

FÁBIO FERMINO

**EXPRESSÃO DE ISOENZIMAS E ANÁLISE CITOQUÍMICA EM DUAS ESPÉCIES
DE *Tetragonisca* APÓS CONTAMINAÇÃO COM HERBICIDAS**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
MARÇO - 2010**

FÁBIO FERMINO

**EXPRESSÃO DE ISOENZIMAS E ANÁLISE CITOQUÍMICA EM DUAS ESPÉCIES
DE *Tetragonisca* APÓS CONTAMINAÇÃO COM HERBICIDAS**

**Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Maringá,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de Mestre.**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
MARÇO – 2010**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Fermino, Fábio

F359e Expressão de isoenzimas e análise citoquímica em duas espécies de *Tetragonisca* após contaminação com herbicidas / Fábio Fermino. -- Maringá, 2010.

45 f. : il. color.

Orientador : Prof^a. Dr^a. Maria Claudia Colla Ruvo
Takasusuki.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, 2010.

1. Abelhas(*Tetragonisca*) - Herbicidas - Avaliação. 2. Abelhas(*Tetragonisca*) - Bioindicadores - Toxicidade - Avaliação. 3. Abelhas(*Tetragonisca*) - Proteínas totais - Análise. 4. Abelhas(*Tetragonisca*) - Isoenzimas - Análise. 5. Abelhas(*Tetragonisca*) - Células nervosas - Análise. I. Takasusuki, Maria Claudia Colla Ruvo, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 21.ed.638.1

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser meu porto seguro e a quem louvo por ter me dado vida, e vida em abundância.

Agradeço também à Universidade Estadual de Maringá e ao Departamento de Biologia Celular e Genética por terem me acolhido como aluno por muitos anos, dando suporte para meus estudos e pesquisas.

A todos os professores do curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento pelas excelentes aulas, aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Francisco José da Cruz e M^a Valquiria Magro.

Agradeço, em especial, à professora doutora Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki pelo valioso trabalho de orientação, pelos conhecimentos transmitidos, pelo carinho e dedicação ao trabalho, além do bom humor e ótimas conversas.

À minha esposa Andréia, e aos meus filhos Felipe e João André, nos quais busco forças e vigor todos os dias de minha vida.

À minha amada mãe, Maria Adélia, que muito me ensinou sobre respeito e dedicação à família. A meu pai, João, que até hoje é o meu herói. Às minhas avós Mariana, Maria, Dirce e Faustina, pelos ensinamentos diários. Aos meus avôs, Mário e Antenor (em memória), e Sebastião e Joaquim, pelos ótimos momentos e histórias de vida compartilhadas. E a todos familiares agradeço de coração, em especial aos meus melhores amigos: Joelma, minha irmã, Elton, Everton, Alexandre e Larissa meus primos queridos. Agradeço ainda a toda minha família Fermino, Gomes, Bonafé e Trabuco.

Aos professores colaboradores doutora Claudete Aparecida Mangolin, e ao querido professor doutor Erasmo Renesto agradeço os ensinamentos, dicas, materiais e piadas capciosas. Aos professores doutor Hélio Conte e doutor José Ricardo Penteado Falco (JR) que muito me ensinaram e ensinam até hoje.

À professora doutora Ana Luisa Portela (DBC) pela facilitação na utilização do laboratório de microscopia e captura de imagens.

A todos os grandes amigos de graduação que me acompanham até hoje: Rodrigo, Márcio, Júnior, Flávia, Ana Luisa e Ivone. Aos amigos do laboratório 21 e 17: Juliana Franzoni, Juliana Ruiz, Suzana, Ludmila, Davis, Simone, Aline, Flávio, Denis e Ana Lúcia. E ainda aos amigos do Colégio Platão de Maringá pelo apoio e suporte.

BIOGRAFIA

Fábio Fermino, filho de João Fermino e Maria Adélia Bonafé Gomes Fermino, nasceu em Santa Isabel do Ivaí, Estado do Paraná, no dia 05 de fevereiro de 1985. Mudou-se, em 1991, para Maringá onde vive até hoje.

Em 1992, ingressou no Ensino Fundamental (primeiros anos) na Escola Estadual Zuleide Samways Portes, finalizando o curso no ano de 1995.

Em 1996, ingressou no Ensino Fundamental (últimos anos), no Colégio Estadual Unidade Pólo, finalizando em 2002 o Ensino Médio.

Em 2001, no dia 02 de fevereiro, nasceu seu filho, escolhido, Felipe Trabuco.

Em 2003, ingressou no curso de graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Maringá.

Em 2006, no dia 27 de outubro, nasceu seu filho João André Trabuco Fermino.

Formou-se em Ciências Biológicas (licenciatura) na Universidade Estadual de Maringá (UEM) em 2007.

Em 2008, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Mestrado, realizando sua pesquisa junto ao Laboratório de Biologia Evolutiva de Insetos (DBC/UEM), estando voltado ao estudo de insetos sociais.

Em 12 de dezembro de 2008, casou-se com Andréia Cristiani Neves Trabuco Fermino.

ÍNDICE

LISTA DE QUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Aspectos gerais das abelhas sem ferrão	3
2.2. Atividade dos herbicidas nicosulfuron e paraquat	5
2.3. Genética bioquímica das isoenzimas.....	8
2.4. Citoquímica de núcleos	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Coleta das abelhas	13
3.2. Montagem dos bioensaios	13
3.3. Diluições dos herbicidas	13
3.4. Análise de mortalidade	14
3.5. Eletroforese em gel de amido	14
3.5.1. Extração das enzimas	14
3.5.2. Preparo dos géis	15
3.5.3. Aplicação das amostras e corrida eletroforética	15
3.5.4. Revelação das Isoenzimas	15
3.6. Eletroforese PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	16
3.6.1. Extração das enzimas	16
3.6.2. Preparo dos géis	16
3.6.3. Aplicação das amostras e corrida eletroforética	16
3.6.4. Revelação das isoenzimas	17
3.7. Eletroforese SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis).....	17
3.8. Basofilia nuclear e concentração crítica de eletrólitos.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Efeitos da contaminação por herbicidas nas abelhas do gênero <i>Tetragonisca</i>	19
4.2. Análise de proteínas totais após contaminação com herbicidas	27
4.3. Análise citoquímica das células nervosas	29
5. CONCLUSÕES.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Diluições dos herbicidas utilizados nos bioensaios.....	14
Quadro 2 - Mortalidade de <i>T. angustula</i> nos bioensaios com os herbicidas nicosulfuron (Sanson 40 SC) e paraquat (Gramoxone 200) após 24h de exposição.....	19
Quadro 3 - Mortalidade de <i>T. fiebrigi</i> nos bioensaios com os herbicidas nicosulfuron (Sanson 40 SC) e paraquat (Gramoxone 200) após 24h de exposição.....	20
Quadro 4 - Inibição da atividade das isoenzimas malato desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD) e esterase (EST) detectada em <i>T. angustula</i> após contato com nicosulfuron e paraquat	21
Quadro 5 - Inibição da atividade das isoenzimas malato desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD) e esterase (EST) detectada em <i>T. fiebrigi</i> após contato com nicosulfuron e paraquat	22
Quadro 6 - Respostas da basofilia nuclear e concentração crítica de eletrólitos (CEC) na cromatina das células nervosas de <i>T. angustula</i> após exposição ao herbicida paraquat em concentração de 100%	29
Quadro 7 - Respostas da basofilia nuclear e concentração crítica de eletrólitos (CEC) na cromatina das células nervosas de <i>T. angustula</i> após exposição ao herbicida nicosulfuron em concentração de 100%	30
Quadro 8 - Respostas da basofilia nuclear e concentração crítica de eletrólitos (CEC) na cromatina das células nervosas de <i>T. fiebrigi</i> após exposição ao herbicida paraquat em concentração de 100%	30
Quadro 9 - Respostas da basofilia nuclear e concentração crítica de eletrólitos (CEC) na cromatina das células nervosas de <i>T. fiebrigi</i> após exposição ao herbicida nicosulfuron em concentração de 100%	31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Zimograma do padrão eletroforético em gel de amido 14% de malato desidrogenase (MDH). *T. angustula*, 1-5: controle, 6-10: paraquat 100%; e *T. fiebrigi*, 11-15: controle, 16-20: paraquat 100%.....23
- Figura 2 - Zimograma do padrão eletroforético em gel de amido 14% de malato desidrogenase (MDH). *T. angustula*, 1-4: controle, 5-9: nicosulfuron 100%; e *T. fiebrigi*, 10-13: controle, 14-18: nicosulfuron 100%23
- Figura 3 - Zimograma do padrão eletroforético em gel de amido 14% de superóxido desmutase (SOD). *T. angustula*, 1-5: controle, 6-10: paraquat 100%; e *T. fiebrigi*, 11-15: controle, 16-20: paraquat 100%23
- Figura 4 - Zimograma do padrão eletroforético em gel de amido 14% de superóxido desmutase (SOD). *T. angustula*, 1-5: controle, 6-10: nicosulfuron 100%; e *T. fiebrigi*, 11-15: controle, 16-20: nicosulfuron 100%23
- Figura 5 - Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% para esterase (EST). *T. angustula*, 1- 8: controle, 9-12: paraquat 1%24
- Figura 6 - Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% para esterase (EST). *T. fiebrigi*, 1-4: controle, 5-10: paraquat 1%24
- Figura 7 - Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% para esterase (EST). *T. angustula*, 1-4: controle, 5-8: nicosulfuron 1%, 9-12: nicosulfuron 10%, 13-16: nicosulfuron 50%, 17-20: nicosulfuron 75%24
- Figura 8 - Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% para esterase (EST). *T. fiebrigi*, 1-8: nicosulfuron 100%. 9-14: controle24
- Figura 9 - Gel de proteína total SDS-PAGE 7% de *T. angustula*, após exposição ao herbicida paraquat por 24h, corado com azul brilhante de comassie. MM: marcador de peso molecular. 1-4: controle; 5-8: paraquat 0,1%; 9-12: paraquat 1%; 13-16: paraquat 10%; 17-18: paraquat 100%27
- Figura 10 - Gel de proteína total SDS-PAGE 7% de *T. fiebrigi*, após exposição ao herbicida nicosulfuron por 24h, corado com azul brilhante de comassie. 1-4: controle; 5-8: nicosulfuron 10%; 9-12: nicosulfuron 50%; 13-16: nicosulfuron 75%; 17-20: nicosulfuron 100%28

Figura 11 - Células nervosas de *T. angustula* após tratamento com água (A-C-E-G-I) (controle) e paraquat 100% (B-D-F-H-J) coradas com azul de toluidina (AT) em pH 4.0 na ausência e presença de $MgCl_2$ (mol/L). A e B: AT sem $MgCl_2$; C e D: AT + 0,05 mol/L de $MgCl_2$; E e F: AT + 0,10 mol/L de $MgCl_2$; G e H: 0,12 mol/L de $MgCl_2$; I e J: AT + 0,15 mol/L de $MgCl_2$. Setas indicam os núcleos dos neurônios. Barra = 20 μ m33

Figura 12 - Células nervosas de *T. fiebrigi* após tratamento com água (A-C-E-G-I) (controle) e paraquat 100% (B-D-F-H-J) coradas com azul de toluidina (AT) em pH 4.0 na ausência e presença de $MgCl_2$ (mol/L). A e B: AT sem $MgCl_2$; C e D: AT + 0,05 mol/L de $MgCl_2$; E e F: AT + 0,10 mol/L de $MgCl_2$; G e H: 0,12 mol/L de $MgCl_2$; I e J: AT + 0,15 mol/L de $MgCl_2$. Setas indicam os núcleos dos neurônios. A-C-D-E-F-G-H-I-J, barra= 20 μ m; B, barra= 50 μ m. Em F presença de omatídios no canto inferior esquerdo34

Figura 13 - Células nervosas de *T. angustula* após tratamento com água (A-C-E-G-I) (controle) e nicosulfuron 100% (B-D-F-H-J) coradas com azul de toluidina (AT) em pH 4.0 na ausência e presença de $MgCl_2$ (mol/L). A e B: AT sem $MgCl_2$; C e D: AT + 0,05 mol/L de $MgCl_2$; E e F: AT + 0,10 mol/L de $MgCl_2$; G e H: 0,15 mol/L de $MgCl_2$; I e J: AT + 0,20 mol/L de $MgCl_2$. Setas indicam os núcleos dos neurônios. Barra = 20 μ m35

Figura 14 - Células nervosas de *T. fiebrigi* após tratamento com água (A-C-E-G) (controle) e nicosulfuron 100% (B-D-F-H) coradas com azul de toluidina (AT) em pH 4.0 na ausência e presença de $MgCl_2$ (mol/L). A e B: AT sem $MgCl_2$; C e D: AT + 0,05 mol/L de $MgCl_2$; E e F: AT + 0,12 mol/L de $MgCl_2$; G e H: 0,20 mol/L de $MgCl_2$. Setas indicam os núcleos dos neurônios. Barra = 20 μ m36

RESUMO

FERMINO, Fábio. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá. Março de 2010. Expressão de isoenzimas e análise citoquímica em duas espécies de *Tetragonisca* após contaminação com herbicidas. Professora Orientadora: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki. Professores Conselheiros: Claudete Aparecida Mangolin e Erasmo Renesto.

As abelhas indígenas sem ferrão *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 e *Tetragonisca fiebrigi* Schwarz, 1938, conhecidas como jataí, estão amplamente distribuídas por todo o Brasil e são reconhecidas pela importante função de polinizadoras de vegetação nativa e de culturas agrícolas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de isoenzimas e peptídeos, averiguar as alterações nucleares em células nervosas das abelhas do gênero *Tetragonisca*, após contaminação *in vitro* com os herbicidas Sanson 40 SC (nicosulfuron) e Gramoxone 200 (paraquat), bem como a utilização dessas abelhas como bioindicadores da presença desses agroquímicos. As abelhas foram expostas a diferentes concentrações de nicosulfuron (1%, 10%, 50%, 75% e 100%) e paraquat (0,1%, 1%, 10% e 100%), durante 24 horas em placa de petri. Em seguida foram congeladas e analisadas. Empregando-se as metodologias de isoenzimas em gel de amido, realizou-se a análise de expressão relativa das isoenzimas malato desidrogenase (MDH) e superóxido desmutase (SOD), além da análise de expressão relativa das isoenzimas esterases (EST) em gel de poliacrilamida (PAGE) e análise de peptídeos em SDS-PAGE. As investigações de células nervosas foram realizadas por meio da técnica de CEC (Concentração Crítica de Eletrólitos), utilizando o corante Azul de Toluidina (AT) em pH 4,0 para avaliação de expressão gênica. Verificou-se que o herbicida nicosulfuron provoca inibição parcial das esterases de *T. angustula* e *T. fiebrigi*. E paraquat promove a inibição total da atividade relativa das esterases nas concentrações de 1%, 10% e 100% em *T. fiebrigi*. Nas abelhas *T. angustula*, após contaminação com paraquat a 1%, foi detectada inibição parcial das esterases e inibição total dessas isoenzimas nas concentrações de 10% e 100%. A isoenzima superóxido desmutase apresentou aumento na sua atividade relativa, posteriormente a contaminação com paraquat a 10% e 100% em ambas as

espécies de *Tetragonisca* analisadas. A malato desidrogenase não se apresentou inibida por nenhuma das concentrações dos herbicidas analisados. Também não se verificou alterações nas expressões de peptídeos. Nas células nervosas ocorreram pequenas alterações na expressão gênica após contato com os herbicidas. As enzimas esterases e superóxido desmutase presentes em extratos de *Tetragonisca* são sensíveis à presença de nicosulfuron e paraquat, assim essas abelhas têm potencial para se tornarem bioindicadores da presença desses agroquímicos.

