

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CÂMPUS DE DRACENA

João Pedro da Silva Fidelis

Químico

**Alterações na bioenergética de mitocôndrias isoladas do
tórax de abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) expostas ao
clomazona**

Dracena

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CÂMPUS DE DRACENA

João Pedro da Silva Fidelis

**Alterações na bioenergética de mitocôndrias isoladas do
tórax de abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) expostas ao
clomazona**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Tecnológicas –
Unesp, Campus de Dracena como parte
das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Dracena

2022

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

F451a

Fidelis, João Pedro da Silva.

Alterações na bioenergética de mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) expostas ao clomazona / João Pedro da Silva Fidelis. -- Dracena: [s.n.], 2022.

50 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2022.

Orientador: Fábio Erminio Mingatto

1. Herbicida. 2. Polinizadores. 3. Bioenergética. 4. Adenosina trifosfato. I. Título.

Bibliotecário Fábio Sampaio Rosas
CRB 8/6665

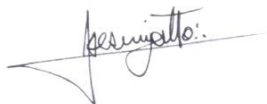
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Alterações na bioenergética de mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) expostas ao clomazona

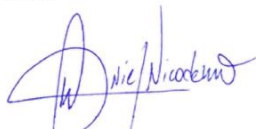
AUTOR: JOÃO PEDRO DA SILVA FIDELIS

ORIENTADOR: FÁBIO ERMINIO MINGATTO

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



Prof. Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Unesp - Câmpus de Dracena/SP



Prof. Dr. DANIEL NICODEMO (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - UNESP - Câmpus de Dracena/SP



Prof. Dr. MARCOS ANTONIO MAIOLI (Participação Virtual)
Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais / Universidade Federal de São Paulo - Unifesp/SP

Dracena, 29 de junho de 2022

Dados curriculares do autor

João Pedro da Silva Fidelis, nascido em 8 de julho de 1994, na cidade de Irapuru/SP - Brasil, filho de Sueli Alves da Silva e Aparecido Pedro Marques Fidelis. Em fevereiro de 2020, concluiu a graduação em Química pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp de Presidente Prudente. Em março de 2020, 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. Dr. Fábio Erminio Mingatto.

DEDICO:

A minha mãe, SUELI ALVES DA SILVA e minhas irmãs, grandes
incentivadoras e exemplos de vida a serem seguidos.

Agradecimentos

Agradeço primeiro a Deus por ter me mantido na trilha certa durante este projeto de pesquisa com saúde e forças para chegar até o final.

Sou grato à minha família pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida.

Deixo um agradecimento especial ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Ermínio Mingatto pelo incentivo e pela dedicação do seu escasso tempo ao meu projeto de pesquisa.

De forma igual agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Daniel Nicodemo, ao qual sem sua colaboração este trabalho não seria possível.

Agradeço a minha amiga Camila que me conduziu com sua vasta experiência desde o início deste projeto de pesquisa.

Também agradeço a meus amigos Edison Rocha, Gustavo Masson e Luis Fernando que sempre me motivaram e influenciaram a me manter firme no meu projeto.

Também quero agradecer à FCAT - Dracena e a todos os professores do meu curso pela elevada qualidade do ensino oferecido, mesmo frente a todas as dificuldades enfrentadas durante estes últimos dois anos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido”.

(Marie Curie)

“Entusiasmo é a inspiração de qualquer coisa importante. Sem ele, nenhum homem deve ser temido; e com ele, nenhum homem deve ser desprezado”.

(Christian Nevell Bovee)

“O conhecimento, como o ar, é vital para a vida. Como o ar, a ninguém deve ser negado”.

(Alan Moore)

Resumo

Os principais agentes polinizadores dos vegetais são as abelhas, a polinização é responsável pela produção de muitas culturas agrícolas ao redor do mundo. A mortalidade de abelhas vem preocupando apicultores e pesquisadores, pois várias espécies vegetais são dependentes destes agentes polinizadores. A utilização excessiva de praguicidas nas lavouras tem ocasionado aumento da mortalidade de animais, contaminação dos solos, águas e alimentos, atingindo o equilíbrio da biodiversidade e saúde da população de forma negativa, além de ser apontado como um dos causadores de morte das abelhas. Apesar de ser bastante efetivo, o herbicida clomazona provoca ampla contaminação ambiental devido à sua elevada solubilidade em água (1100 mg.L^{-1}), além da meia-vida média de 28 a 84 dias, podendo seus resíduos permanecer por até 130 dias no ambiente. As mitocôndrias são responsáveis pela produção da maior parte de ATP nas células, e nas abelhas, o tórax, por ser onde se localizam as asas, é o local com maior produção de ATP. O objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos do herbicida clomazona em abelhas melíferas (*Apis mellifera*). Todos os testes foram realizados *in vitro* com as mitocôndrias isoladas do tórax das abelhas. A fração mitocondrial foi isolada por centrifugação diferencial e as concentrações de clomazona utilizadas foram de 100, 125, 150 e 200 μM . Os efeitos do herbicida nas mitocôndrias foram avaliados pela determinação do consumo de oxigênio mitocondrial, níveis de ATP mitocondriais e geração de espécies reativas de oxigênio (ERRO). Quando energizadas com malato + glutamato (substratos do complexo I da cadeia de transporte de elétrons) a clomazona não apresentou resultados significantes em nenhuma das concentrações utilizadas, porém, quando energizadas com succinato (substrato do complexo II da cadeia de transporte de elétrons) foi observado um estímulo na respiração mitocondrial de forma dose-dependente. Os níveis mitocondriais de ATP foram reduzidos significativamente de maneira dose-dependente a partir de 125 μM de clomazona. A clomazona não induziu a geração de ERRO de maneira significativa em nenhuma das concentrações estudadas. Assim, os resultados desse estudo indicam que a toxicidade da clomazona em abelhas pode estar relacionada às alterações na bioenergética mitocondrial.

Palavras-chave: Herbicida. Polinizadores. Bioenergética. Adenosina trifosfato.

Abstract

The main pollinating agents of plants are bees, and pollination is responsible for the production of many agricultural crops around the world. The mortality of bees has been worrying beekeepers and researchers, because several plant species are dependent on these pollinating agents. The excessive use of pesticides in crops has caused an increase in animal mortality, soil, water, and food contamination, affecting the biodiversity balance and the health of the population in a negative way, besides being pointed out as one of the causes of bee death. Despite being very effective, the clomazone herbicide causes wide environmental contamination due to its high solubility in water (1100 mg.L⁻¹), besides an average half-life of 28 to 84 days, and its residues can remain for up to 130 days in the environment. Mitochondria are responsible for the production of most ATP in cells, and in bees, the thorax, because it is where the wings are located, is the site with the highest production of ATP. The objective of this work was to evaluate the possible toxic effects of the herbicide clomazone on honey bees (*Apis mellifera*). All tests were performed in vitro with the isolated mitochondria or the thorax homogenate of the bees, the mitochondrial fraction was isolated by differential centrifugation and the concentrations of clomazone used were 100, 125, 150 and 200 µM. The effects of the herbicide on mitochondria were evaluated by determining mitochondrial oxygen consumption, mitochondrial ATP levels, and reactive oxygen species (ROS) generation. When energized with malate + glutamate (substrates of complex I of the electron transport chain) clomazone did not show significant results in any of the concentrations used, but when energized with succinate (substrate of complex II of the electron transport chain) a dose-dependent stimulation in mitochondrial respiration was observed. The mitochondrial ATP levels were significantly reduced in a dose-dependent manner starting at 125 µM clomazone. The determination of ROS generation did not show significant results at any of the concentrations studied. Thus, the results of this study indicate that the toxicity of clomazone in bees may be related to alterations in mitochondrial bioenergetics.

Key words: Herbicides. Pollenizers. Bioenergetics. Adenosine triphosphate

Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura do herbicida clomazona.....	18
Figura 2 - Mitocôndria.....	20
Figura 3 - Esquema estrutural da mitocôndria.....	21
Figura 4 - Modelo da hipótese quimiosmótica.....	23
Figura 5 - NADH: Ubiquinona oxidoredutase (complexo I).....	25
Figura 6 - Succinato-Q redutase (complexo II).....	26
Figura 7 - Ubiquinona – citocromo <i>c</i> oxidoredutase ou citocromo <i>b-c₁</i> (complexo III)	27
Figura 8 - Ciclo coenzima Q (complexo III).....	28
Figura 9 - Citocromo oxidase (complexo IV).....	29
Figura 10 - ATP sintase.....	31
Figura 11 - Efeito da clomazona no consumo de oxigênio da respiração em mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas, energizadas com Succinato 5 mM + Rotenona 2 mM.....	38
Figura 12 - Gráfico representativo do experimento de respiração celular empregando KCN, para confirmar o efeito desacoplador da clomazona.....	39
Figura 13 - Efeito da clomazona na concentração de ATP em mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas, energizadas com Succinato 5 mM + Rotenona 2 mM.....	40
Figura 14 - Efeito do herbicida clomazona sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).....	41
Figura 15 - Gráfico representativo do experimento de produção de ERO.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 HIPÓTESE.....	16
3 OBJETIVO.....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivo Específico	17
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
4.1 Agrotóxicos.....	17
4.2 CLOMAZONA	18
4.3 Mitocôndrias	19
4.3.1 Estrutura	19
4.3.2 Energética Celular.....	22
4.3.3 Complexo I.....	24
4.3.4 Complexo II.....	25
4.3.5 Complexo III.....	26
4.3.6 Complexo IV.....	29
4.3.7 ATP Sintase	30
4.4 Desacopladores da Fosforilação Oxidativa.....	31
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1 Preparações	32
5.1.1 Animais	32
5.1.2 Reagentes	32
5.1.3 Tratamentos.....	33
5.2 Isolamento das Mitocôndrias do Tórax das Abelhas	33
5.2.1 Princípio do Método:.....	33
5.3 Dosagem de Proteína	34

5.3.1 Princípio do Método:.....	34
5.4 Ensaaios com as Mitocôndrias Isoladas.....	34
5.4.1 Respiração Mitocondrial	34
5.4.1.1 Princípio do Método:.....	35
5.4.2 Síntese de ATP.....	36
5.4.2.1 Princípio do Método:.....	36
5.4.3 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	37
5.4.3.1 Princípio do Método.....	37
5.5 Análise Estatística	37
6 RESULTADOS	38
6.1 Respiração Mitocondrial.....	38
6.2 Síntese de ATP	39
6.3 Efeito da Clomazona na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	41
7 DISCUSSÃO	42
8 CONCLUSÃO.....	44
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

Os principais agentes polinizadores dos vegetais são as abelhas, a polinização é responsável pela produção de muitas culturas agrícolas ao redor do mundo, nesse processo o grão de pólen é transportado para o estigma da flor, ou com a transferência dos grãos de pólen da antera de uma flor para o estigma de outra flor da mesma espécie ou espécie diferente. Em troca esses vegetais e flores produzem substâncias adocicadas que atraem as abelhas. A principal fonte de proteína das abelhas é o pólen, sendo ela de muita importância para o desenvolvimento da colmeia (SOUZA; RODRIGUES; PINTO, 2007)

O Brasil figura como líder mundial na produção agrícola, sendo que muitas de suas safras são dependentes do serviço de polinização das abelhas. Alguns estudos apontam que o valor econômico das safras beneficiadas pela polinização é de aproximadamente US \$12 – 14 bilhões (GIANNINI *et. al* 2015; NOVAIS *et. al.*, 2016; SANTOS; OTESBELGUE; BLOCHTEIN, 2018).

A polinização das culturas pode ser benéfica tanto para os apicultores com o aluguel de colmeias, aumentando sua renda, quanto para os produtores, uma vez que a polinização contribui para o aumento das receitas das safras brasileiras, pois tanto a quantidade quanto a qualidade dos frutos e sementes aumentam quando a polinização é realizada por abelhas, o que aumenta seu valor de mercado (WOODCOCK, 2012; CALDERONE 2012; KLATT *et al.*, 2014; SANTOS; OTESBELGUE; BLOCHTEIN, 2018).

Segundo Gallai *et al.* (2008), é evidente a importância das abelhas para manter a sustentabilidade da agricultura no país, pois um terço dos alimentos provém da polinização promovida por estes insetos.

