

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) e *Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804) (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)

Bruna Costa Ferreira Cruz^{1*}, Ludimilla Ronqui², Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki³,
Juliana Mosconi Magro⁴, Milton Rönna⁵

SAP 21471 Data de envio: 07/01/2019 Data de aceite: 07/03/2019
Sci. Agrar. Parana., Marechal Cândido Rondon, v. 18, n. 2, abr./jun., p. 154-159, 2019

RESUMO - As abelhas apresentam quatro fases de desenvolvimento e suas características morfológicas e fisiológicas são distintas em cada uma das fases de desenvolvimento, assim, a necessidade metabólica também varia, onde algumas enzimas, principalmente as esterases podem apresentar diferentes atividades. Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho identificar e comparar o perfil eletroforético de esterases de *Trigona spinipes* e *Tetragona clavipes* e suas respectivas fases de desenvolvimento. Foram coletadas abelhas operárias, pupas de cores de olhos diferentes e pré-pupas das duas espécies, provenientes de duas colônias no município de Palotina (PR). Após a separação e estocagem foi realizada a eletroforese PAGE e de cada operária foi retirada a cabeça e o tórax. As pré-pupas e as pupas foram utilizadas inteiras e as eletroforeses realizadas no sentido vertical em gel de poliacrilamida a 10% para *T. spinipes* e 8% para *T. clavipes*. Na espécie *T. spinipes* foram detectadas oito regiões de atividade esterásica (EST). A EST-1, EST-2, EST-3, EST-4 e EST-5 foram encontradas em abelhas adultas, pupas de olhos pretos, vermelhos, rosas e brancos e nas pré-pupas. A EST-6 foi observada nas pupas de olho branco, a EST-7 detectada em extratos de pré-pupa e a EST-8 encontrada em abelhas adultas e em todas as fases de pupas. Em *T. clavipes* foram detectadas sete regiões de atividade da esterase. A EST-1, EST-2 e EST-3 estavam presentes nas pupas de olhos brancos e pretos. A EST-4, EST-5 e a EST-6 foram detectadas nas pré-pupas, pupas de olhos brancos e pretos. A EST-7 foi observada em pré-pupas e pupas de olhos brancos. As duas espécies estudadas apresentam diferentes regiões esterásicas e também foi observado diferentes perfis entre algumas fases de desenvolvimento em cada espécie avaliada.

Palavras-chave: Irapuá, abelha, esterase, eletroforese, fases de desenvolvimento.

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) and *Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804) (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)

ABSTRACT - Bees present four stages of development and their morphological and physiological characteristics are distinct in each of the stages of development, so the metabolic need also varies, where some enzymes, especially esterases, may present different activities. In view of the above, the objective of this work was to identify and compare the electrophoretic profile of *Trigona spinipes* and *Tetragona clavipes* esterases and their respective stages of development. Worker bees, pupae of different eye colors and pre-pupae of the two species were collected from two colonies in the municipality of Palotina (PR). After separation and storage, PAGE electrophoresis was performed and the head and thorax were removed from each worker. The pre-pupae and pupae were used whole and the electrophoresis carried out vertically on 10% polyacrylamide gel for *T. spinipes* and 8% for *T. clavipes*. In the *T. spinipes* species eight regions of esterase activity (EST) were detected. EST-1, EST-2, EST-3, EST-4 and EST-5 were found in adult bees, black-eyed, red, pink and white pupae and pre-pupae. EST-6 was observed in white-eyed pupae, EST-7 detected in pre-pupal extracts and EST-8 found in adult bees and all pupae phases. In *T. clavipes* seven regions of esterase activity were detected. EST-1, EST-2 and EST-3 were present in pupae of white and black eyes. EST-4, EST-5 and EST-6 were detected in the pre-pupae, pupae of white and black eyes. EST-7 was observed in pre-pupae and pupae with white eyes. The two species studied presented different esterases and different profiles were also observed between some stages of development in each species evaluated.

Keywords: Irapuá, bee, esterase, electrophoresis, stages of development.