Palavras-chave: jataí, abelha sem ferrão, bioindicadores, paraquat, nicosulfuron

ABSTRACT

FERMINO, Fábio. M. Sc. State University of Maringá. March of 2010. Isoenzymes expression and cytochemical analysis of two species of *Tetragonisca* after contamination by herbicides. Adviser: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki. Committee: Claudete Aparecida Mangolin and Erasmo Renesto.

The stingless bees *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) and *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938) known as “jataí” bee are widely distributed throughout Brazil and recognized by important role pollinators to native vegetation and agricultural crops. The aim of this work was to evaluate the isoenzymes and peptides expression, and nuclear changes in nerve cells of the stingless bees *Tetragonisca* after *in vitro* contamination with herbicides Sanson 40 SC and Gramoxone 200, and to evaluate the use of these bees as bioindicators of the presence of these pesticides. The bees were exposed to different concentrations of the nicosulfuron (1%, 10%, 50%, 75% and 100%) and paraquat herbicides (0.1%, 1%, 10% and 100%) for 24 hours in petri dish. After this period bees were frozen and analyzed. The methods of isoenzyme were employed in starch gel, performed the analysis of relative expression of malate dehydrogenase (MDH) and superoxide dismutase (SOD), and the analysis of relative expression of esterase (EST) in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and analysis of peptides in SDS-PAGE. Analysis of nerve cells were performed using the CEC technique (critical electrolyte concentration) using the dye Toluidine Blue (TB) at pH 4.0 for evaluation of gene expression. It was found that nicosulfuron is an inhibitor of esterase of *T. angustula* and *T. fiebrigi*. The paraquat herbicide promotes the total inhibition of esterase activity in the concentrations of 1%, 10% and 100% in *T. fiebrigi*. Bees *T. angustula* after contamination with paraquat was detected partial inhibition of esterases after contamination of 1% and total inhibition these isoenzymes in the concentrations of 10% and 100%. The superoxide dismutase isoenzyme showed an increase in the relative activity after contamination with paraquat at 10% and 100% in both species *Tetragonisca* analyzed. The malate dehydrogenase was not inhibited by any of the concentrations of the herbicides analyzed. SDS-PAGE analysis showed no changes in the expression of peptides detected. Nerve cells were observed small

changes in gene expression after contact with the herbicides. The enzymes esterase and superoxide dismutase presents in extracts of *Tetragonisca* are sensitive to the presence of nicosulfuron and paraquat, so these stingless bees have the potential to become bioindicators of the presence of these herbicides.

1. INTRODUÇÃO

As abelhas *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811, conhecidas como jataí-verdadeira, “jatay” ou simplesmente jataí e sua congênere *Tetragonisca fiebrigi* Schwarz, 1938, conhecida como “jateí”, jataí-do-sul ou só jataí são pertencentes à família Apidae e tribo Trigonini. *T. angustula* estão amplamente distribuídas por todo o Brasil, América do Sul e América Central, já *T. fiebrigi* tem distribuição restrita à Argentina, Bolívia, Brasil (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo) e Paraguai (Camargo e Pedro, 2008).

O Brasil é considerado privilegiado no número de espécies de abelhas devido a suas proporções continentais e riquezas de ecossistemas, e abriga cerca de ¼ das espécies de abelhas existentes (aproximadamente 5.000 espécies). Há 729 espécies no Estado de São Paulo e mais de 500 espécies no Rio Grande do Sul (Santos, 2002).

Os Meliponini, também conhecidos como abelhas indígenas sem ferrão, constituem um importante grupo de abelhas, com cerca de 400 espécies pertencentes à aproximadamente 50 gêneros (Michener, 2000). No Brasil existem cerca de 300 espécies de abelhas indígenas sem ferrão (Nogueira-Neto, 1997).

As abelhas sem ferrão são consideradas, por muitos autores, como de importância vital para o ecossistema, devido a sua eficiência como polinizadoras. A criação da maioria das espécies de abelhas está ligada, principalmente, ao seu emprego como auxiliar na agricultura e em projetos de reflorestamento, uma vez que numerosas espécies vegetais dependem de processo de polinização cruzada (Michener, 2000; Proni, 2000).

No Brasil, *Tetragonisca angustula* e outras abelhas sem ferrão são polinizadores de morango em casa de vegetação (Malagodi-Braga e Kleinert, 2004). Estes autores verificaram 100% de plantas polinizadas, enquanto no campo esses números chegam a 88% em campo aberto. São de grande importância econômica, etno-cultural, garantem a manutenção de espécies vegetais, tanto como o equilíbrio

ecológico na maioria dos ecossistemas terrestres, sendo ainda utilizados para produção de mel e geoprópolis (Kerr et al., 1996).

Os meliponídeos estão sendo extintos devido às modificações nos ecossistemas tropicais. A fragmentação de áreas de florestas pelo avanço da agricultura e de outras atividades leva ao isolamento de subpopulações, consequentemente, à deriva genética e à endogamia (Nogueira-Neto, 2002).

Devido a sua importância ecológica, os insetos sociais formam um grupo extremamente promissor como bioindicadores, pois há grande biodiversidade a qual responde as mudanças ambientais (Agosti et al., 2000). Essas mudanças são causadas por atividades antrópicas, principalmente a utilização indiscriminada de agroquímicos em plantações, que têm promovido alterações nas condições do seu habitat, comprometendo a diversidade, devido à destruição de locais usados para nidificação, redução na disponibilidade dos recursos alimentares e destruição de colônias naturais.

O declínio no número de abelhas foi observado no mundo todo, está associado ao uso abusivo de pesticidas, desmatamento e poluição (Klein et al., 2007).

Dado o que foi exposto em relação à importância dos meliponídeos, em especial às espécies *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi*, e aos riscos produzidos pelo uso de agroquímicos, o trabalho teve por objetivos analisar os efeitos dos herbicidas nicosulfuron e paraquat sobre as expressões gênicas de isoenzimas e peptídeos, possíveis mudanças bioquímicas das proteínas e alterações nucleares em células nervosas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais das abelhas sem ferrão

As abelhas da subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae), têm o ferrão atrofiado sendo, portanto, incapazes de ferroar. Ocorrem na América do Sul, América Central, Ásia, Ilhas do Pacífico, Austrália, Nova Guiné e África (Michener, 2000).

Todas as espécies de Meliponinae são eusociais, vivem em colônias constituídas por muitas operárias que realizam as tarefas de construção e manutenção da estrutura física da colônia, coleta e processamento do alimento, cuidado com a cria e defesa. Há em algumas espécies até cinco rainhas, elas são responsáveis pela postura de ovos que darão origem às fêmeas (rainhas e operárias) e a, parte dos machos (em diversas espécies, alguns machos são filhos das operárias). Os machos são produzidos em grande número em certas épocas do ano e podem realizar, esporadicamente, algumas tarefas dentro da colônia, além de fecundarem as rainhas, durante o vôo nupcial. Normalmente, alguns dias após emergirem, os machos são expulsos da colônia (Kerr et al., 1996, Michener, 2000).

Em *Tetragonisca angustula* a postura envolve um ritual comportamental, que compreende interações entre a rainha e as operárias. Este ritual é típico para cada espécie e leva à deposição de alimento na célula; à postura pelas operárias de ovos tróficos (servem de alimento para a rainha e, em alguns casos, são comidos pelas próprias operárias); à ingestão de alimento pela rainha; à postura (da rainha) e à operculação da célula (Nogueira-Neto et al., 1986).

Os favos de cria são dispostos na horizontal, existindo somente uma camada de células de cria em cada favo. As células de cria são demolidas após a emergência do adulto. Existe um invólucro envolvendo as crias (Nogueira-Neto et al., 1986).

Nas abelhas e na maioria dos Hymenoptera, as fêmeas possuem, geralmente, cromossomos aos pares em suas células, então são diplóides. Os machos são haplóides, pois possuem normalmente apenas uma série de cromossomos, vindo da mãe, pois são gerados de ovos não fecundados. Também pode haver machos diplóides, mas estes são estéreis ou semi-estéreis (Nogueira-Neto, 1997). Ocasionalmente,

quando as rainhas foram fecundadas por machos aparentados, parte de seus ovos fecundados podem originar machos diplóides, nesse caso a rainha da colônia poderá ser morta pelas operárias (Camargo, 1979).

Em Trigonini, qualquer larva de fêmea, se alimentada com quantidade adequada, é capaz de se diferenciar em rainha, não existem evidências de diferenças qualitativas entre o alimento depositado em células que originarão operárias e machos e ao depositado nas realeiras. Experimentalmente, é possível produzir rainhas, alimentando-se, em células grandes (construídas artificialmente), larvas jovens de operárias com maior quantidade de alimento, retirado de células de operárias ou de machos (Camargo, 1972; Buschini e Campos, 1995).

A maior parte das abelhas se alimenta de produtos obtidos nas flores. Os meliponini coletam néctar e por desidratação e ação enzimática o transformam em mel que é armazenado na colmeia. O mel das abelhas sem ferrão apresenta composição diferente do mel de *Apis mellifera*, pois são mais fluidos e cristalizam lentamente. A quantidade do mel armazenado na colmeia varia muito, havendo espécies que armazenam quantidades muito pequenas, como é o caso de *Leurotrigona*. Algumas espécies de *Melipona* armazenam quantidades bastante grandes, sendo que, em algumas regiões, elas são criadas para produção de mel, como é o caso de *Melipona compressipes* (Tiúba) no Maranhão. O principal alimento protéico para as abelhas adultas e suas larvas é o pólen. Após sua coleta nas flores, pelas abelhas campeiras, ele é transportado para a colônia onde é estocado, sofrendo alterações físico-químicas, devido a processos fermentativos (Penedo et al., 1976). Esses processos diferem, segundo o grupo cujo pertence a abelha, e permitem uma melhor assimilação dos nutrientes e melhor preservação do alimento estocado (Machado, 1971).

Nos potes de estocagem de pólen, são colocados a massa de pólen, sucos digestivos e micro-organismos. Posteriormente, esses potes são fechados, prosseguindo a fermentação que se processa, num primeiro momento, sob condições de aerobiose, ocorrendo sucessão de tipos bacterianos, diminuição do pH e da tensão de oxigênio. O produto inicial é rico em pólen e microrganismos, com pH em torno de 5,0 a 6,0; após alguns dias, dá lugar a uma massa fermentada, de coloração marrom levemente amarelado e odor característico, com pH em torno de 2,6, com baixo

número de microrganismos (alguns anaeróbios), estando pronto para ser consumido pelas abelhas (Machado, 1971, Fernandes-da-Silva e Zucoloto, 1994).

Em muitas espécies, como por exemplo, nas abelhas da tribo Meliponini, a própolis guardada no ninho não é mole, pois endurece rapidamente e não pode ser reutilizada em outros lugares do ninho. Contudo, em espécies como *Tetragonisca angustula* e *Plebeia sp.*, a própolis é guardada em depósitos e possui uma forma grudenta e pegajosa. Esses meliponíneos empregam esta própolis pegajosa, geralmente, para fechar as frestas dos seus ninhos e também como arma de defesa mais direta sobre inimigos, pois quando estão em perigo, suas operárias frequentemente retiram pequenos pedaços de própolis viscosa de seus depósitos e as colocam sobre a cabeça e outras partes do corpo de seus inimigos, assim elas derrubam-os ao chão, garantindo a tranquilidade da colônia. A cera pura de coloração branca pode ser encontrada em pequenos depósitos no ninho de alguns meliponíneos, como verificado em *Tetragonisca angustula* (Nogueira-Neto, 1997).

2.2. Atividade dos herbicidas nicosulfuron e paraquat

O nicosulfuron, princípio ativo do Sanson 40 SC (BASF), é um herbicida sistêmico seletivo para o milho, pertencente ao grupo das sulfoniluréias e classe toxicológica III, com toxicidade para humanos, incluindo carcinogênese, toxicidade reprodutiva e para o desenvolvimento, e neurotoxicidade. A DL_{50} (dose letal para 50% dos animais expostos, Osweiler, 1998) oral é de 5g/kg em ratos, DL_{50} dérmica para coelhos é 2g/kg, e a CL_{50} (concentração letal para 50% dos animais expostos, Osweiler, 1998) para inalação em ratos é 5,6mg/L. É recomendado para aplicação em pós-emergência inicial no controle de gramíneas anuais e algumas perenes, bem como certas invasoras de folhas largas, sendo recomendado de 1,25 a 1,5 L/ha do produto comercial, que contém 40g do ingrediente ativo (nicosulfuron) (Rodrigues e Almeida, 2005).

O modo de ação do nicosulfuron é baseado na inibição da Acetolacto Sintase (ALS), enzima essencial na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), sendo um potente inibidor de divisão celular (Rodrigues e Almeida, 2005). Segundo Leboulanger et al. (2001), como o nicosulfuron é aplicado em baixas dosagens, ele apresenta baixa toxicidade, não deixa resíduos e não se acumula no solo.

Apesar de ser recomendado para a cultura do milho, o nicosulfuron pode causar em alguns cultivares, fitotoxicidade em níveis inaceitáveis, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta, do ambiente e da dose utilizada (Gubbiga et al., 1995).

Massa et al. (2008) verificaram que o herbicida nicosulfuron associado ao inseticida diazinon, produz um efeito tóxico aumentado contra *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). Segundo os autores, a presença dos pesticidas em associação eleva a toxicidade, mas não prejudica o funcionamento das enzimas acetilcolinesterase e glutathione-S-transferase.

Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio dicloreto) é um herbicida de contato, não seletivo, do grupo dos bipiridílios, sendo considerado muito perigoso ao meio ambiente (classe I). É recomendado o uso de 1,5 a 3,0 L/ha e sua utilização deve ser na pós-emergência de plantas invasoras, desde capins até plantas de folhas largas (dicotiledôneas), como amendoim-bravo - *Euphorbia heterophylla*, e mentrasto - *Ageratum conyzoides* (Syngenta, 2010).

O fabricante do Gramoxone 200 (Syngenta) recomenda para cultivos de banana – *Musa sp.*, café – *Coffea arabica*, cana-de-açúcar – *Saccharum spp.*, citros, maçã – *Mallus spp.*, e seringueira - *Hevea brasiliensis*, e para culturas anuais em plantio direto: algodão – *Gossypium spp.*, arroz – *Oryza spp.*, batata - *Solanum tuberosum*, couve – *Brassica oleracea*, feijão – *Phaseolus vulgaris*, milho – *Zea mays*, trigo – *Triticum spp.*, e soja – *Glycine max*.

Estudos de toxicidade cutânea aguda em ratos determinaram a DL₅₀ aguda dérmica como igual a 520 mg/kg peso corpóreo. Estudo sobre CL₅₀ inalada apresentou resultado de 0,6 e 1,4mg/m³ em ratos, onde os animais apresentaram irritação do trato respiratório (Syngenta, 2010).

O catabolismo do paraquat é feito pelo citocromo P450, provocando a formação de superóxidos que reagem com os lipídios celulares (peroxidação lipídica). Nos pulmões, que constituem o órgão-alvo do paraquat (em humanos e ratos), a ação dos superóxidos resulta em modificações da permeabilidade da membrana celular e morte das células parenquimatosas e endoteliais. Após passar por uma redução a elétron livre nos tecidos, o radical livre resultante é rapidamente oxidado pelo oxigênio molecular ao composto original. Isto leva a uma excreção principalmente de paraquat não alterado, após a administração a ratos (Syngenta, 2010).

A ingestão e/ou inalação de doses subletais de paraquat por animais gera fibrose, edemas pulmonares, pneumonia intersticial, além de ser um fator contribuinte para a doença de Parkinson (caracterizada pela morte de neurônios dopaminérgicos com inclusões conhecidas como corpos de Lewy) (Ishii et al., 2002, Barlow et al., 2004, Yang et al., 2009). Segundo Langston et al. (1984) e González-Polo et al. (2004), paraquat é indutor de doença de Parkinson porque apresenta estrutura molecular semelhante ao MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridínio), um potente indutor da doença de Parkinson. Segundo Wesseling et al. (1999), estudos clínicos sugeriram que o herbicida paraquat pode estar associado a câncer de pele em humanos, bem como outros tipos de tumores.

