

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

Bruna Costa Ferreira da Cruz

Orientador: Milton Rönnau – Universidade Federal do Paraná.  
Trabalho de Conclusão de Curso.

## Resumo

As abelhas são consideradas as mais importantes no processo de polinização. As abelhas das espécies *Trigona spinipes* e *Tetragona clavipes* são abelhas sem ferrão que são encontradas em quase todo o território nacional e são polinizadores de diversas espécies vegetais. O presente trabalho teve como objetivo identificar o perfil eletroforético de esterases das fases de desenvolvimento de *T. spinipes* e *T. clavipes*. Foram coletadas abelhas operárias, pupas de cores de olhos diferentes e pré-pupas das duas espécies, provenientes de duas colônias no município de Palotina-PR. Após a separação e estocagem foi realizada a eletroforese PAGE, de cada operária foi retirada cabeça/tórax, as pré-pupas e as pupas foram utilizadas inteiras, as eletroforeses foram realizadas no sentido vertical em gel de poliacrilamida a 10% para *Trigona spinipes* e 8% para *Tetragona clavipes*. Na espécie *Trigona spinipes* foram detectadas oito regiões de atividade esterásica, a EST-1, EST-2, EST-3, EST-4 e EST-5 foram encontradas nas adultas, pupas de olho preto, vermelho, rosa e branco, e nas pré-pupas. A EST-6 foi observada apenas nas pupas de olho branco. A EST-7 foi detectada somente em extratos de pré-pupa. EST-8 foi encontrada na adulta e em todas as fases de pupas. Na espécie *Tetragona clavipes* foram detectadas sete regiões de atividade da esterase. A EST-1, EST-2 e EST-3 estavam presentes nas pupas de olho branco e preto. A EST-4, EST-5 e a EST-6 foram detectadas nas pré-pupas, pupas de olho branco e pupas de olho preto. A EST-7 foi observada em pré-pupas e pupas de olho branco. As duas espécies apresentaram perfis esterasicos diferentes entre algumas fases de desenvolvimento.

Palavras-Chave: Isoenzimas; Eletroforese; Esterases; Desenvolvimento.

## Abstract

*Biochemical characterization of Trigona spinipes (Fabricius, 1793) and Tetragona clavipes (Fabricius, 1804) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).*

Bees are considered the most important in the pollination process. The bees of the species *Trigona spinipes* and *Tetragona clavipes* are stingless bees that are found in almost all the national territory and are pollinators of diverse vegetal species. The present work had as objective to identify the electrophoretic profile of esterases of the

stages of development of *T. spinipes* and *T. clavipes*. Worker bees, pupae of different eye colors and pre-pupae of the two species were collected from two colonies in the county of Palotina-Paraná. After separation and storage, PAGE electrophoresis was performed, head / thorax was removed from each worker, pre-pupae and pupae were used whole, electrophoreses were performed vertically on 10% polyacrylamide gel for *Trigona spinipes* and 8 % for *Tetragona clavipes*. In the specie *Trigona spinipes*, eight regions of esterase activity were detected, EST-1, EST-2, EST-3, EST-4 and EST-5 were found in adults, black, red, pink and white pupae, and pre-pupae. EST-6 was observed only in the white-eyed pupae. EST-7 was detected only in pre-pupal extracts. EST-8 was found in adult and all phases of pupae. In the *Tetragona clavipes* species seven regions of esterase activity were detected. EST-1, EST-2 and EST-3 were present in white and black eye pupae. EST-4, EST-5 and EST-6 were detected in the pre-pupae, white-eye pupae and black-eye pupae. EST-7 was observed in pre-pupae and white-eyed pupae. The two species presented different esterasic profiles between some stages of development.

Keywords: Isoenzymes; Electrophoresis; Esterases; Development.

## INTRODUÇÃO

A reprodução de muitas espécies vegetais depende da polinização através de insetos, pássaros e morcegos, os insetos ainda são os principais polinizadores, entre os insetos, as abelhas solitárias e sociais fornecem a maior parte da polinização nos ecossistemas naturais e manejados, por causa de suas adaptações morfológicas para a coleta de pólen, são consideradas os polinizadores mais eficientes. Apesar do crescente reconhecimento de seu importante papel na polinização, a população e a diversidade de abelhas está diminuindo devido à perda de habitat causados pelas mudanças no uso da terra, aumento da monocultura e os impactos negativos de pesticidas e herbicidas. Durante os últimos anos estamos enfrentando uma “crise de polinização”, em alguns países, a demanda de polinização está aumentando, na mesma proporção que a oferta de polinizadores está diminuindo (ABROL, 2012).

As abelhas sem ferrão são os polinizadores de 40% a 90% das árvores nativas dependendo do local onde vivem. Portanto, essas abelhas são de extrema importância na

reprodução e na diversidade dos habitats (MICHENER, 2007). De acordo com Duarte et al., 2016, a tribo Meliponini são os mais importantes polinizadores do Continente Americano, já que, em grandes partes da América tropical as espécies dessa tribo, são as mais comuns, e enfatizam que o desmatamento e as construções civis estão fazendo com que essas abelhas desapareçam. Em muitos países, as populações de abelhas naturais já foram seriamente reduzidas pela atividade humana (MICHENER, 2007).