¹Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid - PR 445, Km 380 - CEP 86.057-970, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: bruna.costaferc@gmail.com. *Autora para correspondência.

²Professora, Departamento Interdisciplinar de Tecnologia e Ciências da Universidade Federal de Rondônia, Ariquemes, Rondônia, Brasil. E-mail: ludimilla@unir.br.

³Professora, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Brasil. E-mail: mccrtakasusuki@uem.br.

⁴Professora, Colégio Estadual Francisco Villanueva, Maringá, Paraná, Brasil. E-mail: jumagrobio86@hotmail.com.

⁵Professor, Departamento de Biociências, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Palotina, Paraná, Brasil. E-mail: ronnau@ufpr.br.

INTRODUÇÃO

Em culturas cultivadas as abelhas são as principais polinizadoras. A maioria das espécies vegetais comerciais exige polinização para a produção e aumento dos rendimentos econômicos (ABROL, 2012).

Os meliponíneos são considerados polinizadores eficientes, por apresentarem adaptações para a coleta de recursos florais, muitas vezes se tornando polinizadores específicos de certas culturas, além de contribuírem para a conservação da biodiversidade vegetal. Além dos serviços da polinização, apresentam produtos e subprodutos bastante valorizados economicamente, como, mel, pólen, própolis e geoprópolis (MORITZ et al., 2010).

O uso de meliponíneos na polinização está cada vez mais crescente, pois existe uma grande diversidade de espécies nesse grupo, o que possibilita a seleção daquelas mais eficientes na polinização de determinada cultura (SILVA et al., 2014). Sabe-se que a *Trigona spinipes* tem grande importância na polinização nos cultivos de goiaba, melancia e abacate (GIANNINI e JAFFÉ, 2015).

A *Trigona* é um dos maiores gêneros pertencentes a tribo Meliponini, com espécies encontradas desde o norte da Argentina até o México. No Brasil, a espécie *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) é encontrada desde o Ceará até o Rio Grande do Sul. Essa espécie também é conhecida com irapuá, arapuá ou abelha cachorro (SILVEIRA et al., 2002; MICHENER, 2007).

A *Tetragona clavipes* é uma abelha, pertencente ao gênero *Tetragona*, onde estão presentes 13 espécies distribuídas no continente americano, desde o México até o Uruguai. No Brasil são encontradas oito espécies, praticamente restritas à Bacia Amazônica. Algumas espécies, como a *Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804), apresentam uma distribuição maior, podendo ser encontrada no Acre, Amazonas, Amapá, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (SILVEIRA et al., 2002).

As abelhas apresentam quatro fases de desenvolvimento, sendo a embrionária, larval, pupal e adulta. As características morfológicas e fisiológicas das abelhas são distintas em cada uma destas fases, assim, a necessidade metabólica também varia, onde algumas enzimas apresentam atividades diferentes. Entre as enzimas do metabolismo intermediário, destacam-se as esterases, participativas de vários processos do organismo dos insetos.

As esterases são um grupo de enzimas hidrolíticas, altamente polimórficas e multifuncionais. Nos insetos esse grupo é dividido em quatro classes (acetilsterases, arilesterases, carboxilsterases e colinesterases), com base em suas sensibilidades a três grupos de inibidores. A variabilidade eletroforética das esterases tem sido utilizada em estudos de resistência a inseticidas e populacionais dinâmicos, respostas a flutuações ambientais, estágios de desenvolvimento e diferenciação genética. Estas enzimas têm ação relevante no desenvolvimento dos insetos, pois apresentam variações qualitativas e quantitativas durante seu

desenvolvimento (GIGLIOLLI et al., 2011; MARTINS-PARRA et al., 2016)

As esterases formam um grupo multifuncional e heterogêneo de isoenzimas que apresentam em comum a hidrólise de ésteres e outros compostos, como peptídios, amidas e haletos. Estas têm sido estudadas em todos os tipos de seres vivos em estudos evolutivos e taxonômicos, por apresentarem diferenças em seus padrões enzimáticos. Nos insetos, as esterases ainda não tem uma função esclarecida, embora alguns autores mostrem o envolvimento na regulação dos níveis do hormônio juvenil e capacidade dos insetos em metabolizar vários compostos agroquímicos, incluindo organofosforados (GUPTA et al., 2005; WHEELLOCK et al., 2005).