As enzimas são bons meios de reconhecer a presença de paraquat nos animais. Ahmed et al. (2007) analisaram o papel bioquímico do herbicida paraquat na inibição das enzimas acetilcolinesterase do veneno da serpente *Bungarus sindanus* (Elapidae) e butirilcolinesterase do soro humano, e foi reconhecido que paraquat é inibidor de esterase tão potente quanto malathion e carbofuran.

Mockett et al. (1999) também salientam que o estresse oxidativo provocado por paraquat em *Drosophila melanogaster* é reconhecido pelo aumento de expressão da enzima superóxido desmutase (SOD), portanto, esta enzima também pode ser utilizada nas investigações sobre contaminação por paraquat. As enzimas SOD e glutathione redutase, protegem os animais do estresse oxidativo.

2.3. Genética bioquímica das isoenzimas

As isoenzimas foram, convencionalmente, definidas como formas moleculares múltiplas de uma mesma enzima, ocorrendo ou num único indivíduo, ou em indivíduos de uma mesma espécie (Markert e Möller, 1959). Elas têm uma ocorrência generalizada em plantas e animais e são características de muitas células, tecidos e órgãos.

Algumas enzimas são determinadas por dois ou mais locos gênicos estruturais, cada um dos quais codifica a sequência primária de um determinado polipeptídeo. Estes polipeptídios podem formar, separadamente, os vários componentes de um conjunto de isoenzimas. Os diferentes polipeptídios podem combinar-se, também, em proporções idênticas ou diferentes, para formar uma série mais complexa de isoenzimas. Diferenças marcantes nas quantidades dos polipeptídios produzidos pelos diferentes locos podem ocorrer entre células de diferentes tecidos. As quantidades relativas destas isoenzimas podem exibir, alterações marcantes durante o desenvolvimento (Del Lama, 1982).

A segunda causa da formação de isoenzimas, segundo Del Lama (1982), decorre da possibilidade da ocorrência de diferentes alelos em um loco gênico. Uma vez que cada alelo codificará uma versão estruturalmente distinta da cadeia polipeptídica, a estrutura primária da enzima ou proteína envolvida diferirá de um indivíduo a outro, segundo os alelos que carregam no *loco* em questão. Os heterozigotos, uma vez que apresentam dois alelos diferentes, deverão exibir, geralmente, um padrão isoenzimático mais complexo que os homozigotos.

O padrão isoenzimático dos heterozigotos será uma simples mistura daqueles que ocorrem nos dois homozigotos correspondentes, se a enzima for monomérica. Todavia, quando a enzima apresenta estrutura quaternária, podem ocorrer isoenzimas híbridas adicionais ausentes nos homozigotos (Del Lama, 1982).

Modificações pós-traducionais das enzimas resultam em isoenzimas conformacionais, as quais diferem em estruturas secundárias e terciárias. Podem

ocorrer diferenças na atividade isoenzimática associada a estágios de desenvolvimento (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

O papel fisiológico preciso das múltiplas formas de uma enzima não está bem estabelecido. Sabe-se, entretanto, que algumas destas formas podem existir em diferentes organelas intracelulares, como por exemplo, a malato desidrogenase (MDH) dos eucariotos que apresentam a forma mitocondrial e citosólica. Nos insetos, α -glicerofosfato desidrogenase é outra enzima que apresenta compartimentalização (O'Brien e MacIntyre, 1972 a, b).

O controle genético da síntese de proteínas torna possível a existência de diferenças na estrutura de enzimas homólogas ou proteínas sintetizadas por animais de espécies distintas, ou até mesmo por animais de genótipos diferentes dentro das mesmas espécies. Porém, o que surpreende é a evidência de que várias enzimas não só existem em múltiplas formas moleculares dentro de um único organismo, mas até mesmo dentro de um único tecido (Ruvolo-Takasusuki et al., 1997).

Dos vários marcadores moleculares disponíveis na atualidade, as isoenzimas, pela relativa simplicidade e rapidez das análises em relação aos outros marcadores, têm gerado uma enorme gama de informações práticas na identificação de espécies híbridas, populações naturais e cultivadas de diversos organismos vivos (Teixeira et al., 2004).

A enzima malato desidrogenase apresenta importantes funções no interior da célula. Como uma das enzimas do ciclo de Krebs, desempenha importante função em muitas vias bioquímicas. Participa do ciclo do malato, mecanismo de transferência de equivalentes redutores, através das membranas mitocondriais; em plantas superiores, pode participar da fixação do CO_2 (Scandalios, 1975).

A função da superóxido dismutase parece ser a de proteger os organismos aeróbicos contra os efeitos deletérios potenciais do superóxido. Ela ocorre em diversos compartimentos celulares diferentes. A enzima citosólica é constituída de duas subunidades similares, cada uma contendo um equivalente de Cu^{2+} e um de Zn^{2+} , enquanto a enzima mitocondrial contém Mn^{2+} , similar à enzima encontrada em bactérias. Estas observações apóiam a hipótese de que a mitocôndria evoluiu de um

procarioto que entrou em simbiose com um protoeucarioto. A dismutase ocorre em todos os tecidos aeróbicos principais. Embora a exposição de animais a uma atmosfera de 100% de oxigênio determine um aumento adaptativo da enzima, particularmente, nos pulmões, a exposição prolongada conduz prejuízos pulmonares e morte (Murray et al., 1998).

Segundo Stadtman (1992) e Beckman e Ames (1998), o estresse oxidativo ocorre por um desbalanceamento entre a produção de agentes oxidantes nocivos e a capacidade de defesa antioxidante, levando a uma senescência fisiológica e por consequência a morte. Orr e Sohal (1993) testaram em *Drosophila melanogaster* transgênica a superexpressão dos genes para superóxido desmutase (Cu-Zn SOD) e catalase, e verificaram aumento na longevidade dos indivíduos.

Dentre os sistemas enzimáticos, as esterases são eficientes para catalisar a hidrólise de uma ampla variedade de ésteres alifáticos e aromáticos, amidas e tioésteres, assim como em muitos processos diferentes. Além disso, essas enzimas apresentam uma ampla distribuição tecidual durante o desenvolvimento dos insetos (Ruvolo-Takasusuki et al., 1997).

As colinesterases são classificadas em dois grandes grupos, dependendo do substrato. Acetilcolinesterase (*AChE*: E.C.3.1.1.7) é um componente de membrana presente em neurônios colinérgicos e é responsável por controlar a transmissão de impulsos nervosos através das sinapses colinérgicas e nas junções neuromusculares, enquanto Butirilcolinesterase (*BChE*: E.C.3.1.1.8) é uma colinesterase não específica (Chatonnet e Lockridge, 1989; Milatovic e Dettbarn, 1996; Schetinger et al., 2000).

O papel fisiológico das esterases nos insetos permanece em grande parte ainda desconhecido. Contudo, existem evidências de que estas participam da regulação dos níveis de hormônio juvenil (Whitmore Júnior et al., 1972; Yoo et al., 1996), da degradação de inseticidas, bem como diferentes processos de detoxificação, e no metabolismo de lipídeos (Sudderuddin e Tan, 1973; Zhu e Brindley, 1990).

2.4. Citoquímica de núcleos

Em colorações de tecidos com soluções de azul de toluidina (AT) em pH 3.6-4.0, moléculas deste corante se ligam a grupos fosfatos disponíveis no DNA e no RNA. Deste modo ambos se apresentam corados em soluções de AT. O DNA não complexado a proteína e complexos DNA-proteína em cromatina de células somáticas, geralmente exibem basofilia metacromática (cor violeta). O fenômeno da metacromasia ocorre com o empilhamento e interação das moléculas de AT ligadas aos grupos fosfatos dos ácidos nucleicos (Chayen e Bitensky, 1991; Mello, 1997).

Se a coloração com AT ocorrer em presença de íons Mg^{2+} , ocorrerá competição entre estes pelas cargas negativas do DNA e RNA. Numa certa concentração do íon Mg^{2+} , a coloração do ácido nucleico deixará de ser metacromática. Esta concentração foi chamada por Vidal e Mello (1989) de concentração crítica de eletrólitos (CEC), sendo expressa pela molaridade do sal utilizado, visualmente reconhecido pela coloração esverdeada da cromatina. A curva espectral dos picos de absorção da cromatina corada com AT mostrou que a metacromasia (máxima disponibilidade de grupos fosfatos livres) possui pico de absorção em $\lambda = 540-550$ nm e exibe coloração violeta, enquanto que a abolição da mesma possui pico em $\lambda = 625-630$ nm e exibe coloração verde, o que permite a caracterização da CEC sem a utilização de microespectrofotômetro (Mello, 1997).

A pesquisa de CEC, usando-se AT como corante e Mg^{2+} como íon inorgânico, inicialmente idealizada para modelos de DNA-proteína *in vitro* (Vidal e Mello, 1989), mostrou-se sensível para diferenciar tipos de complexos DNA-proteínas em cromatina *in situ* (Mello, 1997).

A competição entre o AT e o Mg^{2+} pelos sítios de ligação na cromatina varia quando são comparadas heterocromatina e eucromatina, espermatozóides de diferentes espécies animais, *puffs* de DNA e RNA, bandas de cromossomos politênicos e um mesmo núcleo sob diferentes condições fisiológicas ou do desenvolvimento, estresse metabólico de diversos tipos, como presença de pesticidas. As diferenças na disponibilidade dos grupos fosfatos no ácido nucleico, assim como o empacotamento dos mesmos determinam graus de condensação e mudanças nos valores de CEC.

Cromatina condensada apresenta valor de CEC mais elevado do que a cromatina descondensada (Mello, 1997; Monteiro e Mello, 1998, Falco e Mello, 1999). A cromatina se condensa e descondensa à medida que sequências de DNA específicas nas células são acessadas para a expressão gênica (Alberts et al., 2004).

A técnica de CEC, por caracterizar a atividade nuclear das células, é um ótimo método para verificar se mudanças ambientais, como a presença de herbicidas, provoca alterações nas células nervosas de *T. angustula* e *T. fiebrigi*. Se constatada variação na citoquímica dos núcleos, pode-se inferir que tal mudança decorreu devido às substâncias que estão em contato com as abelhas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta das abelhas

Operárias adultas de *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi* foram coletadas de ninhos naturais localizados no campus da Universidade Estadual de Maringá (23° 24'S; 51° 56'O). As abelhas foram coletadas em garrafas plásticas e anestesiadas no freezer por aproximadamente um minuto, sendo então colocadas em placas de petri previamente montadas.

3.2. Montagem dos bioensaios

Após a coleta, as abelhas foram submetidas aos bioensaios em placas de petri contendo alimento (Cândi: mistura de mel e açúcar de confeitiro até adquirir consistência pastosa) e um papel filtro (12cm de diâmetro) embebido em 2mL da solução contendo o herbicida. Foram utilizadas, aproximadamente, 20 abelhas por placa, sendo utilizadas quatro placas, ocorrendo três repetições e uma controle, a qual possuía apenas alimento e papel filtro embebido em 2mL de água destilada. As abelhas foram deixadas nas placas no escuro por um período de 24h. Na sequência realizou-se a contagem das abelhas mortas, as vivas foram sacrificadas e congeladas a -20°C para a análise eletroforética.

3.3. Diluições dos herbicidas

O herbicida foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e a partir dessa solução realizou-se as diluições como mostra o quadro 1.

Quadro 1 - Diluições dos herbicidas utilizados nos bioensaios

Herbicida	Diluição (%)	Concentração (g/ml)
Sanson 40 SC Nicossulfuron 40 g/L	100	$3,0 \times 10^{-4}$
	75	$2,25 \times 10^{-4}$
	50	$1,5 \times 10^{-4}$
	10	$3,0 \times 10^{-5}$
	1	$3,0 \times 10^{-6}$
Gramoxone 200 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio dicloreto (paraquat) 200g/L	100	$1,5 \times 10^{-3}$
	10	$1,5 \times 10^{-4}$
	1	$1,5 \times 10^{-5}$
	0,1	$1,5 \times 10^{-6}$

3.4. Análise de mortalidade

Não foram calculados os valores de CL_{50} para os herbicidas, pois em valores máximos (100%) não se detectou mortalidade acima de 50%.

3.5. Eletroforese em gel de amido

3.5.1. Extração das enzimas

Na análise das isoenzimas em gel de amido foram utilizados apenas os abdomens das abelhas. Essa parte do corpo foi empregada, pois as isoenzimas analisadas apresentam maior atividade relativa nos tecidos abdominais.

O abdome de cada indivíduo foi colocado em tubos de propileno de 1,5mL contendo 20 μ L de β -mercaptoetanol a 0,1%, em seguida, macerado com auxílio de um bastão de vidro. Durante todo o período de manipulação as amostras permaneceram no gelo. Após a maceração, os tubos foram levados para centrífuga refrigerada por 15 minutos a 16100xg, a uma temperatura de 4°C, sendo utilizado o sobrenadante para aplicação no gel.

3.5.2. Preparo dos géis

Os géis de amido de milho (14%) foram preparados com 19,2g de penetrose 50[®] (Corn Products of Brazil) acondicionados em Kitassato, ao qual adicionou-se 120ml de solução tampão tris-citrato 0,1mol/L pH 7,5. Essa mistura foi aquecida até adquirir uma consistência viscosa. Em seguida, despejou-se o gel sobre uma placa de vidro (18cm x 9cm x 0,7cm) para esfriar à temperatura ambiente (Smithies, 1955).

3.5.3. Aplicação das amostras e corrida eletroforética

Os géis de amido foram cortados a 4,5cm de uma das extremidades. O sobrenadante da centrifugação foi absorvido em papel de filtro Whatman nº 3 (5x5 cm) e inseridos verticalmente no corte. Em seguida, o gel foi submetido a uma corrida eletroforética a 200V, em tampão tris-citrato (0,1mol/L pH 7,5), por um período de 5h 30min.

3.5.4. Revelação das isoenzimas

Após o período de corrida eletroforética, os géis de amido foram cortados longitudinalmente em duas partes homólogas e corados para cada sistema enzimático a ser estudado.

A detecção da atividade da isoenzima superóxido dismutase (SOD - EC 1.15.1.1) foi realizada utilizando 200mL de tampão fosfato de sódio pH 6,2, 20mg de MTT, 0,4mL de TEMED (catalisador) e 1mg de Riboflavina (Alfenas, 2006).

Para a enzima malato desidrogenase (MDH – EC 1.1.1.37), utilizou-se 25mL de tampão tris-HCl (0,1mol/L pH 7,5), 0,3g de ácido málico, 1mL de NAD (1%), 750µL de MTT (0,5%), 750µL de PMS (0,5%) (Alfenas, 2006).

3.6. Eletroforese PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

3.6.1. Extração das enzimas

A cabeça e o tórax foram colocados em tubos de propileno contendo 30µl de solução β-mercaptoetanol + glicerol 10%. Em seguida, foram macerados com o auxílio de um bastão de vidro. Durante todo o período de manipulação todas as amostras foram mantidas no gelo. Após macerar, levou-se os tubos para centrífuga refrigerada por 15 minutos a 16100xg, utilizando 15µL do sobrenadante para aplicação no gel.

3.6.2. Preparo dos géis

Os géis de poliacrilamida para visualização foram preparados com concentração de 8% utilizando 4,0mL de acrilamida/bisacrilamida, 4,0mL de tampão tris-HCl (0,1mol/L pH 8,8), 7,8mL de água destilada, 16µL de TEMED e 320µL de Persulfato de amônia (2%). Preparou-se os géis de empilhamento a 5% com 3,0mL de acrilamida/bisacrilamida, 3,0mL de tampão tris-HCl (0,1mol/L pH 6,8), 30µL de água destilada, 3µL de TEMED e 250µL de Persulfato de amônia (2%) (Alfenas, 2006).

