

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

EFEITO OXIDANTE DO IMIDACLOPRIDO EM ABELHAS
MELÍFERAS (*Apis mellifera* L.) E POTENCIAL AÇÃO
ANTIOXIDANTE DA CAFEÍNA

Kamila Vilas Boas Balieira
Zootecnista

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

**EFEITO OXIDANTE DO IMIDACLOPRIDO EM ABELHAS
MELÍFERAS (*Apis mellifera* L.) E POTENCIAL AÇÃO
ANTIOXIDANTE DA CAFEÍNA**

Kamila Vilas Boas Balieira

Orientador: Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Nicodemo

Dissertação apresentada à Unesp - Câmpus de Dracena como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação
Campus de Dracena

B186e

Balieira, Kamila Vilas Boas.

Efeito oxidante do imidacloprido em abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) e potencial ação antioxidante da cafeína / Kamila Vilas Boas Balieira. --
Dracena: [s.n.], 2017.
42 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2017.

Orientador: Fábio Erminio Mingatto

Co-orientador: Daniel Nicodemo

Inclui bibliografia.

1. Apicultura. 2. Estresse oxidativo. 3. Inseticida. 4. Lipoperoxidação. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeito antioxidante da cafeína em abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) intoxicadas com imidacloprido

AUTORA: KAMILA VILAS BOAS BALIEIRA
ORIENTADOR: FABIO ERMINIO MINGATTO
COORIENTADOR: DANIEL NICODEMO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: PRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FABIO ERMINIO MINGATTO
Curso de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP


Prof. Dr. PAULO RENATO MATOS LOPES
Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas


Prof. Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Ilha Solteira, 20 de fevereiro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Kamila Vilas Boas Balieira – nascida em 9 de fevereiro de 1989, na cidade de Diadema/SP - Brasil, filha de Maria Ivone Santos Vilas Boas Balieira e Cicero Nunes Balieira. Em julho de 2014, concluiu a graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - FCAT. Em março de 2015, iniciou no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em nível de mestrado, área de concentração Produção Animal na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa Interunidades do Câmpus de Dracena e Câmpus de Ilha Solteira, realizando estudos na área de “Bioquímica Metabólica e Toxicológica”, sob a orientação do Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto.

“Se as abelhas desaparecerem da face da terra, a humanidade terá apenas mais quatro anos de existência. Sem abelhas não há polinização, não há reprodução da flora, sem flora não há animais, sem animais não haverá raça humana.”

Albert Einstein

Dedico este trabalho aos meus pais.
Maria Ivone Santos Vilas Boas Balieira e Cicero Nunes Balieira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guiar em todos os momentos de minha vida, dando forças para superar todos os obstáculos.

Aos meus pais Cicero e Ivone, meus irmãos Seila e Isaac, meus sobrinhos Christian, Lorena e à minha está prestes a vir ao mundo, e ao meu namorado Alex, amo vocês, obrigada pelo apoio, carinho, confiança e amor, sem vocês minha vida não teria sentido.

Ao meu grande professor, Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto por ter aceitado o convite em ser meu orientador durante o mestrado, obrigado pela confiança depositada, atenção e amizade, o senhor é um grande homem, tenho muito orgulho de ter sido sua aluna durante a graduação e orientada no mestrado, o seu coração e humildade faz do senhor um ser humano iluminado.

Não poderia deixar de agradecer ao meu querido professor, Prof. Dr. Daniel Nicodemo, a pessoa que me ensinou tudo que eu sei sobre apicultura, obrigada por ter me apresentado esse mundo maravilhoso e contagiante das abelhas, por ter sido meu orientador durante toda graduação, e meu co-orientador no mestrado, obrigada por todos os puxões de orelha que foram necessários para que eu trilhasse meu caminho, sem a sua orientação nada disso seria possível, obrigada pela confiança, apoio, amizade e orientação.

Às minhas amigas e amigos de Santa Mercedes, obrigada pelo apoio, amizade, carinho e companheirismo.

A todos os amigos que fiz durante esses sete anos na Unesp, agradeço às equipes NOS e LaBMeT, por toda ajuda e amizade, principalmente a minha grande amiga Meiriele Mazzo.

Aos técnicos de laboratório Andréia e Edison, obrigada pela ajuda, amizade, paciência e pelo auxílio nas análises.

Aos membros da minha banca de qualificação e defesa.

Meu muito obrigada!

EFEITO OXIDANTE DO IMIDACLOPRIDO EM ABELHAS MELÍFERAS (*Apis mellifera* L.) E POTENCIAL AÇÃO ANTIOXIDANTE DA CAFEÍNA

RESUMO - Pesticidas são considerados um dos principais fatores do declínio populacional das abelhas e substâncias antioxidantes podem auxiliar na proteção desses insetos contra esses produtos. Foram avaliados o efeito oxidante do imidacloprido em abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) e a ação antioxidante da cafeína. Foram usadas seis dietas à base de xarope (água e açúcar 1:1), controle (apenas xarope); xarope com adição de 0,1 ng de imidacloprido/abelha; xarope com adição de 0,3 ng de imidacloprido/abelha; xarope com 5 µg/mL de cafeína; xarope com adição de 5 µg/mL cafeína e 0,1 ng de imidacloprido/abelha; xarope com adição de 5 µg/mL cafeína e 0,3 ng de imidacloprido/abelha. Após 72 horas da alimentação, foi preparado homogenato do tórax e avaliados: atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), concentrações de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H) e grupos tióis de proteínas, além da formação de malondialdeído (MDA), um indicador de lipoperoxidação. Foi avaliada a sobrevivência média de 360 abelhas recém-emergidas (1º dia), alimentadas com as dietas experimentais até às 72 horas, e o consumo médio da dieta por abelha. O imidacloprido aumentou a atividade da GPx em relação ao controle nas duas doses testadas, apresentando um efeito dose-dependente, e o mesmo foi observado com a cafeína. A adição de cafeína juntamente com 0,3 ng de imidacloprido/abelha, estimulou ainda mais a atividade da enzima. Observou-se também aumento na atividade da CAT pelas duas doses do imidacloprido e pela cafeína em relação ao controle. A adição da cafeína não alterou o efeito das doses do inseticida sobre a CAT. Nenhum dos tratamentos alterou a razão entre as concentrações de GSH e GSSG (GSH/GSSG) ou a concentração de NAD(P)H. Foi observada uma redução significativa na concentração de grupo tióis de proteínas em relação ao grupo controle nas abelhas tratadas com as duas doses do imidacloprido, e a adição de cafeína protegeu contra a oxidação desses grupos. Para a concentração de MDA, observou-se aumento dose-dependente do imidacloprido em relação ao controle. A cafeína diminuiu parcialmente esse efeito, indicando que inibiu a lipoperoxidação. A sobrevivência média das abelhas durante 72 horas não foi alterada por nenhum dos tratamentos. O consumo das dietas foi maior para as abelhas tratadas com 0,3 ng de imidacloprido/abelha. Os resultados do presente estudo indicam que o imidacloprido provocou danos oxidativos nas abelhas melíferas, enquanto que a cafeína atuou como antioxidante, e ainda, que as abelhas melíferas têm o consumo estimulado quando o alimento estiver intoxicado com o imidacloprido.

Palavras-chave: apicultura; estresse oxidativo; inseticidas; lipoperoxidação.