As abelhas apresentam quatro fases de desenvolvimento, embrionária, larval, pupal e adulta. As características morfológicas e fisiológicas das abelhas são distintas em cada uma das fases de desenvolvimento, assim, a necessidade metabólica também varia em cada fase de desenvolvimento, onde algumas enzimas podem apresentar atividades diferentes nas diferentes fases. Entre as enzimas do metabolismo intermediário podemos destacar as esterases, que participam de vários processos do organismo dos insetos (RUVOLO-TAKASUSUKI, 1994; RUVOLO-TAKASUSUKI et al., 2009)

As esterases são um grupo de enzimas hidrolíticas altamente polimórficas e multifuncionais. Nos mamíferos e nos insetos esse grupo é dividido em quatro classes com base em suas sensibilidades a três grupos de inibidores, sendo essas classes as acetilesterases, as arilesterases, as carboxilesterases e as colinesterases que incluem as acetilcolinesterases e as pseudocolinesterases. A variabilidade eletroforética das esterases tem sido utilizada em estudos de resistência a inseticidas, respostas a flutuações ambientais, estudos populacionais dinâmicos, estágios de desenvolvimento e diferenciação genética. Estas enzimas têm ação relevante no desenvolvimento dos insetos, pois apresentam variações qualitativas e quantitativas durante seu desenvolvimento. As necessidades metabólicas mudam durante o desenvolvimento, portanto certos genes estão ativos e outros inativos nas diferentes fases da vida, dessa forma, vários tipos de proteínas são formadas conforme a necessidade durante a diferenciação e metamorfose (BITONDI; MESTRINER, 1983; MILLER; NOVAK, 1983; HEALY; DUMANCIC; OAKESHOTT, 1991; GIGLIOLLI; LUCENA; LAPENTA, 2011; MARTINS-PARRA et al., 2016)

O presente trabalho teve como objetivos identificar o perfil eletroforético de esterases de *Trigona spinipes* e *Tetragona clavipes* e de suas fases de desenvolvimento,

bem como a realização de uma comparação do perfil de esterases das diferentes fases de desenvolvimento das espécies.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Abelhas**

Dentro da ordem Hymenoptera estão alojadas além das vespas e das formigas, as abelhas. As abelhas pertencem à família Apidae onde são reconhecidas sete subfamílias, 51 tribos e 27 subtribos. Dessas sete subfamílias, cinco ocorrem no Brasil (MELO; GONÇALVES, 2005; MICHENER, 2007; MELO; AGUIAR; GARCETE-BARRET, 2012). Sendo assim, a biodiversidade das abelhas é muito grande, no mundo existem cerca de 30 mil espécies (CARVALHO-ZILSE et al., 2005).

Grande parte das espécies de abelhas tem hábitos solitários, essas abelhas constroem seus próprios ninhos e cuidam da sua prole, assim não formam colônias, já a minoria é conhecida como abelhas sociais, essas sim formam colônias com duas ou mais fêmeas adultas, essas fêmeas têm divisões de trabalhos, como o forrageamento, o cuidado das crias e a guarda do ninho, já a rainha, que geralmente é maior que as operárias, têm a função de acasalar e deixar descendentes para a colônia (CARVALHO-ZILSE et al., 2005; MICHENER, 2007).

As abelhas sofrem metamorfose completa, passando pelo seu ciclo de vida pelos estádios de ovos, larvas, pupas e adultos, as pupas ainda passam por quatro ou cinco mudas, dependendo da espécie. Como na maioria dos Hymenoptera, os ovos de abelhas que foram fertilizados se desenvolvem em fêmeas e aqueles que não são fertilizados, ou seja, com número haplóide, se tornam machos. As larvas de abelhas são gânglios macios, esbranquiçados que crescem rapidamente, já as pupas constituem o estágio mais avançado da cria, elas têm a forma do inseto adulto, mas o seu tegumento ainda está em formação e as suas asas ainda não se expandiram (NOGUEIRA-NETO, 1997; MICHENER, 2007).

Dentro da família Apidae se encontra a subfamília Apinae, que é uma das mais diversas, pois contém mais tribos que qualquer outra. Portanto, sua biologia é altamente variável, nesse grupo de abelhas, são encontradas as de comportamento solitário até as altamente sociais (MICHENER, 2007). Todas as abelhas sem ferrão estão alocadas na

subfamília Apinae, dentro da tribo Meliponini, essa tribo é formada por mais de 300 espécies conhecidas em todo o mundo, encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais, uma das causas mais prováveis desse padrão de distribuição geográfica é a sensibilidade dos indivíduos e das colônias a baixas temperaturas. Assim, ocorrem nas Américas do Sul e Central, África, Sudoeste da Ásia e Austrália. No Brasil são nativas e estão presentes em todo o território nacional (FREITAS,2003; KLEINERT et al., 2009; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA,2002).

As abelhas sem ferrão, geralmente são de tamanho diminuto, sempre vivem em colônias e na maioria das vezes constroem ninhos em cavidades pré-existentes. Elas caracterizam-se por possuírem o ferrão atrofiado impossibilitando o seu uso, aliás, essa é a razão pela qual são popularmente chamadas de abelhas sem ferrão (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA,2002; FREITAS,2003 ). Em algumas espécies de abelhas sem ferrão, como é o caso de *Trigona spinipes* a coloração das abelhas operárias e dos machos é bem diferente da abelha adulta, sendo a adulta geralmente mais escura que as mais jovens (NOGUEIRA-NETO, 1997).

### ***Trigona spinipes***

*Trigona* é um dos maiores gêneros pertencentes à tribo Meliponini com espécies desde o norte da Argentina até o México, no Brasil ele abrange todo o território nacional. As abelhas desse gênero compartilham a presença de mandíbula com quatro ou cinco dentes e uma área de aparência sedosa na porção interna do basitarso posterior. Porém o grupo ainda necessita de revisão, devido a confusões taxonômicas existentes. No Brasil, a espécie *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) é encontrada do Ceará até o Rio Grande do Sul. Essa espécie também é conhecida com Irapuá, Arapuá ou Abelha Cachorro (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA; 2002; MICHENER, 2007; RIBEIRO; RODRIQUES; FERNANDES, 2009).

Uma colônia da abelha Irapuá (*T. spinipes*) pode conter 180.000 indivíduos. Por estarem presentes em muitos estados brasileiros e possuírem muitos indivíduos por colônias, essas abelhas são polinizadores de muitas espécies vegetais. Porém, elas vêm sendo consideradas uma praga agrícola devido ao seu hábito de destruir flores, folhas e frutos, a abelha corta a base das flores para coletar o néctar e o pólen, o que impede a frutificação (AZOUBEL et al., 1993; RIBEIRO; RODRIQUES; FERNANDES, 2009) .