3.6.3. Aplicação das amostras e corrida eletroforética

Em cada poço aplicou-se 15µL do sobrenadante. Em seguida, adicionou-se 500mL de tampão tris-glicina (0,1mol/L pH 8,3) na cuba de eletroforese. Os géis foram submetidos à corrida eletroforética a 200V por 5 horas.

3.6.4. Revelação das isoenzimas

Os géis de poliacrilamida foram incubados por 30min em 50mL de tampão fosfato (0,1mol/L pH 6,2). Em seguida, eles foram retirados do tampão e adicionados a solução de coloração para esterase (EST – E.C. 3.1.1.1), empregando-se 50mL de tampão fosfato (0,1mol/L pH 6,2), 5mL de n-propanol, 0,03g de α -naftil acetato, 0,02g de β -naftil acetato e 0,06g de Fast Blue RR Salt (Alfenas, 2006).

3.7. Eletroforese SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

As eletroforeses SDS-PAGE foram realizadas com géis de visualização a 7% contendo 3,5mL de acrilamida/bisacrilamida, 4,0mL de tampão tris-HCl (0,1mol/L pH 8,8), 8,2mL de água destilada, 107 μ L de SDS (10%), 16 μ L de TEMED e 320 μ L de Persulfato de amônia (2%). Preparou-se os géis de empilhamento a 5% com 3,0 mL de acrilamida/bisacrilamida, 3,0mL de tampão tris-HCl (0,1mol/L pH 6,8), 30 μ L de água destilada, 42 μ L de SDS (10%), 3 μ L de TEMED e 250 μ L de Persulfato de amônia (2%).

O tampão de corrida utilizado foi o tris-glicina 0,1mol/L pH 8,3 e SDS (10%). As eletroforeses realizaram-se a 100 V, por 5h, à temperatura ambiente.

Para coloração, os géis foram incubados em 100mL da solução PAGE (225mL etanol, 225mL de água destilada e 50mL de ácido acético) contendo 0,1g de azul de Comassie brilhante por no mínimo três dias. Após este período, o gel foi lavado com a solução PAGE e fixado em solução conservante (ácido acético a 75%, glicerol a 10%, dissolvidos em 1000mL de água destilada) por pelo menos 24 horas. Em seguida, foram embebidos em gelatina a 5% e colocados entre duas folhas de papel celofane, molhado, esticado, prensado e mantido em temperatura ambiente até a secagem completa deste e, finalmente, digitalizado.

3.8. Basofilia nuclear e concentração crítica de eletrólitos

Após os tratamentos com os herbicidas nicosulfuron e paraquat (nas concentrações recomendadas para aplicação nas culturas, ou seja, 100%), adultos de *T. angustula* e *T. fiebrigi* foram dissecados em estereomicroscópio, seguindo-se à extração de todo o conteúdo da cabeça, seccionada em solução fisiológica para insetos (1.8 g de NaCl; 1.88 g de KCl; 0.16 g de CaCl₂; 0.004 g de NaHCO₃; água destilada - q.s.p. 100 mL) sendo esmagados (lâmina e lamínula) em ácido acético 45% e congelados em nitrogênio líquido. Após atingirem a temperatura ambiente, retirou-se a lamínula. O material foi, então, fixado em etanol: ácido acético (3:1-v/v) por 2 minutos, lavado em etanol 70% por 10 minutos.

As lâminas foram coradas por 20 minutos com azul de toluidina (AT) 0,025% em tampão MacIlvaine pH 4.0 sem MgCl₂. Outras lâminas também foram coradas com AT 0,025% em tampão MacIlvaine pH 4.0 acrescido de diferentes concentrações de MgCl₂ (0,02; 0,05; 0,08; 0,10; 0,12; 0,15; 0,20; 0,30 mol/L). Lavou-se o material em água deionizada. Logo em seguida, efetuou-se o clareamento em xilol por 15 minutos e montagem em Entellan (Vidal e Mello, 1989).

Após a secagem, das lâminas, usou-se microscópio de luz Zeiss Standard (Carl Zeiss, Jena, Germany) para observá-las, fotografando com fotomicroscópio Zeiss Axioescope 40 acoplado a AxioCam (Carl Zeiss, Jena, Germany).

(Obs. Não foram realizadas avaliações citoquímicas nas concentrações mais baixas dos herbicidas, uma vez que houve um comportamento citoquímico quase uniforme para as células nervosas na maior concentração testada, 100%).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeitos da contaminação por herbicidas nas abelhas do gênero *Tetragonisca*

As análises para ambos os herbicidas (Quadros 2-3) indicam que a porcentagem de indivíduos mortos é baixa, não sendo possível afirmar que há efeito dos herbicidas sobre a mortalidade das abelhas.

Quadro 2 - Mortalidade de *T. angustula* nos bioensaios com os herbicidas nicosulfuron (Sanson 40 SC) e paraquat (Gramoxone 200) após 24h de exposição

Teste	Concentração (%)	Concentração (g/mL)	Mortas	Vivas	% Indivíduos mortos
Controle	(água destilada)	----	0	56	0,0
Sanson 40 SC (nicosulfuron)	1	$3,0 \times 10^{-6}$	0	60	0,0
	10	$3,0 \times 10^{-5}$	4	57	6,5
	50	$1,5 \times 10^{-4}$	0	60	0,0
	75	$2,25 \times 10^{-4}$	4	46	8,0
	100	$3,0 \times 10^{-4}$	0	60	0,0
Total			8	339	2,75
Controle	(água destilada)	----	0	60	0,0
Gramoxone 200 (paraquat)	0.1	$1,5 \times 10^{-6}$	0	40	0,0
	1	$1,5 \times 10^{-5}$	0	40	0,0
	10	$1,5 \times 10^{-4}$	0	40	0,0
	100	$1,5 \times 10^{-3}$	4	36	10,0
Total			4	216	2,5

A mortalidade de abelhas não é um parâmetro se utilizará futuramente para detectar a presença de resíduos desses herbicidas no ambiente. Os problemas ambientais gerados pelos herbicidas analisar-se-ão por outros métodos. Apesar de não causar a morte das abelhas, em longo prazo, não se infere ou se sabe qual efeito será ocasionado nos ninhos, se a prole sofrerá algum tipo de problema, como malformações, ou ainda se a população apresentará algum comportamento atípico ou até redução da fertilidade da rainha e dos futuros zangões.

Quadro 3 - Mortalidade de *T. fiebrigi* nos bioensaios com os herbicidas nicosulfuron (Sanson 40 SC) e paraquat (Gramoxone 200) após 24h de exposição

Teste	Concentração(%)	Concentração (g/mL)	Mortas	Vivas	% Indivíduos mortos
Controle	(água destilada)	----	0	62	0,0
Sanson 40 SC (nicosulfuron)	1	$3,0 \times 10^{-6}$	0	63	0,0
	10	$3,0 \times 10^{-5}$	1	79	1,25
	50	$1,5 \times 10^{-4}$	7	73	8,75
	75	$2,25 \times 10^{-4}$	6	55	9,83
	100	$3,0 \times 10^{-4}$	6	54	10,0
Total			20	386	5,8
Controle	(água destilada)	----	0	40	0,0
Gramoxone 200 (paraquat)	0.1	$1,5 \times 10^{-6}$	0	40	0,0
	1	$1,5 \times 10^{-5}$	0	40	0,0
	10	$1,5 \times 10^{-4}$	0	40	0,0
	100	$1,5 \times 10^{-3}$	2	38	5,0
Total			2	198	1,25

La Clair et al. (1998) colocam que, apesar de ser necessário aumentar o número de estudos sobre o efeito de pesticidas (como o paraquat, por exemplo) às populações de anfíbios, supõe-se que estes afetam o crescimento das populações, provocam malformações e mortalidade.

Em ambientes aquáticos, Gagneten (2002) verificou que de 0,2mg/L a 0,8mg/L paraquat é extremamente tóxico, sendo responsável pela diminuição nas densidades populacionais de 40 táxons, mas não causando a redução na riqueza de espécies.

Segundo Leboulanger et al. (2009), os micro-organismos e o zooplâncton presentes em reservatórios de água doce apresentam diminuição no tamanho das populações quando expostos à herbicidas, sendo paraquat um dos agentes tóxicos para estes organismos aquáticos.

As análises isoenzimáticas em *T. angustula* realizaram-se em duas regiões esterásicas: EST-3 (β -esterase, acetilesterase) e EST-4 ($\alpha\beta$ -esterase, carboxilesterase), e em *T. fiebrigi* observou-se três regiões: EST-1 (β -esterase, colinesterase I), EST-2 (α -esterase, colinesterase II) e EST-4 ($\alpha\beta$ -esterase, carboxilesterase). Portanto, EST-4 aparece como uma região comum às duas espécies. A expressão dos locos da superóxido desmutase *Sod-1*, e malato desidrogenase *Mdh-2* e *Mdh-3* foram detectadas nas duas espécies analisadas.

A partir das análises realizadas dos experimentos com paraquat evidenciou-se que a enzima malato desidrogenase não sofreu aparente alteração em nenhuma das espécies, nas concentrações analisadas (Figura 1) (Quadros 4-5). No entanto, ocorreram alterações significativas nas expressões das isoenzimas superóxido desmutase (SOD) (Figura 3) e esterase (Figuras 5-6) de *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi* (Quadros 4-5) após contato com paraquat.

Quadro 4 - Inibição da atividade das isoenzimas malato desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD) e esterase (EST) detectada em *T. angustula* após contato com nicosulfuron e paraquat. (+) ausência de inibição; (+-) inibição parcial; (-) inibição total; (++) aumento na expressão

Herbicidas	ISOENZIMAS				
	MDH-2	MDH-3	SOD-1	EST-3	EST-4
Nicosulfuron (%)					
1%	+	+	+	+	+
10%	+	+	+	+	+
50%	+	+	+	+	+
75%	+	+	+	+/-	+/-
100%	+	+	+	+/-	+/-
Paraquat (%)					
0,1%	+	+	+	+	+
1%	+	+	+	+/-	+/-
10%	+	+	++	-	-
100%	+	+	++	-	-

O tratamento com nicosulfuron apresentou redução na atividade das enzimas esterase de ambas as espécies (Figuras 7-8). Já nas enzimas superóxido desmutase de *T. angustula* e *T. fiebrigi* (Figura 4), não se observou alterações pelas concentrações de nicosulfuron empregadas. As enzimas malato desidrogenase não apresentaram alterações de expressão (Figura 2) nos experimentos com nicosulfuron em nenhuma das espécies (Quadros 4-5).

Quadro 5 - Inibição da atividade das isoenzimas malato desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD) e esterase (EST) detectada em *T. fiebrigi* após contato com nicosulfuron e paraquat. (+) ausência de inibição; (+-) inibição parcial; (-) inibição total; (++) aumento na expressão

Herbicidas	Isoenzimas					
	MDH-2	MDH-3	SOD-1	EST-1	EST-2	EST-4
Nicosulfuron (%)						
1%	+	+	+	+	+	+
10%	+	+	+	+	+	+
50%	+	+	+	+	+	+
75%	+	+	+	+-	+-	+-
100%	+	+	+	+-	+-	+-
Paraquat (%)						
0,1%	+	+	+	+	+	+
1%	+	+	+	-	-	-
10%	+	+	++	-	-	-
100%	+	+	++	-	-	-

Os resultados observados para esterase em *T. angustula* e *T. fiebrigi* corroboram as avaliações da expressão dessas enzimas, após exposição à paraquat, em *Caenorhabditis elegans*, homem, rato, *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae), *Drosophila* e camarão de água doce (Vanfleteren, 1993; Di Marzio et al., 1998; Mockett et al., 1999; Ahmed et al., 2007; Ray et al., 2007; Lee et al., 2008).

As pesquisas citadas acima mostraram que a inibição das esterases, das glutatonas, e das proteínas contra o envelhecimento e degeneração do sistema nervoso foram verificadas após contato com paraquat *in vitro* e *in vivo*.

Estudos desenvolvidos com a toxicidade dos herbicidas paraquat e nicosulfuron foram realizados com várias espécies animais e fungos, contudo, nenhum deles com abelhas. Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que, considerando as alterações observadas nas esterases, as *T. fiebrigi* são mais sensíveis à presença do herbicida paraquat que as *T. angustula*.

El-Demerdash et al. (2001) analisaram a toxicidade de paraquat sobre as enzimas séricas acetilcolinesterase e verificaram que a atividade enzimática torna-se reduzida nas concentrações entre 321mmol e 750mmol do herbicida. Ahmed et al. (2007) descreveram a atividade inibitória de paraquat sobre esterases semelhante a de malathion e carbofuran.

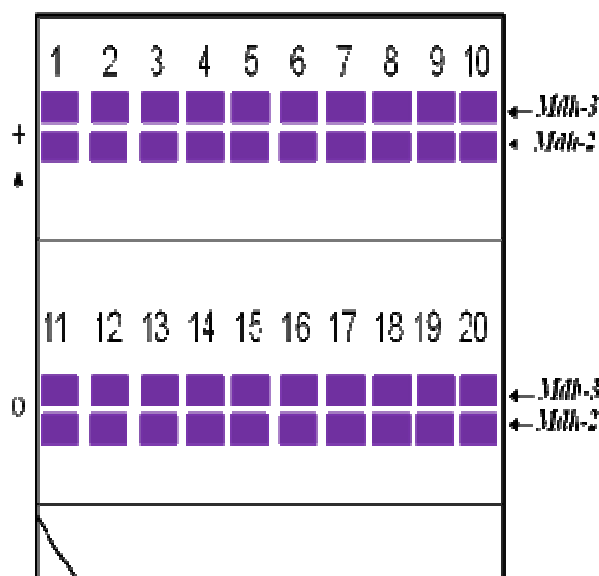


Figura 1 - Zimograma do padrão eletroforético em gel de amido 14% de malato desidrogenase (MDH). *T. angustula*, 1-5: controle, 6-10: paraquat 100%; e *T. fiebrigi*, 11-15: controle, 16-20: paraquat 100%.

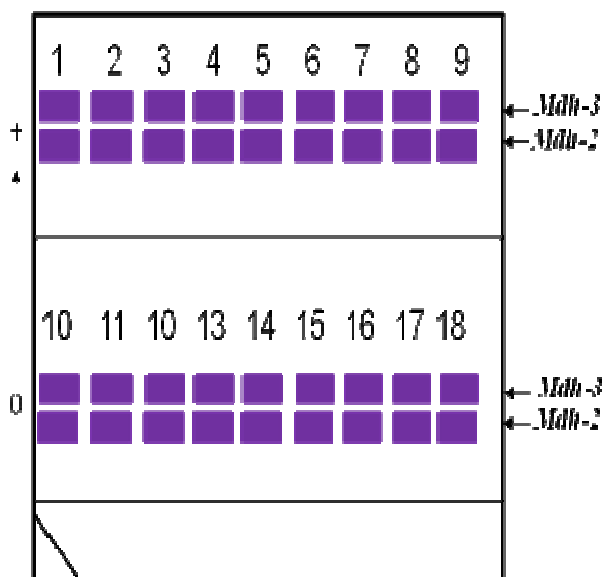


Figura 2 - Zimograma do padrão eletroforético em gel de amido 14% de malato desidrogenase (MDH). *T. angustula*, 1-4: controle, 5-9: nicosulfuron 100%; e *T. fiebrigi*, 10-13: controle, 14-18: nicosulfuron 100%.