OXIDANT EFFECT OF IMIDACLOPRID IN HONEY BEES (*Apis mellifera* L.) AND POTENTIAL ANTIOXIDANT ACTION OF CAFFEINE

ABSTRACT- Pesticides are the main factors in the population decline of bees and antioxidant substances may aid in protecting these insects against these products. The oxidizing effect of imidacloprid in honey bees (*Apis mellifera* L.) and the antioxidant action of caffeine were evaluated. Six diets based on syrup (water and sugar 1: 1), control (syrup only) were used; syrup with addition of 0.1 ng imidacloprid/bee; syrup with addition of 0.3 ng imidacloprid/bee; Syrup with 0.5 µg/mL caffeine; syrup with addition of 5 µg/mL caffeine and 0.1 ng imidacloprid/bee; syrup with addition of 5 µg/mL caffeine and 0.3 ng imidacloprid/bee. After 72 hours of use, the activity of glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT), concentrations of reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), oxidative state of pyridine nucleotides (NAD(P)H) and thiol groups of protein, besides the production of malondialdehyde (MDA), an indicator of lipoperoxidation. The longevity of 360 freshly emerged bees (1st day), fed experimental diets, was evaluated. Imidacloprid increased GPx activity compared to the control, in a dose-dependent manner, and the same and was observed with caffeine. The addition of caffeine with 0.3 ng of imidacloprid/bee stimulated the activity of the enzyme. There was an increase in CAT activity by the two doses of imidacloprid in relation to the control and also by caffeine. The addition of caffeine did not alter the effect of doses of the insecticide on the CAT activity. The GSH:GSSG ratio or the NAD(P)H concentration were not affected. A significant reduction in the concentration of thiol group of proteins was observed in the two groups of imidacloprid relative to the control group, and the addition of caffeine protected against the oxidation of these groups. Imidacloprid caused a dose-dependent increase in the MDA concentration while the addition of caffeine partially decreased this effect, indicating that it inhibited the lipoperoxidation. The average survival of the bees during 72 hours was not altered by any of the treatments. Diets consumption was higher for bees treated with 0.3 ng imidacloprid/bee. The results of the present study indicate that imidacloprid caused oxidative damage in honey bees, whereas the caffeine acted as an antioxidant, and also that the consumption is stimulated when the food is intoxicated with imidacloprid.

Keywords: apiculture; oxidative stress; insecticides; lipoperoxidation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. O papel das Abelhas	14
2.2. Sumiço das abelhas	14
2.4. CAFEÍNA	16
2.5. Estresse oxidativo e mecanismo de proteção antioxidante	17
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5.1. Local do Experimento	20
5.2. Reagentes	20
5.3. Preparo das dietas e alimentação	20
5.4. Obtenção do homogenato de tórax	21
5.5. Dosagem de proteínas no homogenato de tórax.....	22
5.6. Atividade das enzimas antioxidantes no homogenato de tórax	23
5.6.1. Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx).....	23
5.6.2. Atividade da enzima catalase (CAT).....	24
5.7. Determinação da concentração de glutathione reduzida (GSH).....	24
5.8. Determinação da concentração de glutathione oxidada (GSSG).....	24
5.9. Estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H).....	25
5.10. Oxidação de grupos tióis de proteínas.....	25
5.11. Avaliação da lipoperoxidação	26
5.12. Avaliação da sobrevivência média das abelhas.....	26
5.13. Consumo das dietas	27
5.14. Análises estatísticas	28
6.1. Atividade da Enzima Glutathione Peroxidase (GPx)	28
6.2. Atividade da enzima catalase (CAT)	29
6.3. Concentração de glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).....	29
6.4. Estado oxidativo nos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)	30
6.5. Oxidação dos grupos tióis de proteína	30
6.6. Avaliação da lipoperoxidação	30

6.7. Avaliação da sobrevida média das abelhas.....	31
6.8. Consumo das dietas	31
7 DISCUSSÃO	32
8 CONCLUSÕES.....	35
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1 INTRODUÇÃO

No Brasil existem mais de 1.500 espécies de abelhas nativas além da *Apis mellifera* africanizada (MALASPINA, 1979; SILVEIRA et al., 2002). A polinização realizada por abelhas chega a até 90% em flora nativa, dependendo do ambiente (KERR et al., 2001). Segundo Gallai et al. (2008), as abelhas são os pilares da sustentabilidade, pois são elas as responsáveis por um terço dos alimentos provenientes da agricultura. No entanto, o uso indiscriminado de pesticidas nas lavouras tem ocasionado uma redução significativa na população das abelhas, causando impacto negativo na produção agrícola e no forrageamento (JOHNSON et al., 2010; GILL et al., 2012).

Em 2007 apicultores europeus tiveram perdas de até 80% das colmeias, perdas essas que ocasionam a morte de toda colônia, sendo essa por falta de alimento ou cuidados com as crias. Esse fenômeno, ainda não totalmente explicado, passou a ser conhecido como “desordem do colapso das colônias” (GUIMARÃES, 2007). Malaspina et al. (2008) relataram perdas de cerca de 400 colmeias em diferentes regiões do Brasil, porém, na grande maioria dos casos não foi possível a coleta de amostras para análises visando a verificação de contaminação por agentes químicos.

O envenenamento das abelhas por pesticidas pode ocorrer por ingestão, durante visitas das abelhas às flores ou por contato. Os pesticidas têm ação frequente no sistema nervoso das abelhas, acarretando paralisia do trato digestório, asas e pernas. Isso ocasiona a morte desses insetos por dessecação ou por fome, pois os mesmos não se alimentam ou bebem água (CRANE; WALKER, 1983; MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006).

Muitos pesticidas, mesmo em baixas concentrações, podem ser extremamente tóxicos para as abelhas (THOMPSON, 2001; VAN DER STEEN, 2001; THOMPSON, 2002; GALLO, 2003; RORTAIS et al., 2005). Quando as abelhas são expostas aos pesticidas, estes podem desencadear efeitos subletais tais como a interferência na habilidade cognitiva, desorientação e alteração comportamental (PHAN-DELÈGUEH et al., 2002; RORTAIS et al.,

2005) e ainda, podem causar mortalidade generalizada entre as abelhas de diversas espécies (ROCHA, 2012).

Entre os pesticidas que apresentam elevada toxicidade para as abelhas, está o imidacloprido (DECOURTYE et al., 2003; 2004; FAUCON et al., 2005), o qual é um princípio ativo neonicotinóide utilizado em várias formulações para controle de pragas em inúmeras culturas agrícolas no Brasil e no mundo (PINHEIRO; FREITAS, 2010), sendo o terceiro inseticida mais consumido no Brasil segundo dados do IBGE (2015). Os valores de DL₅₀ do imidacloprido para as abelhas são 3,7 e 40,9 ng/abelha, por via oral e contato, respectivamente (SCHMUCK et al., 2001). Nicodemo et al. (2014) demonstraram que o imidacloprido pode afetar a produção de energia pelas mitocôndrias das abelhas, porém, ainda não foram descritos os efeitos deste inseticida sobre o sistema antioxidante celular nestes insetos.

A cafeína (1,3,7- trimetilxantina) é um alcalóide lipossolúvel, integrante da classe dos compostos conhecidos como metilxantinas (D'AMICIS e VIANI, 1993), que atua no sistema nervoso central (ALBINA et al., 2002) e é também conhecida pelas suas propriedades antioxidantes (LEE, 2000; KRISKO, 2005).

Strachecka et al., (2014) estudaram o efeito da cafeína sobre a longevidade e o sistema antioxidante de abelhas operárias expostas ao patógeno *Nosema spp.*, demonstrando que a substância pode ser considerada como um suplemento natural dietético para aumentar a resistência dos enxames a fatores de estresse. Neste sentido, a inclusão da cafeína na alimentação das abelhas *Apis mellifera* pode ser uma alternativa na diminuição da intoxicação de colmeias por pesticidas, sendo importante o desenvolvimento de pesquisas nessa área, para se buscar alternativas para o apicultor.

Diante do exposto acima, este estudo objetivou a investigação dos efeitos do imidacloprido sobre o sistema antioxidante celular das abelhas melíferas (*Apis mellifera*) e a potencial ação antioxidante da cafeína.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O papel das abelhas

O interesse dos humanos nas abelhas é muito antigo, especialmente abelhas da espécie *Apis mellífera* L., sendo esse relacionamento demonstrado por meio de desenhos em cavernas (CRANE, 1999).

As abelhas são consideradas os principais agentes polinizadores dos vegetais, sendo a mesma responsável pela produção de muitas culturas por meio da polinização. A polinização consiste no transporte do grão de pólen para o estigma da flor ou com a transferência dos grãos de pólen na antera de uma flor para o estigma de outra flor de outra espécie ou da mesma espécie, e como recompensa os vegetais e as flores produzem substâncias adocicadas para as abelhas. O pólen é de extrema importância para as abelhas, pois é utilizada como fonte proteica na sua dieta (SOUZA, 2007).