A perda de até 20% dos enxames de abelhas é considerada aceitável pelos apicultores, porém desde 2006, apicultores europeus tiveram até 80% de suas colmeias dizimadas de forma nunca vista antes, pois as operárias que saíam em busca de alimento não retornavam às colmeias de origem ocasionando morte da colônia por fome e falta de cuidado com a cria. Esse

problema passou a ser conhecido como distúrbio do colapso das colônias (GUIMARÃES, 2007).

Malaspina *et al.*, (2008) relataram episódios no Brasil com perda de 400 colmeias, mas na maioria dos casos, não foram coletadas amostras para análise e comprovação da contaminação. Outros relatos sobre a mortalidade súbita de abelhas têm sido feitos por apicultores de diversas regiões do país, como Piauí, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo.

Dentre as prováveis causas para o desaparecimento das abelhas estão: estresse das colônias; baixa variabilidade genética das rainhas; uso de produtos químicos no controle de pragas nas colônias; toxinas presentes no meio ambiente; ácaro *Varroa destructor* e patógenos associados; pragas e patógenos recém-descobertos ou aumento de virulência de patógenos existentes e interações entre duas ou mais das hipóteses (COSTA-MAIA; LINO-LOURENÇO; TOLEDO, 2010).

Os benefícios da polinização podem ser diminuídos quando se utiliza agrotóxicos, pois, há morte de abelhas e declínio populacional das colmeias que se encontram nas áreas em que estes produtos são aplicados, trazendo prejuízos para o apicultor e o agricultor. O envenenamento pode ser por contato, ingestão durante as visitas às flores e, durante eventual fumigação. A ação dos praguicidas que ocorre com maior frequência nas abelhas se dá no sistema nervoso, com paralisia das pernas, asas e trato digestivo. Sendo assim, o inseto não bebe água nem se alimenta, morrendo de fome ou por dessecação (CRANE; WALKER, 1983, MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006).

O uso excessivo de praguicidas nos agroecossistemas pode acarretar um desequilíbrio da população de abelhas que visita, esses locais, além dos perigos aos seres humanos quanto a saúde pública e alimentar (MALASPINA; SOUZA, 2008).

A utilização de praguicidas tem ocasionado casos de intoxicação de operadores de máquinas, aumento da mortalidade de animais, contaminação dos solos, águas e alimentos, atingindo o equilíbrio da biodiversidade e saúde da população de forma negativa. As abelhas que coletam néctar das flores de plantas pulverizadas com praguicidas podem ter o mel de suas colmeias

contaminado, provocando inclusive distúrbios metabólicos ao ser humano que ingere esse mel (ONAT *et al.*, 1991; LANÇAS *et al.*, 1997).

O estudo da toxicidade dos praguicidas ocorre principalmente com a espécie *Apis mellífera*, visto sua relevância nos serviços de polinização comercial de inúmeras culturas (FREE, 1970; MCGREGOR, 1976; CRANE; WALKER, 1984) além da importância social e econômica da apicultura (WILLIAMS, 1994; PHAM-DELEÈGUE *et al.*, 2002).

Muitos praguicidas, mesmo em baixas concentrações, podem ser extremamente tóxicos para as abelhas (THOMPSON 2001; 2002; VAN DER STEEN, 2001a; GALLO, 2003; RORTAIS *et al.*, 2005). Quando as abelhas são expostas por contato ou através de alimento, estes podem desencadear efeitos subletais, tais como: a interferência na capacidade cognitiva na habilidade de orientação, e no comportamento das abelhas (PHAN-DELEÈGUE *et al.*, 2002; RORTAIS *et al.*, 2005).

A mitocôndria, importante organela celular, absorve algumas substâncias, como oxigênio e piruvato, e as converte em energia na forma de adenosina 5'-trifosfato (ATP) para uso pela célula. As mitocôndrias estão presentes em maior número nas células do sistema nervoso, do coração e, em particular nas abelhas, do tórax, porque existe uma grande demanda de energia nessas partes do corpo (LANDIM, 2009).

Para Nicodemo e colaboradores, 2014, além dos efeitos letais e subletais, causados pelos usos de praguicidas, estes também podem comprometer o processo de produção de energia, que é essencial para a manutenção da colmeia.

2 HIPÓTESE

O herbicida clomazona é tóxico para abelhas tendo como alvo as mitocôndrias, responsáveis pela produção de energia nas células através da cadeia de transporte de elétrons, causando efeitos de inibição e/ou desacoplamento, provocando também estresse oxidativo nas mitocôndrias.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Determinar se o herbicida clomazona é capaz de causar alterações nas mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas *Apis Mellifera* e consequentemente na cadeia de transporte de elétrons.

3.2 Objetivo Específico

Elucidar o mecanismo de ação da clomazona na cadeia respiratória, através de testes bioquímicos, e através destes determinar qual a menor concentração do herbicida capaz de gerar efeitos nocivos consideráveis.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Agrotóxicos

Segundo O INCA (2021), entende-se como agrotóxicos as substâncias que são utilizadas para combater organismos indesejados como: insetos, larvas, fungos, carrapatos e para controle do crescimento de vegetação, entre outras funções.

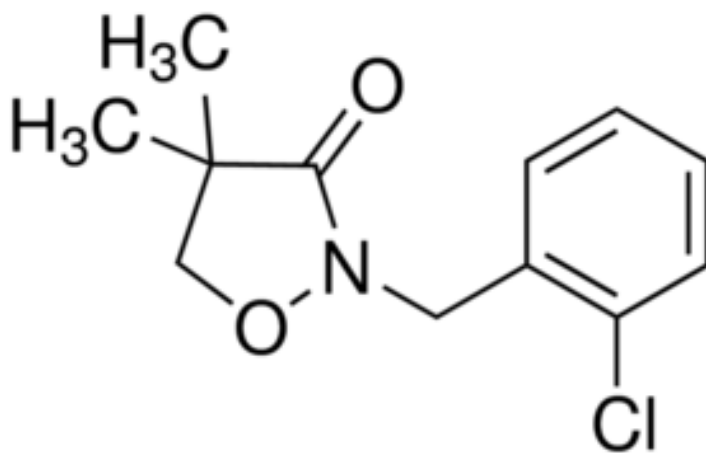
Os herbicidas são classificados como substâncias químicas ou agentes biológicos capazes de matar ou conter o desenvolvimento de espécies específicas. As substâncias químicas dividem-se em duas classes, a orgânica, que compreende a maioria dos herbicidas atualmente utilizados e os inorgânicos, mais utilizados no passado, como por exemplo, o H_2SO_4 (ROMAN 2007).

Na agricultura os herbicidas correspondem a aproximadamente 50% do uso de agrotóxicos, desta forma esta classe dos praguicidas é a mais representativa no mundo. A maior parte deles apresenta alta toxicidade ao ser humano, além de baixa taxa de degradação, com consequente persistência no solo, podendo atingir os lagos e águas subterrâneas (HERTWIG *et al.*, 1983; FERRACINI *et al.*, 2005; ARMAS *et al.*, 2007).

4.2 CLOMAZONA

O herbicida Clomazona (2-(2-clorofenil)metil-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona), representante da classe isoxazolidinona como ilustra a Figura 1, foi desenvolvido no início de 1980 para o controle de gramíneas anuais e ervas daninhas de folha larga em uma ampla variedade de culturas e localizações (GUNASEKARA *et al.*, 2009).

Figura 1: Estrutura do herbicida clomazona



Fonte: Merck, [200-?].

É considerado um pré-herbicida, uma vez que precisa ser ativado durante sua metabolização na planta em que foi aplicado, a qual transforma a molécula para a forma cinco-keto-clomazone, que é o metabolito com atividade herbicida (TENBROOK *et al.*, 2006). É seletivo, utilizado em pré ou pós-emergência inicial no controle de várias espécies daninhas (ANDRES; MACHADO, 2004) é utilizado em culturas como a arroz, soja, mandioca, cana-de-açúcar e algodão. No Brasil já foi comercializado com os nomes de Gamit StarR e Gamit 500 ECR, ambos formulados como concentrado emulsionável, na concentração de 800 e 500g de ingrediente ativo de clomazona por litro, respectivamente. Atualmente é comercializado com o nome de Gamit 360 CSR. (FERHATOGLU *et al.*, 2006).

Pertence ao grupo das isoxazolidinonas, é absorvido pelas raízes movendo-se pelo xilema até as folhas das plantas (RODRIGUES; ALMEIDA; 2005). Os herbicidas deste grupo atuam inibindo a síntese de carotenoides, sendo o caroteno um pigmento das plantas responsável, além de outras funções, pela proteção da clorofila da foto oxidação, como consequência, as plantas suscetíveis apresentam o albinismo com sintoma. (CRHISTOFFOLETI *et al.*, 2004).

Apesar de ser bastante efetivo, o clomazona provoca ampla contaminação ambiental devido sua elevada solubilidade em água (1100 mg. L⁻¹), além da meia-vida média de 28 a 84 dias, seus resíduos podem permanecer por até 130 dias no ambiente (COLBY *et al.*, 1989; ZANELLA *et al.*, 2002).

Zanella *et al.* (2002) relatam que os resíduos de clomazona podem ser detectados em até 90% dos cursos de água perto de regiões de cultivo de arroz. Portanto esse herbicida pode chegar a rios, lagos e nascentes de água através do vazamento constante de água a partir destas culturas durante o período de plantio e colheita ou pela lixiviação em períodos chuvosos, atingindo assim outros organismos. (VAN DER OST *et al.*, 2003).

Estudos realizados por Hakme *et al.*, (2017), analisaram 22 amostras de pólen por cromatografia gasosa (GC), coletadas de colmeias onde as abelhas apresentavam sintomas suspeitos de envenenamento, das amostras analisadas 5% continham clomazona a uma concentração de 20 µg kg⁻¹.

4.3 Mitocôndrias

4.3.1 Estrutura

As mitocôndrias não têm tamanho fixo, mas geralmente em hepatócitos e fibroblastos são descritas como estruturas cilíndricas e alongadas, com dimensões de 3 a 4 µm de comprimento e aproximadamente 1 µm de diâmetro (SCHEFFLER, 2008). São organelas que na maior parte das células animais dominam o cenário intracelular em número total por célula, mais do que

qualquer outra organela, além de conter seu próprio DNA e RNA estão diretamente ligadas à regulação de várias funções celulares dependentes de energia, como o metabolismo intermediário, regulação iônica, motilidade e proliferação celular (PEDERSEN, 1999). Assim, as mitocôndrias que têm modificações no DNA podem induzir doenças com herança materna que durante diferentes fases da vida se desenvolvem e prevalecem nos tecidos que mais precisam de energia: os músculos e o sistema nervoso (VERCESI, 2003).

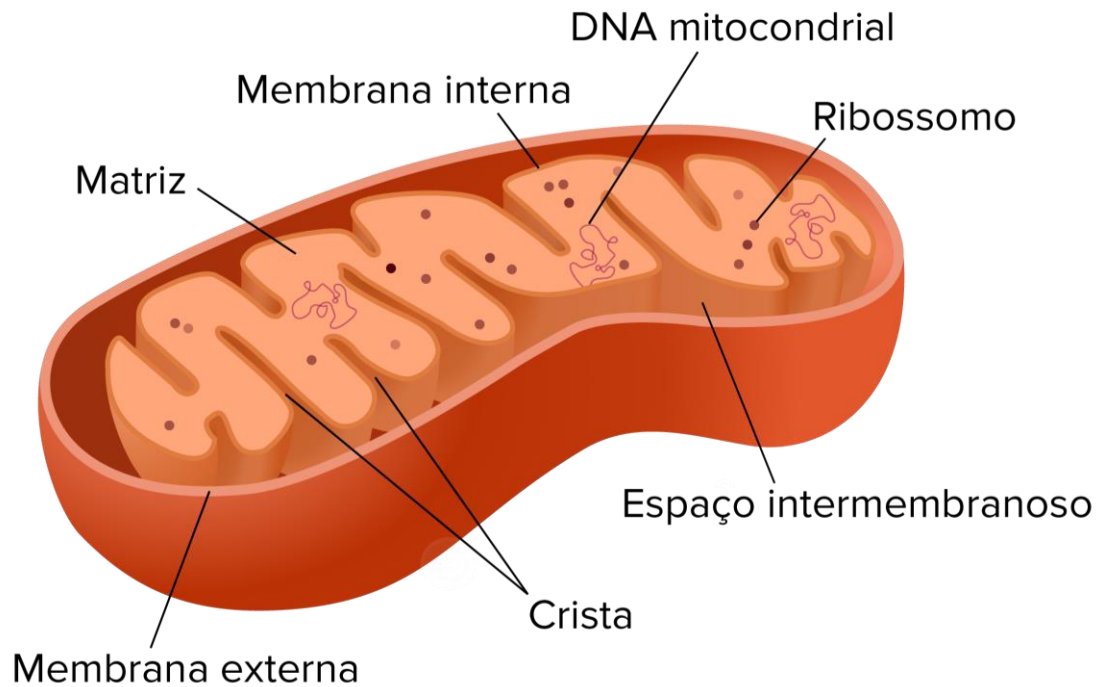
Figura 2- Mitocôndria.