As Irapuás (*T. spinipes*) constroem ninhos aéreos, com um formato externo ovalado, sendo mais alto do que largo, esses ninhos geralmente apresentam uma distância de aproximadamente 100m uns dos outros, já que essa abelha é considerada bastante territorialista (AZOUBEL et al., 1993).

Dentro de uma colmeia de *T. spinipes* são encontrados zangões, operárias e mais de uma rainha por ninho, porém apenas uma dessas rainhas tem a função de realizar a reprodução e postura de ovos de toda a colmeia. Essa abelha apresenta uma alimentação proveniente do mel, que é produzido do néctar e do pólen de flores, assim, como dito anteriormente são importantes polinizadores (CHIARADIA et al., 2003).

De acordo com Zucchi; Silveira e Nakano (1993) Os adultos da espécie *T. spinipes* tem um tamanho diminuto, medindo de 6 a 8mm de comprimento por 2,5mm de largura, são de coloração preta e têm as asas transparentes, Azoubel (1993) ainda cita que essas abelhas possuem a tíbia posterior ferrugínea. Este inseto, além de ser considerado uma praga agrícola, também é visto como uma abelha defensiva, quando se sente ameaçado possui o hábito de atacar e se alojar nos cabelos das pessoas e nos pelos dos animais.

### ***Tetragona Clavipes***

A outra abelha presente neste estudo (*Tetragona clavipes*) pertence ao gênero *Tetragona*, onde estão presentes 13 espécies distribuídas no Continente Americano do México ao Uruguai, no Brasil são encontradas oito espécies que estão praticamente restritas à Bacia Amazônica. Porém algumas espécies, como a *Tetragona Clavipes* (Fabricius,1804), apresentam uma distribuição maior, essa espécie é encontrada no Acre, Amazonas, Amapá, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA;2002).

Conhecida principalmente como Borá, mas também como Jataizão, Vorá e Cola-Cola. A abelha sem ferrão *T. clavipes* é muito conhecida pelos indígenas pelo nome tupi - Heborá. É uma espécie que faz seus ninhos em ocos de árvores, de preferências vivas. Possui colônias muito populosas e é considerada uma espécie bastante defensiva e territorialista, quando se sente ameaçada pode morder a pele ou se enrolar em cabelos e pelos (MONTEIRO, 2001).

As operárias da espécie *T. clavipes* possuem o corpo com 6 a 8mm de comprimento, cor dourada e abdômen com listras pretas, já os machos tem o corpo e as asas escurecidas. Por formarem colônias populosas, é uma espécie que coleta e armazena uma grande quantidade de néctar, pólen e resinas, tendo um potencial muito grande para o fornecimento desses produtos em escalas comerciais. O tubo para entrada do ninho é construído com a deposição de resinas vegetais e tem uma aparência disforme, que endurece com o passar do tempo, geralmente com aberturas verticais e uma inclinação da borda (CASTRO, 2012).

### **Marcadores Moleculares**

Na década de 70 houve o desenvolvimento de novas tecnologias como fusão de protoplastos, técnica do DNA recombinante, marcadores moleculares, entre outras. Como os marcadores morfológicos variam conforme as condições ambientais, apresentando limitações quanto ao seu uso eficiente, os marcadores moleculares foram bem aceitos pela comunidade científica, já que são baseados na análise de polimorfismo de enzimas e de fragmentos de DNA. Nos últimos anos têm aumentado a aplicação de marcadores moleculares na detecção da variabilidade genética, tanto em estudos genéticos como em programas de melhoramento genético. Os marcadores moleculares ainda podem ser divididos em marcadores bioquímicos e marcadores proteicos (BRAMMER, 2000).

Marcadores bioquímicos baseados em eletroforese de isoenzimas permitiram que muitas das dificuldades detectadas pelo uso dos marcadores morfológicos fossem resolvidas. Por definição, as isoenzimas compreendem diferentes formas moleculares de uma mesma enzima, com funções metabólicas específicas, e representam um grupo especializado de proteínas, estando presentes em todos os organismos. As isoenzimas são, de maneira geral, marcadores excelentes, pois, são marcadores de tipo co-dominante, o que possibilita a identificação de todos os alelos para um mesmo gene/loco, assim, o heterozigoto é facilmente reconhecido e a segregação pode ser acompanhada de maneira confiável. Numerosas aplicações da eletroforese de isoenzimas têm sido feitas. Entre elas estão a distinção entre variedades de interesse econômico, a identificação do genoma das espécies, o estudo das isoenzimas e suas relações com resistência ou suscetibilidade a doenças, a investigação das relações entre

as espécies, estudos de estruturação genética de populações, análises de paternidade e contaminações genéticas (BRAMMER, 2000; MALONE et al., 2007).

Existem vários métodos bioquímicos que detectam, isolam e distinguem as isoenzimas, porém a eletroforese é o mais eficiente, a técnica consiste na extração de proteínas ou enzimas de um tecido e na migração delas por um gel de poliacrilamida, submetido a uma corrente elétrica contínua. O sentido e a velocidade da migração é determinada pelo tamanho e carga das enzimas. Em seguida, a posição de uma enzima no gel pode ser verificada pela sua atividade, que é detectada por um sistema de coloração. A consequência disso é o aparecimento de uma ou mais bandas no gel, as distintas formas de uma mesma enzima, codificadas por diferentes alelos, podem ser detectadas em diferentes regiões do gel, caso apresentem diferentes mobilidades eletroforéticas (BORÉM; CAIXETA, 2009).

