas baixas doses,

podem estar relacionados à existência de sítios de ligação de diferentes afinidades, que geram combinações tóxicas e, conseqüentemente, maior alerta do metabolismo de desintoxicação.

Yu; Robinson; Nation (1984) em estudo sobre os efeitos da permetrina para espécie *A. mellifera*, observaram a média de 466,32 nm/min/mg proteína de GST no intestino das abelhas quando expostas a 48 horas desta substância; esta média representa aproximadamente 15,6 vezes mais proteínas do que o encontrado no presente estudo para a espécie *M. scutellaris*.

Segundo, Badiou-Bénéteau et al. (2012) esta enzima tem função de minimizar os danos oxidativos gerados pelos mais variados fatores, dentre estes a exposição de indivíduos a agentes xenobióticos. A chamada defesa oxidante tem a função de proteger as células contra possíveis danos desta natureza; realizado principalmente pela superfamília P450 que são enzimas hemotiolatas que participam da biossíntese de moléculas de sinalização endógena e na desintoxicação de xenobióticos em insetos (FEYEREISEN, 2012).

Dentre as alterações enzimáticas apresentadas, notou-se diminuição na atividade tecidual da enzima GST em 1 horas no inseticida Fipronil CL<sub>50</sub>/5, podendo acarretar danos oxidativos irreversíveis a célula, a partir de graves e variadas agressões químicas, ocasionando colapso no sistema do indivíduo e podendo, conseqüentemente, levá-lo a morte (BADAWY, NASR, RABEA, 2014).

A ausência de alterações na enzima GST também foi observada em diferentes grupos e horas de exposição, este fator pode estar relacionado com o processo de desintoxicação desta enzima, que é dependente da Fase I de biotransformação, ou seja, sem ativação do mesmo, impede-se o processo de Fase II. Visto que este processo é realizado principalmente pela citocromo P450, reconhece-se como importante parâmetro a ser analisado concomitantemente em trabalhos futuros.

Outro importante parâmetro apresentado nos resultados do presente trabalho é a comparação entre os inseticidas, podendo nos elucidar sobre a real interação entre os inseticidas e os efeitos toxicológicos em abelhas. A interação entre os inseticidas pode ser classificada de três formas principais (NASH, 1967; MARKING, 1985; CALABRESE, 1991): efeito aditivo – onde os efeitos tóxicos resultantes da combinação são iguais à soma de cada produto isoladamente; efeito sinérgico – os efeitos tóxicos da combinação dos inseticidas são maiores que a soma dos produtos isolados; e o efeito antagonístico – a combinação dos inseticidas têm efeitos tóxicos menores do que os produtos administrados isoladamente.

Efeitos aditivos foram observados após decorridas exposições em 24 horas para a enzima AChE para concentração CL<sub>50</sub>/5 e 96 horas para a enzima GST para concentração

CL<sub>50</sub>/2. Estes resultados podem estar relacionados com os efeitos citotóxicos destas moléculas combinadas, ao longo do tempo, podendo ocasionar degeneração tecidual e aumento da atividade metabólica na tentativa de combater os efeitos e neutralizar a combinação destes compostos químicos, devido ao aumento da atividade de metabolização (SOARES et al., 2013; JACOB et al., 2014; JACOB et al., 2015).

Diferentemente, em 96 horas de exposição do inseticida fipronil com concentração CL<sub>50</sub>/5 observou-se aumento da atividade GST; este fator pode estar relacionado ao efeito do composto original com os metabólitos tóxicos deste inseticida gerarem uma combinação problemática após maior tempo de exposição, comparativamente ao tiametoxam isoladamente ou à combinação (SUCHAIL, 2000).

Já no tempo de 1 hora, a atividade tecidual da enzima AChE para as concentrações CL<sub>50</sub>/2 e CL<sub>50</sub>/5, apresentou-se aumentada para o inseticida fipronil; este fator pode estar relacionado a forma rápida que o inseticida chega ao cérebro através da hemolinfa, interferindo diretamente no funcionamento deste sistema. Já em 48 horas, observamos aumento da atividade de AChE para tiametoxam na concentração CL<sub>50</sub>/5, relacionado possivelmente aos efeitos neurotóxicos diretamente ligado ao mecanismo de ação deste inseticida e/ou ao mecanismo de desintoxicação ter ativação precoce com a combinação de inseticidas, impedindo aumento em maior tempo de exposição.

De forma conclusiva, as alterações enzimáticas podem influenciar diretamente em fatores como: desintoxicação, eficiência celular e funções fisiológicas. Se o processo de desintoxicação não for efetivo, isto pode acarretar a morte dos indivíduos; desestruturação e abandono da colônia; aumento da suscetibilidade à patógenos e não encadeamento das gerações futuras. Este cenário comprometeria o ecossistema como um todo, e desta maneira, observaríamos impactos econômicos e sociais relacionados a produção de alimentos no país, impactando diretamente na agricultura e prejudicando tanto produtores quanto consumidores.

## 7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados, conclui-se que:

- O fipronil e o tiametoxam, em doses subletais, ocasionaram alterações nas enzimas AChE; refletindo assim a toxicidade a partir dos respectivos mecanismos de ação.
- A combinação entre os inseticidas mostrou diferenças na atividade de AChE, GST e CaE. Nota-se que somente na dose mais baixa os compostos combinados apresentam-se mais tóxicos do que isolados, devido a ativação precoce das enzimas;
- Maiores estudos devem ser desenvolvidos com as isoformas de CaE, visto que todas participam do processo de desintoxicação e não sabemos quantas isoformas existem para abelha *Melipona scutellaris*;
- A GST é uma enzima de ação precoce em *M. scutellaris*, porém as diferentes concentrações e combinações dos inseticidas alteram esse processo;
- As comparações entre os inseticidas ocasionaram efeitos aditivos em diferentes tempos de exposição, aumentando o efeito prejudicial à abelha *M. scutellaris*.
- A vulnerabilidade das abelhas *M. scutellaris* aos inseticidas podem ter relação com o déficit de enzimas de desintoxicação como CaEs e GST, quando comparadas com as abelhas *A. mellifera*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

\_\_\_\_\_. **NBR 14724**: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2011.