Fonte: Zimmermann; Arnim; McLaughlin, (2015)

Frey e Manella, (2000) relatam que Palade em 1952 e Sjöstrand em 1956 foram os pioneiros a descrever a organização interna da mitocôndria (Figura 3), composta por um sistema duplo de membranas, as quais definem três classes de compartimentos: as membranas externa e interna, o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial.

Figura 3 - Esquema estrutural da mitocôndria.



Fonte: Adaptada de Mitocôndrias e Cloroplastos, [200-?]

Devido aos atuais avanços na microscopia eletrônica, conseguiu-se desvendar mais detalhadamente a estrutura das mitocôndrias, e embora possam apresentar variabilidade morfológica, é possível definir uma morfologia básica.

A membrana mitocondrial externa é a interface entre a organela e o citosol e permeável à maior parte dos íons e moléculas pequenas ($PM < 1500$ Da), mas com menor superfície e contém a maior porcentagem de proteínas associadas (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina), ricas em colesterol, denominadas porinas, que formam poros na membrana e promovem a comunicação entre as mitocôndrias e a rede metabólica celular (DAUM, 1985; LESNEFSKY *et al.*, 2001). Já a membrana mitocondrial interna é impermeável a quase todos os íons e moléculas polares, incluindo o hidrogênio e contém a porcentagem mais elevada de proteínas (fosfatidilcolina,

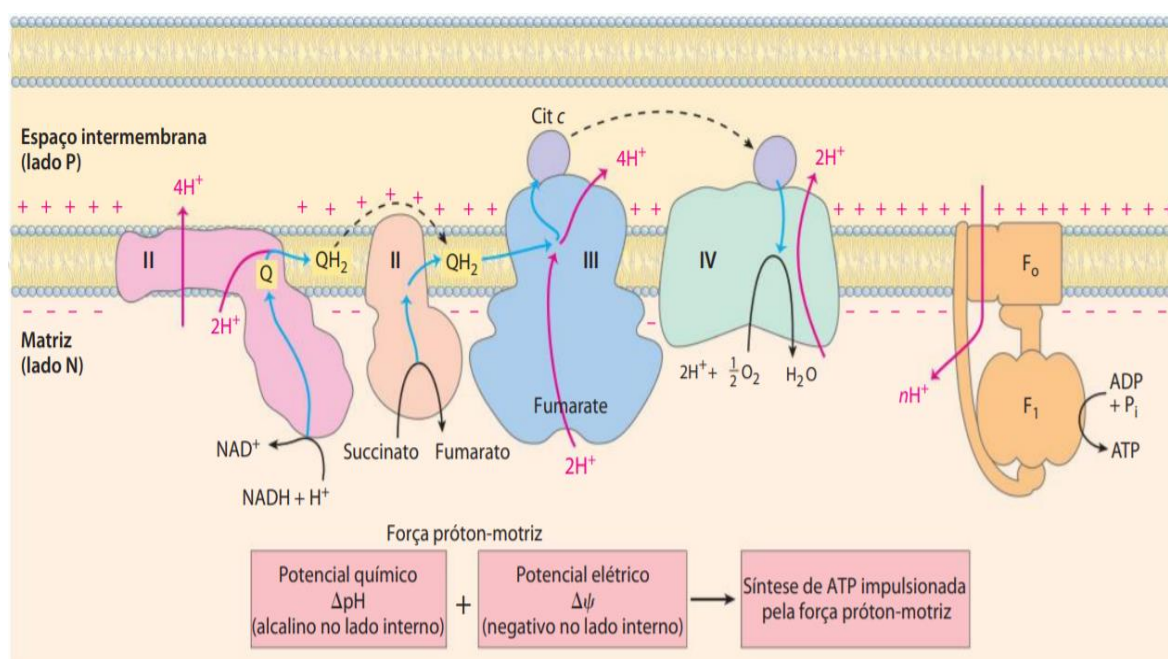
fosfatidiletanolamina e cardiolipina) (DAUM, 1985; NICHOLLS, 1982), que tem a função de mediar e regular o transporte de metabólitos selecionados garantindo a integridade morfológica e funcional das mitocôndrias, segundo Frey e Mannella (2000). Nessa membrana se encontra o sistema transportador de elétrons (cadeia respiratória), o sistema de fosforilação (ATP sintase) e os transportadores dos intermediários das vias metabólicas que incluem enzimas intra-mitocondriais. A matriz mitocondrial contém enzimas, principalmente as pertencentes ao ciclo de Krebs, da β -oxidação de ácidos graxos e o DNA mitocondrial. Apesar de pequeno, mas de suma importância fisiológica o espaço intermembranar possui proteínas com funções importantes dentro do metabolismo energético como o citocromo c (envolvido no transporte de elétrons e no apoptose), creatina-quinase e adenilato-quinase (FREY; MANNELLA, 2000). E é neste espaço que o gradiente eletroquímico (elemento fundamental) é utilizado em sistemas biológicos para produzir energia, ocorrendo tanto em mitocôndrias na fosforilação oxidativa quanto em cloroplastos na síntese fotossintética de ATP, em seres eucariontes e procariontes, respectivamente.

4.3.2 Energética Celular

Em 1948, Eugene Kenedy e Albert Lehninger revolucionaram os estudos da bioenergética quando descobriram que as mitocôndrias eram os sítios da fosforilação oxidativa nos seres eucariontes Nelson e Cox, (2014). As células animais utilizam quase 90% da energia proveniente da cadeia respiratória mitocondrial e transforma energia redutora em um potencial de prótons transmembranar (MITCHELL, 1961). A respiração celular ocorre em três grandes estágios. No primeiro estágio, as moléculas dos combustíveis orgânicos - carboidratos, lipídios e proteínas - têm o seu metabolismo degradativo convergido em acetil-CoA. No segundo estágio, esses grupos acetil são consumidos durante o ciclo de Krebs, sendo oxidados totalmente a CO_2 acompanhado da redução de grande quantidade de coenzimas oxidadas NAD^+ e FAD, gerando os transportadores de elétrons reduzidos NADH e FADH_2 .

No terceiro estágio da respiração, a mitocôndria remove os elétrons oriundos dessas coenzimas reduzidas (NADH ou FADH_2) e os transfere para o oxigênio molecular reduzindo-o a H_2O (respiração mitocondrial), por meio de complexos respiratórios especializados I, II, III e IV, localizados nas cristas da membrana mitocondrial interna. Durante esse processo de transferência de elétrons, uma grande quantidade de energia é liberada e conservada na forma de ATP, por meio do processo chamado de fosforilação oxidativa que acontece no complexo V, ATP sintase (Figura 4).

Figura 4 - Modelo da hipótese quimiosmótica



Fonte: Nelson; Cox, (2014).

Tanto os elétrons transferidos pelo NADH para o átomo de ferro central da NADH desidrogenase (complexo I) quanto os elétrons originários do succinato que são transferidos para o FAD (complexo II) são repassados para a forma oxidada da coenzima Q ou ubiquinona (Q ou UQ), levando à sua redução a ubiquinol (QH_2 ou UQH_2). Em seguida esta é desprotonada formando duas espécies na forma do ânion semiquinona ($\text{UQH}^{\cdot-}$) um localizado na face citoplasmática da membrana mitocondrial interna, e outro na face

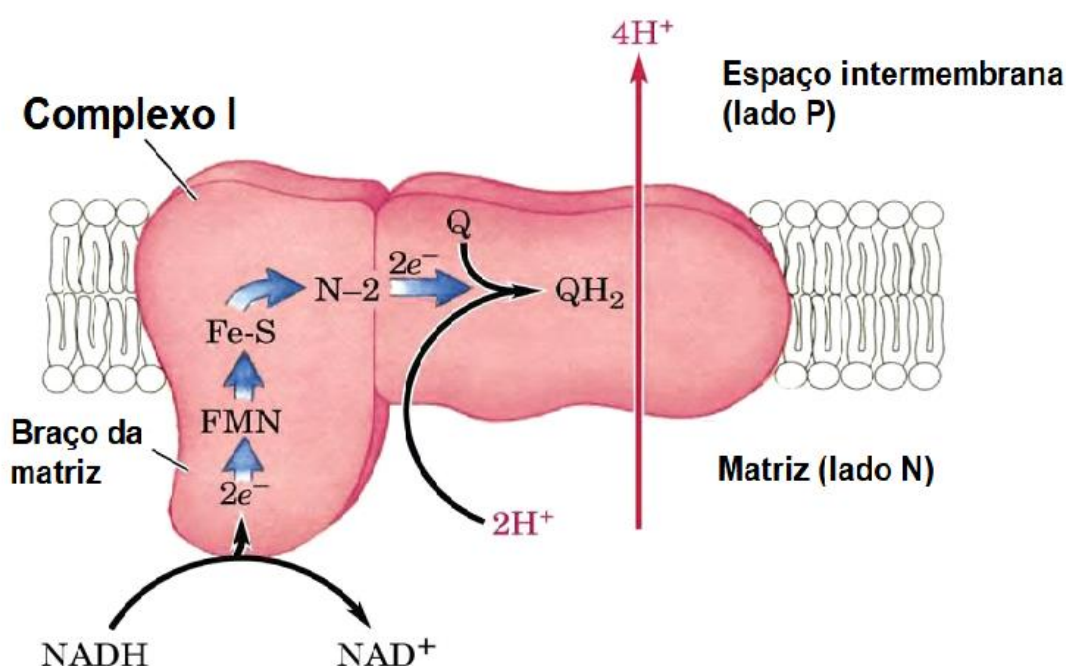
matricial da membrana. As duas formas de $UQH^{\cdot-}$ são combinadas quando oxidadas, regenerando UQ e doando seus elétrons ao citocromo $b-c_1$ e posteriormente ao citocromo c (complexo III). Este transporta elétrons para a citocromo c oxidase formada por várias subunidades proteicas associadas a dois grupos heme (citocromo a e a_3) e três centros íons cobre (2 Cu A e 1 Cu B), responsáveis pela transferência de elétrons para o oxigênio molecular, que resulta na formação de água (complexo IV). De acordo com as descobertas da hipótese quimiosmótica de Peter Mitchell (1961) em associação com a do acoplamento conformacional de Paul Boyer e colaboradores (1973), o fluxo de elétrons é acompanhado de bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar (complexos I, III e IV), gerando um gradiente eletroquímico de H^+ . O bombeamento destas espécies químicas geradas na cadeia respiratória de volta à matriz mitocondrial pela F_0F_1 -ATP sintase (complexo V), por meio do canal de prótons do componente F_0 que induz alteração conformacional dos sítios catalíticos a cada 120° no componente F_1 liberando o ATP formado a partir de ADP e P_i , sendo que cada rotação completa libera três unidades de ATP.