As esterases formam um grupo multifuncional e heterogêneo de isoenzimas que apresentam em comum a hidrólise de ésteres e outros compostos, como peptídios, amidas e haletos. As esterases têm sido estudadas em todos os tipos de seres vivos em estudos evolutivos e taxonômicos, por apresentarem diferenças em seus padrões enzimáticos. Nos insetos, as esterases ainda não tem sua função esclarecida, embora alguns autores mostrem o envolvimento dessas enzimas na regulação dos níveis do hormônio juvenil, e a capacidade dos insetos de metabolizar vários compostos agroquímicos, incluindo organofosforados (NASCIMENTO; BICUDO, 2002; GUPTA et al. 2005; WHEELOCK et al. 2005; PAULINO, 2008).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material**

Foram coletadas abelhas operárias adultas recém-emergidas, pupas e pré-pupas das espécies *Tetragona clavipes* e *Trigona spinipes* provenientes de alguns discos de crias de duas colônias localizados no município de Palotina-PR. Após a coleta houve a separação e a seleção das abelhas, que foram sacrificadas e estocadas em frascos devidamente identificados, a -20°C.

### Seleção de abelhas

As pupas foram retiradas das células dos discos de cria e separadas de acordo com a cor dos olhos, o processo foi feito utilizando um estereomicroscópio para a observação da coloração dos olhos. As pupas foram separadas em cinco categorias, sendo elas pupa de olho branco, pupa de olho rosa, pupa de olho vermelho, pupa de olho marrom e pupa de olho preto, como mostra na figura 1. O procedimento descrito a seguir foi realizado de acordo com a disponibilidade de abelhas que foram encontradas nas colônias.



Figura 1 - Pupas da espécie *Trigona spinipes* com fases diferentes de desenvolvimento. Pupa de olho branco, rosa, vermelho, marrom e preto, respectivamente.

Da espécie *Trigona spinipes* foram utilizadas abelhas adultas operárias recém-emergidas, pupas de olho preto, pupas de olho vermelho, pupas de olho rosa, pupas de olho branco e pré-pupas, como mostrado na figura 2. As pupas de olho marrom não foram encontradas em quantidade suficiente para realizar o procedimento.



Figura 2- Abelhas da espécie *Trigona spinipes*. Pré-pupas, pupa de olho branco, rosa, vermelho e preto, e adulta, respectivamente.

Já da espécie *Tetragona clavipes* foram utilizadas pupas de olho preto, pupas de olho branco e pré-pupas, as demais não foram encontradas em quantidade suficiente, observado na figura 3.



Figura 3- Abelhas da espécie *Tetragona clavipes*. Pré-pupas, pupa de olho branco e pupa de olho preto, respectivamente.

### **Preparo das amostras e eletroforese PAGE**

Após a separação e estocagem das abelhas foi realizada a eletroforese PAGE a fim de separar as esterases por sua diferença de tamanho e peso molecular. De cada operária foi retirada cabeça/tórax, as pré-pupas e as pupas foram utilizadas inteiras, as pupas foram homogeneizadas de acordo com a cor dos olhos, foram transferidas em tubos de propileno 1,5 mL contendo 40 $\mu$ L da solução de 2-mercaptoetanol mais glicerol a 10%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000xg por 10 min., a temperatura de 4°C.

A eletroforese foi realizada no sentido vertical e foram aplicados 20  $\mu$ L de sobrenadante de cada amostra em gel de poliacrilamida a 10% para *Trigona spinipes* e 8% para *Tetragona clavipes* para a corrida eletroforética. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Glicina 0,1M pH 8,3. Os géis foram submetidos à eletroforese em voltagem de aproximadamente 200V por 5h.

Para a realização da coloração, primeiramente, o gel foi incubado por 30 min em 50 mL da solução de tampão fosfato sódio (0,1M pH 6,2). Em seguida, o tampão foi

descartado e foi acrescentado a solução de coloração (50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,2; 0,03 g de  $\alpha$ -naftil acetato; 0,03 g de  $\beta$ -naftil acetato; 0,06 g do corante Fast Blue RR Salt).

## RESULTADOS

### *Trigona spinipes*

As Regiões de atividade de esterase foram denominadas numericamente de acordo com a sua mobilidade eletroforética, sendo a EST-1 a que apresentou maior migração. Na espécie *Trigona spinipes* foram detectadas oito regiões de atividade esterásica, a EST-1, EST-2, EST-3, EST-4 e EST-5 foram encontradas nas adultas, pupas de olho branco, rosa, vermelho e preto, e nas pré-pupas, ou seja, foram encontradas em todas as fases analisadas. A EST-6 foi observada apenas nas pupas de olho branco. A EST-7 foi detectada somente em extratos de pré-pupa. EST-8 foi encontrada na adulta e em todas as fases de pupas, não foi observada somente nas pré-pupas.

