

	<b>MACROPROCESO DE APOYO</b>	<b>CÓDIGO: AAAR113</b>
	<b>PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO</b>	<b>VERSIÓN: 6</b>
	<b>DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	<b>VIGENCIA: 2021-09-14</b>
		<b>PAGINA: 1 de 13</b>

21.1

<b>FECHA</b>	lunes, 1 de agosto de 2022
--------------	----------------------------

Señores  
**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA**  
 BIBLIOTECA  
 Fusagasugá-Cundinamarca

<b>UNIDAD REGIONAL</b>	Sede Fusagasugá
<b>TIPO DE DOCUMENTO</b>	Trabajo De Grado
<b>FACULTAD</b>	Ciencias Agropecuarias
<b>NIVEL ACADÉMICO DE FORMACIÓN O PROCESO</b>	Pregrado
<b>PROGRAMA ACADÉMICO</b>	Zootecnia

El Autor(Es):

<b>APELLIDOS COMPLETOS</b>	<b>NOMBRES COMPLETOS</b>	<b>No. DOCUMENTO DE IDENTIFICACIÓN</b>
Porras Acero	Miguel Ángel	1020799215

Director(Es) y/o Asesor(Es) del documento:

<b>APELLIDOS COMPLETOS</b>	<b>NOMBRES COMPLETOS</b>
Granados Moreno	Jairo Enrique

Diagonal 18 No. 20-29 Fusagasugá – Cundinamarca  
 Teléfono: (091) 8281483 Línea Gratuita: 018000180414  
[www.ucundinamarca.edu.co](http://www.ucundinamarca.edu.co) E-mail: [info@ucundinamarca.edu.co](mailto:info@ucundinamarca.edu.co)  
 NIT: 890.680.062-2

*Documento controlado por el Sistema de Gestión de la Calidad  
 Asegúrese que corresponde a la última versión consultando el Portal Institucional*

	<b>MACROPROCESO DE APOYO</b>	<b>CÓDIGO: AAAR113</b>
	<b>PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO</b>	<b>VERSIÓN: 6</b>
	<b>DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	<b>VIGENCIA: 2021-09-14</b>
		<b>PAGINA: 2 de 13</b>

### TÍTULO DEL DOCUMENTO

Estudio de alteraciones bioquímicas de extractos proteicos de *Apis mellifera*, ocasionados por insecticidas sistémicos (Imidacloprid e Chlorpirifos)

### SUBTÍTULO

(Aplica solo para Tesis, Artículos Científicos, Disertaciones, Objetos Virtuales de Aprendizaje)

-

### EXCLUSIVO PARA PUBLICACIÓN DESDE LA DIRECCIÓN INVESTIGACIÓN

INDICADORES	NÚMERO
ISBN	
ISSN	
ISMN	

### AÑO DE EDICIÓN DEL DOCUMENTO

01/08/2022

### NÚMERO DE PÁGINAS

87

### DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS (Usar 6 descriptores o palabras claves)

ESPAÑOL	INGLÉS
1. <i>Apis mellifera</i>	<i>Apis mellifera</i>
2. Organofosforados	Organophosphates
3. Neocotinoides	Neonicotinoids
4. Estrés oxidativo	Oxidative stress
5. Catalasa	Catalase
6. Peroxidasa	Peroxidase

### FUENTES (Todas las fuentes de su trabajo, en orden alfabético)

10celula. (n.d.). *Las principales 16 partes de la célula y sus funciones*. Retrieved July 3, 2022, from <https://10celula.com/partes/>

Abejas Vivas. (2016). *Envenenamiento abejas*. <https://www.facebook.com/AbejasVivas/>

Alberts, B., Hopkin, K., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2021). *Introducción a la biología celular* (5a ed.). Panamericana.

Alcaldía de Fusagasuga. (2021). *Información Municipal*. <https://www.fusagasuga-cundinamarca.gov.co/Paginas/default.aspx>

Alcaldía Municipal Silvania. (2019). *Información del Municipio*. <https://www.silvania-cundinamarca.gov.co/MiMunicipio/Paginas/Informacion-del-Municipio.aspx>

ANLA. (2018). *Resolución N°00640 04*.