4.3.3 Complexo I

O complexo I ou NADH: ubiquinona oxidoredutase ou NADH desidrogenase (Figura 5) é o maior deles, possuindo 42 cadeias polipeptídicas diferentes. A primeira etapa da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias consiste em ionizar os átomos de H_2 que foram removidos dos substratos alimentares. Estes átomos de H_2 são removidos aos pares; um deles torna-se imediatamente um íon H^+ , enquanto o outro se combina com a nicotinamida adenina dinucleotídeo-forma oxidada (NAD^+) para formar o NADH. O efeito inicial é liberar o outro átomo de H do NADH para formar outro íon H^+ , esse processo reconstitui o NAD^+ que é reutilizado continuamente (GUYTON, 1997). Um grupo prostético de FMN (flavina mononucleotídeo) reduz a $FMNH_2$ e vários centros Fe-S são os componentes diretamente envolvidos na transferência de dois elétrons do NADH para a ubiquinona (BRACHT; ISHIIWAMOTO, 2003). A ubiquinona é reduzida a um radical livre denominado

semiquinona pela captação de apenas um elétron (FREITAS, 2006). Este intermediário sofre redução por um segundo elétron, provindo da matriz, originando o ubiquinol ou ubiquinona reduzida (UQH₂). Na matriz o ubiquinol bombeia quatro H⁺ para o lado citosólico da membrana interna, gerando parte do potencial eletroquímico responsável pela síntese de ATP.

Figura 5- NADH: Ubiquinona oxidoredutase (complexo I)



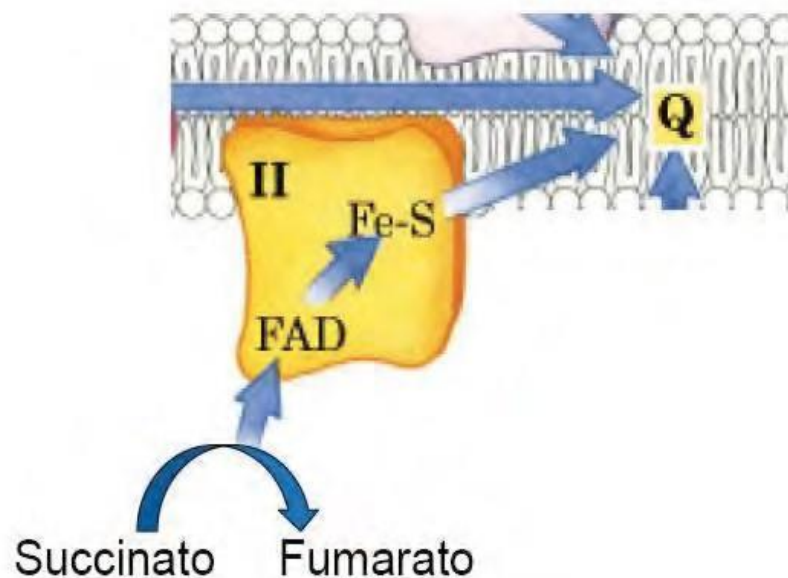
Fonte: Nelson; COX, (2014).

4.3.4 Complexo II

O complexo II ou succinato-coenzima Q redutase (Figura 6) é composto por vários polipeptídios, sendo que os dois maiores representam a succinato desidrogenase, contendo uma molécula de FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e dois centros Fe-S (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003). A succinato

desidrogenase é uma enzima do ciclo de Krebs e a única que não está livre na matriz mitocondrial, ela está ligada à membrana mitocondrial interna, recebe os equivalentes redutores do succinato, ou seja, transforma o succinato em fumarato, passando o H^+ e os elétrons para o FAD que é reduzido a $FADH_2$. O $FADH_2$ doa seus elétrons aos centros Fe-S que então os transfere à coenzima Q ou ubiquinona, mas antes os prótons são devolvidos à matriz mitocondrial, distinguindo-se do complexo I por não ser uma bomba de prótons (DORTA, 2007; FREITAS, 2006; MARZZOCO; TORRES, 1999).

Figura 6 - Succinato-Q redutase (complexo II)



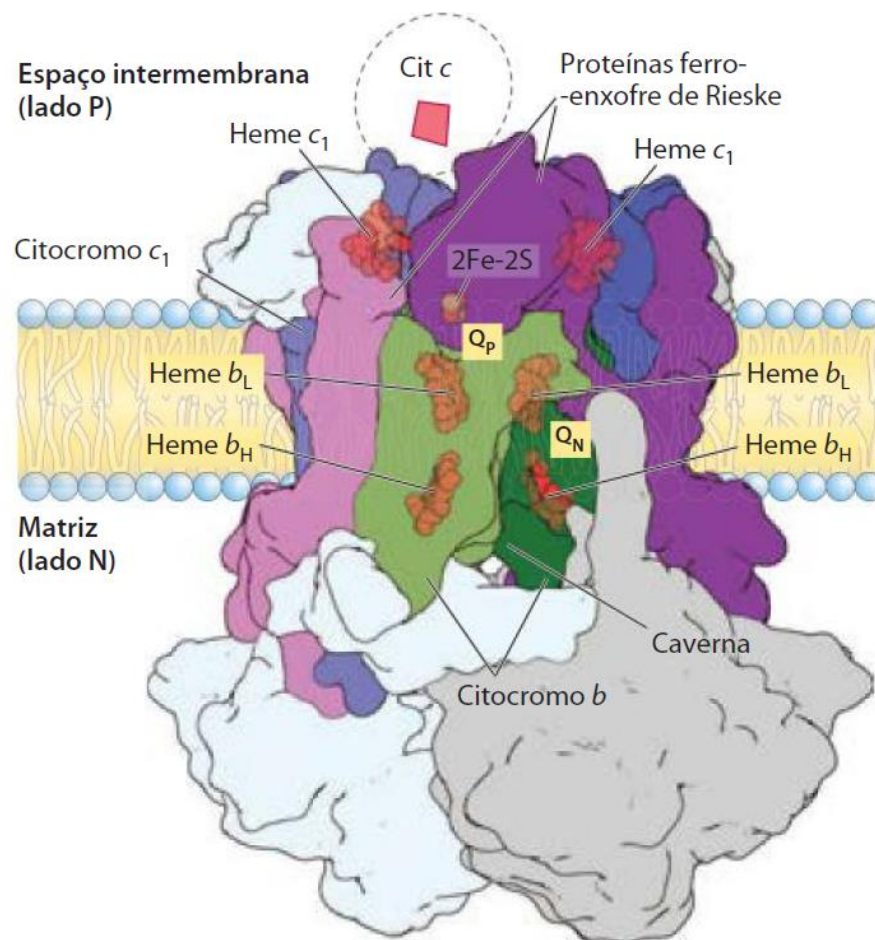
Fonte: Nelson e Cox, (2014).

4.3.5 Complexo III

O complexo III ou complexo dos citocromos $b-c_1$ ou ubiquinona – citocromo c oxidoredutase (Figura 7) é constituído por pelo menos três cadeias polipeptídicas, contendo três tipos de centros redox: proteína ferroenxofre, denominada proteína Rieske, citocromos c_1 e b (b_{566} e b_{562}). Os complexos I e

II assim como a glicerol-3-fosfatodesidrogenase, desprotonam a Coenzima Q reduzida (QH), transformando-a no ânion semiquinona (QH⁻). A redução ocorre com a adição de dois pools distintos, um localizado na face citoplasmática da membrana mitocondrial interna, e outro na face matricial da membrana, ambas formas da semiquinona são combinadas quando oxidadas, regenerando o ubiquinol (QH₂), forma reduzida da ubiquinona, responsável pela transferência de elétrons ao citocromo *b-c*₁ e posteriormente ao citocromo *c*, com transporte vetorial de prótons da matriz para o espaço intermembranar (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003; CALGARO-HELENA, 2006; MARZZOCO; TORRES, 1999).

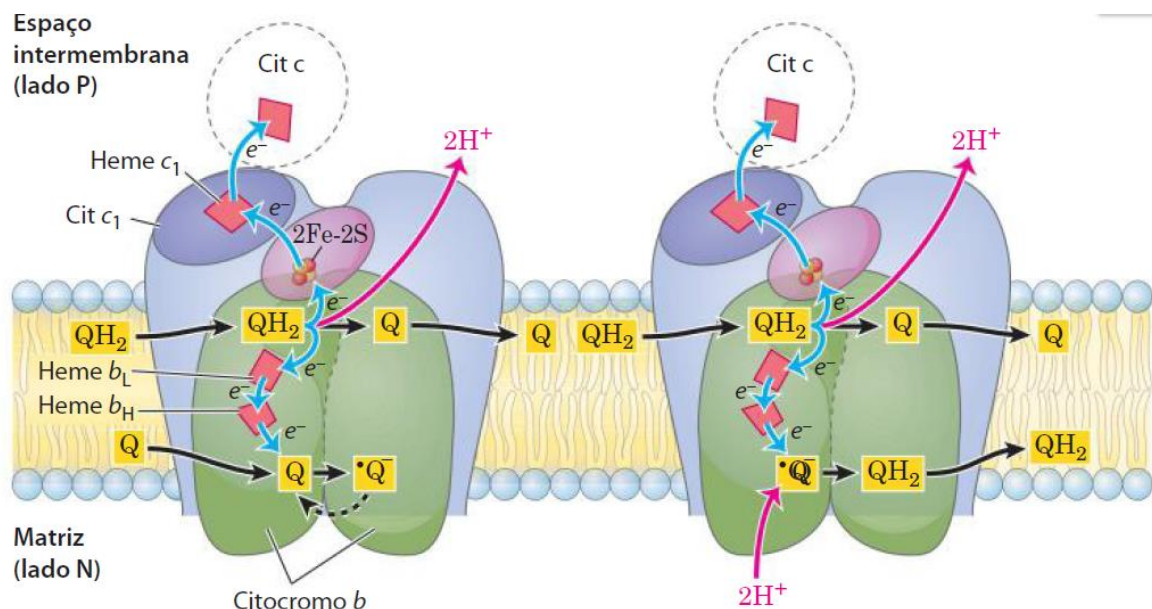
Figura 7- Ubiquinona – citocromo *c* oxidorreductase ou citocromo *b-c*₁ (complexo III)



Fonte: Nelson e Cox, (2014).

O ciclo coenzima Q (Figura 8) apresenta dois sítios catalíticos distintos um localizado na face citoplasmática da membrana mitocondrial interna para oxidação de QH_2 do qual faz parte o citocromo b_{566} , e outro na face matricial da membrana para a redução de coenzima Q que faz parte o citocromo b_{562} é dividido em dois ciclos o primeiro o QH_2 , perde 1 elétron e 1 próton, formando $\text{QH}^\bullet$, o elétron segue a rota $\text{QH}_2 \rightarrow \text{Fe-S} \rightarrow \text{cit.c1} \rightarrow \text{cit.c}$, enquanto o H^+ é liberado no espaço intramembranar e $\text{QH}^\bullet$, converte-se na forma oxidada Q, por transferência de seu elétron aos $b_{566} \rightarrow b_{562} \rightarrow \text{coenzima Q} \rightarrow \text{QH}^\bullet$, o consumo de um H^+ da matriz mitocondrial que irá reconstituir o $\text{QH}^\bullet$ em ubiquinol no próximo ciclo. O segundo inicia-se como o primeiro até o citocromo $b_{562} \rightarrow \text{QH}^\bullet$, recebe mais um H^+ da matriz mitocondrial recuperando o QH_2 , que passa a refazer o ciclo, liberando mais 2H^+ para o espaço intramembranar. A coenzima Q formada neste segundo ciclo torna-se disponível para receber os elétrons que antecedem a cadeia respiratória (MARZZOCO; TORRES, 1999).