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho identificar e comparar o perfil eletroforético de esterases de *Trigona spinipes* e *Tetragona clavipes* e suas respectivas fases de desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas abelhas operárias adultas recém-emergidas, pupas e pré-pupas das espécies *Tetragona clavipes* e *Trigona spinipes*, provenientes de três discos de crias de duas colônias localizadas no município de Palotina (Paraná) entre os meses de fevereiro e março de 2018. Após a coleta, realizaram-se a separação e seleção das abelhas, que foram sacrificadas e estocadas em frascos devidamente identificados em freezer a -20°C.

As pupas foram retiradas das células dos discos de cria e separadas de acordo com a cor dos olhos. O processo foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), entre fevereiro e março de 2018, utilizando um estereomicroscópio (marca Lumen®), para a observação da coloração dos olhos. Em seguida, as pupas foram separadas em cinco categorias, sendo pupas de olhos brancos, olhos rosas, olhos vermelhos, olhos marrons e olhos pretos (Figura 1). Os procedimentos descritos a seguir foram realizados de acordo com as fases nos discos de cria coletados.

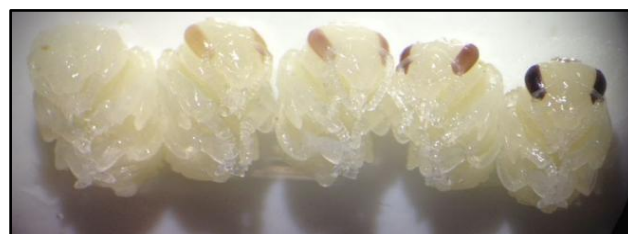


FIGURA 1 - Pupas da espécie *Trigona spinipes* nas diferentes fases de desenvolvimento. Pupas de olhos brancos, olhos rosas, olhos vermelhos, olhos marrons e olhos pretos, da esquerda para a direita, respectivamente.

Da espécie *Trigona spinipes* foram utilizadas abelhas adultas operárias recém-emergidas, pupas de olhos pretos, olhos vermelhos, olhos rosas, olhos brancos e pré-pupas (Figura 2). Para as pupas de olhos marrons, foram identificadas apenas duas, não sendo utilizadas na análise.



FIGURA 2 - Abelhas da espécie *Trigona spinipes* nas diferentes fases de desenvolvimento. Pré-pupas, pupas de olhos brancos, olhos rosas, olhos vermelhos e olhos pretos e adultas, da esquerda para a direita, respectivamente.

Para a espécie *Tetragona clavipes* foram utilizadas pupas de olhos pretos, olhos brancos e pré-pupas (Figura 3). As pupas de olhos marrons, olhos vermelhos e olhos rosas foram encontradas em número menor que 5, por esse motivo não foram utilizadas, o número encontrado não foi suficiente para realizar a análise e as repetições.



FIGURA 3 - Abelhas da espécie *Tetragona clavipes*. Pré-pupas, pupas de olhos brancos e olhos pretos, da esquerda para a direita, respectivamente.

Após a separação e estocagem das abelhas foi realizada a eletroforese PAGE durante os meses de agosto a setembro de 2018, a fim de separar as esterases, por sua diferença de tamanho e peso molecular, as esterases foram denominadas de “EST” de acordo com a sua mobilidade eletroforética. De cada abelha operária retirou-se a cabeça/tórax para análise eletroforética, descartando o abdômen e as pré-pupas e pupas foram utilizadas inteiras. As pupas foram homogeneizadas de acordo com a cor dos olhos. Em seguida foram transferidas para tubos de propileno (1,5 mL), contendo 40 µL da solução de 2-mercaptoetanol + glicerol a 10%. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 10 min., a temperatura de 4°C, na centrífuga Jouan MR23i.