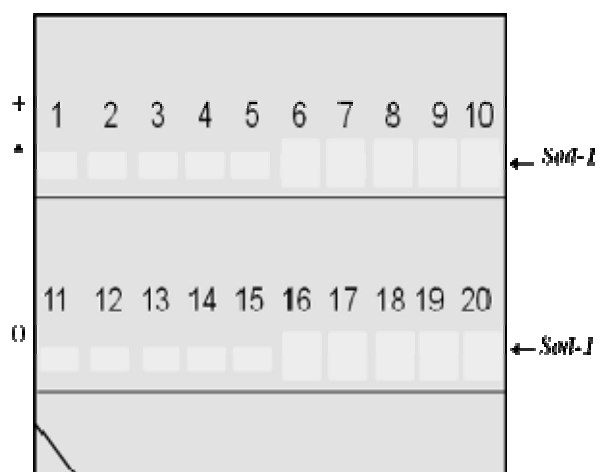


Figura 3 - Zimograma do padrão eletroforético em gel de amido 14% de superóxido desmutase (SOD). *T. angustula*, 1-5: controle, 6-10: paraquat 100%; e *T. fiebrigi*, 11-15: controle, 16-20: paraquat 100%.

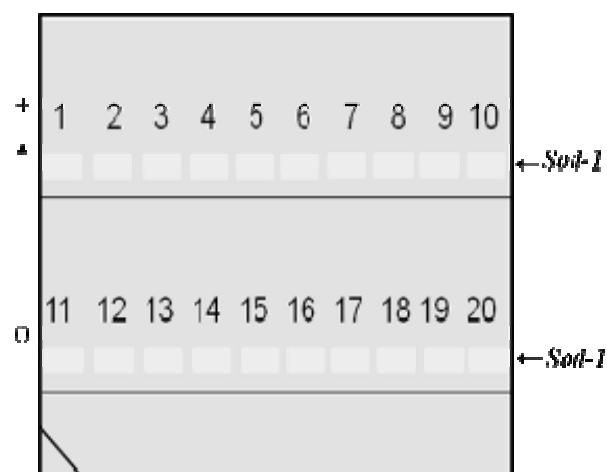


Figura 4 - Zimograma do padrão eletroforético em gel de amido 14% de superóxido desmutase (SOD). *T. angustula*, 1-5: controle, 6-10: nicosulfuron 100%; e *T. fiebrigi*, 11-15: controle, 16-20: nicosulfuron 100%.

Observação: nesta página são exibidos alguns resultados na forma de zimogramas, apenas para efeito de ilustração.

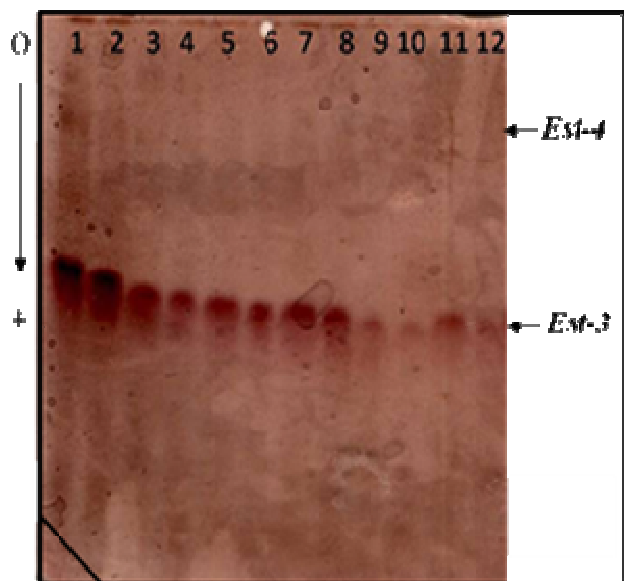


Figura 5 - Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% para esterase (EST). *T. angustula*, 1- 8: controle, 9-12: paraquat 1%.

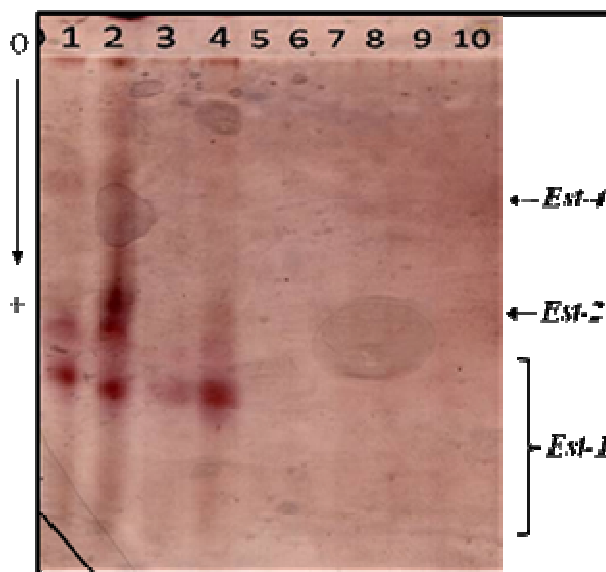


Figura 6 - Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% para esterase (EST). *T. fiebrigi*, 1-4: controle, 5-10: paraquat 1%.

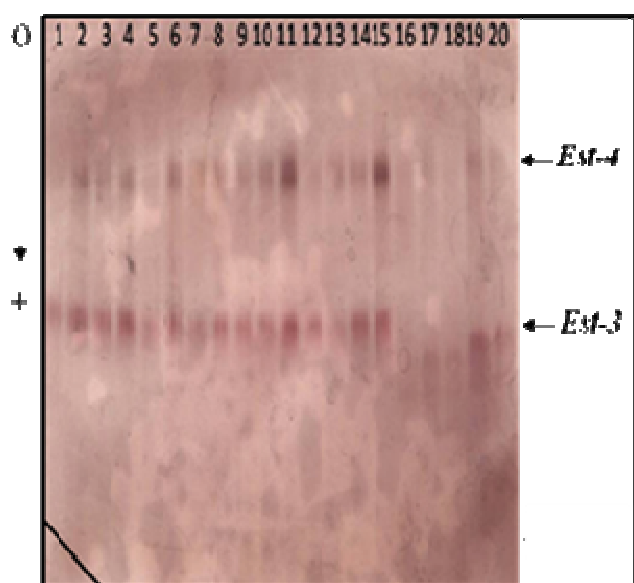


Figura 7 - Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% para esterase (EST). *T. angustula*, 1-4: controle, 5-8: nicosulfuron 1%, 9-12: nicosulfuron 10%, 13-16: nicosulfuron 50%, 17-20: nicosulfuron 75%.

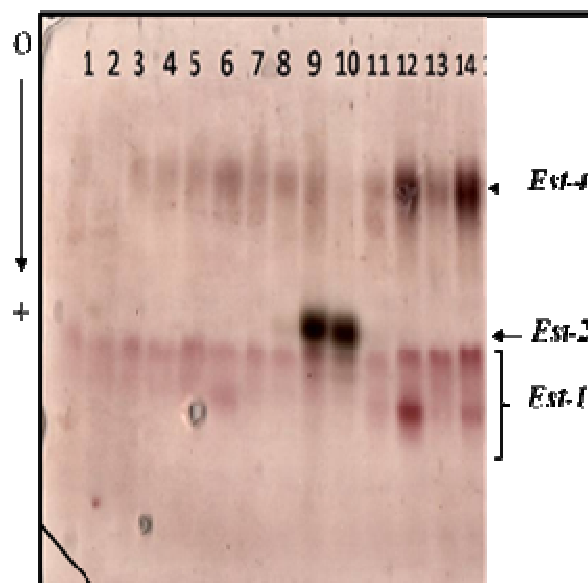


Figura 8 - Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% para esterase (EST). *T. fiebrigi*, 1-8: nicosulfuron 100%. 9-14: controle.

Observação: nesta página são exibidos géis de esterase de algumas concentrações analisadas, apenas para efeito de ilustração.

Com nicosulfuron, os dados de Massa et al. (2008) não foram corroborados, pois segundo estes autores, o herbicida não apresenta ação de inibição sobre esterases, mas foi observada uma inibição parcial das esterases de *T. angustula* e *T. fiebrigi* (Quadros 4-5; figuras 7-8) nas concentrações analisadas.

Asma e Yesilada (2002) analisaram os efeitos de paraquat sobre diversas enzimas de *Funalia trogii* (Fungi), e concluíram que 1,0mmol/L de paraquat aumenta a atividade das enzimas glutathiona redutase, glutathiona transferase e superóxido desmutase e o herbicida diminui a atividade da enzima catalase. O presente estudo corrobora parte dessas afirmativas, pois, observou-se um aumento na atividade relativa da superóxido dismutase nas duas espécies de *Tetragonisca* analisadas.

Em ratos, Ray et al. (2007) verificaram que o herbicida paraquat apresenta-se tóxico para os sistemas anti-oxidantes dos organismos analisados. Há uma redução na atividade das enzimas glutathiona redutase e glicose-6-fosfato desidrogenase, com aumento na atividade das enzimas glutathiona-S-transferase, glutathiona peroxidase, catalase e superóxido desmutase, concluindo que estes sistemas enzimáticos são bons indicadores da presença de paraquat.

A enzima superóxido desmutase tem se tornado importante para análise quanto à presença de resíduos de paraquat no ambiente, porque ela é responsável por detoxificar radicais superóxidos de todos os organismos aeróbicos. Mutações induzidas no gene *Sod-2* de *Drosophila* produziram adultos com severa redução no tempo de vida (Duttaroy et al., 2003). Desta forma, a inativação da SOD ou a competição de outras moléculas pelos sítios ativos da enzima podem gerar perda da capacidade de detoxificação, com danos aos organismos e consequente morte.

Em células nervosas de ratos foi verificado que o aumento de radicais livres tem relação direta com a inibição da enzima SOD e com seu aumento de expressão, e peroxidação de lipídios, e assim representa um risco ao metabolismo deste tipo de células (Otitoju et al., 2008).

Portanto, a enzima superóxido desmutase possui importante papel no metabolismo do herbicida paraquat em animais após a contaminação. O aumento da atividade relativa dessa isoenzima nas duas espécies de abelhas *Tetragonisca*, depois de ser contaminada com esse herbicida, demonstra serem necessários novos estudos para o entendimento do seu papel na detoxificação do organismo desses insetos.

Os efeitos metabólicos produzidos por herbicidas em longo prazo podem levar a mudanças nas populações de invertebrados, como em camarão de água doce (*Macrobrachium nipponense*) de Taiwan, analisados após exposição a paraquat, apresentaram diminuição no tamanho do corpo e redução no consumo de alimento e de oxigênio (Yuan et al., 2004).

Em *Carassius auratus*, verificou-se que, nas concentrações entre 1mg/L e 10mg/L de nicosulfuron, os peixes apresentaram mudanças na percepção olfatória e no comportamento (Saglio et al., 2001).

Por outro lado, Vanfleteren (1993) e Vermeulen et al. (2005) verificaram que em *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* há resistência a paraquat, produzida por alelos da enzima SOD. González-Polo et al. (2004) propõem que os efeitos deletérios de paraquat são minimizados pela vitamina E e alopurinol, que previnem a diminuição de citocromo *c*.

Baixas concentrações de paraquat (5µmol) produzem morte celular por apoptose com redução do conteúdo de citocromo *c* nas mitocôndrias, ativação proteolítica, aumento na atividade da caspase-3, fragmentação do DNA e produção de radicais livres pela enzima xantina oxidase (González-Polo et al., 2004).

Segundo Dinis-Oliveira et al. (2006) o herbicida paraquat é um dos principais agentes da doença de Parkinson, causando danos às mitocôndrias e às células nervosas nos níveis de proteína e genoma (Di Monte, 2003).

Os dados de ambientes aquáticos indicam que os herbicidas apresentam grande potencial para contaminação destes ecossistemas, e a partir dos dados de *T. angustula* e *T. fiebrigi* verificou-se um potencial tóxico também para o ambiente terrestre.

Desta forma, deve ser realizado o manejo adequado dos herbicidas no campo evitando contaminação do solo e dos corpos de água.

A contaminação de animais por herbicidas necessita de maior atenção, sendo paraquat e nicosulfuron potenciais agentes de acidentes que podem gerar desde doenças neurodegenerativas até a morte humana e de outros animais.

4.2. Análise de proteínas totais após contaminação com herbicidas

Os peptídeos analisados por SDS-PAGE foram identificados de acordo com os pesos moleculares (kDa) (Figuras 9 e 10).

As análises em SDS-PAGE revelaram 23 peptídeos para *T. angustula* (Figura 9) e 21 peptídeos para *T. fiebrigi* (Figura 10). Os pesos moleculares variaram de 10kDa (P1) a aproximadamente 300kDa (P23) em *T. angustula*, e de 10kDa (P1) a aproximadamente 220kDa (P21) em *T. fiebrigi*.

Não foram detectadas alterações no número de peptídeos após a contaminação com nicosulfuron e paraquat em todas as concentrações analisadas (Figuras 9 e 10).

Segundo Lee et al. (2008), em *Drosophila*, o herbicida paraquat nas concentrações entre 20mmol e 20 μ mol inibe a expressão dos genes *Parkin* e *tau*, e induz os genes *Uch* (ubiquitina carboxil hidrolase), todos ligados à doença de Parkinson. Ainda segundo os autores, os genes ligados à doença de Parkinson são ativados através do estresse oxidativo, com a expressão aumentada da superóxido desmutase, catalase, peroxidase e glutathiona.

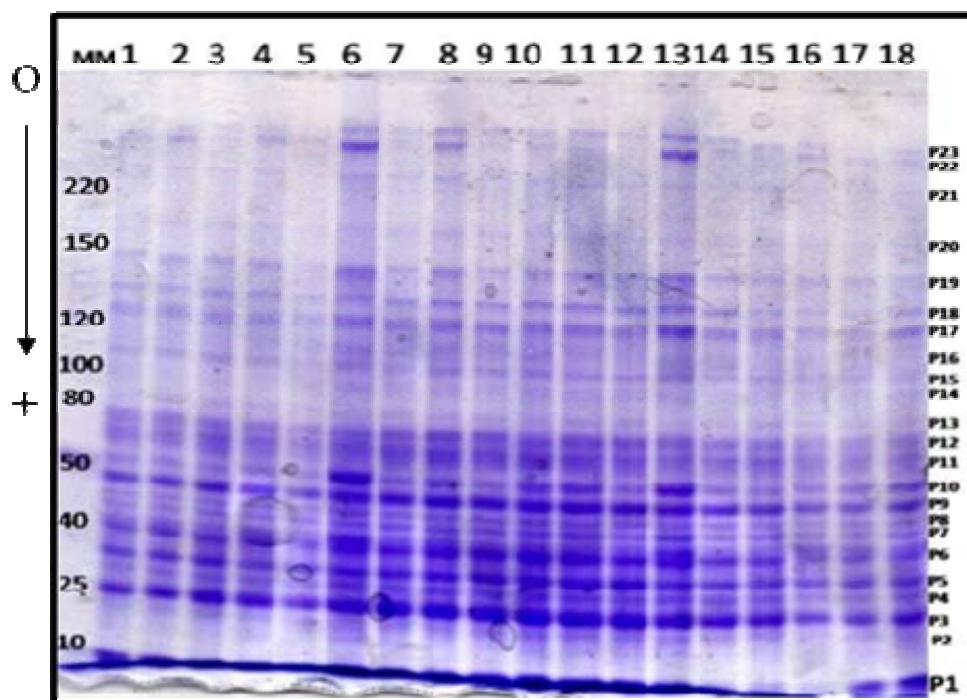


Figura 9 - Gel de proteína total SDS-PAGE 7% de *T. angustula*, após exposição ao herbicida paraquat por 24h, corado com azul brilhante de comassie. MM: marcador de peso molecular. 1-4: controle; 5-8: paraquat 0,1%; 9-12: paraquat 1%; 13-16: paraquat 10%; 17-18: paraquat 100%.

Yang et al. (2009) salientam que paraquat ativa a produção de proteínas reguladoras de apoptose, como GRP78 (proteína chaperona do retículo endoplasmático), proteína semelhante a α -manosidase, proteína homóloga CHOP (fator de transcrição relacionado ao estresse no retículo endoplasmático), IRE1 (enzima requerente de inositol 1), sinal regulador de apoptose kinase 1 (ASK1) e JNK (c-Jun N-terminal kinase). Além disso, paraquat ativa as enzimas calpaína e caspase-3. A presença de paraquat permite a expressão de uma série de proteínas, inclusive chaperonas HSP70 (*heat shock proteins*) (Manning-Bog et al., 2003).