Figura 8- Ciclo coenzima Q (complexo III)

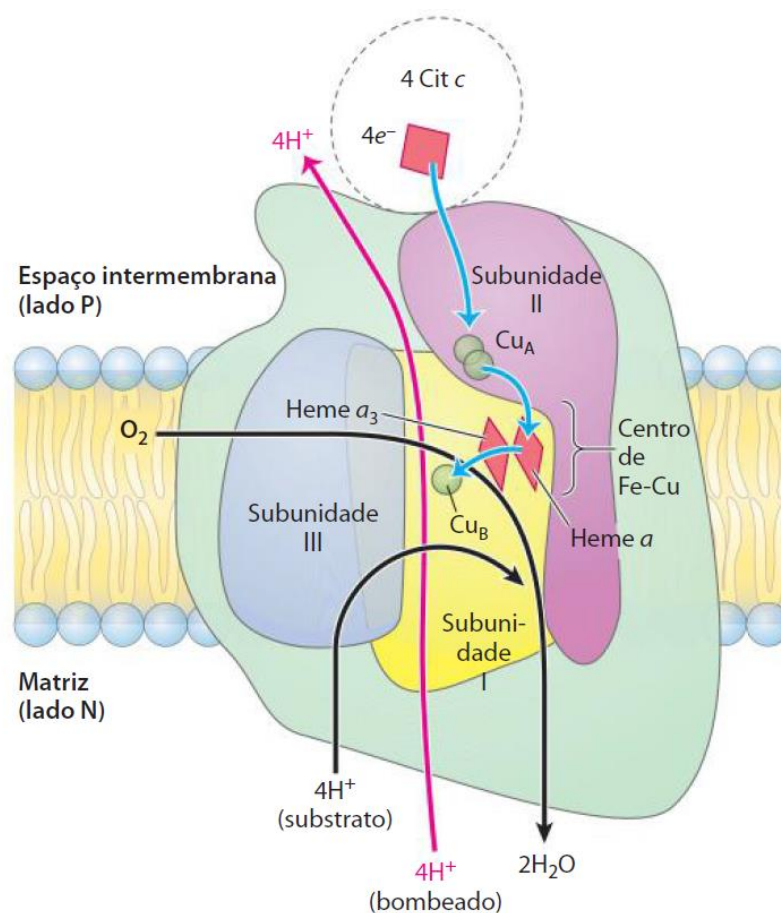


Fonte: Nelson e Cox, (2014).

4.3.6 Complexo IV

Complexo IV ou citocromo oxidase (Figura 9), é nesta etapa final da cadeia de transporte de elétrons que o citocromo *c*, uma proteína solúvel associada à parte externa da membrana mitocondrial interna, transfere elétrons, através de dois grupos heme (citocromo *a* e *a₃*), pelo menos dois átomos de cobre denominados Cu_A e Cu_B, para o O₂ molecular formando 2H₂O e bombeia prótons da matriz para o lado citosólico pela reação de catálise do citocromo *c* oxidase. O caminho percorrido pelos elétrons neste complexo ainda é hipotético (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003; MARZZOCO; TORRES, 1999).

Figura 9 - Citocromo oxidase (complexo IV)

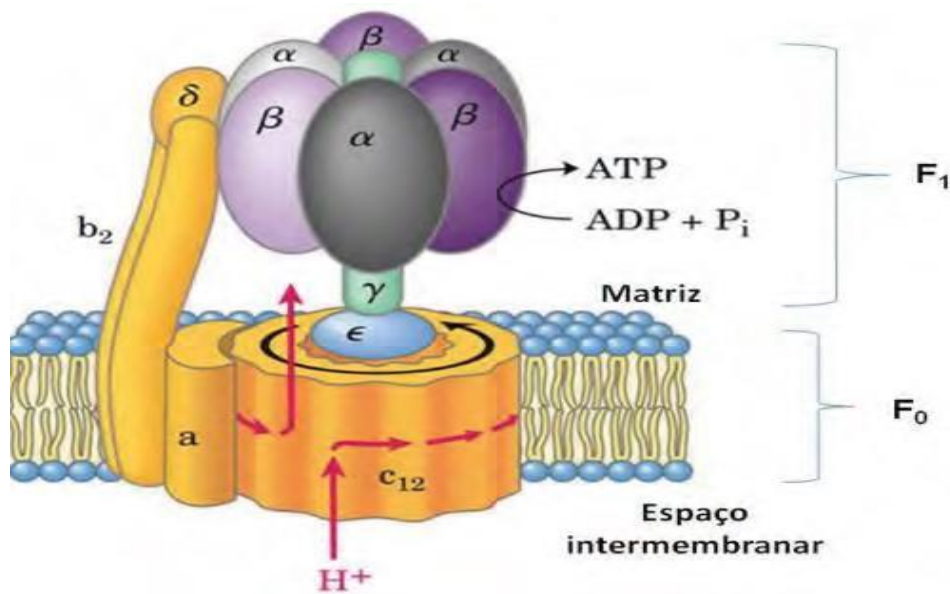


Fonte: Nelson e Cox, (2014).

4.3.7 ATP Sintase

A F_0F_1 ATP sintase (Figura 10) apresenta dois componentes distintos: F_1 , uma proteína periférica de membrana, e F_0 , uma proteína integral de membrana. A letra *o* subscrita em F_0 significa sensível à oligomicina Nelson e Cox, (2014). Cada componente é constituído por várias subunidades proteicas. F_1 tem 9 polipeptídios, 5 dos quais são diferentes, com a composição: α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ e cada uma dessas três subunidades tem um sítio catalítico para a síntese de ATP. F_0 tem é composto por três tipos de subunidades proteicas a, b e c. A força próton-motriz dirige a síntese de ATP catalisada pela ATP sintase. A elevada concentração de íon H^+ , com carga positiva no lado citosólico da membrana mitocondrial interna, e a grande diferença de potencial elétrico através da membrana interna determinam o fluxo de íons H^+ para o interior da matriz mitocondrial através do componente F_0 . A energia derivada desse fluxo é utilizada para converter $ADP + P_i$ em ATP (GUYTON, 1997). As últimas evidências sugerem que o H^+ entra pela porção F_0 causando uma rotação, fazendo as subunidades girarem, a cada 120° a subunidade γ entra em contato com a subunidade β (aberta, ligada ao ADP ou ligada ao ATP). Cada rotação completa de γ , faz com que β passe pelas três conformações liberando três moléculas de ATP (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003).

Figura 10 - ATP sintase



Fonte: Nelson e Cox, (2014).

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias denomina-se respiração mitocondrial. Os estados clássicos da respiração mitocondrial são a respiração de estado 4 (basal) e a respiração de estado 3 (acoplada à síntese de ATP) (CHANCE; WILLIAMS, 1956). A relação entre a respiração de estado 3 e a de estado 4, Razão de Controle Respiratório (RCR), é um parâmetro da função mitocondrial que indica o grau de acoplamento entre a oxidação dos substratos respiratórios e a produção de ATP. A relação ADP/O, outro parâmetro, está associado à eficiência da mitocôndria em sintetizar ATP. Agentes desacopladores da fosforilação oxidativa estimulam a respiração de estado 4, enquanto o efeito de agentes inibidores manifesta-se sobre a respiração de estado 3 (CAIN; SKILLETER, 1987).

4.4 Desacopladores da Fosforilação Oxidativa

O firme acoplamento do transporte de elétrons com a fosforilação nas mitocôndrias pode ser rompido (desacoplado). Assim, os desacopladores estimulam a respiração de estado 4 ou basal (estado 2) minimizando a

produção de ATP mitocondrial, agem na força próton-motriz que é dissipada na presença destes compostos. O transporte de elétrons pela cadeia respiratória prossegue normalmente, desfazendo o acoplamento entre o transporte de elétrons e a síntese do ATP.

Estas substâncias carregam prótons pela membrana mitocondrial interna e essa atividade é conhecida como protonoforética. Há diversos compostos com atividade protonoforética como os ácidos lipofílicos fracos carbonilcianetom-clorofenilhidrazona (CCCP), 2,4-dinitrofenol (DNP) e o carbonilcianeto-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), os quais atravessam a membrana interna na forma protonada, liberando o próton dentro da matriz mitocondrial (WALLACE; STARKOV, 2000).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Preparações

5.1.1 Animais

Foram utilizadas em média 600 abelhas da espécie *Apis mellifera* de colmeias modelo Langstroth, oriundas do apiário experimental da FCAT - Unesp. As abelhas foram coletadas em potes plásticos transparentes com furos na tampa para entrada de ar e com um algodão embebido em água.

5.1.2 Reagentes

O clomazona ($C_{12}H_{14}ClNO_2$) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil) e dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). Os demais reagentes utilizados, foram do mais alto grau analítico comercialmente disponível. As soluções dos reagentes foram preparadas com água ultra-filtrada por meio do sistema purificador Millipore DirectQ-3® (MilliQ®).

5.1.3 Tratamentos

Os testes foram realizados em triplicata, contendo um controle e quatro concentrações de clomazona: 100, 125, 150 e 200 μM .

5.2 Isolamento das Mitocôndrias do Tórax das Abelhas

Foram coletadas abelhas 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, posteriormente, macerado com pistilo de porcelana e filtrado em gaze dobrada 8 vezes. Os ensaios com as mitocôndrias foram efetuados dentro de um período máximo de 3 horas.

5.2.1 Princípio do Método:

A composição e a viscosidade dos meios são importantes fatores para o isolamento, sedimentação e integridade da mitocôndria. Assim, os meios devem conter sacarose para manutenção da osmolaridade, EGTA, um quelante de cátions bivalentes, principalmente cálcio que atua como desacoplador ou ainda como segundo mensageiro na ativação de fosfolipases que degradam os fosfolipídios da membrana, e HEPES-KOH, um sistema tampão pH 7,2 de acordo com Cain e Skilleter (1987).

No processo de homogeneização é por meio da força imposta pelo pistilo e a velocidade angular constante que a membrana citoplasmática é rompida liberando os componentes para o meio.

No processo de centrifugação fracionada, a primeira velocidade de centrifugação é baixa, sendo o primeiro sedimento do tecido homogeneizado desprezado, pois contém células intactas, núcleo, citoesqueleto e membrana plasmática. O sobrenadante é submetido a uma velocidade de centrifugação maior, e o segundo sedimento contém lisossomos, mitocôndrias e

peroxissomos. Este é resuspenso e submetido à última centrifugação com velocidade média para separar as mitocôndrias das demais organelas devido às diferenças de densidade de flutuação de cada uma, resultante das proporções diferentes de lipídeos e proteínas em cada tipo de organela.

5.3 Dosagem de Proteína

A proteína mitocondrial foi determinada de acordo com Cain e Skilleter (1987), utilizando-se a reação do biureto.

Extraiu-se da suspensão mitocondrial uma alíquota de 10 µL e adicionada a 100 µL de uma solução de ácido deoxicólico 5% (m/v) e 1.390 µL de água Milli-Q® e posteriormente 1.500 µL do reagente de Biureto 0,15% (m/v). A absorbância foi estabelecida em 540 nm em relação a um branco reagente, e a concentração a partir de uma curva padrão ou de calibração utilizando-se a Albumina de Soro Bovino (BSA) nas mesmas condições das amostras.

5.3.1 Princípio do Método:

O reagente de biureto tem por base hidróxido de sódio e sulfato de cobre, que se torna violeta na presença de proteínas. Os íons cúpricos em meio alcalino ligam-se ao nitrogênio de polipeptídeos e proteínas formando um complexo de coordenação colorido com 4 ou até 6 ligações peptídicas vizinhas. A intensidade da cor produzida é proporcional ao número de ligações peptídicas que participam da reação. A vantagem da reação é que as ligações entre cobre e ligações peptídicas são independentes da composição de aminoácidos das proteínas.

5.4 Ensaio com as Mitocôndrias Isoladas

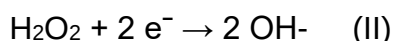
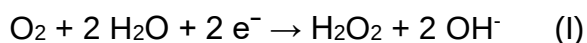
5.4.1 Respiração Mitocondrial

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi medido usando um medidor de oxigênio dissolvido (Strathkelvin Precision Dissolved Oxygen

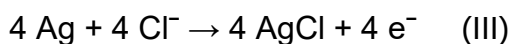
Respirometer, Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Scotland, UK) equipado com um eletrodo tipo Clark. As mitocôndrias (1mg de proteína/mL) foram incubadas em uma câmara termostatzada fechada sob agitação em um meio composto por 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de K₂HPO₄, 0,5 mM de EGTA, 10 mM de HEPES-KOH e albumina de soro bovino 0,1% (p/v) pH 7,4 (volume final de 1 mL), a 30°C. Os substratos utilizados foram o glutamato (5 mM) e o malato (5 mM) ou succinato (5 mM) associado a rotenona (2 µM) (inibidor do complexo² I) e as velocidades de consumo de oxigênio foram determinadas por meio do software Strathkelvin Oxygen 782 System (versão 3.0, 2005) e expressas como nmol O₂.min⁻¹.mg de proteína. O efeito desacoplador foi observado com a adição do Clomazona (100 a 200 µM).