A eletroforese foi realizada no sentido vertical e foram aplicados 20 µL de sobrenadante de cada amostra em gel de poliacrilamida a 10% para *Trigona spinipes* e 8% para *Tetragona clavipes*. O tampão de corrida utilizado foi o tris-glicina 0,1 M (pH = 8,3). Os géis foram submetidos à eletroforese, em voltagem aproximada de 200 vV por 5 h.

Para a realização da coloração, o gel foi incubado por 30 min. em 50 mL da solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH = 6,2). Em seguida, o tampão foi descartado e acrescentado: solução de coloração (50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH = 6,2) + 0,03 g de α -naftil acetato + 0,03 g de β -naftil acetato + 0,06 g de corante

Fast Blue RR Salt, da marca Sigma-Aldrich® (CERON, 1988).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As regiões esterásicas foram detectadas e denominadas numericamente, de acordo com a sua mobilidade eletroforética, sendo a que apresentou maior migração foi considerada como EST-1. O conhecimento sobre as isoenzimas, em especial as esterases contribuem com futuros estudos sobre variabilidade genética e genética de populações, bem como na utilização de abelha sem ferrão como biomarcador da presença de resíduos de pesticidas utilizados na agricultura (RONQUI et al., 2016).

Na espécie *Trigona spinipes* foram detectadas oito regiões de atividade esterásica (Figura 4), encontrando cinco nas abelhas adultas (EST-1, EST-2, EST-3, EST-4 e EST-5), nas pupas de olhos brancos, olhos rosas, olhos vermelhos e olhos pretos e nas pré-pupas. A EST-6 foi observada apenas nas pupas de olhos brancos, a EST-7 somente em extratos de pré-pupas e a EST-8 encontrada na fase adulta e em todas as fases de pupa.

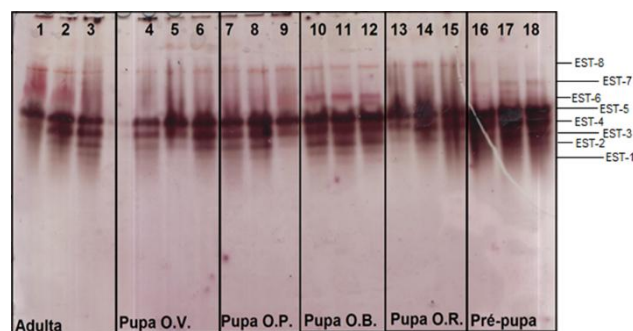


FIGURA 4 - Gel de esterase a 10% em abelhas da espécie *Trigona spinipes* na fase adulta (Adulta = 1, 2 e 3), pupas de olhos vermelhos (pupas O.V. = 4, 5 e 6), pupas de olhos pretos (pupas O.P. = 7, 8 e 9), pupas de olhos brancos (pupas O.B. = 10, 11 e 12), pupas de olhos rosas (pupas O.R. = 13, 14 e 15) e pré-pupas (16, 17 e 18). EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5, EST-6, EST-7, EST-8 = regiões de atividades esterásicas denominadas numericamente, de acordo com a mobilidade eletroforética.

Em *Trigona spinipes* a EST-1, EST-2, EST-3, EST-4 e EST-5 aparecem em todas as fases de desenvolvimento, podendo afirmar que essas enzimas são de extrema importância para a vida dessa espécie e não estando associadas a variações morfológicas nas fases de desenvolvimento. A EST-6 e a EST-7 que aparecem, respectivamente, somente nas pupas de olhos brancos e pré-pupas podem ser enzimas específicas das primeiras fases de desenvolvimento, podendo ser responsável pelas características únicas dessas fases. Verificou-se a EST-8 em todas as fases do desenvolvimento, menos nas pré-pupas, podendo indicar assim o aparecimento de alguma característica que se encontra nas fases de pupa e adulta, mas que não esteja presente nas pré-pupas, como a definição do corpo em cabeça, tórax e abdômen.