As interações entre as abelhas e as plantas garantem aos vegetais o sucesso na polinização, aumentando o vigor das espécies e a produção de frutos e sementes (COUTO; COUTO, 2002). Segundo Gallai et al. (2008), as abelhas são os pilares da sustentabilidade, são elas as responsáveis por um terço dos alimentos provenientes da agricultura.

Além da polinização, as abelhas também têm grande importância na agropecuária, pois existem muitos produtos produzidos pela colmeia tais como: mel, geleia real, apitoxina, pólen apícola, cera e própolis (ROCHA, 2012).

2.2. Sumiço das abelhas

Apicultores e pesquisadores tem se preocupado com a baixa diversidade e quantidade de abelhas presentes no ambiente (FAO, 2004; WINFREE et al., 2007). No ano de 2006, foi relatada por apicultores uma grande perda de colônias de abelhas nos Estados Unidos, causando prejuízos sem precedentes (JOHNSON, 2010). Casos semelhantes começaram a acontecer no início de 2007 na Europa (DUPONT, 2007).

O fenômeno do aumento da mortalidade das abelhas e abandono das suas colmeias passou a ser conhecido como distúrbio do colapso das colônias,

sendo que muitos estudos sobre o assunto sugerem como principais causas: *Varroa destructor*, fungos, bactérias, nutrição, clima, pesticidas e estresse (AMARO, 2010).

O uso exacerbado de inseticidas pode acarretar em um desequilíbrio populacional das abelhas e causar prejuízos aos seres humanos em relação à alimentação e saúde (MALASPINA et al, 2008; MALASPINA; SOUZA, 2008).

Mesmo em baixas concentrações os efeitos dos inseticidas sobre as abelhas podem ser letais ou subletais (THOMPSON, 2003). Estudos sobre a toxicidade de inseticidas nas abelhas começaram a ser realizados nos países de clima temperado (PASCHOAL, 1979; MORAES et al; 2000), principalmente na espécie *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Apidae), pela sua importância na polinização (FREE, 1970; MCGREGOR, 1976; CRANE; WALKER, 1984) e pelo impacto econômico e social da apicultura (PHAM-DELÈGUE et al., 2002).

O efeito que os inseticidas causa nas abelhas, pode não ser observado imediatamente, sendo necessário o uso de doses subletais para futuros estudos relacionados a sobrevivência, comportamento e fisiologia (MEDRZYCHI et al., 2003).

2.3. Imidacloprido nas abelhas

Imidacloprido é um inseticida neonicotinóide, utilizado em grande escala no Brasil e no mundo pela eficiência no controle de pragas (Figura 1) (PINHEIRO e FREITAS 2010). A exposição de abelhas a inseticidas neonicotinóides tem sido associada a desvio comportamental tal como a dificuldade em regressar à colmeia (HIGES et al., 2009).

Em estudo realizado por BALIEIRA; NICODEMO (2013), sobre a sobrevivência média no regresso das abelhas melíferas às suas colônias após o fornecimento de dietas energéticas (xaropes de água e açúcar em iguais proporções) contaminadas com o imidacloprido em diferentes doses (0, 1, 5, 10 e 20 ng/abelha), observou-se que a dose mínima utilizada de 1 ng/abelha foi tóxica para as abelhas, sendo o efeito dose-dependente, não permitindo que as abelhas completassem o seu ciclo de vida.

Segundo Chambó et al. (2010) há diminuição de visitas quando abelhas *Apis mellifera* são expostas a ação do inseticida imidacloprido e beta-ciflutrina nas inflorescências de híbridos de girassol.

Efeitos de doses subletais de imidacloprido em doses de 100 ppb, 500 ppb e 1000 ppb foram testados no comportamento de forrageamento e retorno à colônia de abelhas *Apis mellifera*, sendo que os resultados mostraram que as abelhas tratadas com doses a partir de 500 ppb desapareceram da colônia após 24 horas (BORTOLOTTI et al.,2003).

Estudos realizados por Catae; Malaspina; Roat (2016) avaliaram a toxicidade oral do imidacloprido em abelhas melíferas, obtiveram como resultados alterações bioquímicas como o estresse químico, alterações no suprimento de oxigênio, degeneração neuronal, deficiência no processo de aprendizagem e alterações mitocondriais.

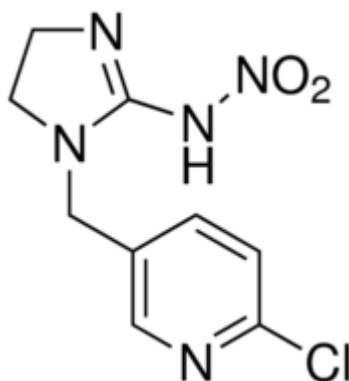


Figura 1. Fórmula química do imidacloprido. Fonte: domínio público.

2.4. Cafeína

A cafeína é uma metilxantina que atua no sistema nervoso central (Figura 2) (COSTA, 1994). Ela está presente em mais de sessenta espécies de plantas, sendo encontrada em diversos alimentos e bebidas, tais como: chocolates, guaraná, cafés, chás, refrigerantes, bebidas energéticas, além de estar presente em diversos medicamentos (MANDEL, 2002).

Segundo Nehling e Debry (1994), a cafeína age na mobilização intracelular do cálcio do retículo sarcoplasmático, na inibição de

fosfodiesterases em vários tecidos, músculos e adipócitos e age como antagonista na relação dos receptores de adenosina principalmente no SNC.

Estudos demonstraram que a cafeína apresenta uma significativa capacidade antioxidante, atuando como protetora das membranas contra os danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio (SHI; DALAL; JAIN, 1991; DEVASAGAYAM et al., 1996; VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2011).

Os efeitos da cafeína em insetos são poucos estudados, porém Ishay; Paniry (1979) estudaram em determinados comportamentos de vespas, e concluíram que o efeito da cafeína está associado à quantidade de tecido adiposo, vespas operárias responderam ao tratamento mais cedo, pois possuem baixa quantidade de gordura.

Abelhas suplementadas com 5 µg/mL de cafeína, apresentaram influência positiva nos parâmetros relacionados à longevidade, níveis globais de DNA, teor de proteínas, atividades proteolíticas e sistema antioxidante, sugerindo assim o uso da cafeína em condições de estresse, doenças, infestações por microrganismos e estresse oxidativo (STRACHECKA et al., 2014).

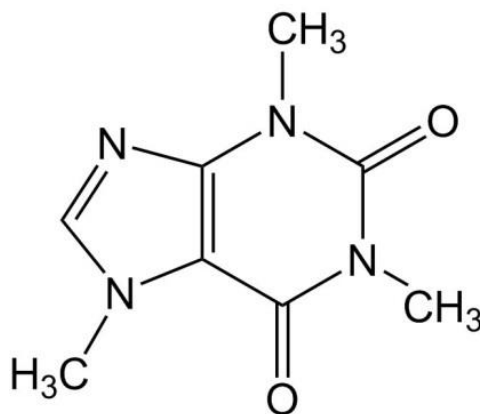


Figura 2. Fórmula química da cafeína. Fonte: domínio público.

2.5. Estresse oxidativo e mecanismo de proteção antioxidante

Estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o grau de proteção dos mecanismos antioxidantes (ONG; SHAN; CHIA, 2002).

Entre os radicais livres, estão às espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo as mais importantes o radical hidroxila (OH^\cdot), o ânion superóxido (O_2^\cdot) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Dentre essas, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são as ERO formadas primariamente, sendo o H_2O_2 gerado por meio da dismutação (enzimática ou não enzimática) do ânion superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Para se proteger contra o processo oxidativo, o organismo desenvolveu mecanismos que recebeu como nome antioxidante. São classificadas como agentes antioxidantes as vitaminas, minerais e enzimas, que podem restabelecer o balanço entre as moléculas oxidantes e antioxidantes, mantendo a integridade das membranas celulares e prevenindo danos oxidativo ao DNA (WOUNG et al., 2000).