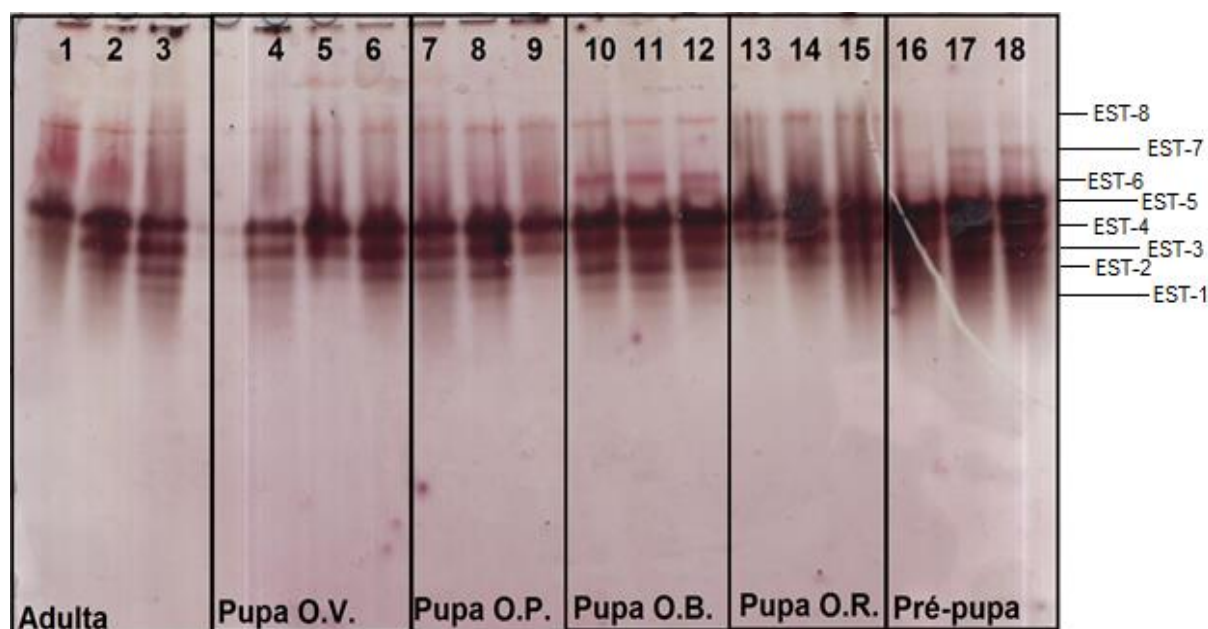


Figura 4- Perfil eletroforético de esterases de *Trigona spinipes* na fase adulta (1, 2 e 3), pupa de olho vermelho (4, 5 e 6), pupa de olho preto (7, 8 e 9), pupa de olho branco (10, 11 e 12), pupa de olho rosa (13, 14 e 15) e pré-pupa (16, 17 e 18), respectivamente.

### ***Tetragona Clavipes***

Na espécie *Tetragona clavipes* foram detectadas sete regiões de atividade da esterase. A EST-1, EST-2 e EST-3 estavam presentes nas pupas de olho branco e preto, não aparecendo nas pré-pupas. A EST-4, EST-5 e a EST-6 foram detectadas em todas as fases analisadas, sendo elas, pré-pupas, pupas de olho branco e pupas de olho preto. A EST-7 foi observada em pré-pupas e pupas de olho branco, não foi observada somente em pupas de olho preto.

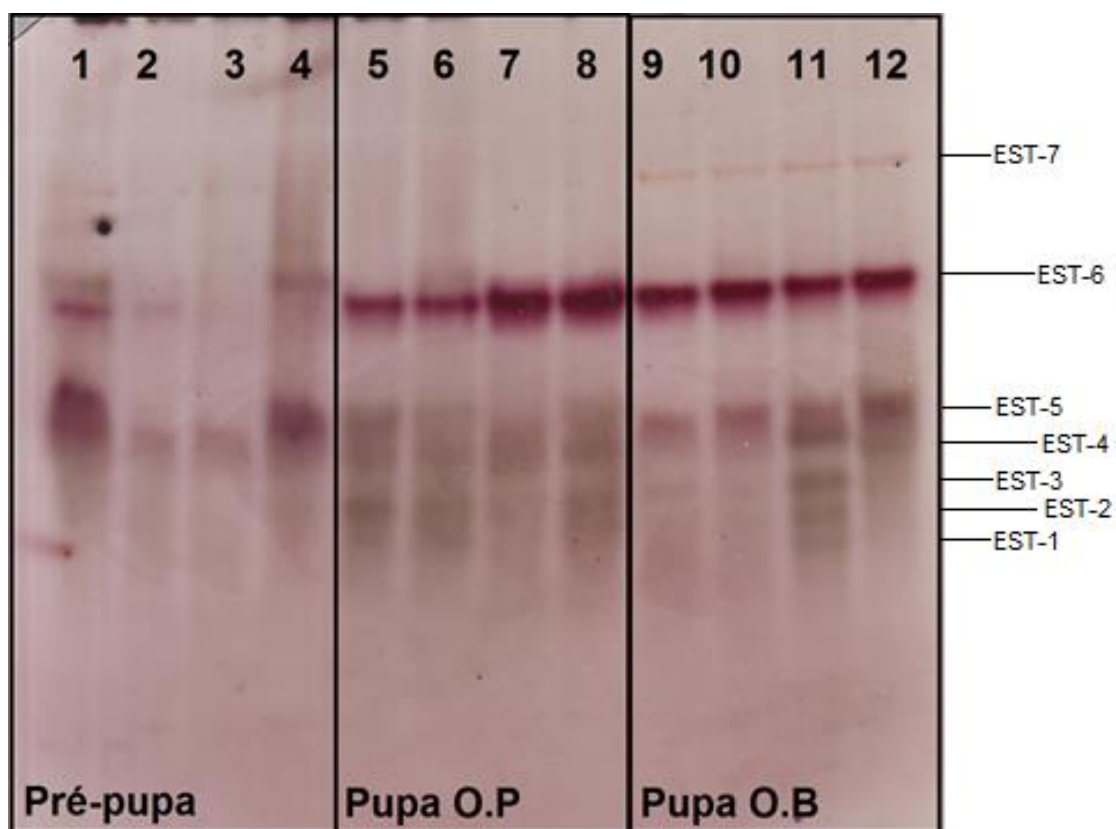


Figura 5- Perfil eletroforético de esterases de *Tetragona clavipes* na fase pré-pupa (1, 2, 3 e 4), pupas de olho preto (5, 6, 7 e 8) e pupas de olho branco (9, 10, 11 e 12).

Foram observadas diferenças entre as regiões esterásicas de *Trigona spinipes* e *Tetragona clavipes*, sendo oito regiões esterásicas para *Trigona spinipes* e sete para *Tetragona clavipes*.