Na espécie *Tetragona clavipes* foram detectadas sete regiões de atividade da esterase (Figura 5). A EST-1, EST-2 e EST-3 estavam presentes nas pupas de olhos brancos e pretos, não sendo visualizadas nas pré-pupas. A EST-4, EST-5 e a EST-6 foram detectadas em todas as fases analisadas (pré-pupas, pupas de olhos brancos e pupas de olhos pretos). A EST-7 foi observada em pré-pupas e pupas de olhos brancos.

Em trabalho avaliando as diferenças de expressão de enzimas esterases na cabeça/tórax e no abdômen de *Tetragona clavipes*, Ruvolo-Takasusuki et al. (2006) encontraram os mesmos números de atividades de esterases do presente trabalho. Todas as sete atividades de esterases foram encontradas nas pupas de olhos brancos de *T. clavipes*, descrito anteriormente, podendo inferir que a EST-7 deixa de ser expressa em algum momento depois da fase de olhos brancos, podendo ser nas pupas de olhos rosas, vermelhos ou marrons, já que, na fase de olhos pretos a EST-7 não se expressa.

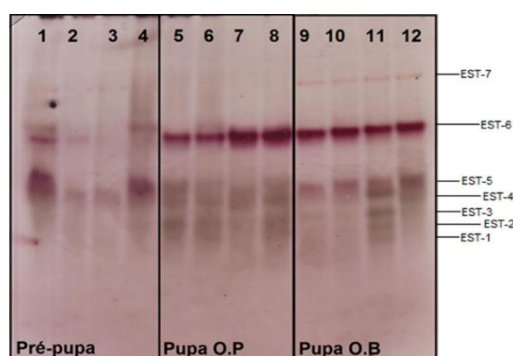


FIGURA 5 - Gel de esterase a 10% em abelhas da espécie *Tetragona clavipes* nas fases de pré-pupa (1, 2, 3 e 4), pupas de olhos pretos (pupas O.P. = 5, 6, 7 e 8) e pupas de olhos brancos (pupas O.B. = 9, 10, 11 e 12). EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5, EST-6, EST-7 = regiões de atividades esterásicas denominadas numericamente, de acordo com a mobilidade eletroforética.

De acordo com o trabalho de Ruvolo-Takasusuki et al. (2006), a EST-7 volta a ser expressa na fase adulta, uma vez que as abelhas operárias adultas apresentaram sete atividades de esterases. Portanto, nas pré-pupas de *T. clavipes* foram encontradas somente a EST-4, EST-5, EST-6 e EST-7, passando em seguida para as pupas de olhos brancos, que apresentam todas as esterases. Em algum momento entre as pupas de olhos brancos e aquelas de olhos pretos a EST-7 deixa de ser expressa, voltando a se expressar na fase adulta.

As diferenças na síntese de esterases durante as fases do desenvolvimento podem ser atribuídas à atuação de mecanismos regulatórios que permitem a adequação das quantidades de enzimas produzidas às necessidades do organismo (LUCENA et al., 2012).

Foram observadas oito regiões esterásicas para *Trigona spinipes* e sete para *Tetragona clavipes*. As atividades esterásicas também apresentaram diferenças entre as fases de desenvolvimento das duas espécies,

notando que o perfil esterásico não foi o mesmo para as pré-pupas, pupas de cores de olhos diversos e adultas.

O trabalho de Figueiredo et al. (1996), que teve como objetivo a investigação detalhada das variações qualitativas de isoenzimas esterases durante o desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera*, demonstrou variação da atividade isoenzimática durante o desenvolvimento e permitiu enumerar sete fenótipos, de acordo com a expressão esterásica. Os fenótipos foram descritos pelo aparecimento ou desaparecimento de esterases, sendo agrupados no mesmo fenotipo as fases que apresentam perfil esterásico igual. Os sete conjuntos de esterase ou fenótipos descritos representam marcadores das fases de desenvolvimento, de modo que os eventos críticos, tais como a eclosão das larvas, fiação do casulo, transição larva-pré-pupa, pigmentação cuticular e emergência, são marcadas por alternância entre as atividades de esterase.