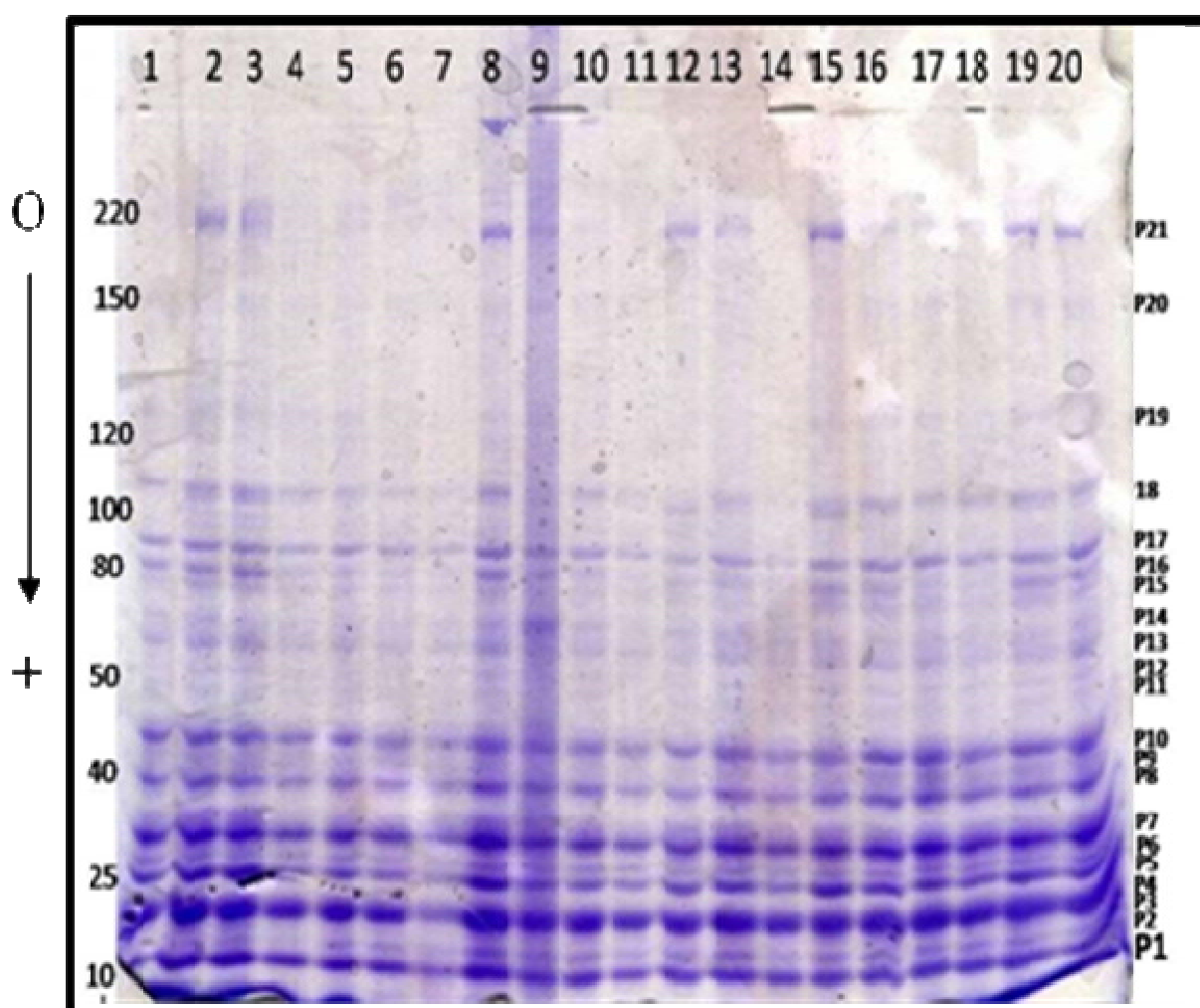


Figura 10 - Gel de proteína total SDS-PAGE 7% de *T. fiebrigi*, após exposição ao herbicida nicosulfuron por 24h, corado com azul brilhante de comassie. 1-4: controle; 5-8: nicosulfuron 10%; 9-12: nicosulfuron 50%; 13-16: nicosulfuron 75%; 17-20: nicosulfuron 100%.

4.3. Análise citoquímica das células nervosas

As células nervosas do cérebro dos insetos e dos invertebrados em geral, são formadas por neurônios (transmissão de impulsos nervosos) e na menor parte por células da glia. Existem vários tipos de células da glia com funções de: regulação neural, barreira hemato-encefálica, suporte trófico, regulação do controle da homeostase extracelular e isolamento dos neurônios e axônios (Edenfeld et al., 2005).

Os neurônios se apresentaram com núcleos pequenos e arredondados e em coloração com AT 0,025%, pH 4.0, na ausência de $MgCl_2$, exibiram coloração metacromática violeta (Figuras 11A-B, 12A-B, 13A-B, 14A-B). A abolição da metacromasia e ponto de CEC nas células nervosas dos indivíduos controle de *T. angustula* ficaram entre 0,12mol/L e 0,15mol/L ($0,12 \leq CEC \leq 0,15$) (Quadros 6-7). Para *T. fiebrigi* o valor de CEC controle também ficou entre 0,12mol/L e 0,15mol/L ($0,12 \leq CEC \leq 0,15$) (Quadros 8-9).

Nas observações dos conteúdos da cabeça das abelhas *T. angustula* e *T. fiebrigi*, observou-se omatídios (Figura 12F), células de epitélio glandular e neurônios. Os omatídios apresentaram-se em todas as colorações com azul de toluidina a coloração violeta característica da metacromasia.

Quadro 6 - Respostas da basofilia nuclear e concentração crítica de eletrólitos (CEC) na cromatina das células nervosas de *T. angustula* após exposição ao herbicida paraquat em concentração de 100%

Azul de Toluidina (AT) + $MgCl_2$ (mol/L)	Controle (água)	Paraquat 100%
AT sem $MgCl_2$	violeta ^λ	violeta ^λ
AT + 0,02	violeta	violeta
AT + 0,05	violeta	violeta
AT + 0,08	azul	azul
AT + 0,10	azul/verde	azul/verde
AT + 0,12	Verde*	Verde*
AT + 0,15	verde	verde
AT + 0,20	verde	verde
AT + 0,30	azul/verde	azul/verde

^λ Coloração violeta, evento da metacromasia em que as moléculas do corante AT estão sobrepostas

* Ponto de CEC, em que o sal $MgCl_2$ se liga ao DNA retirando as moléculas do corante AT

Os indivíduos da espécie *T. angustula* tratados com paraquat apresentaram abolição da metacromasia em 0,12mol/L (Quadro 6), condizendo com o controle ($0,12 \leq \text{CEC} \leq 0,15$). Após os tratamentos com nicosulfuron o ponto de CEC também foi 0,12mol/L (Quadro 7), portanto, os tratamentos não produziram efeitos na expressão gênica reconhecíveis pela técnica citoquímica (Figuras 11-13).

Quadro 7 - Respostas da basofilia nuclear e concentração crítica de eletrólitos (CEC) na cromatina das células nervosas de *T. angustula* após exposição ao herbicida nicosulfuron em concentração de 100%

Azul de Toluidina (AT) + MgCl ₂ (mol/L)	Controle (água)	Nicosulfuron 100%
AT sem MgCl ₂	violeta ^λ	violeta ^λ
AT + 0,02	violeta	violeta
AT + 0,05	azul	azul
AT + 0,08	azul	azul
AT + 0,10	azul/verde	azul/verde
AT + 0,12	azul/verde	Verde*
AT + 0,15	Verde*	verde
AT + 0,20	verde	verde
AT + 0,30	azul/verde	azul/verde

^λ Coloração violeta, evento da metacromasia em que as moléculas do corante AT estão sobrepostas

* Ponto de CEC, em que o sal MgCl₂ se liga ao DNA retirando as moléculas do corante AT

O tratamento de *T. fiebrigi* com paraquat apresentou valor de CEC 0,12mol/L (Quadro 8), dentro do intervalo dos indivíduos controle ($0,12 \leq \text{CEC} \leq 0,15$) (Figura 12).

Quadro 8 - Respostas da basofilia nuclear e concentração crítica de eletrólitos (CEC) na cromatina das células nervosas de *T. fiebrigi* após exposição ao herbicida paraquat em concentração de 100%

Azul de Toluidina (AT) + MgCl ₂ (mol/L)	Controle (água)	Paraquat 100%
AT sem MgCl ₂	violeta ^λ	violeta ^λ
AT + 0,02	violeta	violeta
AT + 0,05	violeta	violeta
AT + 0,08	azul	azul
AT + 0,10	azul/verde	azul/verde
AT + 0,12	Verde*	Verde*
AT + 0,15	verde	verde
AT + 0,20	verde	verde
AT + 0,30	verde	azul/verde

^λ Coloração violeta, evento da metacromasia em que as moléculas do corante AT estão sobrepostas

* Ponto de CEC, em que o sal MgCl₂ se liga ao DNA retirando as moléculas do corante AT

Para *T. fiebrigi* tratadas com nicosulfuron, a abolição da metacromasia ocorreu na concentração 0,15mol/L de MgCl₂ (Quadro 9), estando compreendida no intervalo reconhecido nos indivíduos controle (0,12≤CEC≤0,15). Desta forma não foi possível reconhecer alterações citoquímicas nos núcleos após os tratamentos com herbicidas (Figura 14). Vale ressaltar que as concentrações testadas foram iguais ao que é recomendado para aplicações em campo, assim, não se pode afirmar que os princípios ativos dos herbicidas não interferiram na expressão gênica das células nervosas em outras concentrações não testadas e em períodos de contato diferentes.

Quadro 9 - Respostas da basofilia nuclear e concentração crítica de eletrólitos (CEC) na cromatina das células nervosas de *T. fiebrigi* após exposição ao herbicida nicosulfuron em concentração de 100%

Azul de Toluidina (AT) + MgCl ₂ (mol/L)	Controle (água)	Nicosulfuron 100%
AT sem MgCl ₂	violeta ^λ	violeta ^λ
AT + 0,02	violeta	violeta
AT + 0,05	azul	azul
AT + 0,08	azul	azul
AT + 0,10	azul	azul/verde
AT + 0,12	azul/verde	azul/verde
AT + 0,15	Verde*	Verde*
AT + 0,20	verde	verde
AT + 0,30	azul/verde	azul/verde

^λ Coloração violeta, evento da metacromasia em que as moléculas do corante AT estão sobrepostas

* Ponto de CEC, em que o sal MgCl₂ se liga ao DNA retirando as moléculas do corante AT

Pelo fato de paraquat agir no ciclo das reações redox nas mitocôndrias associado com a geração de superóxidos, oxigênio livre, radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e lipídios peroxidados, acredita-se que ocorram muitas alterações no funcionamento celular, incluindo alterações na expressão gênica, mas outras abordagens devem ser realizadas para tal confirmação.

Krishnan et al. (2007) verificou que 38pmol de paraquat manifestaram elevação de proteínas carboniladas e produtos de peroxidação de lipídios. Como as membranas celulares são constituídas em grande parte por lipídios, o grau de toxicidade é elevado, ocorrendo morte celular e prejuízos orgânicos que podem levar a morte dos indivíduos. A avaliação por polarização anisotrópica revelou diminuição na fluidez das membranas das células cerebrais dos besouros *Pyrrhocoris apterus*. Esses efeitos

subletais nas células nervosas podem acarretar dificuldades de locomoção e comunicação, prejudicando as populações.

Além disso, houve diminuição na atividade metabólica de γ -glutamyl-transpeptidase, enzima chave no metabolismo da glutatona. Isso indica um estresse efetivo provocado por paraquat, incluindo reflexos na hemolinfa, intestino, corpo gorduroso e gônadas (Krishnan et al., 2007).

Segundo Okabe et al. (2009), o herbicida paraquat e a produção de superóxidos perturba o desenvolvimento normal de células musculares. Este estudo verificou alteração do desenvolvimento de células C2C12 (mioblasto de camundongo), principalmente pelo aumento da MHC (cadeia pesada da miosina).

Segundo Yamagami et al. (1993), em análises de culturas de células (MDCK-Maden Darby Canine kidney) através de citometria foram encontrados indicativos de que o herbicida paraquat retira as células da fase S (síntese), assim inibe a síntese de DNA. As células após o bloqueio sofrem citólise.

Para Yang et al. (2009), paraquat produz morte celular em células nervosas por indução de estresse no retículo endoplasmático. Segundo os autores, a presença de paraquat induz uma cascata de sinais que levam à apoptose.

Yang e Sun (1998) verificaram que paraquat induz à morte celular nas células PC12. Segundo os autores, a peroxidação dos lipídios das células leva à morte celular, com risco para o desenvolvimento de doença de Parkinson, e a adição de catalase, superóxido desmutase e prometazina foram eficientes no bloqueio da formação de malondialdeído atenuando a morte celular.

Por meio de coloração com azul de toluidina, não se verificou morte celular nas células nervosas de *T. angustula* e *T. fiebrigi*, sendo necessários novos estudos empregando microscopia eletrônica de transmissão (MET) e/ou análise por meio de técnicas específicas de citoquímica para morte celular.

Manning-Bog et al. (2003) verificaram que, em injúrias produzidas por paraquat, a proteína α -sinucleína age contra os seus efeitos tóxicos. Além disso, em ratos transgênicos super-expressando α -sinucleína há aumento nos níveis de chaperonas HSP70 (proteínas de choque térmico de 70 kDa), que protegem contra os efeitos do herbicida paraquat.