ABOU-DONIA, M. B. Metabolism and toxicokinetics of xenobiotics. In: DERELANKO, M. J.; AULETTA, C. S. **Handbook of toxicology**. Boca Raton: CRC Press, 2014. chap. 17, p. 618-658.

AGOSTINI, K. Sistema de Polinização de Espécies Brasileiras. **Biota-Educação Ciclo de Conferências**, São Paulo. 2014. Disponível em: <[http://www.fapesp.br/eventos/2014/03/polinizacao/Kayna\\_Agostini.pdf](http://www.fapesp.br/eventos/2014/03/polinizacao/Kayna_Agostini.pdf)>. Acesso em: 15 mai. 2016.

AIZEN, M. A.; HARDER, L. D. The Global Stock of Domesticated Honey Bees Is Growing Slower Than Agricultural Demand for Pollination. **Current Biology**, Düsseldorf, v. 19, n. 11, p.1-4, 2009.

AIZEN, M.A.; FEINSINGER, P. Forest fragmentation, pollination and plant reproduction in a Chaco Dry Forest, Argentina. **Ecology**, Brooklyn, v. 75, p. 330-351, 1994.

AL NAGAR, Y.; WISEMAN, S.; SUN, J.; CUTLER, G. C.; ABOUL-SOUD, M.; NAIEM, E.; MONA, M.; SEIF, A.; GIESY, J. P. Effects of environmentally-relevant mixtures of four common organophosphorus insecticides on the honey bee (*Apis mellifera* F.). **Journal of Insect Physiology**, n. 82, p. 85-91, 2015.

ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C.A.L.; SOUZA, B.A.; SANTOS, W.S. Areas of Natural Occurrence of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) in the state of Bahia, Brazil. In: Academia Brasileira de Ciências, v. 3, n. 84, 2010, Rio de Janeiro. **Anais...** p.659-688, 2010.

ANDRADE, D. C.; ROMEIRO, A. R. Serviços ecossistêmicos e sua importância para o sistema econômico e o bem-estar humano. Texto para Discussão. **Instituto de Economia**, UNICAMP, Campinas, n.155, p.1-44, 2009.

**AVALIAÇÃO ECOSISTÊMICA DO MILÊNIO - MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT**. Relatório-Síntese da Avaliação Ecosistêmica do Milênio, p. 57, 2005. Disponível em: <<http://www.millenniumassessment.org/documents/document.446.aspx.pdf>>. Acesso em: 29 mai. 2016.

BADAWY, M. E. I.; NASR, H. M.; RABEA, E. I. Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. **Apidologie**, Versailles, v. 46, n. 2, p. 177-193, 2014.

BADIOU, A.; MELED, M.; BELZUNCES, L.P. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase – A biomarker to detect deltamethrin exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 69, p. 246-253, 2008.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A.; CARVALHO, S. M.; BRUNET, J. L.; CARVALHO, G. A.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; BELZUNCES, L.P. Development of biomarkers of exposure to

xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide Thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, v. 82, p. 22–31, 2012.

BARATA, C.; LEKUMBERRI, I.; VILA-ESCALE, M.; PRAT, N.; PORTE, C. Tracemetal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregatriver basin (NESpain). **Aquatic Toxicology**, v.74, p. 3-19, 2005.

BARBOSA, R. A. Avaliação dos efeitos de concentrações subletais de dimetoato no cérebro e ventrículo de *Apis mellifera* africanizada. 2015. 96f. Tese (Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2015.

BARREIROS, A. L. B.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BELO HORIZONTE. Secretaria do Estado de Agricultura, Pecurária e Abastecimento de Minas Gerais: Subsecretaria do Agronegócio. **Apicultura**. 2017. Disponível em: <[http://www.agricultura.mg.gov.br/images/Arq\\_Relatorios/Pecuaria/2017/Mar/apicultura\\_mar\\_2017.pdf](http://www.agricultura.mg.gov.br/images/Arq_Relatorios/Pecuaria/2017/Mar/apicultura_mar_2017.pdf)>. Acesso em: 13 jan. 2018.

BELZUNCES, L. P.; TCHAMITCHIAN, S.; BRUNET, J. L. Neural effects of insecticides in honey bee. **Apidologie**, Versailles, v 43, n. 3, p. 348-370, 2012.

BELZUNCES, L.P., TOUTANT, J.P., BOUNIAS, M. Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head: Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by Triton X-114 phase separation. **Biochemical Journal**, n. 255, p. 463–470, 1988.

BELZUNCES, L.P.; GAUTHIER, M.; COLIN, M.E. Acetylcholinesterase in *Apis mellifera* head during postembryonic development—existence of a glycoinositol-anchored membrane form at early pupal stages. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, n.103, p. 57–63, 1992.

BENZIDANE, Y.; TOUINSI, S.; MOTTE, E.; JADAS-HÉCART, A.; COMMUNAL, P. Y.; LEDUC, L.; THANY, S. H. Effect of thiamethoxam on cockroach locomotor activity is associated with its metabolite clothianidin. **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, n. 12, p. 1351-1359, 2010.

BERENBAUM, M. R.; JOHNSON, R. M. Xenobiotic detoxification pathways in honeybees. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 1-8, 2015.

BIANCONI, M. L. **Introdução aos Conceitos de Velocidade Máxima e de Atividade Específica de Enzimas (Introducing the Concepts of Maximal Velocity and Specific Activity of Enzymes)**, Departamento de Bioquímica Médica - ICB – UFRJ, 2001. Disponível em: <[bioquimica.org.br/revista/ojs/index.php/REB/article/download/8/7](http://bioquimica.org.br/revista/ojs/index.php/REB/article/download/8/7)>. Acesso em: 19 jun. 2016.