O mesmo pode ser verificado neste trabalho, onde em *T. spinipes* a EST-1, EST-2, EST-3, EST-4 e EST-5 estão presentes em todas as fases de desenvolvimento. A EST-6 aparece somente nas pupas de olhos brancos, tornando elas um fenotipo único. A mesma coisa acontece nas pré-pupas, onde o aparecimento da EST-7 e ser única sem atividade da EST-8 também a tornam um fenotipo único, nas demais fases de desenvolvimento todas apresentam a EST-8, salvo as pupas de olho branco, que também apresentam a EST-6. Todas as outras fases, de pupas de olhos rosas até a fase adulta possuem o mesmo fenotipo, apresentando EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5 e EST-8. A partir da pupa de olhos brancos, o fenotipo de esterases não sofreu mais alterações.

Na espécie *T. clavipes* as diferenças entre as fases de desenvolvimento também foram notórias, onde cada uma das fases amostradas apresentou diferença nos fenótipos de esterases. Em pré-pupas encontraram-se um perfil sem a presença da EST-1, EST-2 e EST-3 e nas pupas de olhos brancos houve a presença de todas as sete atividades de esterases. Nas pupas de olhos pretos, somente a EST-7 não foi expressa. No ninho de *T. clavipes* em que as abelhas foram coletadas não foi possível encontrar pupas de cores de olhos intermediários entre aquelas de olhos brancos e pretos, podemos inferir para *T. spinipes*, que o perfil esterásico das pupas de olhos rosas, vermelhos e marrons provavelmente seria parecido com aquele perfil de pupas de olhos brancos ou pretos e possivelmente apresentando todas as atividades de esterases, ou exceto a EST-7.

Os padrões de bandas e a atividade das esterases em diferentes populações e espécies são muito variados (GALEGO et al., 2006). Observam-se perfis esterásicos diferentes entre as espécies adultas de *Trigona spinipes* e *Tetragona clavipes*. Estudos realizados por Stuchi et al. (2012) e Ronqui et al. (2016), demonstraram que em abelhas adultas do mesmo gênero e espécies diferentes, podem ser encontradas 2, 3 e 6 áreas de atividades esterásicas. Para Ronqui et al. (2016), as regiões de atividades esterásicas são diferentes, mesmo quando comparadas com abelhas do mesmo gênero.

As atividades de esterase em abelhas são consideradas muito dinâmicas e influenciadas pelo estoque genético e idade (RINKEVICH et al., 2018). A atividade da izoenzima esterase correlaciona-se positivamente com a idade das abelhas, ou seja, existe uma tendência de aumento da atividade esterásica com o aumento da idade das abelhas, sugerindo que a transição fisiológica ocorre com o aumento da taxa metabólica.

Fermino et al. (2011) observaram as alterações em esterases de *Tetragonisca angustula* quando comparada a *Tetragonisca fiebrigi*. Estes autores afirmam que, quando essas abelhas são expostas a herbicidas, a segunda espécie estudada é mais sensível à presença do herbicida paraquat que aquela primeira. A utilização do herbicida nicosulfuron não apresentou ação inibitória sobre as esterases estudadas (MASSA et al., 2008). Silva e Lapenta (2011), estudando os insetos praga *Orizaephilus surinamensis* e *O. mercator*, demonstraram que a variabilidade genética para as esterases está relacionada com resistência aos inseticidas.

Györi et al. (2017) testando o efeito *in vitro* de quatro inseticidas neonicotinóides, inibidores da acetilcolinesterase, puderam verificar um bloqueio direto da acetilcolinesterase, demonstrando que esta esterase é o alvo direto mais provável entre os inseticidas neonicotinóides.