O sistema de proteção antioxidante não enzimático é composto pelas vitaminas C e E, e pela glutathiona reduzida (GSH). As vitaminas C e E, atuam como proteção das membranas lipídicas sobre os danos oxidativos (BUETTNER, 1993). A GSH é um tripeptídeo que está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (MEISTER; ANDERSON, 1958). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, sendo que na inativação de um agente oxidante ocorre produção de glutathiona oxidada (GSSG). Em situações em que o sistema antioxidante está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo. Assim, a razão GSH/GSSG pode ser usada como marcador do estresse oxidativo (OWEN; BUTTERFIELD, 2010; ZITKA et al., 2012).

O sistema antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona redutase (GR) e glutathiona peroxidase (GPx), de modo que o organismo mantém as concentrações de espécies reativas de oxigênio dentro dos limites fisiológicos (DANDEKAR et al., 2002).

A enzima catalase tem papel importante sobre a eliminação do H_2O_2 citosólico, promovendo a sua catálise até água. Nas mitocôndrias, o H_2O_2 é

convertido a H_2O pela glutatona reduzida (GSH) por ação da glutatona peroxidase (GPx), sendo que a manutenção dos níveis adequados de GSH é feita à custa da atividade da glutatona redutase (GR), a qual utiliza equivalentes redutores no NADPH, o qual é produzido pela Via das Pentoses Fosfato ou por meio de enzimas transidrogenases (RIBEIRO et al., 2005) (Figura 3).

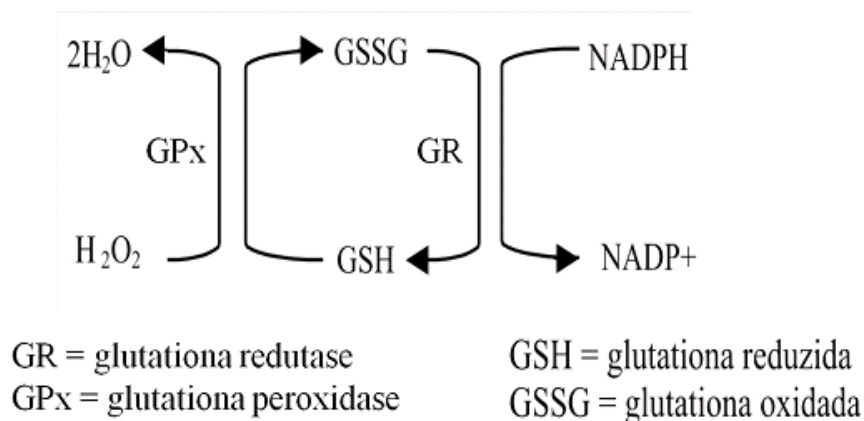


Figura 3. Sistema antioxidante enzimático (RIBEIRO, 2005).

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do inseticida imidacloprido sobre o sistema antioxidante celular em abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) e a potencial ação protetora da cafeína por meio de dietas experimentais.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o efeito do imidacloprido sobre os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo nas abelhas.
- Determinar a atividade antioxidante da cafeína em abelhas tratadas com o imidacloprido.
- Avaliar a relação entre o consumo do imidacloprido e da cafeína frente à sobrevivência média das abelhas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local do Experimento

O experimento foi realizado na FCAT – Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de Dracena, no Laboratório de Ecologia e Insetos Úteis e no Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica (LaBMeT).

5.2. Reagentes

Em todos os ensaios foram empregados reagentes de maior grau de pureza disponíveis comercialmente e as soluções foram preparadas com água ultra-filtrada em sistema purificador Millipore DirectQ-3[®] (Milli-Q[®]). O imidacloprido foi cedido pela empresa Ourofino Agronegócios (Cravinhos, SP, Brasil) e a cafeína utilizada foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda (CÓDIGO C0750).

5.3. Preparo das dietas e alimentação

Foram utilizadas abelhas de colmeias modelo Langstroth, oriundas do apiário experimental da FCAT - UNESP. Foram retiradas abelhas de quadros de cria operculados (de uma mesma colônia) e colocadas em gaiolas de confinamento e introduzidas em estufa com temperatura (33°C) e umidade (70%) controladas, para a emergência das operárias. Após a emergência das abelhas, amostras com 20 operárias recém-emergidas foram coletadas e introduzidas em gaiolas de confinamento, local onde foram alimentadas com diferentes dietas, sendo esse procedimento repetido por três vezes para cada tratamento.

As dietas oferecidas foram em função do tratamento, sendo preparados seis tipos de dietas energéticas (xaropes de água e açúcar em iguais proporções), a saber:

- Controle (apenas xapore);
- Xarope com adição de 0,1 ng de imidacloprido/abelha;

- Xarope com adição de 0,3 ng de imidacloprido/abelha;
- Xarope com 5 µg/mL de cafeína;
- Xarope com adição de cafeína e 0,1 ng de imidacloprido/abelha;
- Xarope com adição de cafeína e 0,3 ng de imidacloprido/abelha.

Em cada gaiola foram fornecidos 3 mL da dieta embebida em algodão de 0,60 g em recipiente de plástico com abertura frontal. As dietas experimentais foram fornecidas por um período de 24 horas. Em seguida, foi fornecido apenas xarope de água e açúcar (1:1). As análises foram realizadas 72 horas após o oferecimento das dietas experimentais.

As doses de imidacloprido usadas neste estudo foram selecionadas por meio de um estudo piloto no qual as abelhas foram submetidas a diferentes doses do inseticida (0,1, 0,3 e 0,5 ng/abelha), sendo que, na maior dose testada (0,5 ng/abelha) as abelhas não sobreviveram enquanto que nas doses de 0,1 e 0,3 ng não houve mortalidade. A dose da cafeína foi selecionada a partir de estudo prévio realizado por Strachecka et al. (2014).

5.4. Obtenção do homogenato de tórax

Foram coletadas 20 abelhas por tratamento para a obtenção de músculo torácico. O tórax foi dissecado e o homogenato foi preparado de acordo com Hoskins et al. (1956), com modificações. Após a separação da cabeça e abdômen, o tórax foi adicionado em grau de porcelana contendo 20 mL de meio gelado composto por sacarose 250 mM, EGTA 0,2 mM, EDTA 0,1 mM, HEPES-KOH 5 mM (pH 7,4) e BSA (albumina de soro bovino) 0,1% e, posteriormente, macerado com pistilo de porcelana e filtrado em gaze dobrada 8 vezes (Figura 4).



Figura 4. Preparação do homogenato do músculo torácico das abelhas.
Fonte: elaborado pelo autor.

5.5. Dosagem de proteínas no homogenato de tórax

A quantificação total de proteínas foi realizada pela reação do biureto, de acordo com Cain e Skilleter (1987), e a construção da curva padrão foi realizada utilizando albumina sérica bovina (BSA) (Figura 5).



Figura 5. Preparação da dosagem de proteínas, do homogenato do músculo torácico. Fonte: elaborado pelo autor.

5.6. Atividade das enzimas antioxidantes no homogenato de tórax

5.6.1. Atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi determinada por um método indireto baseado na oxidação da glutaciona reduzida (GSH) para glutaciona oxidada (GSSG), catalisada pela GPx e a consequente oxidação da NADPH pela GSSG (FLOHÉ, GÜNZLER, 1984). O sistema de reação foi composto de 1,5 mL contendo: GSH 1,0 mM, NADPH 0,2 mM, H₂O₂ 0,25 mM, EDTA 0,5 mM e tampão fosfato de sódio 0,10 M (pH 7,6) e homogenato de tórax (1 mg de proteína/mL). A atividade enzimática foi avaliada a 30°C em um espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800 no comprimento de onda de 340 nm e a oxidação de 1 µmol of NADPH/min foi usada como uma unidade de glutaciona peroxidase. A atividade específica foi expressa como unidade por mg de proteína/minuto (Figura 6).



Figura 6. Determinação da atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx), pelo espectrofotômetro Beckman-Couter. Fonte: elaborado pelo autor.

5.6.2. Atividade da enzima catalase (CAT)

A avaliação da atividade da enzima catalase foi realizada com o homogenato de tórax (1 mg de proteína/mL) em 1,75 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM pH 7). A reação foi iniciada pela adição de 200 µL de H₂O₂ 10 mM. A atividade da catalase foi definida como a quantidade da enzima requerida para decompor 1 µmol de H₂O₂ por minuto, a 25°C e pH 7. A absorvância foi lida em espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800 a 230 nm. A atividade específica foi expressa como unidade por mg de proteína/minuto (AEBI; BERGMEYER, 1974).