BITONDI, M. M. G.; MESTRINER, M. A. Esterases isozymes of *Apis mellifera*: substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny and electrophoretic variability. **Biochemical Genetics**, New York, v. 21, n. 9/10, p. 985-1002, 1983.



BOILY, M.; SARRASSIN, B.; DEBLOIS, C.; ARAS, P.; CHAGNON, M. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental Science And Pollution Research**, França, v. 20, n. 8, p.5603-5614, ago. 2013.

BOLDYREV, A. A.; YUNEVA, M. O.; SOROKINA, E. V.; KRAMARENKO, G. G.; FEDEROVA, T. N.; KONOVALOVA, G. G.; LANKIN, V. Z. Antioxidant systems in tissues of senescence accelerated mice. **Biochemistry**, Oxford, v.66, n.10, p.1157-1163, 2001.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p.248-254, 1976.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Agrotóxicos: Agência discute o controle de resíduos no Senado**, 2009. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/251109.htm>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Fipronil**, p.2, 2007. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[18765-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[18765-1-0].PDF)>. Acesso em: 10 jun. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Agrofit - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários: Thiamethoxam**, Brasília, 2003a. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons!/ap\\_ing\\_ativo\\_detalhe\\_cons?p\\_id\\_ingrediente\\_ativo=248](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons!/ap_ing_ativo_detalhe_cons?p_id_ingrediente_ativo=248)>. Acesso em: 20 jun. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Agrofit - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários: Fipronil**, Brasília, 2003b. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 20 jun. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Cana-de-açúcar**, Brasília, s.d. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons!/ap\\_ing\\_ativo\\_detalhe\\_cons?p\\_id\\_ingrediente\\_ativo=248](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons!/ap_ing_ativo_detalhe_cons?p_id_ingrediente_ativo=248)>. Acesso em: 20 jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº. 148, de 26 de dezembro de 2017. Instrução Normativa Conjunta MAPA/ANVISA/IBAMA que estabelece critérios e procedimentos a serem adotados para recomendação de mistura em tanque de agrotóxicos e afins, e sua prescrição em receituário agrônomo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 dez. 2017.

BRASÍLIA (Estado). MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Agrotóxicos e afins registrados no IBAMA (N.A.)**, 2015. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade\\_Ambiental/produtos\\_na\\_ibama\\_2015.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_na_ibama_2015.pdf)>. Acesso em: 23 mai. 2016.

BRASÍLIA (Estado). MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Agrotóxicos**, 2013. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-publicas-2013/audiencia-publica-13-de-agosto-de-2013-ibama>>. Acesso em: 23 mai. 2015.

BRASÍLIA (Estado). MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos: Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil**, 2014. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>. Acesso em: 23 mai. 2016.

BRITAIN, C.; POTTS, S. G. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and Applied Ecology**, Switzerland, v. 12, p. 321-331, 2011.

CABONI, P.; SAMMELSON, R.E.; CASIDA, J.E. Phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABA ergic action: ethiprole compared with fipronil. **J. Agr. Food Chem.**, v.51, p.7055-7061, 2003.

CARILLO, M. P.; BOVI, T. de S.; NEGRÃO, A. F.; ORSI, R. de O. Influence of agrochemicals fipronil and imidacloprid on the learning behavior of *Apis mellifera* L. honeybees. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 35, n. 4, p. 431-434, 2013.

CARVALHO, C. A. L. de; MORETI, A. C. de C. C.; MARCHINI, L. C.; ALVES, R. M. de O.; OLIVEIRA, P. C. F. de. Pollen spectrum of honey of “Uruçu” bee (*Melipona scutellaris*, 1811). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 1, n. 61, p.63-67, 2001.

CARVALHO, S. M.; BELZUNCES, L. P.; CARVALHO, G. A.; BRUNET, J. L.; BADIOU-BÉNÉTEAU, A. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: A case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. **Environmental Toxicology**, New York, v. 32, n. 9, p.1-7, 2013.

CASIDA, J. E. Neonicotinoid Metabolism: Compounds, Substituents, Pathways, Enzymes, Organisms and Relevance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2923-2931, 2011.

CASTRO, N. R. A.; RIGITANO, R. L. O.; LIMA, J. M.; GUERREIRO, M. C. Lixiviação do inseticida thiamethoxam em macrolisímetros de duas classes de solo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, p.1818-1823, 2008.

CASTRO, V. L. S. S. Uso de misturas de agrotóxicos na agricultura e suas implicações toxicológicas na saúde. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 4, n. 1-3, p. 87-94, 2009.

CATAE, A. F.; ROAT, T. C.; OLIVEIRA, R. A.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 77, n. 4, p. 274-281, abr. 2014.

CHAPLIN, C. **Tempos Modernos**, filme, Estados Unidos: United Artists P & B, 1936.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 5<sup>th</sup> ed. Cambridge: Cambridge University, 2013. 929p.

CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R. M.; BISWAS, S.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT, J. G. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Molecular Biology**, USA, v. 5, n. 15, p.615-636, 2006.

COSTA, L. M.; GRELLA, T. C.; BARBOSA, R. A.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Determination of acute lethal doses (LD<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub>) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, Feira de Santana, v. 62, p. 578-582, 2015.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S.T.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismos de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.15, p.65-72, 2005.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009. 408p.

DAILY, G.C. Nature's services: Societal Dependence on Natural Ecosystems. **Island Press**, Washington, 1997.

DARY, O.; GEORGHIOU, G. P.; PARSONS, E.; PASTEUR, N. Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.83, p. 2187-2192, 1990.

DE MARCO, P.; COELHO, F.M. Services performed by the ecosystem: forest remnants influence agricultural cultures' pollination and production. **Biodiversity Conservation**, v. 13, p. 1245-1255, 2004.