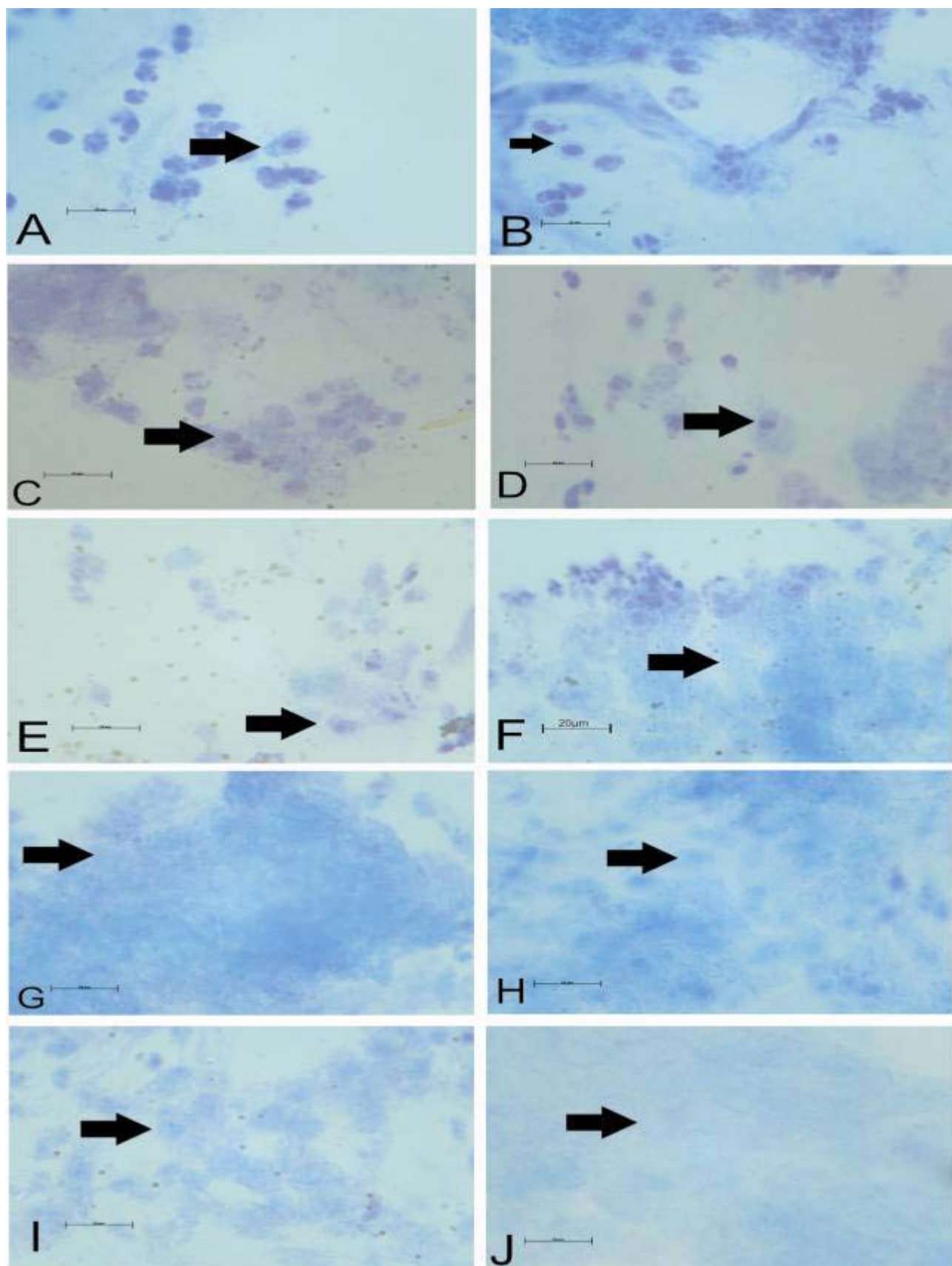


Figura 11 - Células nervosas de *T. angustula* após tratamento com água (A-C-E-G-I) (controle) e paraquat 100% (B-D-F-H-J) coradas com azul de toluidina (AT) em pH 4.0 na ausência e presença de MgCl_2 (mol/L). A e B: AT sem MgCl_2 ; C e D: AT + 0,05 mol/L de MgCl_2 ; E e F: AT + 0,10 mol/L de MgCl_2 ; G e H: 0,12 mol/L de MgCl_2 ; I e J: AT + 0,15 mol/L de MgCl_2 . Setas indicam os núcleos dos neurônios. Barra = 20 μm .

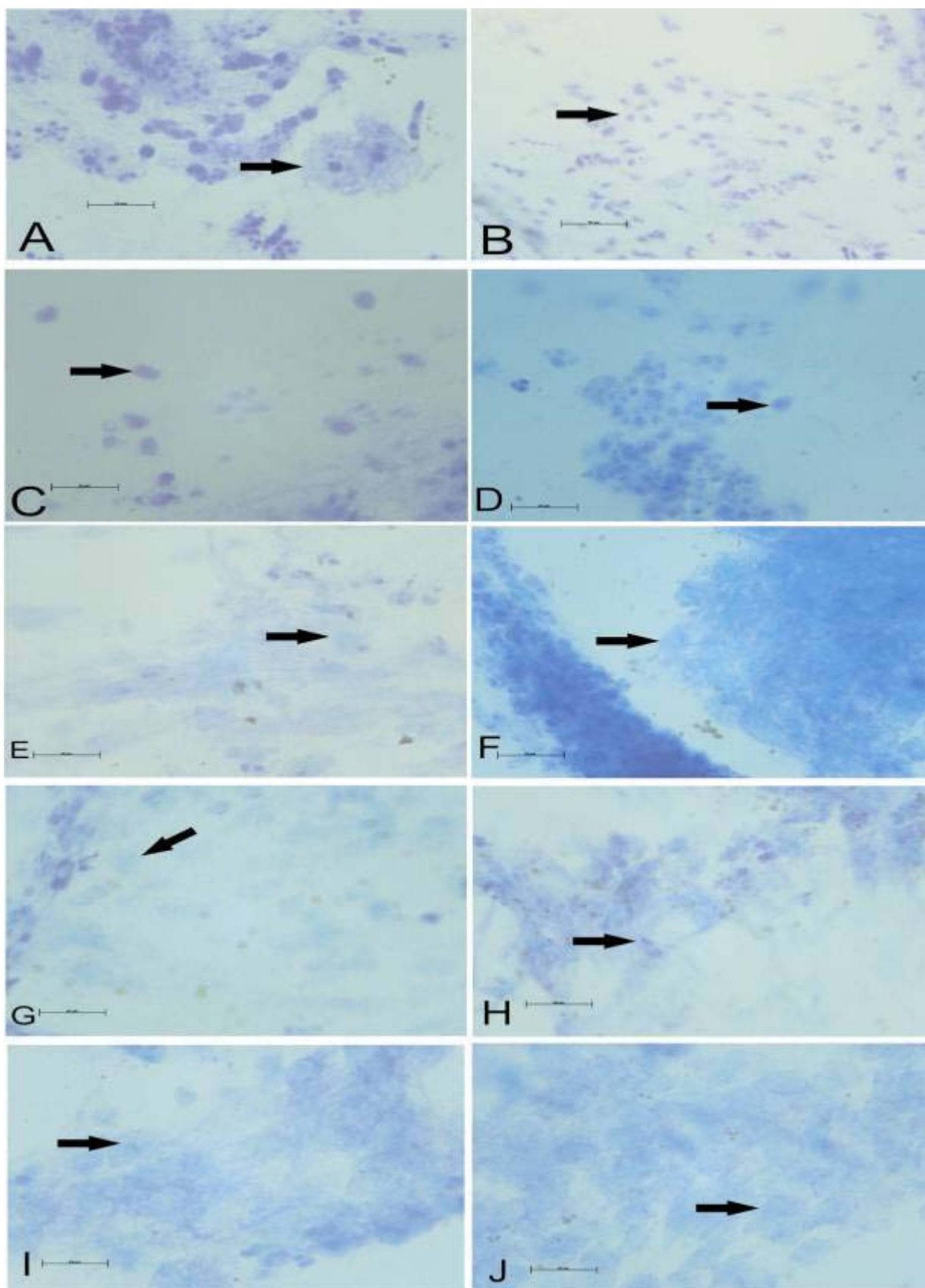


Figura 12 - Células nervosas de *T. fiebrigi* após tratamento com água (A-C-E-G-I) (controle) e paraquat 100% (B-D-F-H-J) coradas com azul de toluidina (AT) em pH 4.0 na ausência e presença de MgCl_2 (mol/L). A e B: AT sem MgCl_2 ; C e D: AT + 0,05 mol/L de MgCl_2 ; E e F: AT + 0,10 mol/L de MgCl_2 ; G e H: 0,12 mol/L de MgCl_2 ; I e J: AT + 0,15 mol/L de MgCl_2 . Setas indicam os núcleos dos neurônios. A-C-D-E-F-G-H-I-J, barra= 20 μm ; B, barra= 50 μm . Em F presença de omatídios no canto inferior esquerdo.

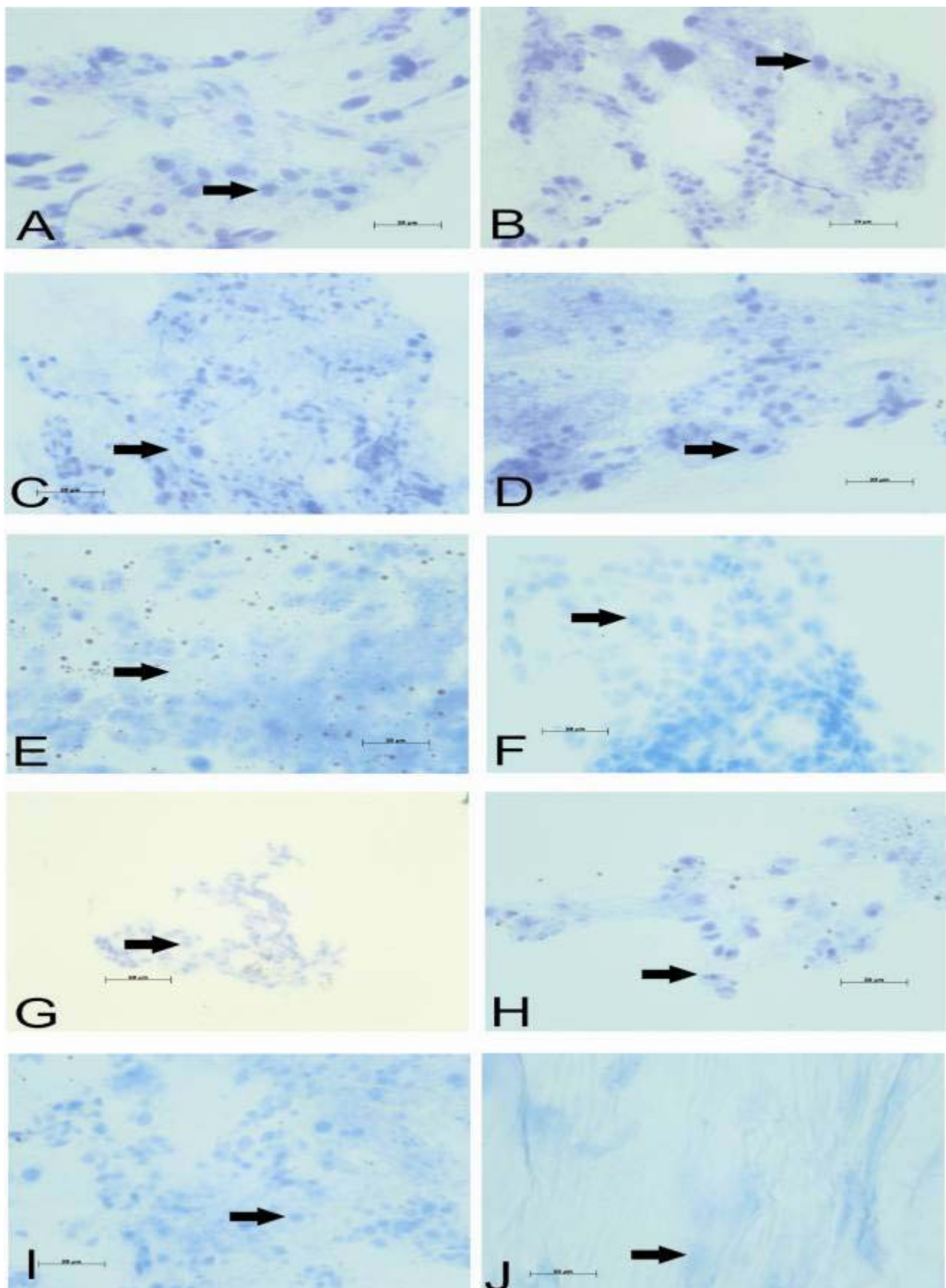


Figura 13 - Células nervosas de *T. angustula* após tratamento com água (A-C-E-G-I) (controle) e nicosulfuron 100% (B-D-F-H-J) coradas com azul de toluidina (AT) em pH 4.0 na ausência e presença de MgCl_2 (mol/L). A e B: AT sem MgCl_2 ; C e D: AT + 0,05 mol/L de MgCl_2 ; E e F: AT + 0,10 mol/L de MgCl_2 ; G e H: 0,15 mol/L de MgCl_2 ; I e J: AT + 0,20 mol/L de MgCl_2 . Setas indicam os núcleos dos neurônios. Barra = 20µm.

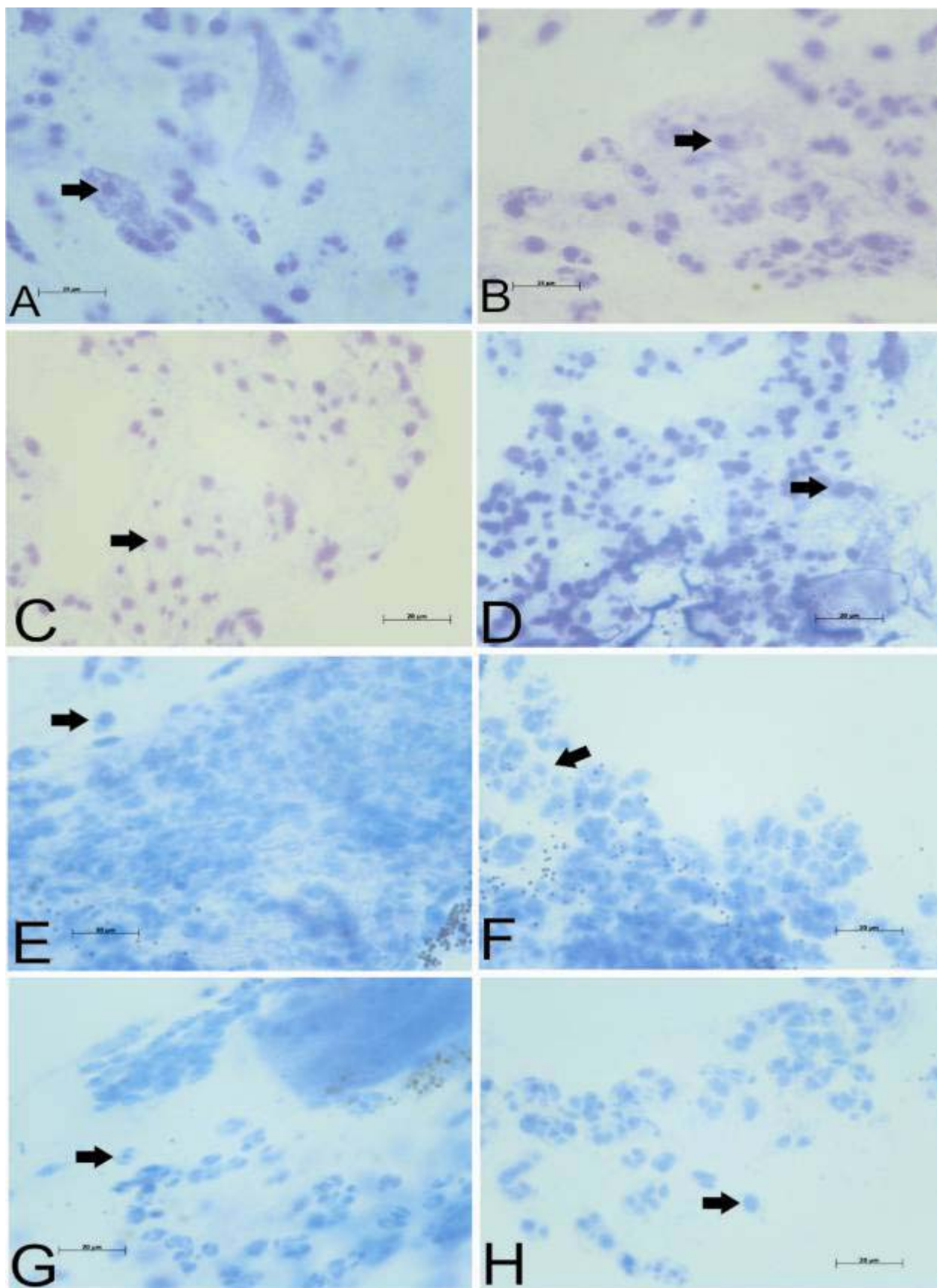


Figura 14 - Células nervosas de *T. fiebrigi* após tratamento com água (A-C-E-G) (controle) e nicosulfuron 100% (B-D-F-H) coradas com azul de toluidina (AT) em pH 4.0 na ausência e presença de MgCl_2 (mol/L). A e B: AT sem MgCl_2 ; C e D: AT + 0,05 mol/L de MgCl_2 ; E e F: AT + 0,12 mol/L de MgCl_2 ; G e H: 0,20 mol/L de MgCl_2 . Setas indicam os núcleos dos neurônios. Barra = 20 μm .

5. CONCLUSÕES

A) Os herbicidas apresentam influência sobre a expressão de isoenzimas, sendo as esterases sensíveis à presença de nicosulfuron e paraquat, apresentando inibição na sua atividade relativa após contaminação.