## DISCUSSÃO

As atividades esterasicas apresentam diferenças entre as fases de desenvolvimento das duas espécies, podemos notar que o perfil esterastico não é o mesmo para as pré-pupas, as pupas de cores de olhos diferentes e os adultos. De acordo com Ruvulo-Takasusuki et al. (2006), que teve como um dos objetivos avaliar as diferenças de expressão de enzimas esterases na cabeça/tórax e no abdômen de *Tetragona clavipes*, foram encontrados os mesmos números de atividades de esterases presentes neste trabalho.

Todas as sete atividades de esterases estão presentes nas pupas de olho branco de *T. clavipes*, descrito anteriormente, podemos inferir que a EST-7 deixa de ser expressa em algum momento depois da fase de olho branco, podendo ser nas pupas de olho rosa, vermelho ou marrom, já que, na fase de olho preto a EST-7 já não se expressa. De acordo com o trabalho de Ruvulo-Takasusuki et al. (2006), ela volta a ser expressa nas adultas, já que as abelhas operárias adultas deste trabalho apresentaram 7 atividades de esterases. Portanto, as abelhas pré-pupas de *T. clavipes* apresentam somente as EST-4, EST-5, EST-6 e EST-7, passando em seguida para as pupas de olho branco, que apresentam todas as esterases, em algum momento entre as pupas de olho branco e as pupas de olho preto a EST-7 deixa de ser expressa, voltando a se expressar na fase adulta.

Em *Trigona spinipes* a EST-1, EST-2, EST-3, EST-4 e EST-5 aparecem em todas as fases de desenvolvimento, o que leva a crer que essas enzimas são de extrema importância para a vida dessas abelhas e não estão associadas a variações morfológicas nas diferentes fases de desenvolvimento, já a EST-6 e a Est-7 que aparecem respectivamente, somente nas pupas de olho branco e nas pré-pupas são enzimas específicas das primeiras fases de desenvolvimento, podendo ser responsável pelas características únicas dessas fases, por exemplo. A EST-8 está presente em todas as fases do desenvolvimento, menos nas pré-pupas, ela também poderia indicar o aparecimento de alguma característica que se encontra nas fases de pupas e adulta e que não esteja presente nas pré-pupas, como a definição do corpo em cabeça, tórax e abdômen, por exemplo.

O trabalho de Figueiredo et al. (1996), que teve como objetivo a investigação detalhada das variações qualitativas de isoenzimas esterase durante o desenvolvimento ontogenético de *A mellifera*, demonstrou variação da atividade isoenzimática durante o desenvolvimento e ainda permitiu enumerar sete fenótipos de acordo com a expressão das esterases, sendo eles: fenótipo embrionário; fenótipo larval jovem típico de larvas de L1 a L4; fenótipo de larvas L5; fenótipo de pré-pupas e pupas jovens; fenótipo de pupa no processo de pigmentação cuticular; fenótipo típico de pupas emergentes e adultos jovens; e fenótipo adulto, identificado pelas atividades de todas as esterases. Os fenótipos foram descritos pelo aparecimento ou desaparecimento de esterases, sendo agrupados no mesmo fenótipo as fases que apresentam perfil esterásico igual. Os sete conjuntos de esterase ou fenótipos descritos representam marcadores das fases de desenvolvimento, de modo que os eventos críticos, tais como a eclosão das larvas, fiação casulo e transição larva para pré-pupa, pigmentação cuticular, e finalmente, a emergência, são marcadas por alternância entre as atividades de esterase.

O mesmo pode ser percebido neste trabalho, em *T. spinipes* a EST-1, EST-2, EST-3, EST-4 e EST-5 estão presentes em todas as fases de desenvolvimento, a EST-6 aparece somente nas pupas de olho branco, tornando elas um fenótipo único, a mesma coisa acontece nas pré-pupas onde o aparecimento da EST-7 e ser única sem atividade da EST-8 também a tornam um fenótipo único, nas demais fases desenvolvimento todas apresentam a EST-8, salvo as pupas de olho branco, que também apresentam a EST-6. Todas as outras fases, de pupas de olho rosa até a adulta possuem o mesmo fenótipo, apresentando EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5 e EST-8, portanto a partir da pupa de olho branco, o fenótipo de esterases não sofre mais alterações. Diferente do estudo de Figueiredo et al. (1996) a adulta da espécie *T. spinipes* não apresentou todas as áreas de atividades esterásicas.

Na espécie *T. clavipes* as diferenças entre as fases de desenvolvimento também são notórias, cada uma das fases amostradas neste estudo apresentou diferença nos fenótipos de esterases, em pré-pupas encontramos um perfil sem a presença da EST-1, EST-2 e EST-3, nas pupas de olho branco há a presença de todas as sete atividades de esterases, e nas pupas de olho preto, como já dito anteriormente, somente a EST-7 não está expressa. No ninho de *T. clavipes* em que as abelhas foram coletadas não foi possível encontrar pupas de cores de olhos intermediários entre as pupas de olho branco

e olho preto, podemos inferir, observando o perfil de *T. spinipes*, que o perfil esterásico das pupas de olho rosa, vermelho e marrom provavelmente seria parecido com o perfil de pupas de olho branco ou de olho preto, portanto, possivelmente apresentando todas as atividades de esterases, ou exceto EST-7. Observando o trabalho de Ruvulotakasussuki, também já dito anteriormente, sabemos que nas adultas a EST-7 volta a ser expressa, formando então um perfil igual a das pupas de olho branco.

Assim como observamos perfis esterásicos diferentes entre as espécies adultas de *Trigona spinipes* e *Tetragona clavipes*, quando comparamos nossos resultados com outros autores confirmamos essas diferenças mesmo em espécies que são mais próximas. Exemplos dessa correlação são os estudos realizados por Stuchi et al. (2012) e Ronqui et al. (2016), que avaliaram abelhas do mesmo Gênero porém espécies diferentes sendo elas a *Tetragonisca angustula*, *Tetragonica fiebrigi* e *Tetragonisca weyrauchi*, os autores encontraram respectivamente 2, 3 e 6 áreas de atividades esterásicas para cada uma das espécies, a atividade portanto foi menor do que o encontrado para as duas espécies desse trabalho, sendo sete áreas esterásicas para *T. clavipes* e oito áreas esterásicas para *T. spinipes*.