DECIO, P. H. Estresse celular e atividade de enzimas biomarcadoras em abelhas africanizadas *Apis mellifera* Lineau, 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE) expostas ao tiametoxam. Relatório científico parcial, **Processo FAPESP nº 2014/23197-7**, 2016. 42p.

DECIO, P.; ROAT, T. C.; TAVARES, D. A.; MALASPINA, O. "Effect of sublethal dose of Thiamethoxam in the acetylcholinesterase activity in the brain of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)". In: XI Encontro sobre abelhas. Ribeirão Preto/SP, out. 2015. (Pôster).  
DECOURTYE, A. DEVILLERS, J.; GENECQUE, E.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Comparative Sublethal Toxicity of Nine Pesticides on Olfactory Learning Performances of the Honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 48, n. 2, p. 242-250, 2005.

DECOURTYE, A.; DEVILLERS J.; AUPINEL, P.; BRUN, F.; BAGNIS, C.; FOURRIER, J.; GAUTHIER, M. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. **Ecotoxicology**, Londres, v. 20, n. 2, p. 429-437, 2011.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, Paris, v. 52, p. 81-106, 2007.

DIAO, Q.; YUAN, K.; LIANG, P.; GAO, X. Tissue distribution and properties of glutathione S-transferases in *Apis cerana cerana Fabricius* and *Apis mellifera ligustica Spinola*. **Journal of Apicultural Research**, v.45, p.145-152, 2006.

EARAERTS, M.; CEUPPENS, B.; ASSELMAN, J.; DE SCHAMPHELAERE, K.; SMAGGHE, G. Effects of imidacloprid in combination with  $\lambda$ -cyhalothrin on the model pollinator *Bombus terrestris* at different levels of complexity. **Julius-Kühn-Archiv**, Berlin, v. 450, p. 219-224, 2015.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY; K. D.; ANDRES; V. Jr.; FEATHERSTONE; R. M. A new and rapid colometric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Kansas, v.7, p. 88-95, 1961.

ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 3-8, 2005.

**FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS**, 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/biodiversity/components/pollinators/en/> Acesso em: 20 mar. 2016.

FARIA, A. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo Integrado de pragas florestais. **Ambiência**, Guarapuava, v. 5, n. 2, p. 345-358, 2009.

FEYEREISEN R. Insect CYP genes and P450 enzymes. **Insect Molecular, Biology and Biochemistry**, p. 236–316, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides: Fipronil**, 2009. Disponível em: <[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/Specs/fipronil\\_09.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/fipronil_09.pdf)>. Acesso em: 21 mai. 2016.

FOURNIER, D.; BRIDE, J.M.; POIRE, M.; BERGE, J.B.; PLAPP, F.W. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 3, p. 1840–1845, 1992.

FULTON, M. H.; KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.20, p. 37-45, 2001.

GALLAI, N., SALLES, J.M., SETTELE, J.; VAISSIERE, B. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, Virginia, n. 68, p. 810-821, 2009.

GAZZIERO, D.L.P. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 33. 2015a.

GAZZIERO, D.L.P. Regulamentação das misturas em tanques de agrotóxicos. In: VII Congresso Brasileiro de Soja – MERCOSOJA. **Anais...** Santa Catarina, p. 1-4, 2015b.

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal Economic Entomology**, Lanham, v. 108, n. 3, p. 849-857, 2015.  
GILBERT, M. D.; WILKINSON, C. F. Microsomal oxidases in the honey bee, *Apis mellifera* (L.) **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.4, n.1, p. 56-66, 1974.

GILL, R. J.; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N. E. Combined pesticide exposure severely affects individual and colony-level traits in bees. **Nature**, New York, v. 491, p. 105-109, 2012.

GOULSON, G.; NICHOLLS, E.; BOTIAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, New York, v. 347, n. 6229, p. 1255957-1-1255957-8, 2015.

**GRAPHPAD PRISM Software.** Prism 7: Analyse, graph and present scientific data. California: GraphPad Software Inc., 2016. Disponível em: <<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>>. Acesso em: 30 mai. 2017.

GRIBEL, R. Pollination ecology and pollinator management in cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Willd. Ex Spreng. Schum., Sterculiaceae), an amazonian fruit tree of promising economic importance. In **Pollinators management in Brazil** (C.A.B. Alvarez & M. Landeiro, org.). Ministério de Meio Ambiente, Brasília, p.14-17, 2008.

GUNNING, R. V.; MOORES, G. D.; DEVONSHIRE, A. L. Esterase and fenvalerate resistance in a field population of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.58, p. 155-162, 1997.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-Transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.249, p.7130-7139, 1974.

HOLT, R. A.; SUBRAMANIAN, G. M. HALPERN, A.; SUTTON, G. G.; CHARLAB, R.; NUSSKERN, D. R. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Science**, New York, p. 129-149, 2002.

HOPWOOD, J.; VAUGHAN, M.; SHEPHERD, M.; BIDDINGER, D.; MADER, E.; BLACK, S.H.; MAZZACANO, C. Are neonicotinoids killing bees: A review of research into the effects of neonicotinoid insecticides on bees, with recommendations for action. **The Xerces Society For Invertebrate Conservation**, Portland, p.44, 2012.

HORST, P. D. Estresse celular e atividade de enzimas biomarcadoras em abelhas africanizadas *Apis mellifera* Lineu, 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE) expostas ao Tiametoxam. 2016. 42f. Relatório Científico Parcial Processo FAPESP nº 2014/23197-7 – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2016.

HYNE, R. V.; MAHER, W. A. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Australia, n. 54, p.366-374, 2003.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M.; DE JONG, D. **Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices**. Ed. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2006, 112 pp.