5.4.1.1 Princípio do Método:

O eletrodo tipo Clark é constituído por dois ânodos de prata, em forma de anel, que circunda o cátodo de platina, em forma de cilindro, acoplados por uma solução de KCl saturada e revestidos por uma membrana de teflon. À medida que é polarizado com 0,6 a 0,8 volts o fluxo de elétrons do eletrodo da prata para a platina, gera uma diferença de potencial entre os dois metais proporcional a quantidade de oxigênio dissolvido no meio de reação reduzindo-o a íons OH⁻, de acordo com as reações no catodo da platina (I) e (II):



O circuito, que ocorre no ânodo de prata resulta com a reação (III):



A corrente elétrica gerada é proporcional à concentração de oxigênio que é detectado pela membrana de teflon, amplificado e registrado em um potenciômetro (CAIN; SKILLETER, 1987). Para a manutenção da osmolaridade o meio de respiração utilizado contém sacarose e KCl além de EGTA, HEPESKOH, e K₂HPO₄ com fonte de fosfato para a síntese de ATP. O estado 3 da respiração inicia-se com a adição do ADP ocorrendo um aumento na velocidade de consumo de oxigênio e o estado 4 da respiração, quando todo o

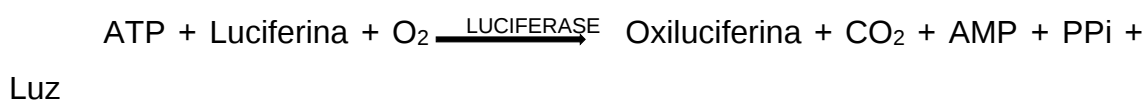
ADP tiver sido consumido, a respiração retorna a lentidão. A razão do controle respiratório (RCR) é a relação entre os estados 3 e 4 da respiração mitocondrial, esta razão indica o grau de acoplamento entre a oxidação dos substratos respiratórios e a produção de ATP.

5.4.2 Síntese de ATP

A síntese de ATP foi determinada pelo método de quimioluminescência utilizando o sistema luciferina-luciferase de vaga-lume por meio de um kit Bioluminescent Assay Kit Sigma (St. Louis, MO, USA) em um aparelho Luminômetro modelo Sirius I (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha). Previamente a suspensão de mitocôndrias foi tratada nas condições de respiração com succinato (5 mM) e rotenona (2 M) e centrifugada 9.000 g por 5 minutos, a 4°C. O sedimento obtido foi tratado com 1 mL de ácido percloracético 1 M gelado e novamente centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Foram retiradas alíquotas de 100 µL de cada amostra e elas foram neutralizadas com KOH 2 M. Em seguida foi adicionado TrisHCl 100 mM, pH 7,8, sendo as amostras centrifugadas a 12.000g, por 12 minutos a 4°C, e os sobrenadantes resultantes foram avaliados, em triplicata, no Luminômetro seguindo as recomendações do fabricante do kit.

5.4.2.1 Princípio do Método:

O ATP presente na amostra é consumido durante a oxidação da luciferina em oxiluciferina “excitada” catalisada pela enzima luciferinaluciferase, no retorno da oxiluciferina no seu estado basal ocorre à emissão de luz, conforme a reação:



Mantendo as concentrações de luciferina, luciferase e oxigênio, constantes e sendo o ATP o reagente limitante, a quantidade de luz emitida é proporcional ao ATP disponível no meio.

5.4.3 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas mitocôndrias do tórax foi avaliada por meio da produção de H_2O_2 (Votyakova; Reynolds, 2001). As mitocôndrias (0,5 mg/mL) energizadas com succinato 5mM (acrescido de rotenona) foram incubadas com a sonda CMH_2DCFDA , e a fluorescência foi medida em um espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tokyo, Japão) em comprimentos de onda de 503 e 528nm para excitação e emissão, respectivamente.

5.4.3.1 Princípio do Método

A quantidade de ERO pode ser avaliada pelo emprego da sonda CMH_2DCFDA , a qual é permeável às membranas celulares e hidrolisada por esterases que removem grupos acetato formando o composto não fluorescente DCFDA, que na presença de ERO é rapidamente oxidado e transformado em DCF. Este último apresenta alta intensidade de fluorescência em 528 nm quando excitado em 503 nm sendo assim, um indicador de formação e acúmulo de ERO nas células (LEBEL *et al.*, 1992).

5.5 Análise Estatística

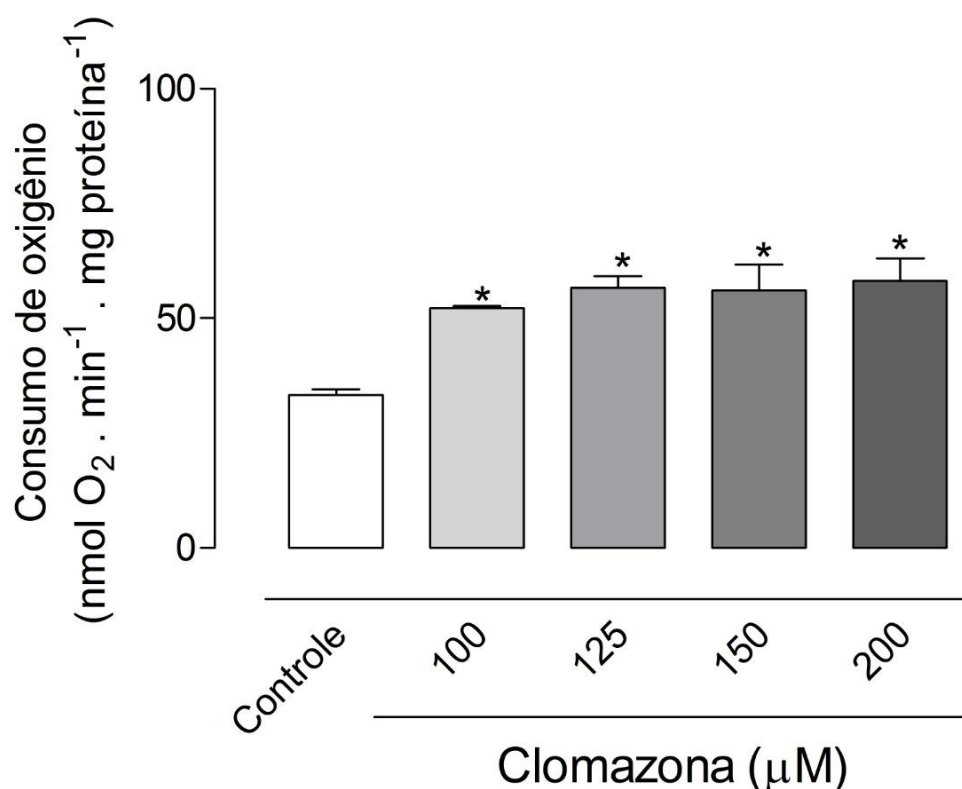
A análise dos dados experimentais foi feita pela análise de variância, sendo a comparação de médias realizada por meio do teste de Dunnet, o qual realiza a comparação entre os tratamentos e o controle, e os resultados com valor de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. O programa utilizado foi o Graphpad Prism, versão 4.0 para o Windows, do Graphpad Software (SAN DIEGO, CA, USA).

6 RESULTADOS

6.1 Respiração Mitochondrial

Os resultados de consumo de oxigênio obtidos utilizando mitocôndrias energizadas com glutamato + malato (doadores de elétrons para o complexo I), não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (dados não apresentados). Já quando energizadas com succinato, doador de elétrons para o complexo II, e rotenona inibidor do complexo I, foi observado um aumento no consumo de oxigênio quando adicionado a clomazona (100, 125, 150, 200 μM). Sendo que os efeitos significantes começam a ser vistos a partir da concentração de 100 μM (Figura 11).

Figura 11 - Efeito da clomazona no consumo de oxigênio da respiração em mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas, energizadas com Succinato 5 mM + Rotenona 2 mM.

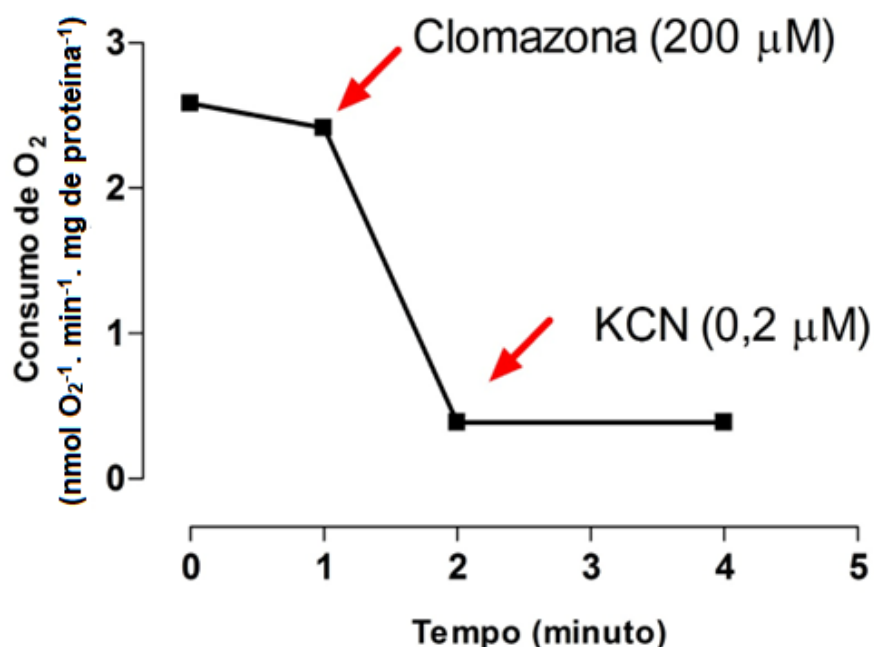


Os valores representam a média $\pm$ EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *Significantemente diferente do controle (* $P < 0,05$). Controle = sem adição de clomazona.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para confirmar que o aumento no consumo de oxigênio observado pela adição da clomazona era de fato relacionado ao desacoplamento da cadeia de transporte de elétrons foi realizado um experimento de respiração mitocondrial seguindo a mesma metodologia apresentada no item 5.4.1 adicionando cianeto de potássio (KCN), um inibidor do complexo IV da cadeia de transporte de elétrons, após a adição da clomazona, conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12 - Gráfico representativo do experimento de respiração celular empregando KCN, para confirmar o efeito desacoplador da clomazona.



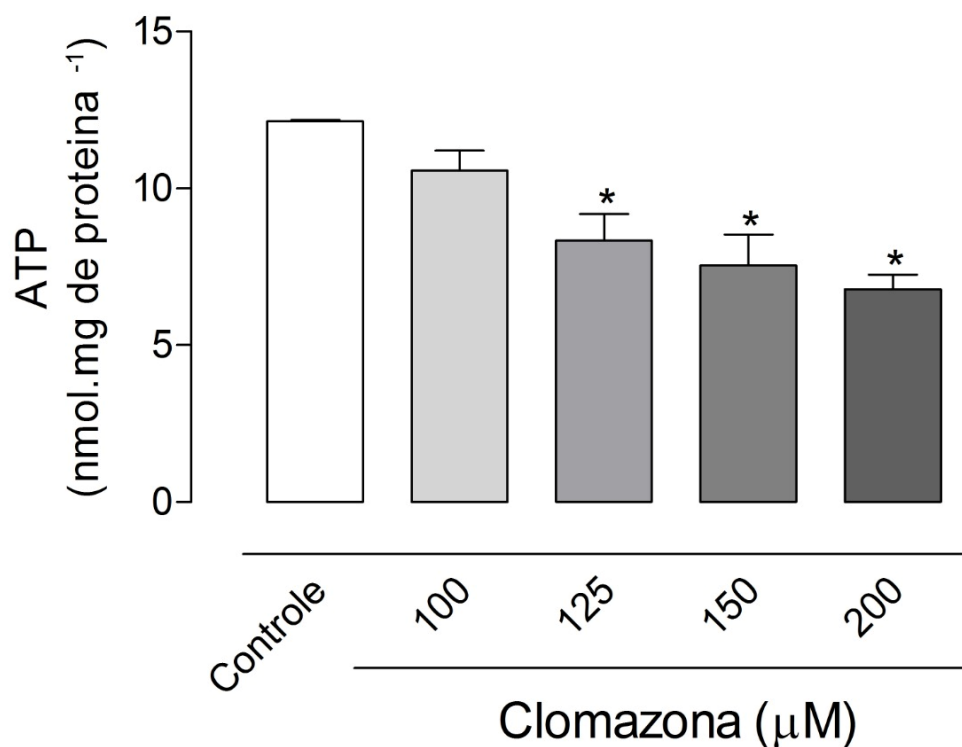
Fonte: Elaborado pelo autor

6.2 Síntese de ATP

A síntese de ATP foi inibida de maneira dose-dependente pela clomazona, sendo que os efeitos significantes se iniciam com a concentração

de 125 μM , e tendo seu efeito mais pronunciado na concentração de 200 μM (Figura 13).