5.7. Determinação da concentração de glutatona reduzida (GSH)

A determinação da concentração de GSH no homogenato de tórax foi realizada de acordo com Hissin e Hilf (1976) utilizando-se tubos do tipo “ependorf” de 2 mL. Ao homogenato (1 mg de proteína), foi adicionado meio contendo sacarose 125 mM, KCl, 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4 para completar 1 mL e após uma leve homogeneização foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético 13%. A mistura foi agitada e centrifugada a 9000 g por 3 min. Em tubos de ensaio de 5 mL foram adicionados 1800 µL de tampão contendo NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 8,0, com EDTA 5 mM, 100 µL do sobrenadante obtido da centrifugação e 100 µL de OPT (o-ftalaldeído) 1 mg/mL. Em seguida os tubos foram agitados e mantidos por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Foi efetuada a leitura em espectrofluorímetro Shimadzu modelo RFPC 5301 com comprimento de onda de 350 e 420 nm para emissão e excitação, respectivamente, com abertura de fenda 3 em ambos os casos.

5.8. Determinação da concentração de glutatona oxidada (GSSG)

Para a dosagem de GSSG, 250 µL do sobrenadante inicial foram tratados com 250 µL de N-etilmaleimida (NEM) 0,04 M e submetidos ao mesmo

procedimento de mistura com o OPT. As concentrações de GSH e GSSG foram estimadas por meio de uma curva padrão.

5.9. Estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)

A determinação do estado oxidativo da NAD(P)H foi realizada no homogenato de tórax. Amostras de homogenato (1 mg de proteína/mL) foram adicionadas a um meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4 (volume final de 2 mL) e a leitura foi realizada em espectrofluorímetro Shimadzu modelo RFPC 5301, usando-se 366 e 450 nm para excitação e emissão, respectivamente. Os resultados foram expressos como Unidade Relativa de Fluorescência (URF) (Figura 7).



Figura 7. Aparelho de espectrofluorímetro Shimadzu modelo RFPC 5301. Fonte: elaborado pelo autor.

5.10. Oxidação de grupos tióis de proteínas

A concentração de grupos tióis (-SH) de proteínas foi determinado usando o reagente de Ellman de acordo com Sedlak; Lindsay (1968) com algumas modificações. Uma amostra do homogenato (5 mg de proteína) foi tratada com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%, contendo EDTA 5 mM e submetida a

centrifugação a 2500 *g* por 5 minutos. O precipitado proteico foi lavado duas vezes com a mesma solução de TCA-EDTA. As proteínas foram redissolvidas em 3 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, contendo EDTA 5 mM e dodecil sulfato de sódio 0,5%. Alíquotas dessa solução foram tratadas com DTNB (concentração final 0,1 mM) dissolvido em 2 mL de tampão Tris-EDTA, pH 8,6. As amostras foram incubadas “no escuro” e a absorvância foi medida em espectrofotômetro Beckman-Coulter modelo DU-800 a 412 nm e os valores subtraídos de um “branco” obtido pelo tratamento das amostras com N-etilmaleimida 5 mM antes da reação com o DTNB. A concentração de grupos tióis foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.11. Avaliação da lipoperoxidação

A lipoperoxidação foi determinada utilizando o método do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (BUEGE; AUST, 1978). O homogenato (5 mg de proteína) foi colocado em tubos de ensaio e adicionados 0,2 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) (8,1%), 1,5 mL de ácido acético (20%), 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (solução aquosa a 0,67%), o volume foi completado até 4 mL com água deionizada (milli-Q) e a mistura colocada em banho-maria a 95°C por 60 min. Após o período de incubação os tubos foram retirados e resfriados em banho de gelo e adicionado 1 mL de água milli-Q e o complexo MDA-TBA foi extraído com 5 mL de n-butanol. Em seguida os tubos foram centrifugados a 2000 *g* por 10 minutos, a parte orgânica foi coletada e a absorvância medida a 535 nm. A concentração de lipoperoxídios foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

5.12. Avaliação da sobrevivência média das abelhas

Foi verificada a sobrevivência média de abelhas melíferas tratadas com as dietas experimentais no dia de nascimento das abelhas. As 360 operárias foram confinadas em 18 gaiolas, sendo três gaiolas por tratamento. As gaiolas

foram mantidas à temperatura (33°C) e umidade relativa (70%) controladas, em estufa (Figura 8). Diariamente as abelhas mortas foram contadas e retiradas de as gaiolas até completar-se o período experimental de 72 horas. Após o período de 24 horas com as dietas experimentais disponíveis às abelhas, foi fornecido o alimento controle *ad libitum* para todos os insetos.



Figura 8. Abelhas confinadas em gaiolas. Fonte: elaborado pelo autor.

5.13. Consumo das dietas

Foi avaliado o consumo de alimento pelas operárias. Antes do oferecimento das dietas às abelhas, cada chumaço de algodão já embebido da respectiva dieta (3 mL) foi pesado e então colocado na gaiola. Após 24 horas do oferecimento da dieta, o chumaço de algodão foi novamente pesado para se avaliar o consumo, o qual foi obtido pela diferença entre o peso entre a primeira e segunda pesagens (Figura 9). Os valores obtidos foram divididos pelo número de abelhas presentes na gaiola após o período de fornecimento das dietas.



Figura 9. Abelhas confinadas em gaiolas, onde o alimento e a fonte de água foram oferecidos em chumaços de algodão. Fonte: elaborado pelo autor.

5.14. Análises estatísticas

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e três repetições por tratamento.

A significância estatística dos dados experimentais dos efeitos sobre o sistema antioxidante foi determinada pelo teste de análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Newman-Keuls a um nível de significância de 5% ($P < 0,05$). A significância estatística dos dados experimentais da sobrevivência média das abelhas foi realizada pelo método não paramétrico de Kaplan-Meier. O consumo das dietas foi submetido à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste Tukey a um nível de significância de 5% ($P < 0,05$). As análises foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA 03/04/2003).

6 RESULTADOS

6.1. Atividade da Enzima Glutaciona Peroxidase (GPx)

A análise da atividade da enzima GPx demonstrou que houve um aumento significativo na atividade desta enzima no homogenato de tórax das

abelhas nos grupos tratados com 0,1 ng imidacloprido/abelha e 0,3 ng imidacloprido/abelha, sendo o efeito dose-dependente. Efeito semelhante foi encontrado no grupo tratado com a cafeína. A adição de cafeína juntamente com o imidacloprido não impediu o aumento na atividade da enzima (Tabela 1).

6.2. Atividade da enzima catalase (CAT)

Na análise da atividade da enzima CAT, observou-se um aumento significativo na atividade da enzima provocado pelas duas doses de imidacloprido em relação ao grupo controle. Efeito semelhante foi encontrado no grupo tratado com a cafeína. Não foram observadas alterações no efeito provocado pelo imidacloprido quando foi adicionada a cafeína (Tabela 1).

Tabela 1- Atividade das enzimas antioxidantes.

	Controle	Cafeína	Imidacloprido 0,1	Imidacloprido 0,3	Imidacloprido 0,1+Cafeína	Imidacloprido 0,3+Cafeína
GPx (U/mg de proteína)	0,33±0,01 a	1,20±0,09 b	0,77±0,07 b	1,38±0,14 b	1,29±0,28 b	1,95±0,24 c
CAT (U/mg de proteína)	1,27±0,33 a	3,55±0,55 b	3,20±0,47 b	4,13±0,23 b	3,78±0,44 b	3,36±0,05 b

Fonte: Elaborado pelo autor. Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Teste comparativo de Newman-Keuls. Letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$).

6.3. Concentração de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

Os tratamentos com 0,1 ng imidacloprido/abelha e 0,3 ng imidacloprido/abelha ou com a cafeína não apresentaram efeito sobre a concentração de GSH em relação ao grupo controle. Aumento significativo do tripeptídeo na forma reduzida foi observado somente no tratamento com 0,3 ng imidacloprido/abelha com a inclusão da cafeína (Tabela 2). Efeito semelhante foi observado com relação à concentração de GSSG (Tabela 2).