**IPBES - INTERGOVERNMENTAL SCIENCE-POLICY PLATFORM ON BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM SERVICES**. Summary for policymakers of the methodological assessment of scenarios and models of biodiversity and ecosystem services. 2016. Disponível em:<[https://www.ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/SPM\\_Deliverable\\_3c.pdf](https://www.ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/SPM_Deliverable_3c.pdf)>. Acesso em: 29 out. 2017.

JACOB, C. R. O.; SOARES, H. M.; CARVALHO, S. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Acute Toxicity of fipronil on the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 90, p. 69-72, 2013.

JACOB, C. R. O.; SOARES, H. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Pest Management Science**, New York, v. 71, p. 114-122, 2014.

JAKOBY, W.B. Glutathione Transferases: An Overview. **Methods in Enzymology**, Yale, p.495-499, 1985.

JOHNSON, R. M. Honey Bee Toxicology. **Annual Review of Entomology**, n. 60, p. 415-434, 2015.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; SILVA, A. C. da; ASSIS, M. da G. P. de. Aspectos poucos mencionados da biodiversidade Amazônica. **Parceria e Estratégias**, n. 12, 2001.

KLEIN, A. M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society**, Londres, v. 274, p. 303-313. 2007.

KORSLOOT, A.; VAN GESTEL, C. A. M.; VAN STRAALLEN, N. M. Environmental stress and cellular response in arthropods. Boca Raton: CRC Press, 2004. 197 p.

KRAL, K. Acetylcholinesterase in the ocellus of *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, Portici, v.26, p. 807-809, 1980.

KRAL, K.; SCHNEIDER, L. Fine structural localization of acetylcholinesterase activity in the compound eye of the honeybee (*Apis mellifica* L.). **Cell and Tissue Research**, v. 22, p. 351-359, 1981.

LAMBIN, M.; ARMENGAUD, C.; RAYMOND, S.; GAUTHIER, M. Imidacloprid Induced Facilitation of the Proboscis Extension Reflex Habituation in the Honeybee. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, n. 48, p. 129-134, 2001.

LEINWEBER, F. J. Possible physiological roles of carboxylic ester hydrolases. **Drug Metabolism**, v. 18, p. 379-439, 1987.

LIMA, L. C. F. **Produtos fitossanitários: misturas em tanque.** Cascavel: Oepar/Coodetec/Associação Nacional de Defesa Vegetal, 1997. 13 p. (Relatório Técnico)

LIMA, M. C. de; ROCHA, S. de A. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento.** Brasília: Ibama, 2012. 88 p.

LOURENÇO, C. T.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Determination of fipronil LD50 for the brazilian bee *Melipona scutellaris*. **Julius-Kühn-Archiv**, Berlim, v. 437, p. 174, 2012a.

LOURENÇO, C.T.; CARVALHO, S.M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R.C.F. Oral toxicity of fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 1, n. 89, p. 921-4, 2012b.

LUKASZEWICZ-HUSSAIN, A. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity: short review. **Pesticides Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 98, n. 2, p. 145-150, 2010.

MALASPINA, O.; SOUZA, T. F.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; CRUZ, A. S.; JESUS, D. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 2008, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FUNPEC, Universidade de São Paulo, 2008. p. 41–48.

MALERBO-SOUZA, D. T.; HALAK, A. L. Por que se preocupar com a polinização? **Casa da Agricultura: Apicultura**, Belo Horizonte, v. 1, p.15-16, 2014.

MARTINS, A.C.; GONÇALVES, R.B.; MELO, G.A.R. Changes in wild bee fauna of a grassland in Brazil reveal negative effects associated with growing urbanization during the last 40 years. **Zoologia**, Curitiba, v. 30, p. 157-176, 2013.

MATOZZO, V.; TOMEI, A.; MARIN, M. G. Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. **Marine Pollution Bulletin**, New Jersey, v.50, p. 1686-1693, 2005.

MAXWELL, D. M. The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.114, p. 306-312, 1992.

MICHENER, C. D. **The Bees of the World.** Segunda Edição. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2007. p. 972.

MILHORANCE, F. Brasil lidera o ranking de consumo de agrotóxicos: Dados são de relatório divulgado nesta quarta-feira pelo INCA, que alerta para as consequências à saúde, como o câncer. **Infoglobo Comunicação e Participações S.A:** O Globo, 2015. Disponível em: <<http://oglobo.globo.com/sociedade/saude/brasil-lidera-ranking-de-consumo-de-agrotoxicos-15811346#ixzz4EmmcbY7Z>>. Acesso em: 16 jun. 2016.

MIOTA, F.; SCHARF, M. E.; ONO, M.; MARÇON, P.; MEINKE, L. J.; WRIGHT, R. J.; CHANDLER, L. D.; SIEGFRIED, B. D. Mechanisms of methyl and ethyl parathion resistance in the western corn rootworm. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 61, p.39–52, 1998.

MIOTELO, L.; REIS, A. L. M. dos; MALASPINA, O.; ROAT, T. C. Toxicidade do tiametoxam para *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Miliponini). In: Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 27., 2015, Rio Claro. **Resumo...** Rio Claro: UNESP, 2015. 1p.

NARAHASHI, T., ZHAO, X., IKEDA, T., SALGADO, V.L., YEH, J.Z. Glutamate-activated chloride channels: Unique fipronil targets present in insects but not in mammals. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, p. 149–152, 2010.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER - NPIC. **Fipronil: Technical fact sheet**, 11p., 2009. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/fiptech.pdf>>. Acesso em 20 mai. 2016.

NAUEN, R.; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; SALGADO, V. L.; KAUSSMANN, M. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 76, p. 55-59, 2003.

NOCELLI, R. C. F.; ROAT, T. C.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. da; MALASPINA, O. **Riscos de Pesticidas sobre as Abelhas**, 2012. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69299/1/Roberta.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

**OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 2, EFFECTS ON BIOTIC SYSTEMS.** Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, n.213, set. 1998b. 8p.

OLIVEIRA, R. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, New York, v. 29, n. 10, p. 1122-1133, 2014.