Figura 13 - Efeito da clomazona na concentração de ATP em mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas, energizadas com Succinato 5 mM + Rotenona 2 mM.



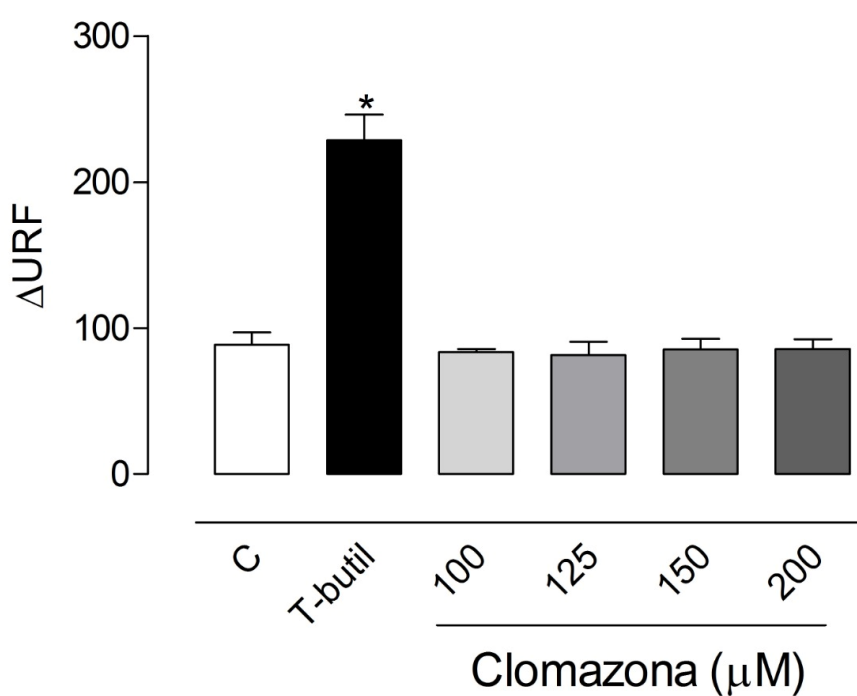
Os valores representam a média $\pm$ EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *Significantemente diferente do controle (*P < 0,05). Controle = sem adição de clomazona.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3 Efeito da Clomazona na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Não foram observadas alterações significantes na produção de ERO em relação ao controle em nenhuma das concentrações de clomazona utilizadas.

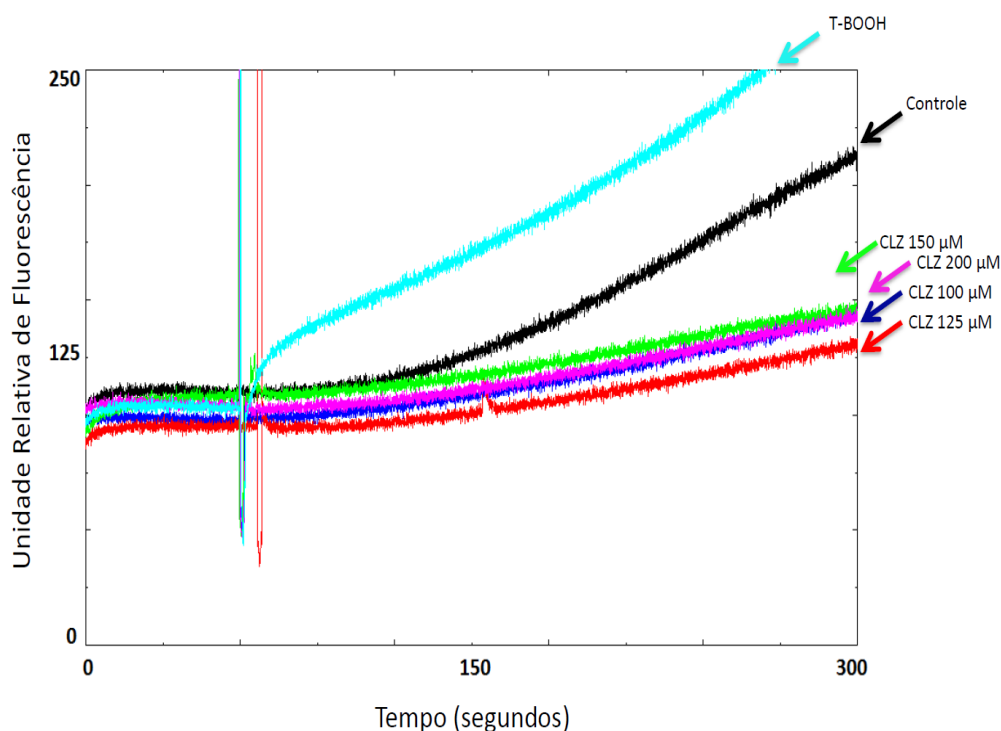
Figura 14: Efeito do herbicida clomazona sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).



O gráfico representa a média $\pm$ EPM de três experimentos com mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas. *Estatisticamente significante em relação ao grupo controle (* $P < 0,05$). C = controle; T-butyl = controle positivo com 100 μM de hidroperóxido de terc-butila.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15: Gráfico representativo do experimento de produção de ERO.



A maior Unidade Relativa de Fluorescência (URF) indica uma maior geração de ERO no sistema.

Fonte: Elaborado pelo autor.

7 DISCUSSÃO

Entre todos os organismos afetados pelo uso indiscriminado de agrotóxicos, deve-se dar uma maior relevância as abelhas, especificamente a *Apis mellifera*. Essa espécie de abelha possui um perfil mais generalista na busca de recursos que outras espécies de abelhas e, graças a essa característica, presta um importante papel como polinizadora, principalmente das espécies produtoras de alimento, além de possuírem um importante papel na manutenção dos ecossistemas e no aumento da produtividade da agricultura e consequentemente na produção de alimentos (COSTA, 2019).

Como relatado por Imperatriz-Fonseca *et al.*, (2012), essa exposição pode levar a perdas de colônias inteiras causando sérios danos a economia mundial o que pode acarretar prejuízos de milhares de dólares por ano, além

de levar a uma diminuição considerável na quantidade e na qualidade dos alimentos de origem vegetal produzidos.

Dados na literatura mostram que o herbicida clomazona é capaz de causar danos a mitocôndrias de células animais, em especial a cadeia de transporte de elétrons (FAGUNDES *et al.*, 2015).

Neste trabalho, ao analisar a respiração mitocondrial, utilizando como substrato malato + piruvato, doadores de elétrons para o complexo I da cadeia respiratória, não foi observado, nenhuma alteração em relação ao consumo de oxigênio. Quando o substrato foi trocado para succinato (doador de elétrons para o complexo II) + rotenona (inibidor do complexo I) foi observado um estímulo no consumo de oxigênio, indicando então um efeito desacoplador da cadeia respiratória, tendo seu efeito mais pronunciado na concentração de 200 μM de clomazona. Segundo Marzzoco; Torres, 1999, substâncias desacopladoras são aquelas capazes de agir sobre o acoplamento da síntese de ATP com o transporte de elétrons. Dessa forma os prótons podem permear a membrana mitocondrial interna, sendo que a transferência de elétrons ocorre, mas não há síntese de ATP (MORELAND, 1994).

Faita *et al.*, (2018), relatam resultados semelhantes ao exporem abelhas a um herbicida, onde este demonstrou estimular o desenvolvimento de alterações metabólicas que poderiam diminuir suas funções bioenergéticas relacionadas ao colapso na síntese de ATP.

Segundo Nelson e Cox (2014), a adição de cianeto (CN^-), bloqueia a transferência de elétrons entre a citocromo-oxidase (complexo IV) e o O_2 , dessa forma o consumo de oxigênio é inibido, confirmando assim a hipótese do clomazona atuar como um desacoplador, uma vez que se após a adição de KCN o consumo de oxigênio ainda fosse observado esse poderia então estar relacionado a geração de ERO.

O estresse oxidativo se caracteriza pelo desequilíbrio entre a produção de ERO e antioxidantes. Organismos aeróbicos desenvolveram sistemas antioxidantes enzimáticos ou não capazes de os protegerem. Alguns sistemas enzimáticos relatados em abelhas são: Glutathione redutase (GR), glutathione

peroxidase (GPX), superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (BALIEIRA *et al.*, 2018).

No experimento de síntese de ATP, foi possível observar um efeito de redução na concentração de ATP, dose dependente à concentração de clomazona tendo seu efeito perceptível a partir da concentração de 125 μM , e efeito máximo na concentração máxima de clomazona testada (200 μM), o que indica uma capacidade deste herbicida de diminuir o potencial de fosforilação oxidativa. Tendo em vista que o ATP é um componente metabólico fundamental, interferências em sua síntese ou utilização caracterizam mecanismos onde os xenobióticos podem indicar toxicidade aguda ou crônica (MEYER; KULKARNI, 2001).

Além disso, a ausência de produção de ERO mitocondrial, corroborou a ausência de efeitos oxidativos no desacoplamento causado pelo herbicida clomazona. Kowaltowski *et al* 2009, demonstraram que aumentar sistemicamente as taxas respiratórias *in vivo* usando baixas doses de desacoplador é uma estratégia antioxidante altamente eficaz, prevenindo até mesmo baixos níveis de dano oxidativo a biomoléculas. Ao aumentar o consumo de O_2 , o aumento do transporte de elétrons pode prevenir a formação de ERO ao diminuir a tensão de O_2 no microambiente mitocondrial.

8 CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos neste estudo pode-se concluir que o mecanismo de toxicidade da clomazona sobre as mitocôndrias do músculo torácico de abelhas consiste em: diminuição da bioenergética mitocondrial com a consequente redução na produção de ATP.

E uma vez que o desacoplamento da cadeia respiratória pode afetar vários processos importantes para a manutenção celular, é plausível que as mudanças na produção de energia mitocondrial descritas no presente trabalho possam contribuir para o efeito tóxico apresentado pelo herbicida.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. **Métodos de laboratório em bioquímica**. Barueri: Manole, 2003. p. 230–233

ARMAS, E. D; MONTEIRO, R. T. R.; ANTUNES, P. M.; SANTOS, M. A. P. F; CAMARGO, P. B; ABAKERLI, R. B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, [S.l.], v. 30, n. 5, p. 1119–1127, 2007.

BALIEIRA, K. V. B.; MAZZO, M.; BIZERRA, P. F. V.; GUIMARÃES, A. R. J. S.; NICODEMO, D.; MINGATTO, F. E. Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. **Apidologie**, [S.l.], v. 49, n. 5, p. 562–572, 2018.

BOYER, P. D.; CROSS, R. L.; MOMSEN, W. A New Concept for Energy Coupling in Oxidative Phosphorylation Based on a Molecular Explanation of the Oxygen Exchange Reactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.l.], v. 70, n. 10, p. 2837–2839, 1973.

CAIN, K. **Preparation and use of mitochondria in toxicological research**. Oxford: Biochemical Toxicology: A Practical Approach, 1987. p. 217–254

CALDERONE, N. W. Insect Pollinated Crops, Insect Pollinators and US Agriculture: Trend Analysis of Aggregate Data for the Period 1992–2009. **PLoS ONE**, [S.l.], v. 7, n. 5, p. e37235, 2012.