Apesar dos resultados citados acima, quando calculada a razão entre as concentrações de GSH e GSSG (GSH/GSSG) observou-se que não houve efeito de nenhum dos tratamentos sobre o estado oxidativo da glutathione (Tabela 2).

6.4. Estado oxidativo nos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)

Não foram observadas alterações significantes na concentração de NAD(P)H no homogenato do tórax das abelhas em nenhum dos tratamentos (Tabela 2).

6.5. Oxidação dos grupos tióis de proteína

Os tratamentos com imidacloprido promoveram redução significativa na concentração de grupos tióis (-SH) de proteínas no homogenato de tórax das abelhas em relação ao grupo controle, indicando a oxidação desses grupos. A adição de cafeína nos tratamentos com imidacloprido protegeu os grupos tióis contra a oxidação provocada pelo inseticida (Tabela 2).

6.6. Avaliação da lipoperoxidação

A lipoperoxidação foi avaliada pela medida da concentração de malondialdeído (MDA). Todos os tratamentos apresentaram efeito sobre esse parâmetro, aumentando a concentração de MDA em relação ao grupo controle. Porém, observou-se aumento dose-dependente nos grupos tratados com imidacloprido e quando adicionada aos tratamentos com o inseticida, a cafeína diminui o efeito do mesmo (Tabela 2).

Tabela 2- Concentrações de parâmetros relacionados ao estado oxidativo.

	Controle	Cafeína	Imidacloprido 0,1	Imidacloprido 0,3	Imidacloprido 0,1+Cafeína	Imidacloprido 0,3+Cafeína
GSH (nmol/mg de proteína)	0,12±0,01 a	0,17±0,01ab	0,13±0,03ab	0,13±0,02ab	0,19±0,03ab	0,22±0,01 b
GSSG (nmol/mg de proteína)	0,07±0,00 a	0,08±0,01 a	0,07±0,00 a	0,09±0,01 a	0,09±0,00 a	0,12±0,01 b
GSH/GSSG	1,70±0,10 a	2,21±0,13 a	2,25±0,029 a	1,22±0,18 a	1,83±0,39 a	2,04±0,03 a
NAD(P)H (URF)	11,33±2,31a	10,34±0,23a	9,39±0,87 a	7,78±0,18 a	9,04±1,76 a	5,82±0,39 a
Grupos tióis (-SH) (nmol/mg de proteína)	0,94±0,09bc	1,05±0,09 c	0,50±0,05 a	0,47±0,01 a	0,78±0,04 b	0,69±0,02 ab
MDA (nmol/mg de proteína)	0,04±0,00 a	0,06±0,01 b	0,10±0,00 d	0,14±0,02 f	0,08±0,01 c	0,13±0,00 e

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Teste comparativo de Newman-Keuls. Letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

6.7. Avaliação da sobrevivência média das abelhas

O tratamento das abelhas com as dietas experimentais não interferiu na sobrevivência média das abelhas durante as 72 horas de avaliação, inclusive considerando-se a dieta controle (dados não apresentados).

6.8. Consumo das dietas

O consumo foi maior para as abelhas tratadas com a dieta contendo imidacloprido 0,3 ng/abelha em relação ao grupo controle (Tabela 3). Não houve diferença de consumo entre os grupos de abelhas que receberam as demais dietas.

Tabela 3- Consumo médio das dietas (mg) por abelha.

Controle	14,57±4,41 b
Cafeína	11,98±2,92 b
Imidacloprido 0,1	13,34±5,04 b
Imidacloprido 0,3	32,79± 2,49 a
Imidacloprido 0,1+Cafeína	15,12±3,12 b
Imidacloprido 0,3+Cafeína	19,21±2,71 b

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Teste comparativo de Tukey. Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o efeito do inseticida imidacloprido sobre o sistema antioxidante de abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) e o potencial efeito protetor da cafeína. O imidacloprido aumentou a atividade das enzimas antioxidantes GPx e CAT no tórax das abelhas em ambas as doses testadas indicando uma ação pró-oxidante. Estes efeitos estão de acordo com os descritos por Kapoor et al., 2010, os quais demonstraram um aumento na atividade das enzimas GPx, CAT e superóxido dismutase (SOD) no fígado e cérebro e Kapoor; Srivastava; Srivastava, 2011, que demonstraram aumento na atividade das mesmas enzimas no ovário de ratas submetidas ao tratamento com 20 mg/kg de peso corporal/dia do inseticida durante 90 dias. El-Gendy, 2010 também relataram um aumento na atividade das enzimas antioxidantes GPx, CAT, SOD e glutathione transferase (GST) em camundongos machos 24 horas após o tratamento com uma dose única de imidacloprido (14,976 mg/kg de peso corporal).

A cafeína também promoveu um aumento na atividade das enzimas GPx e CAT. Esses resultados estão de acordo com os descritos por Strachecka et al., 2014, os quais constataram que o uso da cafeína na alimentação das abelhas aumentou a atividade das enzimas antioxidantes: GPx, CAT, SOD e

GST. A adição de cafeína juntamente com o imidacloprido promoveu alteração nos efeitos causados pelo inseticida somente na atividade da GPx, a qual foi aumentada quando a cafeína foi adicionada à dose 0,3 ng/abelha, provavelmente, devido a uma ação sinérgica de ambos os compostos.

A GSH e a NADPH são importantes componentes do sistema antioxidante celular, fornecendo equivalentes redutores para a ação das enzimas GPx e GR, respectivamente (RIBEIRO et al., 2005). O tratamento das abelhas com o imidacloprido não apresentou efeito sobre as concentrações de GSH e GSSG em relação ao grupo controle, diferentemente ao encontrado em outros estudos, os quais relataram diminuição da concentração de GSH em diferentes tecidos animais após tratamentos com o inseticida (El-Gendy, 2010; Kapoor et al., 2010; Kapoor; Srivastava; Srivastava, 2011). A cafeína também não promoveu alterações nas concentrações de GSH e GSSG. Entretanto, houve aumento significativo nas concentrações de GSH e GSSG na dose 0,3 ng imidacloprido/abelha com a inclusão da cafeína. Porém, quando calculada a razão entre as concentrações dessas substâncias (GSH/GSSG) constatou-se que não houve efeito significativo de nenhum dos tratamentos usados no presente estudo. Também não foi observada alteração significativa na concentração de NAD(P)H no homogenato do tórax das abelhas em nenhum dos tratamentos em relação ao grupo controle.

A ação de substâncias oxidantes sobre as proteínas pode levar à oxidação do grupo tiol (-SH) do aminoácido cisteína, causando agregação e fragmentação de aminoácidos levando à desnaturação proteica (ARKEZENOV; MARKESBERY, 2001; LEICHERT; JAKOB, 2004). Esses efeitos podem provocar a redução ou a inativação da atividade de enzimas, e ainda, causar danos em receptores, vias de transdução de sinais e de transporte (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Nas concentrações do grupo tióis (-SH) de proteínas, os grupos contendo imidacloprido promoveram redução significativa em relação ao controle, indicando que houve oxidação desses grupos. Este efeito está de acordo com os resultados obtidos por Sauer et al. (2014) que avaliaram o efeito dos neonicotinóides em fígado de ratos. A adição da cafeína nos tratamentos com imidacloprido protegeu os grupos tióis contra a oxidação, indicando um efeito antioxidante. Foi observada uma elevação dose-dependente na formação de MDA no homogenato de tórax das abelhas

tratadas com o imidacloprido, indicando a ocorrência da peroxidação lipídica. Resultado semelhante foi relatado por El-Gendy, 2010, Kapoor et al., 2010, Kapoor; Srivastava; Srivastava, 2011 e Bal et al., 2012, os quais encontraram aumento na concentração de MDA em diferentes tecidos animais após o tratamento com imidacloprido. A cafeína também induziu a lipoperoxidação, o que está de acordo com o relatado em trabalhos desenvolvidos por Dianzane et al., 1991 que descreveram a oxidação de lipídios de fígado de ratos tratados com cafeína e Gülçín, 2008, que relatou atividade prooxidante da cafeína sobre ácidos graxos em emulsão em experimentos realizados “in vitro”. Quando adicionada às dietas contendo imidacloprido, porém, a cafeína reduziu a formação do MDA, o que indica uma atividade antioxidante da mesma. De fato, vários estudos demonstraram uma redução na concentração de MDA no soro, fígado, coração, cérebro e rim de animais tratados com cafeína (Devasagayam et al., 1996; George et al., 1999; Lee, 2000; Karas; Chakrabarti, 2001; Al Moutaery et al., 2003).