Balieira, K. V. B., Mazzo, M., Bizerra, P. F. V., Guimarães, A. R. de J. S., Nicodemo, D., & Mingatto, F. E. (2018). Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the

Diagonal 18 No. 20-29 Fusagasuga – Cundinamarca

Teléfono: (091) 8281483 Línea Gratuita: 018000180414

[www.ucundinamarca.edu.co](http://www.ucundinamarca.edu.co) E-mail: [info@ucundinamarca.edu.co](mailto:info@ucundinamarca.edu.co)

NIT: 890.680.062-2

	<b>MACROPROCESO DE APOYO</b>	<b>CÓDIGO: AAAR113</b>
	<b>PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO</b>	<b>VERSIÓN: 6</b>
	<b>DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	<b>VIGENCIA: 2021-09-14</b>
		<b>PAGINA: 3 de 13</b>

antioxidant action of caffeine. *Apidologie*, 49(5), 562–572. <https://doi.org/10.1007/S13592-018-0583-1>

Bartomeus, I., & Bosch, J. (2018). *Pérdida de polinizadores: evidencias, causas y consecuencias*. <https://doi.org/10.7818/ECOS.1542>

Benjamin, A., & McCalum, B. (2008). A world without bees. *A World without Bees*, vi + 298 pp. [https://books.google.com/books/about/A\\_World\\_Without\\_Bees.html?id=YzkgAQAAMAAJ](https://books.google.com/books/about/A_World_Without_Bees.html?id=YzkgAQAAMAAJ)

Bindoli, A., & Rigobello, M. P. (2013a). Peroxidase Biochemistry and Redox Signaling. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, 407–412. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00179-1>

Bindoli, A., & Rigobello, M. P. (2013b). Peroxidase Biochemistry and Redox Signaling. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, 407–412. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00179-1>

Blacquièrre, T., Smaghe, G., van Gestel, C. A. M., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 973–992. <https://doi.org/10.1007/S10646-012-0863-X>

Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., & Büchler, R. (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 86, 40–47. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2016.01.001>

Brom, M. (2015a). *Degradación de imidacloprid en cultivo de lechuga y reducción de residuos por medio de lavado*.

Brom, M. (2015b). *Degradación de imidacloprid en cultivo de lechuga y reducción de residuos por medio de lavado*. <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/644728>

Burge, K. (2017). *La célula. 8. Ciclo celular. Fase S. Atlas de Histología Vegetal y Animal*. <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/8-s.php>

Carlos, J., & Pérez, F. (2002). *Estudio del desarrollo post-embrionario en el ciclo holometabólico de la obrera de Apis mellifica mellifica L [Universidad complutense de Madrid]*. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/3146/>

Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1). [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152019000100091](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091)

Castro, G. (2013). Dependencia de la dosis en los mecanismos de toxicidad y la evaluación de riesgo en toxicología. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/1345>

Castro, R., Baquero, L., & Narváez, C. (2006). CATALASA, PEROXIDASA Y POLIFENOLOXIDASA DE PITAHAYA AMARILLA (*Acanthocereus pitajaya*). *Revista Colombiana de Química*, 11. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-28042006000100009](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28042006000100009)

CBQ. (2018, September 5). *INHIBICIÓN ENZIMÁTICA*. <https://clasesparticularescbq.com/2018/09/06/inhibicion-enzimatica/>

Céspedes, E., Hernández, I., & Llópiz, N. (1996). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Revista Cubana Invest Bioméd*, 15(2). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03001996000200001&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03001996000200001&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

Chainy, G. B. N., Paital, B., & Dandapat, J. (2016). An Overview of Seasonal Changes in Oxidative Stress and Antioxidant Defence Parameters in Some Invertebrate and Vertebrate Species. *Scientifica*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6126570>

	<b>MACROPROCESO DE APOYO</b>	<b>CÓDIGO: AAAR113</b>
	<b>PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO</b>	<b>VERSIÓN: 6</b>
	<b>DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	<b>VIGENCIA: 2021-09-14</b>
		<b>PAGINA: 4 de 13</b>

Chmiel, J. A., Daisley, B. A., Pitek, A. P., Thompson, G. J., & Reid, G. (2020). Understanding the Effects of Sublethal Pesticide Exposure on Honey Bees: A Role for Probiotics as Mediators of Environmental Stress. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 22. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2020.00022/BIBTEX>

Codling, G., Naggar, Y. al, Giesy, J. P., & Robertson, A. J. (2017). Neonicotinoid insecticides in pollen, honey and adult bees in colonies of the European honey bee (*Apis mellifera* L.) in Egypt. *Ecotoxicology* 2017 27:2, 27(2), 122–131. <https://doi.org/10.1007/S10646-017-1876-2>

Coneo, M. (2021, June 9). La producción anual del sector apícola solo cubre un tercio de la demanda nacional. *La Producción Anual Del Sector Apícola Solo Cubre Un Tercio de La Demanda Nacional*. <https://www.agronegocios.co/agricultura/la-produccion-anual-del-sector-apicola-solo-cubre-un-tercio-de-la-demanda-nacional-3198053#>

Constanza, L., María, M., & Ariza, M. (2012). *Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno*.

Constanza, L., & Muñoz, M. (2010). *Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno*.

Corona, M., & Robinson, G. E. (2006a). Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 687. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.2006.00695.X>

Corona, M., & Robinson, G. E. (2006b). Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 687. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.2006.00695.X>

Cruces, E. (2016). *LOS NEONICOTINOIDES Y SU USO SEGURO EN LA AGRICULTURA*.