Rouibi et al. (2016) determinaram possíveis efeitos negativos de dois acaricidas (fluvalinato e ácido oxálico), medindo a acetilcolinesterase em abelhas operárias recém-emergidas, enfermeiras e coletoras de *A. mellifera*. Os dados mostraram que apenas o fluvalinato causou diminuição da atividade da acetilcolinesterase. Jiang et al. (2016) demonstraram que a alta expressão de certos genes, como o codificador da esterase (E4) fornece tolerância para a colônia de abelhas e maior capacidade de lidar com possíveis efeitos colaterais tóxicos da infestação de ácaros. Na fase adulta, este gene foi mais altamente expresso na colônia tolerante sem ácaros. Este padrão de expressão mostra que o papel deste gene varia com estágio de desenvolvimento.

O conhecimento sobre as isoenzimas em especial as esterases contribuem com os futuros estudos sobre variabilidade genética bem como para o emprego de abelha sem ferrão como biomarcador da presença de resíduos de pesticidas utilizados na agricultura.

CONCLUSÕES

As duas espécies estudadas apresentam diferentes regiões esterásicas. Nas abelhas da *T. spinipes* as diferenças foram encontradas nas pré-pupas e nas pupas de olho branco. As pupas de olho rosa, vermelho, preto e a adulta apresentam o mesmo perfil de esterase.

Na *T. clavipes* as pré-pupas também apresentaram o perfil esterásico diferenciado quando comparado com as demais fases de desenvolvimento, apresentando somente quatro das sete esterases, mostrando ser diferentes das pupas de olho branco e das adultas, mesmo sendo uma fase intermediária entre elas.

REFERÊNCIAS

- ABROL, D.L. **Pollination biology: biodiversity conservation and agricultural production**. New York: Springer, 2012. 792p.
- CERON, C.R. **Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos**. 1988, 142p. Tese (Doutorado em Entomologia). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1988.
- FIGUEIREDO, V.L.C.; PAULINO-SIMÕES, Z.L.; BITONDI, M.M.G. Developmental pattern of esterases in *Apis mellifera* L honey bees. I. Stage-dependent changes of esterase isoenzymes in Africanized workers. **Apidologie**, v.27, n.1, p.47-54, 1996.
- FERMINO, F.; FALCO, J.R.P.; TOLEDO, V.A.A.; RUVOLLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Isoenzymes and cytochemical analysis in *Tetragonisca angustula*. **Sociobiology**, v.58, n.2, p.353-366, 2011.
- GALEGO, L.G.; CERON, C.R.; CARARETO, C.M. Characterization of esterases in a Brazilian population of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). **Genética**, v.126, n.1-2, p.89-99, 2006.
- GIANNINI, T.C.; JAFFÉ, R. O papel das abelhas Irapuás como polinizadores na agricultura e em habitats degradados. **A.B.E.L.H.A.**, 2015. Disponível em: <<http://abelha.org.br/opapeldasabelhasirapuas.comopolinizadoresnaagriculturaemhabitatsdegradados/print>>. Acesso em: 14 jun. 2019.
- GIGLIOLLI, A.A.S.; LUCENA, A.L.M.; LAPENTA, A.S. Identificação e caracterização das esterases em *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v.6, n.1, p.25-35, 2011.
- GUPTA, S.C.; SIDDIQUE, H.R.; SAXENA, D.K.; CHOWDHURI, D.K. Hazardous effect of organophosphate compound, dichlorvos in transgenic *D. melanogaster* (hsp70-lacZ): induction of hsp70n antioxidant enzymes and inhibition of acetylcholinesterase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1725, n.1, p.81-92, 2005.
- GYORI, J.; FARKAS, A.; STOLYAR, O.; SZÉKÁCS, A., MÖRTL, M.; VEHOVSZKY, A. Inhibitory effects of four neonicotinoid active ingredients on acetylcholine esterase activity. **Acta Biologica Hungarica**, v.68, n.4, p.345-357, 2017.
- JIANG, S.; ROBERTSON, T.; MOSTAJERAN, M.; ROBERTSON, A.J.; QIU X. Differential gene expression of two extreme honey bee (*Apis mellifera*) colonies showing varroa tolerance and susceptibility. **Insect Molecular Biology**, v.25, n.3, p.272-282, 2016.
- LUCENA, A.L.M.; GIGLIOLLI, A.A.S.; LAPENTA, A.S. Análise das esterases durante as fases do desenvolvimento em *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) e sua relação com a resistência ao inseticida malathion. **SaBios - Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p.36-44, 2012.
- MASSA, R.; BLEVINS, S.; CHAO, S.L. Role of acetylcholinesterase and glutathione transferase following exposure to nicosulfuron and diazinon in *Helicoverpa zea*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.71, n.1, p.230-235, 2008.