## CONCLUSÃO

É possível concluir que existem diferenças entre as fases de desenvolvimento nas duas espécies. Nas abelhas da espécie *Trigona spinipes* as diferenças foram encontradas nas pré-pupas e nas pupas de olho branco, as pré-pupas demonstram maior diferença apresentando uma esterase a menos e uma a mais que as demais, já as pupas de olho branco apresentaram somente uma esterase a mais quando comparadas com as outras fases de desenvolvimento. Surpreendentemente as pré-pupas e as pupas de olho branco tiveram o perfil esterásico mais diferente entre todas as fases de desenvolvimento, era esperado que as fases mais próximas tivessem um perfil esterásico semelhante. Entre essas duas fases existe uma diferença de três esterases, uma presente na pré-pupa e ausente nas pupas de olho branco e duas presentes nas pupas de olho branco e ausentes nas pré-pupas. As pupas de olho rosa, vermelho, preto e a adulta apresentam o mesmo perfil de esterases. É possível inferir também, que a pupa de olho marrom, intermediária da pupa de olho preto e de olho vermelho, provavelmente teria o

mesmo perfil esterasico que está presente nas fases de desenvolvimento de pupa de olho rosa, vermelho, preto e adulta.

Na Espécie *Tetragona clavipes* as pré-pupas também apresentaram o perfil esterasico diferenciado quando comparado com as demais fases de desenvolvimento, apresentando somente quatro das sete esterases, as pupas de olho branco apresentaram todas as atividades esterasicas, mostrando que são iguais as adultas do trabalho de Ruvulo-Takasusuki et al. (2006), também surpreendentemente as pupas de olho preto apresentaram apenas seis esterases, mostrando ser diferentes das pupas de olho branco e das adultas, mesmo sendo uma fase intermediaria entre elas. Também é presumível que as pupas de olho rosa, vermelho e a marrom provavelmente apresentam um perfil esterasico igual ao das pupas de olho branco ou das pupas de olho preto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABROL, D.L. **Pollination biology: biodiversity conservation and agricultural production**. New York: Springer, 2012. 792p.

AZOUBEL, M. L. et al. **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: Edusp, 1993. 193p.

BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. 2000. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/852456/1/pdo03.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2018.

BITONDI, M. M. G.; MESTRINER, M. A. Esterase isozymes of *Apis mellifera*: Substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny, and electrophoretic variability. **Biochemical Genetics**, São Paulo, v. 21, n. 9/10, p.985-1001, nov. 1983. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/16535509\\_Esterase\\_isozymes\\_of\\_Apis\\_mellifera\\_Substrate\\_and\\_inhibition\\_characteristics\\_developmental\\_ontogeny\\_and\\_electrophoretic\\_variability](https://www.researchgate.net/publication/16535509_Esterase_isozymes_of_Apis_mellifera_Substrate_and_inhibition_characteristics_developmental_ontogeny_and_electrophoretic_variability)>. Acesso em: 25 jun. 2018

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2009. 532 p.

CARVALHO-ZILSE, G. A. et al. **Criação de abelhas sem ferrão**. Manaus: Provárzea/ibama, 2005. 17p. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/livros/criacaoabelhassemferrao.pdf>>. Acesso em: 09 maio 2018.

CASTRO, I. **Obtenção artificial de rainhas e estabelecimento de novas colônias de *Tetragona clavipes* (hymenoptera, apidade Meliponini)**. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Entomologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

CHIARADIA, L. A. et al. Dano e controle da abelha “Irapuá” em eucalipto. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 16, n. 1, p.60-62, mar. 2003.

DUARTE, R. S.; SOUZA, J.; SOARES, A. E. E. Nest Architecture of *Tetragona clavipes* (Fabricius) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**: An international journal on social insects, Ribeirão Preto, v. 2, n. 63, p.813-818, jun. 2016. Disponível em: <<http://periodicos.uefs.br/index.php/sociobiology/article/view/1019/833>>. Acesso em: 03 maio 2018.

FIGUEIREDO, V.L.C.; PAULINO-SIMÕES, Z.L.; BITONDI, M.M.G. Developmental pattern of esterases in *Apis mellifera* L honey bees. I. Stage-dependent changes of esterase isoenzymes in Africanized workers. **Apidologie**, 10, v. 27, n. 1, p.47-54, 19 jan.1996. Disponível em: <[https://www.apidologie.org/articles/apido/abs/1996/01/Apidologie\\_00448435\\_1996\\_27\\_1\\_ART0006/Apidologie\\_00448435\\_1996\\_27\\_1\\_ART0006.html](https://www.apidologie.org/articles/apido/abs/1996/01/Apidologie_00448435_1996_27_1_ART0006/Apidologie_00448435_1996_27_1_ART0006.html)>. Acesso em: 26 set. 2018.

FREITAS, B. M. **Meliponíneos: A Vida das Abelhas**. In: SIMPÓSIO DE HEMIPTERA, Fortaleza, 2003. Disponível em: <<http://www.abelhas.ufc.br/documentos/meliponineos.pdf>>

GIGLIOLLI, A.A.S.; LUCENA, A.L.M.; LAPENTA, A.S.. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESTERASES EM *Tribolium castaneum* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE). **Sabios-revista de Saúde e Biologia**, v. 6, n. 1, p.25-35, abr. 2011.