B) A enzima superóxido desmutase também é sensível à presença de paraquat, tendo sua expressão aumentada quando em contato com o herbicida, indicando maior demanda contra efeitos deletérios dos superóxidos.

C) As abelhas do gênero *Tetragonisca* têm potencial para serem empregadas como bioindicadores da presença desses herbicidas, sendo que *T. fiebrigi* apresenta maior sensibilidade ao herbicida paraquat que *T. angustula*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTI, D.; MAJER, J.D.; ALONSO, L.E.; SCHULTZ, T.R., (eds). **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity**. Biological diversity handbook series. Washington: Smithsonian Institution, 2000. 275p.

AHMED, M.; ROCHA, J.B.T.; MAZZANTI, C.M.; MORSCH, A.L.B.; CARGNELUTTI, D.; CORRÊA, M.; LORO, V.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Malathion, carbofuran and paraquat inhibit *Bungarus sindanus* (krait) venom acetylcholinesterase and human serum butyrylcholinesterase *in vitro*. **Ecotoxicol.**, 16:363-369, 2007.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1584p.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 2006. 627p.

ASMA, D.; YESILADA, O. Effect of paraquat on cellular defense enzymes and glutathione of *Funalia troglia*. **Folia Microbiol.**, 47:413-416, 2002.

BARLOW, B.K.; RICHFIELD, E.K.; CORY-SLECHTA, D.A.; THIRUCHELVAM, M. A fetal risk factor for Parkinson's disease. **Dev. Neurosci.**, 26:11-11, 2004.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiol. Rev.**, 78:547-581, 1998.

BUSCHINI, M.L.T.; CAMPOS, L.A.O. Caste determination in *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apidae): influence of the available food and the juvenile hormone. **Rev. Brasil. Biol.**, 55:121-129, 1995. (Suplemento 1).

CAMARGO, C.A. Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Brasil. Biol.**, 32:133-138, 1972.

CAMARGO, C.A. Sex determination in bees. Production of diploid males and sex determination in *Melipona quadrifasciata*. **J. Apic. Res.**, 18:77-84, 1979.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. Meliponini Lepeletier, 1836. *In*: Moure, J.S.; Urban, D.; Melo, G.A.R. (orgs). **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region**. 2008. Disponível em <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em: 05, Janeiro, 2010.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparision of butyrylcholinestrse and acetylcholinestrse. **J. Biochem.**, 260:625-634, 1989.

CHAYEN, J.; BITENSKY, L. **Practical histochemistry**, 2nd ed., New York: John Wiley & Sons, 1991. 55-58.

DEL LAMA, M.A. **Estudos genéticos e bioquímicos das isoenzimas de malato desidrogenase de *Apis mellifera***. São Paulo: FMRP-USP, 1982. 104p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Genética).

DiMARZIO, W.D.; ALBERDI, J.L.; SAENZ, M.E.; DEL CARMEN-TORTORELLI, M. Effects of paraquat (Osaquat[®] formulation) on survival and total cholinesterase activity in male and female adults of *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). **Environ. Toxicol. Water Quality**, 13:55-59, 1998.

DiMONTE, D.A. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? **Lancet Neurol.**, 2:531-538, 2003.

DINIS-OLIVEIRA, R.J.; REMIAO, F.; CARMO, H.; DUARTE, J.A; NAVARRO, A.S.; BASTOS, M.L.; CARVALHO, F. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. **Neurotoxicol.**, 27:1110-1122, 2006.

DUTTARROY, A.; PAUL, A.; KUNDU, M.; BELTON, A. A Sod2 null mutation confers severely reduced adult life span in *Drosophila*. **Genetics**, 165:2295-2299, 2003.

EDENFELD, G.; STORK, T.; KLAMBT, C. Neuron-glia interaction in the insect nervous system. **Cur. Opin. Neurobiol.**, 15:34-39. 2005.

EL-DEMERDASH, F.M.; YOUSEF, M.I.; ELAGAMY, E.I. Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (*in vitro*). **J. Environ. Sci. Health**, 36:29-42, 2001.

FALCO, J.R.P.; MELLO, M.L.S. Critical electrolyte concentration of spermatozoal chromatin containing histone H1 variants. **Genet. Mol. Biol.**, 22:197-200, 1999.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ª Ed. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1996. 220p.

FERNANDEZ-DA-SILVA, P.G.; ZUCOLOTO, F.S. Influência de microrganismos no valor nutritivo do pólen, para *Scaptotrigona depilis* Moure (Hymenoptera, Apidae). In: 1º ENCONTRO SOBRE ABELHAS. Ribeirão Preto, 1994. **Resumos Expandidos...** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 1994, p. 232-242.

GAGNETEN, A.M. Efectos del herbicida paraquat sobre el zooplancton. **Iheringia Zool.**, 92:47-56, 2002.

GONZÁLEZ-POLO, R.A.; RODRIGUEZ-MARTÍN, A.; MORÁN, J.M.; NISO, M.; SOLER, G.; FUENTES, J.M. Paraquat-induced apoptotic cell death in cerebellar granule cells. **Brain Res.**, 1011:170-176, 2004.

GUBBIGA, N.G.; WORSHAM, A.D.; COBLE, H.D. Effect of nicosulfuron on johnsongrass (*Sorghum halepense*) control and corn (*Zea mays*) performance. **Weed Technol.**, 9:574-581, 1995.

ISHII, K.; ADACHI, J.; TOMITA, M.; KUROSAKA, M.; UENO, Y. Oxysterols as indicators of oxidative stress in man after paraquat ingestion. **Free Radic. Res.**, 36:163-163, 2002.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V.A. (orgs.). **Abelha urucu: biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Fundação Acungau, 1996. 144p.

KLEIN, A.M.; VAISSIE, B.E.; CANE J.H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S.A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proc. R. Soc. B**, 274:303–313, 2007.

KRISHNAN, N.; VECERA, J.; KODRÍK, D.; SEHNAL, F. **Inhibits lipid peroxidation and maintains membrane fluidity in the brain of *Pyrrhocoris apterus* subjected to oxidative stress**. Disponível em insectscience.org/7.13. 16th. International Ecdysone Workshop, 2007. Acesso em: 12, janeiro, 2010.

LA CLAIR, J.J.; BANTLE, J.A.; DUMONT, J. Photoproducts and metabolites of a common insect growth regulator produce developmental deformities in *Xenopus*. **Environ. Sci. Technol.**, 32:1453-1461, 1998.

LANGSTON, J.W.; LANGSTON, E.B.; IRWIN, I. MPTP-induced Parkinsonism in human and non-human primates - clinical and experimental aspects. **Acta Neurol. Scand. Suppl.**, 100:49-54, 1984.

LEBOULANGER, C.; RIMET, F.; LACOTTE, M.H.; BÉRARD, A. Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. **Environ. Intern.**, 26:131-135, 2001.

LEBOULANGER, C.; BOUVY, M.; PAGANO, M.; DUFOUR, R.A.; GOT, P.; CECCHI, P. Responses of planktonic microorganisms from tropical reservoirs to paraquat and deltamethrin exposure. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 56:39-51, 2009.

LEE, H.S.; LEE, K.S.; YU, K.; HONG, S.Y. Expression of genes related to Parkinson's disease after paraquat treatment in *Drosophila melanogaster*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, 92:19-23, 2008.

MACHADO, J.O. Simbiose entre as abelhas sociais brasileiras (Meliponinae, Apidae) e uma espécie de bactéria. **Ciência e Cultura**, 23:625-633, 1971.

MACHADO, M.F.P.S.; CONTEL, E.P.B. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase isozyme variation in adult meliponids (Hymenoptera: Apidae). **Biochem. Genet.**, 29:593-600, 1991.

MALAGODI-BRAGA, K.S.; KLEINERT, A.M.P. Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be used as strawberry pollinator in greenhouses? **Austral. J. Agri. Res.**, 55:771-773, 2004.

MANNING-BOG, A.B.; MCCORMACK, A.L.; PURISAI, M.G.; BOLIN, L.M.; DIMONTE, D.A. α -Synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. **J. Neurosci.**, 23:3095-3099, 2003.

MARKERT, C. L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 45:753-763, 1959.

MASSA, R.; BLEVINS, S.; CHAO, S.L. Role of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase following exposure to nicosulfuron and diazinon in *Helicoverpa zea*. **Ecotox. Environ. Safety**, 71:230-235, 2008.

MELLO, M.L.S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. **Braz. J. Genet.** 20:257-264, 1997.

MICHENER, C.D. **The bees of the world**. Baltimore: The John Hopkins University Press, 2000. 963p.

MILATOVIC, D.; DETTBARN, W.D. Modification of acetylcholinesterase during adaptation to chronic, subacute paraoxon application in rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 136:20-28, 1996.

MOCKETT, R.J.; SOHAL, R.S.; ORR, W.C. Overexpression of glutathione reductase extends survival in transgenic *Drosophila melanogaster* under hyperoxia but not normoxia. **The FASEB J.**, 13:1733-1742. 1999.

MONTEIRO, A.L.P.; MELLO, M.L.S. Critical electrolyte concentration of chromatin in polytene chromosomes of *Trichosia pubescens* (Diptera, Sciaridae). **Genet. Mol. Biol.**, 21:185-90, 1998.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper: bioquímica**. São Paulo: Atheneu, 1998. 835p.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997. 446p.

NOGUEIRA-NETO, P. Ainda a questão da variabilidade genética e ecológica das pequenas populações e dos fragmentos florestais. In: V ENCONTRO SOBRE ABELHAS. Ribeirão Preto, 2002. **Resumos Expandidos...** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2002, p.15-17.

NOGUEIRA-NETO, P.; FONSECA, V.L.; KLEINERT-IOVANINI, A.; VIANA, B.F.; CASTRO, N.S. **Biologia e manejo das abelhas sem ferrão**. São Paulo: Tecnapis, 1986. 54p.

O'BRIEN, S.J.; MACINTYRE, R.J. The α -glycerophosphate cycle in *Drosophila melanogaster*. I. Biochemical and development aspects. **Biochem. Gen.**, 7:141-161, 1972a.

O'BRIEN, S.J.; MACINTYRE, R.J. The α -glycerophosphate cycle in *Drosophila melanogaster*. II. Genetic aspects. **Genetics**, 71:127-138, 1972b.

OKABE, M.; AKIYAMA, K.; NISHIMOTO, S.; SUGAHARA, T.; KAKINUMA, Y. Paraquat modulates the differentiation of C2C12 cells to myotube. **Interdisc. Stud. Environ. Chem.**, 2:219-225, 2009.

ORR, W.C.; SOHAL, R.S. Effects of Cu-Zn superoxide dismutase overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*. **Arch. Biochem. Biophys.**, 301:34-40, 1993.

OSWEILER, G.D. **Toxicologia veterinária**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. 526p.

OTITOJU, O.; ONWURAH, I.N.E.; OTITOJU, G.T.O.; UGWU, C.E. Oxidative stress and superoxide dismutase activity in brain of rats fed with diet containing permethrin. **Biokemistri**, 20:93-98, 2008.

PENEDO, M.C.T.; TESTA, P.R.; ZUCOLOTO, F.S. Valor nutritivo do geval e do levedo de cerveja em diferentes misturas com o pólen para *Scaptotrigona (Scaptotrigona) postica* (Hymenoptera, Apidae). **Ciência e Cultura**, 28:536-538, 1976.

PRONI, E.A. Biodiversidade de abelhas indígenas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) na Bacia do Rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil. **Arq. Ciên. Veter. Zool. UNIPAR**, 3:145-150, 2000.

RAY, S.; SENGUPTA, A.; RAY, A. Effects of paraquat on anti-oxidant system in rats. **Indian J. Exp. Biol.**, 45:432-438, 2007.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. Londrina: IAPAR, 2005. 648p.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; DEL LAMA, M.A.; SOARES, A.E. Genetic characterization of a new *Apis mellifera* esterase. **Apidologie**, 28:259-267, 1997.

SAGLIO, P.; OLSEN, K.H.; BRETAUD, S. Behavioral and olfactory responses to prochloraz, bentazone, and nicosulfuron-contaminated flows in goldfish. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 41:192-200, 2001.

SANTOS, I.A. **A vida de uma abelha solitária**. 2002. Disponível em: <<http://eco.ib.usp.br/beelab/solitarias.htm>>. Acesso em: 21, janeiro, 2010.

SCANDALIOS, J.G. **Genes, isozymes and evolution**. New York: C.L. Markert Acad. Res., 1975. 763p.

SCHETINGER, M.R.C.; PORTO, N.M.; MORETTO, M.B.; MORSCH, V.M.; ROCHA, J.B.T.; VIEIRA, V.; MORO, F.; NEIS, R.T.; BITTENCOURT, S.; BONACORSO, H.G.; ZANATTA, N. New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPase activities. **Neurochem. Res.**, 25:949–955, 2000.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adult. **Biochem. J.**, 61:629-641, 1955.

STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging. **Science**, 257:1220–1224, 1992.

SUDDERUDDIN, K.I.; TAN, H.H. Some hydrolases and their involvement in insecticide resistance. **Pest. Art. News Summ.**, 19:24-35, 1973.

SYNGENTA. **Gramoxone 200**. Disponível em www.syngenta.com.br. Acesso em: 05, janeiro, 2010.

TEIXEIRA, A.S.; CHAVES, L.S.; YUYAMA, K. Esterases no exame da estrutura populacional de camucamu (*Myrciaria dúbia* (Kunth) Mc Vaugh-Murtaceae). **Acta Amazonia**, 34:89-96, 2004.

VANFLETEREN, J.R. Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. **Biochem. J.**, 292:605-608, 1993.

VERMEULEN, C.J.; VAN-DE-ZANDE, L.; BIJLSMA, R. Resistance to oxidative stress induced by paraquat correlates well with both decreased and increased lifespan in *Drosophila melanogaster*. **Biogerontol.**, 6:387–395, 2005.

VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. Critical electrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes in vitro. **Acta Histochem. Cytochem.**, 22:471-478, 1989.

WESSELING, C.; ANTICH, D.; HOGSTEDT, C.; RODRIGUEZ, A.C.; AHLBOM, A. Geographical differences of cancer incidence in Costa Rica in relation to environmental and occupational pesticide exposure. **Int. J. Epidemiol.**, 28:365, 1999.

WHITMORE Jr, D.; WHITMORE, E.; GILBERT, L.I. Juvenile hormone induction of esterases: A mechanism for the regulation of juvenile hormone titer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 69:1592-1595, 1972.

YAMAGAMI, K.; MATSUBARA, M.; KITAZAWA, Y.; TAKEYAMA, N.; TANAKA, T.; KAWAMOTO, K. Flow cytometric analysis of the direct toxic effects of paraquat on cultured MDCK cells. **J. Applied Toxicol.**, 14:155-159, 1993.

YANG, W.; SUN, A.Y. Paraquat-induced cell death in PC12 cells. **Neurochem. Res.**, 23:1387-1394, 1998.

YANG, W.; TIFFANY-CASTIGLIONI, E.; KOH, H.C.; SON, I-H. Paraquat activates the IRE1/ASK1/JNK cascade associated with apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Toxicol. Let.**, 191:203-210, 2009.

YOO, C.M.; BAK, C.B.; LEE, H.C. Substrate and inhibitor specificities of esterase in *Lucilia illustris*. **Korean J. Zool.**, 39:190-197, 1996.

YUAN, Y.C.; CHEN, H.C.; YUAN, Y.K. Sublethal effects of paraquat and malathion on the freshwater shrimp, *Macrobrachium nipponense*. **Acta Zool. Taiwan.**, 14:87-9, 2004.

ZHU, K.Y.; BRINDLEY, W.A. Properties of esterases from *Lygus hesperus* knight (Hemiptera: Miridae) and the roles of the esterases in insecticide resistance. **J. Econ. Entomol.**, 83:725-727, 1990.