- MARTINS-PARRA, F.; FIGUEIREDO, V.L.; ISSA, M.R.C.; ALMEIDA, R. Perfil esterásico durante o desenvolvimento ontogenético de *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera: Pyralidae). **SaBios - Revista de Saúde e Biologia**, v.11, n.3, p.17-27, 2016.
- MICHENER, C.D. **The Bees of the World**. 2a. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2007. 953p.
- MORITZ, R.F.A.; MIRANDA, J.; FRIES, I.; LE CONTE, Y.; NEUMANN, P.; PAXTON, R.J. Research strategies to improve honeybee health in Europe. **Apidologie**, v.41, n.3, p.227-242, 2010.
- RINKEVICH, F.D.; MARGOTTA, J. W.; SIMONE-FINSTROM, M.; GUZMAN, L.I.; HEALY, K.B. Esterase activity is affected by genetics, age, insecticide exposure, and viral infection in the honey Bee, *Apis mellifera*. **Biorxiv**, v.1, n.1, p.1-41, 2018.
- RONQUI, L.; GALHARDO, D.; LISBOA, F.T.; RUVULO-TAKASUSUKI, M.C.C.; TOLEDO, V.A.A. Electrophoretic and biochemical characterization of *Tetragonisca weyrauchi* (Hymenoptera, Apidae) stingless bees esterases. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.15, n.1, p.70-75, 2016.
- ROUBI, A.; BOUCHEMA, W.; LOUCIF-AYAD, W.; ACHOU, M.; SOLTANI, N. Risks assessment of two acaricides (fluvalinate and oxalic Acid) in *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera, Apidae): acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.4, n.2, p.503-508, 2016.
- RUVULO-TAKASUSUKI, M.C.C.; VIANA, L.H.O.; BAITALA, T.V.; NICOLIN, K.C.; TOLEDO, V.A.A. Characterization of esterases in *Tetragonisca angustula* and *Tetragona clavipes* (Hymenoptera; Meliponinae). **Journal of Morphological Sciences**, v.3-4, n.23, p.431-434, 2006.
- SILVA, G.A.R.; LAPENTA, A.S. Genetic variability in esterases and the insecticide resistance in brazilian strains of *Oryzaephilus mercator* and *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.101, n.2, p.177-185, 2011.
- SILVA, G.R.; PEREIRA, F.M.; SOUZA, B.A.; LOPES, M.T.R.; CAMPELO, J.E.G.; DINIZ, F.M. Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaira, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini) e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade. **Agricultural Entomology**, v.81, n.3, p.299-308, 2014.
- SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA E.A.B. **Abelhas Brasileiras - Sistemática e Identificação**. Editora Composição e Arte: Minas Gerais. 1a. ed., 2002. 253p.
- STUCHI, A.L.P.B.; TOLEDO, V.A.A.; LOPES, D.A.; CANTAGALLI, L.B.; RUVULO-TAKASUSUKI, M.C.C. Molecular marker to identify two stingless bee species: *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigii* (Hymenoptera, Meliponinae). **Sociobiology**, v.59, n.1, p.123-134, 2012.
- WHEELOCK, C.E.; SHAN, G.; OTTEA, J. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. **Journal of Pesticide Science**, v.30, n.2, p.75-83, 2005.