GUPTA, S.C.; SIDDIQUE, H.R.; SAXENA, D.K.; CHOWDHURI, D.K. Hazardous effect of organophosphate compound, dichlorvos in transgenic *D. melanogaster* (hsp70-lacZ): induction of hsp70n anti-oxidant enzymes and inhibition of acetylcholinesterase. **Biochem. Et Biophys. Acta**, v.1725, p.81-92, 2005.

HEALY, M. J.; DUMANCIC, M. M.; OAKESHOTT, J. G.. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Genetics**, v. 29, n. 7/8, p.365-388, abr. 1991. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/226370133>>. Acesso em: 25 jun. 2018.

KLEINERT, A.M.P. et al. Abelhas sociais (Bombini, Apini, Meliponini). In: PANIZZI, Antonio R.; PARRA, José R. P. (Ed.). **Bioecologia e Nutrição de Insetos**: Base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 371-424.

MALONE, G. et al. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ACESSOS DE ARROZ VERMELHO COLETADOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. **Pesq Agropec Trop**, Goiânia, v. 2, n. 37, p.77-85, jun. 2007. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/pat/article/viewFile/1823/1742>>. Acesso em: 19 ago. 2018.

MARTINS-PARRA, F. et al. PERFIL ESTERÁSICO DURANTE O DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO DE *Diatraea saccharalis* FABR. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE). **Sabios-revista de Saúde e Biologia**, São Paulo, v. 11, n. 3, p.17-27, dez. 2016.

MELO, G. A. R.; GONÇALVES, R. B. Higher-level bee classification and bee classifications (Hymenoptera) (Hymenoptera, Apoidea, Apoidea, Apidae sensu lato). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 22, n. 1, p.153-159, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbzool/v22n1/a17v22n1.pdf>>. Acesso em: 09 maio 2018.

MELO, G.A.R.; AGUIAR, A.P.; GARCETE-BARRET, B. R.. HYMENOPTERA. In: RAFAEL, José Albertino et al (Ed.). **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos, 2012. p. 547-612.

MICHENER, C. D. **The Bees of the World**. 2. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2007. 953p. Disponível em: <<http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Beekeeping/Thep-Bees-of-the-World.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2017. traduzido?

MILLER, S.; NOVAK, R. A COMPARATIVE STUDY OF ESTERASES IN TWO STRAINS OF ANOPHELTNE MOSQUITOES BY ISOELECTRIC FOCUSING. **International Journal Biochemistry**, v. 15, n. 12, p.1409-1415, fev. 1983.

MONTEIRO, W. R. **ABELHA BORÁ (Tetragona clavipes) (Fabricius)**. 2001. Disponível em: <<https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/61/nativas.htm>>. Acesso em: 22 maio 2018.

NASCIMENTO, A.P., BICUDO, H.E.M.C. Esterase patterns and phylogenetic relationships of Drosophila species in the saltans subgroup (saltans group). **Genetica**, v.114, p.41-51, 2002.

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

PAULINO, R. M. **Caracterização molecular e bioquímica de uma esterase macho-específica em Zaprionus indianus**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Genética, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

Disponível em: <[https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/92500/paulino\\_rm\\_me\\_sjrp.pdf?sequence=1](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/92500/paulino_rm_me_sjrp.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 18 set. 2018.

RIBEIRO, M. de F.; RODRIQUES, F.; FERNANDES, N. de S. ABELHA IRAPUÁ (*Trigona spinipes*): UMA POTENCIAL POLINIZADORA DA ROMÃ (*Punica granatum*)? **Congresso Nordestino de Apicultura e Meliponicultura e Feira da Cadeia Apícola**, Salvador, 04 nov. 2009. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/577413/1/ID41979.pdf>>. Acesso em: 21 abr. 2018.

RONQUI, L. et al. ELECTROPHORETIC AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *Tetragonisca weyrauchi* (Hymenoptera, Apidae) STINGLESS BEES ESTERASES. **Scientia Agraria Paranaensis**, Paraná, v. 15, n. 1, p.70-75,mar.2016.Disponível em:<<https://www.semanticscholar.org/paper/ELECTROPHORETIC-ANBIOCHEMICAL-CHARACTERIZATION-OF-Ronqui-Galhardo/1fa1328eb50b46b5afe5f82a699c126574043df2>>. Acesso em: 26 set. 2018.

RUVOLO-TAKSASUSUKI, M.C.C. **Caracterização genética de uma esterase sexo/específica de *Apis mellifera***. São Carlos: UFSCar, 1994, 120 p. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1994.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C. et al. CHARACTERIZATION OF ESTERASES IN *Tetragonisca angustula* AND *Tetragona clavipes* (HYMENOPTERA; MELIPONINAE). **J. Morphol. Sci.**, v. 3-4, n. 23, p.431-434,2006. Disponível em: <<http://www.jms.periodikos.com.br/article/587cb4647f8c9d0d058b464a>>. Acesso em: 26 set. 2018.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; LOPES, D. A.; TOLEDO, V. A. A.; HASHIMOTO, J. H. . Avaliação da utilização de larvas de abelhas Africanizadas (*Apis mellifera*) como bioindicadores da presença de resíduos de Thiamethoxam. **clickcientia**, São Carlos, 20 ago. 2009.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA E. A. B. 2002. **Abelhas brasileiras – Sistemática e Identificação**. Editora Composição e Arte, Minas Gerais, Brasil. 1ª edição, 253p.

STUCHI, A. L. P. B. et al. Molecular Marker to Identify Two Stingless Bee Species: *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera, Meliponinae). **Sociobiology**, v. 59, n. 1, p.123-134, 2012. Disponível em: <<http://periodicos.uefs.br/index.php/sociobiology/article/viewFile/671/551>>. Acesso em: 03 out. 2018.

WHEELLOCK, C.E.; SHAN, G.; OTTEA, J. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides, **J. Pestic. Sci.**, v.30(2), p.75-83, 2005.

ZUCCHI, R. A.; SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O. **Guia de Identificação de pragas Agrícolas**. Piracicaba: Fealq, 1993.