OLIVEIRA, V. S.; LIMA, J. M. de; CARVALHO, R. F. de; RIGITANO, R. L. O. Sorção do inseticida tiametoxam em latossolos sob efeito de fosfato e vinhaça. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1432-1435, 2009.

OLIVER, C. J.; SOFTLEY, S.; WILLIAMSON, S. M.; STEVENSON, P. C.; WRIGHT, G. A. Pyrethroids and nectar toxins have subtle effects on the motor function, grooming and wing fanning behaviour of honeybees (*Apis mellifera*). **Plos One**, San Francisco, v.10, n.8, p. 1-12, 2015.

OLLERTON J., WINFREE R., TARRANT S. 2011. How many Flowering plants are pollinated by animals? **OIKOS Synthesising Ecology**, London v. 120, n. 3, p. 321-326. 2011.

PAPADOPOULOS, A. I.; POLEMITOU, I.; LAIFI, P.; YIANGOU, A.; TANANAKI, C. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera macedonica*: Kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. Comparative Biochemistry and Physiology: Part C. **Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 139, n. 1/3, p. 93-97, 2004.

PARMENTIER, L.; MUYS, E.; COPPIN, S.; DEMEYER, L.; ASSELMAN, J.; DE SCHAMPHELAERE, K.; SMAGGHE, G. Toxicity assessment of mixtures of neonicotinoids



and systemic fungicides or biopesticides in bumblebees (*Bombus terrestris*). **Julius-Kühn-Archiv**, Berlim, p. 234-240, 2014.

RANSON, H.; PATON, M. G.; JENSEN, B.; COLLINS, F. H. Genetic Mapping of Genes Conferring Permethrin Resistance in the Malaria Vector. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 379-386, 2004.

RICKETTS, T. H.; REGETZ, J.; STEFFAN-DEWENTER, I.; VIANA, B. F. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**, Hoboken, 2008, p. 499–515. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1461-0248.2008.01157.x/abstract>>. Acesso em: 25 mar. 2015.

RIO DE JANEIRO (ESTADO). Prefeitura do Rio de Janeiro. Ministério da Saúde. **Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos**. Rio de Janeiro, 2015. 5 p.

RIZZARDO, R.A.G.; FREITAS, B.M.; MILFONT, M.O.; SILVA, E.M.S. A polinização de culturas agrícolas com potencial para produção de biodiesel: um estudo de caso com a mamona (*Ricinus communis* L.). In: VIII ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 2008, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FUNPEC, Universidade de São Paulo, 2008. p. 293-299.

ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; NOCELLI, R. C. F.; SILVA-ZACARIN, E. C.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Effects of Sublethal Dose of Fipronil on Neuron Metabolic Activity of Africanized Honeybees. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, Vancouver, v. 64, n. 3, p.456-466, 2013.

RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; HALM, M.P.; TOUFFET-BRIENS, F.. Modes of honey bees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, Celle, v.36, p.71- 83, 2005.

SALLES, L. A. Eficiência do inseticida thiamethoxam (actara) no controle das pragas de solo da batata, *Diabrotica speciosa* (COL., CHRYSOMELIDAE) e *Heteroderes* spp. (COL., ELATERIDAE). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 6, n. 2, p. 149-151, 2000.

SCHARF, M. E.; SIEGFRIED, B. D.; MEINKE, L. J.; CHANDLER, L. D. Fipronil metabolism, oxidative sulfone formation and toxicity among organophosphate - and carbamate-resistant and susceptible western corn rootworm populations. **Pest Management Science**, v. 56, p. 757-766, 2000.

SILVA, C. I. da; ALEIXO, K. P.; NUNES-SILVA, B.; FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Guia ilustrado de abelhas polinizadoras no Brasil. 1ª Edição: São Paulo-SP, 2014. 50 p.

SILVERIO, M. S.; RODOVALHO, V. R. de; BONETTI, A. M.; OLIVEIRA, G. C. de; CUADROS-ORELLANA, S.; UEIRA-VIEIRA, C.; SANTOS, A. R. dos. Preliminary Characterization of Mitochondrial Genome of *Melipona scutellaris*, a Brazilian Stingless Bees. **BioMed Research International**, p. 1-6, 2014.

SIMON-DELSON, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.;

GOULSON D.; KREUTZWEISER D. P.; KRUPKE C.; LIESS M.; LONG E.; MCFIELD M.; MINEAU P.; MITCHELL E. A. D.; MORRISSEY C. A.; NOOME D. A.; PISA L.; SETTELE J.; STARK J. D.; TAPPARO A.; VAN DYCK H.; VAN PRAAGH J.; VAN DER SLUIJS J. P.; WHITEHORN P. R.; WIEMERS M. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 22, p. 5-34, 2014.

SOARES, H. M.; JACOB, C. R. O.; CARVALHO, S. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Toxicity of imidacloprid to the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 94, p. 675-680, 2015.

SOUZA, J. R. de. Toxicidade da clotianidina para a abelha africanizada *Apis mellifera* Linnaeus (HYMENOPTERA: APIDAE). 2015. 140f. Tese (Pós-Graduação em Entomologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

STONE, D.; JEPSON, P.; LASKOWSKI, R. Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae) inhabiting a gradient of pollution. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Nova York, v.132, part. C, p. 105-112, 2002.

STRYER, L. **Biochemistry**. Ed: 3<sup>rd</sup> W.H. Freeman and Company, New York, 1988, 1100 p.

STUCHI, A. L. P. B. **Toxicidade e expressão gênica em abelhas do gênero *Tetragonista* após a contaminação com agrotóxico**. 2009. 120f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

SUCHAIL, S.; DEBRAUWER, L.; BELZUNCES, L. P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science**, n. 60, p. 291-296, 2004.

SUCHAIL, S.; DEBRAUWER, L.; BELZUNCES, L. P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science**, v. 60, p. 291-296, 2003.

SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L. P. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 1901-1905, 2000.

SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L. P. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 2482-2486, 2001.

TAVARES, D. A.; DUSSAUBAT, C.; KRETZSCHMAR, A.; CARVALHO, S. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O.; BÉRAIL, G.; BRUNET, J. L.; BELZUNCES, L. P. Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. **Environmental Pollution**, v. 229, p.386-393, 2017.

TAVARES, D. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O. *In vitro* effects of thiamethoxam on larvae of africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, Los Angeles, v. 135, p. 370-378, 2015.

TEIXEIRA, E. W.; SANTOS, L. G.; SATTTLER, A.; MESSAGE, D.; ALVES, M. L. T. M. F.; MARTINS, M. F.; GRASSI-SELLA, M. F.; FRANCOY, T. M. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honeybees. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 114, p. 250-254, 2013.

TERRIERE, L. C. Induction of detoxication enzymes in insects. **Annual Review Entomology**, v. 29, p. 71-88, 1984.

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

THOMPSON, H.M. Risk assessment for honey bees and pesticides – recent development and “new issues”. **Pest Management Science**, Sussex, n. 66, p. 1157-1152, 2010.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURTS, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Health and environmental effects of fipronil. **Pesticide Action Network Uk**. London, v. 1, p.1-30, 2000.

**UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR – UNICA**. Área plantada com cana-de-açúcar, 2015-2015. 2016. Disponível em: < <http://www.unicadata.com.br/historico-de-area-ibge.php?idMn=33&tipoHistorico=5&acao=visualizar&idTabela=1792&produto=%C3%81rea+Plantada&anoIni=2015&anoFim=2015&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

**UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR – UNICA**. Setor: Números finais da safra 2014/2015 e iniciais da nova safra 2015/2016. 2015. Disponível em: < <http://www.unica.com.br/noticia/27460993920325965467/numeros-finais-da-safra-2014-por-cento2F2015-e-iniciais-da-nova-safra-2015-por-cento2F2016/>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

URZEDO, A. P. F. M.; RIGITANO, R. L. O.; LIMA, J. M.; CASTRO, N. R. A. Sorção do inseticida tiametoxam em amostras de solos da região de Lavras - MG. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.16, p.71-80, 2006.

VAN DER SLUIJS, J. P.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BIJLEVELD VAN LEXMOND, M. F. I. J.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C. A.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A. D.; MORRISEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; SIMON-DELISO, N.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 22, p. 148-154, 2015.

VEDDELER, D., OLSCHESKI, R., TSCHARNTKE, T. & KLEIN, A.M. The contribution of non managed social bees to coffee production: new insights based on farm-scale yield data. **Agroforestry Systems**, v. 73, p. 109-114, 2008.

VENTURIERI, G.C., RODRIGUES, S.T. & PEREIRA, C.A.B. As abelhas e as flores do açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart. - Arecaceae). **Mensagem Doce**, v. 80, p. 32-33, 2005.

VIANA, B.F. Exemplos regionais de animais: *Melipona scutellaris*, 2010. **Projeto Qualibio**. Disponível em: <<http://www.qualibio.ufba.br/063.html>>. Acesso em: 6 mai. 2016.

WEBBEE. **A abelha Uruçu.** 2010. Disponível em: <<http://www.webbee.org.br/urucu/index.html>>. Acesso em: 14 mai. 2016.

WILLIAMS, P. H.; OSBORNE, J. L. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. **Apidologie**, Celle, v. 40, p. 367-387, 2009.

YU, S. J.; ROBINSON, F. A.; NATION, J. L. Detoxication Capacity in the Honey Bee, *Apis mellifera* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.22, p.360-368, 1984.

ZALUSKI, R.; KADRI, S. M.; ALONSO, D. P.; MARTINS RIBOLLA, P. E.; OLIVEIRA, O. R. de. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 15, p. 1062-1069, 2015.

## APÊNDICES

**Apêndice A:** Atividades tecidual e específica das enzimas AChE, CaE-3 (cabeça) e GST (intestino) para grupo Controle acetona. Os símbolos ↑ e ↓ representam aumento e diminuição significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) e o símbolo = indica ausência de alteração significativa.

| Enzimas      | Tempo (horas) | Fipronil           |                      | Tiametoxam         |                      | Combinado          |                      |
|--------------|---------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
|              |               | Atividade tecidual | Atividade específica | Atividade tecidual | Atividade específica | Atividade tecidual | Atividade específica |
| <u>AChE</u>  | 1             | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 6             | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 12            | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 24            | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 48            | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 96            | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
| <u>CaE-3</u> | 1             | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 6             | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 12            | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 24            | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 48            | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |

|                   |    |   |   |   |   |   |   |
|-------------------|----|---|---|---|---|---|---|
|                   | 96 | = | = | = | = | = | = |
| <b><u>GST</u></b> | 1  | ↑ | = | ↑ | = | ↑ | = |
|                   | 6  | = | = | = | = | = | = |
|                   | 12 | = | = | = | = | = | = |
|                   | 24 | = | = | = | = | = | = |
|                   | 48 | = | = | = | = | = | = |
|                   | 96 | = | = | = | = | = | = |

**Apêndice B:** Atividades tecidual e específica das enzimas AChE, CaE-3 (cabeça) e GST (intestino) para grupo CL<sub>50</sub>/2. Os símbolos ↑ e ↓ representam aumento e diminuição significativa em relação ao controle (p<0,05) e o símbolo = indica ausência de alteração significativa.