A sobrevida média de abelhas até as 72 horas experimentais, não interferiu negativamente na mortalidade dessas abelhas. Valores da DL_{50} de imidacloprido para as abelhas são de 3,7 ηg e 40,9 $\eta\text{g/abelha}$, respectivamente para via oral e contato (SCHMUCK et al., 2001). Esses dados evidenciam que as doses oferecidas nas dietas não obtiveram mortalidade significativa, pois as abelhas estavam intoxicadas, mas não o suficiente para matar a metade da população.

Kessler et al. (2015) observaram que as abelhas *Apis mellifera* são atraídas por neonicotinóides, aumentando sua exposição a essas substâncias. Essa preferência foi semelhante aos resultados obtidos no consumo médio das dietas, confirmando assim, que as abelhas têm preferência por alimentos intoxicados com neonicotinóides, os quais agem no cérebro das abelhas como uma droga (KESSLER et al., 2015). Nossos resultados indicam que o uso exacerbado de inseticidas pelo homem pode causar um vício eminente nas abelhas, sendo ele prejudicial, já que foi constatada a preferência dessas abelhas a esses alimentos intoxicados com o imidacloprido. Essa exposição pode causar um declínio populacional das abelhas, afetando negativamente a apicultura, ambiente e conseqüentemente a vida humana.

8 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos neste estudo pode-se concluir que o imidacloprido afetou os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no tórax das abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) e que a cafeína atuou como antioxidante, evitando parcialmente os danos causados pelo inseticida.

Abelhas melíferas tem o consumo estimulado quando o alimento é intoxicado com o neonicotinóide imidacloprido, sendo esse um motivo preocupante para o declínio populacional das abelhas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI H, B. H. U. **Catalase in methods of enzymatic analysis**. New York: Academic Press, 1974. p.673-684

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, p. 141-145, 2001.

ALBINA, M. L.; COLOMINA, M. T.; SANCHEZ, D. J.; TORRENTE, M.; DOMINGO, J. Interactions of caffeine and restraint stress during pregnancy in mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, p. 779-785, 2002.

AL MOUTAERY, K.; AL DEEB, S.; AHMAD KHAN, H.; TARIQ, M. Caffeine impairs short-term neurological outcome after concussive head injury in rats. **Neurosurgery**, v. 53, p. 704-711, 2003.

AMARO, P. A toxicidade dos pesticidas para as abelhas em Portugal. **Revista da APH**, v. 99, p. 32-40, 2010.

BALIEIRA, K. V. B.; NICODEMO, D. **Efeito tóxico dos inseticidas Fipronil e Imidacloprido sobre abelhas melíferas (*Apis mellifera* L)**. 2013. 21 f. Monografia (Graduação) - Curso de Zootecnia, Unesp, Dracena, 2013.

BORTOLOTTI, L.; MONTANARI, R.; MARCELINO, J.; MEDRZYCKI, P.; MAINI, S.; PORRINI, C. et al. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. **Bolletín of Insectology**, v. 56, n. 1, p. 63, 2003.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, trocopherol, and ascorbate. **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 300, p. 535-543, 1993.

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (eds.), **Biochemical Toxicology**. Oxford: IRL Press, 1987. p. 217-254.

CATAE, A. F; MALASPINA, O; ROAT, T. C. ALTERAÇÕES NO CÉREBRO E NO VENTRÍCULO DE ABELHAS *Apis mellifera* EXPOSTAS AO IMIDACLOPRIDO. 2016. 21 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2016.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. v.2. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

COSTA-MAIA, F. M.; LINO-LOURENÇO, D. A.; TOLEDO, V. A. A. Aspectos econômicos e sustentáveis da polinização por abelhas. **Sistemas de Produção Agropecuária: (Ciências Agrárias, Animais e Florestais)**, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, v. 2010, n. 1, p. 45-67, 06 nov. 2013.

COUTO, R. H. N; COUTO, L.A. Polinização com abelhas *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 2002, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: CONBRAPI. 2002. p. 251-256.

CHAMBÓ, E.D. GARCIA, R. C.; OLIVEIRA, N. T. E.; DUARTE JÚNIOR, J. B. Aplicação de inseticidas e seus impactos sobre a visitação de abelhas (*Apis mellifera* L.) no girassol (*Helianthus annuus* L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, n. 1, p. 37-42, 2010.

CRANE, E.; WALKER, P. **The impact of pest management on bees and pollination**. London: International bee research association, 1983. p. 129.

CRANE, E.; WALKER, P. **Pollination directory for world crops**. London International Bee Research Association, 1984. 183p.

CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. 1.ed. New York: Routledge, 1999. 682p.

DANDEKAR, S. P.; NADKARNI, G.D.; KULKARNI, V.S.; PUNEKAR, S. Lipid Peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. **Journal of Postgraduate Medicine**. v. 48, n. 3, p. 186-190, 2002.

SOUZA, D. L. As abelhas como agentes polinizadores (The bees agents pollinizer's). 2007. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030307/030710.pdf>>. Acesso em: 05 nov. 2016.

D'AMICIS, A.; VIANI, R. The consumption of coffee. In: GARATTINI, S. (ed.), *Coffee: caffeine and health*. New York: **Raven Press**, 1993. p. 1-16.

DECOURTYE, A.; LACASSIE, E.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Learning performances of honey bees are differentially affected by imidacloprid according to the season. **Pest Management Science**, v. 59, n. 3, p. 269-278, 2003.

DEVASAGAYAM, T.P.A.; KAMAT, J.P.; MOHAN, H.; KESAVAN, P.C. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1282, p. 63-70, 1996.

EL-GENDY, K. S.; ALY, N.M.; MAHMOUD, F.H.; KENAWY, A.; EL-SEBAE, A.K. The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 215-221, 2010.

FAUCON, J. P.; AURIÈRES, C.; DRAJNUDEL, P.; MATHIEU, L.; RIBIÈRE, M.; MARTEL, A. C.; ZEGGANE, S.; CHAUZAT, M. P.; AUBERT, M. F. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **Pest Management Science**, v. 61, n. 2, p. 111-125, 2005.

FAO - Food and Agriculture Organization. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture – the international response. In: FREITAS, B. M.; PORTELA, J. O. B. (Ed.). **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2004. p. 285.

FLOHÉ L, G. W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FREE, J. B. Insect pollination of crops. London: **Academic Press Inc.**, 1970. p.544.

GALLO, M.A. History and scope of toxicology. In: Klaassen, C. D. & Watkins, J.B (Eds.). **Essentials of toxicology**. Nova York, McGraw-Hill. p 3-4, 2003

GALLAI, N; SALLES, J SETTELE, J; VAISSIÈRE, B. Economic evaluation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, v. 68, n. 3, p. 810-821, 2008.

GEORGE KC, HEBBAR SA, KALE SP, KESAVAN PC. Caffeine protects mice against whole-body lethal dose of γ -irradiation. **Journal of Radiological Protection**, v. 19, p. 171-176, 1999.

GILL J. R; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N. E. **Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony- level traits in bees**. [S.l.: s.n.],2012.

GUIMARÃES, M. Colmeias às moscas: síndrome misteriosa causa sumiço de abelhas na América e na Europa. **Revista Pesquisa Fapesp**, v. 137, p. 51, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. p. 704.

HIGES, M; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R; GARRIDO-BAILÓN, E; GONZÁLEZPORTO, A, V.; GARCÍA-PALENCIA, P; MEANA, A, DEL NOZAL, M J.; MAYO, R.; BERNAL, J, L. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, p. 110-113, 2009.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 74, p. 214-226, 1976.