CALGARO-HELENA, A. F. **Estudo estrutura-atividade das ações pró-oxidante e antioxidante de isocumarinas sobre as mitocôndrias**. 2008. 101f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2008.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. **The respiratory chain and oxidative phosphorylation**. [S.l.: s.n.], 1956.

CHRISTOFFOLETI P. J.; OVEJERO, R. F. L.; CARVALHO, J. C. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2. ed. [S.l.]: Piracicaba: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas - Hrac-Br, 2004. p. 100

COLBY, S. R.; HUMBURG, N. E. **Herbicide handbook of the Weed Science Society of America**. 6. ed. Champaign: The Society, 1989.

COSTA, H. L. R. U. C. M. **Avaliação do comportamento e do perfil bioquímico de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* Lepeletier) expostas ao herbicida glifosato por ingestão**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

COSTA-MAIA, F. M.; LINO-LOURENÇO, D. A.; TOLEDO, V. A. A. **Sistemas de Produção Agropecuária**. [S.l.]: Editora UTFPR, 2010. v. 1. p. 45–67

- CRANE, E.; WALKER, P. **The impact of pest management on bees and pollination**. London: Tropical Development and Research Institute, 1983. p. 129
- CRANE, E.; WALKER, P. **Pollination directory for world crops**. London: International Bee Research Association, 1984. p. 183
- DA, A. **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. [S.l.]: Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.
- DAUM; GÜNTHER. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes: lipids of mitochondria**. [S.l.s.n.] 1985. v. 822p. 1–42
- DORTA, D. J. **Efeito citoprotetor e/ou citotóxico dos flavonóides: estudo estrutura-atividade envolvendo mecanismos mitocondriais, com ênfase no apoptose**. 2007. 82f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2007.
- SANTOS, C. F.; OTESBELGUE, A.; BLOCHTEIN, B. The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. **PLOS ONE**, [S.l.], v. 13, n. 7, p. 1-13, 2018.
- FAGUNDES, M. Z.; GONÇALVES, M. A.; SOARES, M. P.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R.; RIET-CORREA, F.; ANJOS, B. L. Clinicopathological and toxicological aspects of poisoning by the clomazone herbicide in sheep. **Small Ruminant Research**, [S.l.], v. 124, p. 120–126, 2015.
- FAITA, M. R.; OLIVEIRA, E. M.; ALVES, V. V.; ORTH, A. I.; NODARI, R. O. Changes in hypopharyngeal glands of nurse bees (*Apis mellifera*) induced by pollen-containing sublethal doses of the herbicide Roundup®. **Chemosphere**, [S.l.], v. 211, p. 566–572, 2018.
- FERHATOGLU, Y.; BARRETT, M. Studies of clomazone mode of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S.l.], v. 85, n. 1, p. 7–14, 2006.
- FERRACINI, V. L.; QUEIROZ, S. C. N.; GOMES, M. A. F.; SANTOS, G. L. Método para a determinação de hexazinone e tebutiuron em água. **Química Nova**, [S.l.], v. 28, n. 3, p. 380–382, 2005.
- FREE, J. B. **Insect pollination of crops**. London: Academic Press, 1970. p. 544
- FREITAS, E. M. S. **Ação tóxica da veratrina em mitocôndrias e no retículo sarcoplasmático**. 2006. 173f Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, 2006.
- FREY, T. G.; MANNELLA, C. A. The internal structure of mitochondria. **Trends in Biochemical Sciences**, [S.l.], v. 25, n. 7, p. 319–324, 2000.
- GALLAI, N.; SALLES, J.-M.; SETTELE, J.; VAISSIÈRE, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, [S.l.], v. 68, n. 3, p. 810–821, 2008.

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, [S.l.], v. 108, n. 3, p. 849–857, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26470203/#:~:text=The%20economic%20contribution%20of%20pollinators>. Acesso em: 05 jun. 2022.

GUIMARÃES, M. Colmeias às moscas: síndrome misteriosa causa sumiço de abelhas na América e na Europa. **Revista Pesquisa Fapesp**, [S.l.], 2007.

GUNASEKARA, A. S.; DELA CRUZ, I. D. P.; CURTIS, M. J.; CLAASSEN, V. P.; TJEERDEMA, R. S. The behavior of clomazone in the soil environment. **Pest Management Science**, [S.l.], v. 65, n. 6, p. 711–716, 2009.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 1014

HAKME, E.; LOZANO, A.; GÓMEZ-RAMOS, M. M.; HERNANDO, M. D.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Non-target evaluation of contaminants in honey bees and pollen samples by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Chemosphere**, [S.l.], v. 184, p. 1310–1319, 2017.

HERTWIG, K. V. **Manual de herbicidas desfolhantes, dessecantes, fitorreguladores e bio-estimulantes**. [S.l.]: São Paulo: Agronômica Ceres, 1983. p. 28–30

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 74, n. 1, p. 214–226, 1976.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; GONÇALVES, L. S.; FRANCOY, T. M.; NUNES-SILVA, P. O Desaparecimento das Abelhas Melíferas (*Apis mellifera*) e as Perspectivas do Uso de Abelhas Não Melíferas na Polinização. **Documentos Embrapa Semiárido**, Petrolina, v. 249, p. 210 –233, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), I. Ambiente, trabalho e câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S.l.], 2021.

KLATT, B. K.; HOLZSCHUH, A.; WESTPHAL, C.; CLOUGH, Y.; SMIT, I.; PAWELZIK, E.; TSCHARNTKE, T. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [S.l.], v. 281, n. 1775, 2014.

KOWALTOWSKI, A. J.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, [S.l.], v. 47, n. 4, p. 333–343, 2009.

LANÇAS, F. M.; VILEGAS, J. H. Y.; VASCONCELOS, E. C.; CELEGHINI, R. M. S. NOVAS APLICAÇÕES DE SISTEMAS SFE “HOME MADE”. I. PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S.l.], v. 17, n. 4, 1997.

LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora Unesp, 2009.

LESNEFSKY, E. J.; MOGHADDAS, S.; TANDLER, B.; KERNER, J.; HOPPEL, C. L. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [S.l.], v. 33, n. 6, p. 1065–1089, 2001.

MACGREGOR, S. E. **Insect pollination of cultivated crop plants**. [S.l.]: Washington, D.C. U.S. Gov. Print. Off, 1976.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell makers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, [S.l.], v. 23, p. 309–309, 2006.

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

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 2. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1999. p. 136–158

MERCK. **CLOMAZONA**. [20--?]. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/substance/clomazone2397081777891?gclid=Cj0KCQjws4aKBhDPArisAIWH0JWCnTLie-POGPLECGXN_-IKBzYUENKCLcCumcWUxhWSidpmUcUN_FgaAhc6EALw_wcB. Acesso em: 15 set. 2021.

MEYER, S. A.; KULKARNI, A. P.; HODGSON, E.; ROBERT, C. **Introduction to biochemical toxicology**. 3. ed. New York: Wiley, 2001. p. 487–507

MITCHELL, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. **Nature**, [S.l.], v. 191, n. 4784, p. 144–148, 1961.

Mitocôndrias e cloroplastos (artigo). [20--?]. Disponível em: <https://pt.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-structure-and-function/cell-compartmentalization-and-its-origins/a/chloroplasts-and-mitochondria>. Acesso em: 23 maio. 2022.

MORELAND, D. E.; HODGSON, E. **Introduction to biochemical toxicology**. NORWALK: Appleton and Lange, 1994. p. 354–366

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Leningher Principios de Bioquímica**. 6. ed. São Paulo: SARVIER, 2014. p. 975

NICHOLLS, D. G. **Bioenergetics: An Introduction To The Chemiosmotic Theory**. [S.l.]: London: Academic Press, 1982.

NICODEMO, D.; MAIOLI, M. A.; MEDEIROS, H. C. D.; GUELF, M.; BALIEIRA, K. V. B.; DE JONG, D.; MINGATTO, F. E. Fipronil and imidacloprid reduce

honeybee mitochondrial activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S.l.], v. 33, n. 9, p. 2070–2075, 2014.

NOVAIS, S. M. A.; NUNES, C. A.; SANTOS, N. B.; D'AMICO, A. R.; FERNANDES, G. W.; QUESADA, M.; BRAGA, R. F.; NEVES, A. C. O. Effects of a Possible Pollinator Crisis on Food Crop Production in Brazil. **PLOS ONE**, [S.l.], v. 11, n. 11, p. e0167292, 2016.

ONAT, F. Y.; YEGEN, B. C.; LAWRENCE, R.; OKTAY, A.; OKLAY, S. Mad Honey Poisoning in Man and Rat. **Reviews on Environmental Health**, [S.l.], v. 9, n. 1, 1991.

PEDERSEN, P. L. Mitochondrial events in the life and death of animal cells: A brief overview. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, [S.l.], v. 31, n. 4, p. 291–304, 1999.

PHAM-DELEGUE, M. H.; DECOURTYE, A.; KAISER, L.; DEVILLERS, J. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. **Apidologie**, [S.l.], v. 33, n. 5, p. 425–432, 2002.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: IAPAR, 2005. p. 461–466

ROMAN, E. S. **Como funcionam os herbicidas da biologia à aplicação**. 21. ed: Passo Fundo: Berthier, 2005. p. 5

RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; HALM, M.; TOUFFET-BRIENS, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, [S.l.], v. 36, n. 1, p. 71–83, 2005.

SCHEFFLER, I. E. **Mitochondria**. Hoboken: Wiley-Liss, 2008. p. 462

SOUZA, L. D.; RODRIGUES, A. E.; PINTO, M. S. C. As Abelhas Como Agentes Polinizadores (The Bees Agents Pollinizer's). **Revista Eletrônica de Veterinária**, [S.l.], v.8, n.3, p.1–7, 2007. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/636/63613302010.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2022.

TENBROOK, P. L.; TJEERDEMA, R. S. Biotransformation of clomazone in rice (*Oryza sativa*) and early watergrass (*Echinochloa oryzoides*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S.l.], v. 85, n. 1, p. 38–45, 2006.

THOMPSON, H. M. Assessing the exposure and toxicity of pesticides to bumblebees (*Bombus* sp.). **Apidologie**, [S.l.], v. 32, n. 4, p. 305–321, 2001.

THOMPSON, H. M. Behavioral effects of pesticides in bees- their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, [S.l.], v. 12, n. 1-4, p. 317–330, 2002.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, Netherlands, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VAN DER STEEN, J. J. M. Review of the methods to determine the hazard and toxicity of pesticides to bumblebees. **Apidologie**, [S.l.], v. 32, n. 5, p. 399–406, 2001.

VELIKY, M. M.; VOUK, O. I.; APHONIUSHKI, T. A.; ZABABURINA, M. L.; GURSKA, N. I.; DROBOT, L. B. Redox state of nicotinamide nucleotides and antioxidant enzyme activities in C-27 hepatoma tissue and liver of tumor-bearing rats. **Experimental Oncology**, [S.l.], v. 23, n. 1, p. 39–42, 2001.

VERCESI, A. E. Mitocôndria: atp, calor e morte celular: **Ciência Hoje**, v. 34, n. 199, p. 16–23, 2003.

WALLACE, K. B.; STARKOV, A. A. Mitochondrial Targets of Drug Toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [S.l.], v. 40, n. 1, p. 353–388, 2000.

WILLIAMS, I. H. The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. **Agricultural Science Reviews**, [S.l.], v. 6, p. 229–257, 1994.

WOODCOCK, T. S. **Pollination in the agricultural landscape: best management practices for crop pollination**. [S. l.]: Canadian Pollination Initiative, 2012. Disponível em: https://seeds.ca/pollinator/bestpractices/images/Pollination%20in%20Agricultural%20Landscape_Woodcock_Final.pdf. Acesso em: 20 maio 2022.

ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; MACHADO, S. L. O.; GONÇALVES, F. F.; MARCHEZAN, E. Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Chromatographia**, [S.l.], v. 55, n. 9-10, p. 573–577, 2002. Acesso em: 20 maio. 2022.

ZIMMERMAN, J. J.; ARNIM, A. V. S. A.; MCLAUGHLIN, J. **Cellular Respiration**. 2015. Disponível em: <https://clinicalgate.com/cellular-respiration/>. Acesso em: 20 maio. 2022.