| Enzimas            | Tempo (horas) | Fipronil           |                      | Tiametoxam         |                      | Combinado          |                      |
|--------------------|---------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
|                    |               | Atividade tecidual | Atividade específica | Atividade tecidual | Atividade específica | Atividade tecidual | Atividade específica |
| <b><u>AChE</u></b> | 1             | ↑                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|                    | 6             | ↓                  | ↓                    | ↓                  | =                    | ↓                  | ↑                    |
|                    | 12            | ↓                  | =                    | ↓                  | =                    | =                  | =                    |
|                    | 24            | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|                    | 48            | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |

|                     |    |   |   |   |   |   |   |
|---------------------|----|---|---|---|---|---|---|
|                     | 96 | ↑ | = | ↑ | = | ↑ | = |
| <b><u>CaE-3</u></b> | 1  | = | = | = | = | = | = |
|                     | 6  | = | = | = | = | = | = |
|                     | 12 | ↓ | = | = | = | = | = |
|                     | 24 | = | = | = | = | = | = |
|                     | 48 | = | = | = | = | = | = |
|                     | 96 | ↑ | = | = | = | = | = |
| <b><u>GST</u></b>   | 1  | = | = | = | = | = | = |
|                     | 6  | = | = | ↑ | = | = | = |
|                     | 12 | = | = | = | = | = | = |
|                     | 24 | = | = | = | = | = | = |
|                     | 48 | = | = | = | = | ↑ | = |
|                     | 96 | ↑ | = | = | = | ↑ | = |

**Apêndice C:** Atividades tecidual e específica das enzimas AChE, CaE-3 (cabeça) e GST (intestino) para grupo CL<sub>50</sub>/5. Os símbolos ↑ e ↓ representam aumento e diminuição significativa em relação ao controle (p<0,05) e o símbolo = indica ausência de alteração significativa.

| Enzimas      | Tempo (horas) | Fipronil           |                      | Tiametoxam         |                      | Combinado          |                      |
|--------------|---------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
|              |               | Atividade tecidual | Atividade específica | Atividade tecidual | Atividade específica | Atividade tecidual | Atividade específica |
| <u>AChE</u>  | 1             | ↑                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 6             | ↓                  | ↓                    | ↓                  | =                    | ↓                  | =                    |
|              | 12            | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 24            | =                  | =                    | ↓                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 48            | =                  | =                    | =                  | ↑                    | ↓                  | =                    |
|              | 96            | ↑                  | ↑                    | ↑                  | =                    | =                  | ↑                    |
| <u>CaE-3</u> | 1             | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 6             | =                  | =                    | =                  | =                    | ↓                  | =                    |
|              | 12            | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 24            | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 48            | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 96            | =                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |
| <u>GST</u>   | 1             | ↓                  | =                    | =                  | =                    | =                  | =                    |



|  |    |   |   |   |   |   |   |
|--|----|---|---|---|---|---|---|
|  | 6  | = | = | ↑ | = | ↑ | = |
|  | 12 | = | = | ↑ | = | ↑ | = |
|  | 24 | = | = | = | = | = | = |
|  | 48 | = | = | = | = | = | = |
|  | 96 | ↑ | = | = | = | = | = |

**Apêndice D:** Atividades tecidual e específica das enzimas AChE, CaE-3 (cabeça) e GST (intestino) para grupo CL<sub>50</sub>/2. Os símbolos ↑ e ↓ representam aumento e diminuição significativa em relação aos inseticidas combinados (p<0,05) e o símbolo = indica ausência de alteração significativa.

| Enzimas      | Tempo (horas) | Fipronil           |                      | Tiametoxam         |                      |
|--------------|---------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
|              |               | Atividade tecidual | Atividade específica | Atividade tecidual | Atividade específica |
| <u>AChE</u>  | 1             | ↑                  | ↑                    | =                  | =                    |
|              | 6             | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 12            | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 24            | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 48            | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 96            | =                  | =                    | =                  | =                    |
| <u>CaE-3</u> | 1             | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 6             | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 12            | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 24            | =                  | =                    | =                  | =                    |
|              | 48            | =                  | =                    | =                  | =                    |

|                   |    |   |   |   |   |
|-------------------|----|---|---|---|---|
|                   | 96 | = | ↑ | = | = |
| <b><u>GST</u></b> | 1  | = | = | = | = |
|                   | 6  | = | = | = | = |
|                   | 12 | = | = | = | = |
|                   | 24 | = | = | = | = |
|                   | 48 | = | = | = | = |
|                   | 96 | = | = | ↓ | = |

**Apêndice E:** Atividades tecidual e específica das enzimas AChE, CaE-3 (cabeça) e GST (intestino) para grupo CL<sub>50</sub>/5. Os símbolos ↑ e ↓ representam aumento e diminuição significativa em relação aos inseticidas combinados ( $p < 0,05$ ) e o símbolo = indica ausência de alteração significativa.

| Enzimas             | Tempo (horas) | Fipronil           |                      | Tiametoxam         |                      |
|---------------------|---------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
|                     |               | Atividade tecidual | Atividade específica | Atividade tecidual | Atividade específica |
| <b><u>AChE</u></b>  | 1             | ↑                  | ↑                    | =                  | =                    |
|                     | 6             | =                  | =                    | =                  | =                    |
|                     | 12            | =                  | =                    | =                  | =                    |
|                     | 24            | =                  | =                    | ↓                  | =                    |
|                     | 48            | =                  | =                    | ↑                  | ↑                    |
|                     | 96            | =                  | ↓                    | =                  | ↓                    |
| <b><u>CaE-3</u></b> | 1             | =                  | =                    | =                  | =                    |
|                     | 6             | =                  | =                    | =                  | =                    |
|                     | 12            | =                  | =                    | =                  | =                    |
|                     | 24            | =                  | =                    | =                  | =                    |

|            |    |   |   |   |   |
|------------|----|---|---|---|---|
|            | 48 | = | = | = | = |
|            | 96 | = | = | = | = |
| <u>GST</u> | 1  | = | = | = | = |
|            | 6  | = | = | = | = |
|            | 12 | = | = | = | = |
|            | 24 | = | = | = | = |
|            | 48 | = | = | = | = |
|            | 96 | ↑ | = | = | = |