HOSKINS, D.D.; CHEHLDELIN, V. H.; NEWBURGH, R. W. Oxidative enzyme systems of the honey bee, *Apis mellifera* L. **Journal of General Physiology**, v. 39, p. 705-713, 1956.

HUNT, G. J. **Protecting honey bees from pesticides**. West Lafayette: Purdue University Cooperative Extension Service. 2000. p. 8.

IBGE (Org.). **Indicadores de desenvolvimento sustentável: uso de agrotóxicos**. 10. ed. Rio Claro: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2015.

ISHAY, J. S.; PANIRY, V. A. Effects of caffeine and various xanthines on hornets and bees. **Psychopharmacology**, v. 65, n. 3, p. 299-309, 1979.

JOHNSO R. M, ELIS M. D, MULLIN C. A, FRAIZIER M. Pesticides and honey bee toxicity-USA. **Apidologie**, v. 41, p. 312-331, 2010.

KAPOOR, U.; SRIVASTAVA, M.K.; BHARDWAJ, S.; SRIVASTAVA, L.P. Effect of Imidacloprid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in female rats to derive its No Observed Effect Level (NOEL). **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 35, n. 4, p.577-581, 2010. doi: 10.2131/jts.35.577.

KAPOOR, U.; SRIVASTAVA, M. K.; SRIVASTAVA, L. P. (Org.). Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. **Food And Chemical Toxicology**, v. 49, p.3086-3089, 12 dez. 2011.

KARAS M, CHAKRABARTI SK. Influence of caffeine on allyl alcohol inducedhepatotoxicity in rats. In vivo study. **Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology** v. 20, p. 141-54, 2001.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; SILVA, A. C.; ASSIS, M. G. P. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégicas**, Brasília, DF, n. 12, p. 20-41, 2001.

KESSLER, S. C.; TIEDEKEN, ERIN JO; SIMCOCK, KERRY L.; DERVEAU, SOPHIE. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. **Nature**, v. 521, n. 7550, p. 74-76, 2015. doi:10.1038/nature14414.

KRISKO, A.; KVEDER, M.; PIFAT, G. Effect of caffeine on oxidation susceptibility of human plasma low density lipoproteins, **Clinica Chimica Acta**, v. 355, p. 4753, 2005.

LEE, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. **Clinica Chimica Acta**, v. 295, p. 141-154, 2000.

LEICHERT, L. I.; JAKOB, U. Protein thiol modifications visualized in vivo. **Plos Biology**, v. 2, n. 11, e333, 2004. doi: 10.1371/journal.pbio.0020333.

MALASPINA, O. **Estudo genético da resistência ao DDT e relação com outros caracteres em *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae)**. 1979. 81 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Invertebrados) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 1979.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 23, p. 303-309, 2006.

MALASPINA, O.; SOUZA, T. F.; ZACARIN, E. C. M. S.; CRUZ, A. S.; JESUS, D. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 8., 2008. Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: [s.n.], 2008. p. 41-48.

MALASPINA, O.; STORT, A. C. As abelhas e os pesticidas. **Apicultura no Brasil**, v. 2, n. 10, p. 42-45, 1985.

MANDEL, H. G. Update on caffeine consumption, disposition and action. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 1231-1234, 2002.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v.52, p. 711-60, 1983.

MEDRZYCHI, P.; MONTANARI, R.; BORTOLOTTI, L.; SABATINI, A.G.; MAINI, S.; PORRINI, C. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour: laboratory test. **Bulletin of Insectology**, v. 56, n. 1, p. 59-62, 2003.

MORAES, S. S; BAUTISTA, A. R. L; VIANA, B. F. Avaliação da Toxicidade Aguda (DL50 e CL50) de Inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): via de contato. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 31-37, 2000.

MCGREGOR, S. E. Insect pollination of cultivated crop plants. Agricultural Reserch service. **Agriculture Hand book**, v. 496, p. 357-361, 1976.

NEHLING, A.; DEBRY, G. Potential teratogenic and neurodevelopmental consequences of coffee and caffeine exposure: a review on human and animal data. **Neurotoxicology and Teratology**, New Jersey, v. 16, p. 531-543, 1994.

NICODEMO, D.; MAIOLI, M. A.; MEDEIROS, H. C.; GUELFY, M.; BALIEIRA, K. V.; DE JONG, D.; MINGATTO, F. E. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 9, p.2070-2075, 2014. doi: 10.1002/etc.2655

ONG, C. N.; SHAN, A. M.; CHIA, S. E. Biomarkers for male reproductive health hazards: Are they available? **Toxicology Letters**, v. 134, p. 17-30, 2002.

OWEN, J. B.; BUTTERFIELD, D. A. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. **Methods in Molecular Biology**. v. 648, p. 269-277, 2010.

PASCHOAL, A. D. **Pragas, praguicidas e a crise ambiental: problemas e soluções**. [S.l.]: Fundação Getulio Vargas, 1979. p.106.

PINHEIRO, J. N.; FREITAS, B. M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, v. 14, p. 266-281, 2010.

PHAM-DELÈGUE, M. H.; DECOURTYE, A.; KAISER, L.; DEVILLERS, J. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. **Apidologie**, v. 33, p. 425-432, 2002.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELUZIO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L.P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROCHA, M. C. .L.; ALENCAR, S.. Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: Proposta metodológica de acompanhamento. Brasília: **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**, 2012.

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

SAUER, E.; MORO, A. M.; BRUCKER, N.; NASCIMENTO, S.; GAUER, B.; FRACASSO, R. Liver δ -aminolevulinate dehydratase activity is inhibited by neonicotinoids and restored by antioxidant agents. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 11, n. 11, p. 11676-11690, 2014. doi: 10.3390/ijerph111111676

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R; ALMEIDA, E. A. B. **Origem, filogenia e biogeografia: abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: [s.n.]. 2002. p. 29–41.

SCHMUCK, R.; SCHONING, R.; STORK, A.; SCHRAMEL, O. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera*) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. **Pest Management Science**, v. 57, p. 225-238, 2001.

SHI, X.; DALAL, N. S.; JAIN, A. C. Antioxidant behaviour of caffeine: Efficient scavenging of hydroxyl radicals. **Food And Chemical Toxicology**, v. 29, n. 1, p.1-6, 1991. doi: 10.1016/0278-6915(91)90056-d.

STRACHECKA, A.; KRAUZE, M.; OLSZEWSKI, K.; BORSUK, G.; PALEOLOG, J.; MERSKA, M.; CHOBOTOW, J.; BAJDA, M.; GRZYWNOWICZ, K. Unexpectedly strong effect of caffeine on the vitality of western honeybees (*Apis mellifera*). **Biochemistry (Mosc)**, v. 79, n. 11, p. 1192-1201, 2014.

THOMPSON, H.M. Assessing the exposure and toxicity of pesticides to bumble bees (*Bombus* sp.). **Apidologie**, v. 32, p. 305-321, 2001.

THOMPSON, H. M. Behavioural effects of pesticides in bees: their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 12, p. 317-330, 2003.

THOMPSON, H. M. Behavioral effects of pesticides in bees: their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 12, p. 317-333, 2002.

VAN DER STEEN, J. J. M. Review of the methods to determine the hazard and toxicity of pesticides to bumble bees. **Apidologie**, v. 32, p. 399-406, 2001.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: the influence of processing conditions and raw material. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 863-868, 2011. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.07.008

WINFREE, R.; N.M. WILLIAMS; J. DUSHOFF; C. KREMEN. Native bees provide insurance against ongoing honey bee losses. **Ecology Letters**, v. 10, p. 1105-1113, 2007.

WOUNG, W. Y.; THOMAS, C. M.; MERKUS, J. M.; ZIELHUIS, G.A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 3, p. 435-442, 2000.

ZITKA, O.; SKALICKOVA, S.; GUMULEC, J.; MASARIK, M.; ADAM, V.; HUBALEK, J.; TRNKOVA, L.; KRUSEOVA, J.; ECKSCHLAGER, T.; KIZEK, R. Redox status expressed as GSH: GSSG ratio as a marker for oxidative stress in pediatric tumor patients. **Oncology Letters**, v. 4, p. 1247-1253, 2012.