Decio, P., Miotelo, L., Pereira, F. D. C., Roat, T. C., Marin-Morales, M. A., & Malaspina, O. (2021). Enzymatic responses in the head and midgut of Africanized *Apis mellifera* contaminated with a sublethal concentration of thiamethoxam. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 223, 112581. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112581>

EPA, E. P. A. (2012). *Ecological Effects Test Guidelines - OCSPP 850.3020: Honey Bee Acute Contact Toxicity Test*. <http://www.epa.gov/ocspp>

EPA, E. P. A. (2014). *Guía de evaluación de riesgos de plaguicidas para las abejas*. <http://www.epa.gov/espp/consultation/ecorisk-overview.pdf>

Felipe, L., García, J., & Larios, H. M. (2003). El estrés oxidativo actúa como activador de la muerte celular. In L. Gaona (Ed.), *Biología Celular y Molecular* (1st ed.). Pearson Educación.

Feng, M., Ramadan, H., Han, B., Fang, Y., & Li, J. (2014). Hemolymph proteome changes during worker brood development match the biological divergences between western honey bees (*Apis mellifera*) and eastern honey bees (*Apis cerana*). *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-563>

Fent, K., Haltiner, T., Kunz, P., & Christen, V. (2020). Insecticides cause transcriptional alterations of endocrine related genes in the brain of honey bee foragers. *Chemosphere*, 260, 127542. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.127542>

Forêt, S., Wanner, K. W., & Maleszka, R. (2007). Chemosensory proteins in the honey bee: Insights from the annotated genome, comparative analyses and expression profiling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2006.09.009>

Gebicki, S., & Gebicki, J. M. (1999). Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides. *Biochemical Journal*, 338(Pt 3), 629. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3380629>

Gianazza, E., Eberini, I., Palazzolo, L., & Miller, I. (2021). Hemolymph proteins: An overview across marine arthropods and molluscs. *Journal of Proteomics*, 245, 104294. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2021.104294>

	<b>MACROPROCESO DE APOYO</b>	<b>CÓDIGO: AAAR113</b>
	<b>PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO</b>	<b>VERSIÓN: 6</b>
	<b>DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	<b>VIGENCIA: 2021-09-14</b>
		<b>PAGINA: 5 de 13</b>

Giannuzzi, L. (2018). *Toxicología general y aplicada*. Universidad Nacional de La Plata (EDULP) . <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/1031>

Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6229). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1255957>

Guacaneme, D., Orozco, V., Moreno, E., & Chaparro, L. (2014). *Organofosforados y Carbamatos Características generales y probleas generados por la utilización de estos plaguicidas*. <https://es.scribd.com/document/444144946/Organofosforados-y-carbamatos-caracteris-docx>

Gunasekara, A. S., Truong, T., Goh, K. S., Spurlock, F., & Tjeerdema, R. S. (2007). Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticide Science*, 32(3), 0706180001–0706180001. <https://doi.org/10.1584/JPESTICS.R07-02>

Gusman-Novoa, ernesto, Correa, A., Espinosa, L., & Gusman, guadalupe. (2011). Colonización, impacto y control de las abejas melíferas africanizadas en México. *Veterinaria México*, 42(2), 149–178. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0301-50922011000200005&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0301-50922011000200005&script=sci_abstract)

Hatjina, F., Papaefthimiou, C., Charistos, L., Dogaroglu, T., Bouga, M., Emmanouil, C., & Arnold, G. (2013). Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie 2013 44:4*, 44(4), 467–480. <https://doi.org/10.1007/S13592-013-0199-4>

He, B., Liu, Z., Wang, Y., Cheng, L., Qing, Q., Duan, J., Xu, J., Dang, X., Zhou, Z., & Li, Z. (2021). Imidacloprid activates ROS and causes mortality in honey bees (*Apis mellifera*) by inducing iron overload. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 228, 112709. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112709>

Hodgson, E., & Blake, B. (2010). TOXICANT EFFECTS ON THE NERVOUS SYSTEM. In Ernest Hodgson (Ed.), *A TEXTBOOK OF MODERN TOXICOLOGY THIRD EDITION* (3rd ed., pp. 308–323). Wiley-Interscience.

Huerta, T. (2021). *Catalasa*. <https://www.udocz.com/apuntes/165446/catalasa>

Hurtado, C., & Gutierrez, M. (2005). ENFOQUE DEL PACIENTE CON INTOXICACIÓN AGUDA POR PLAGUICIDAS ORGANOS FOSFORADOS. *Revista Facultad de Medicina*, 53, 244–258. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-00112005000400006&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-00112005000400006&script=sci_abstract&tlng=es)

Registro Nacional de Plaguicidas Químicos de uso Agrícola, (2021).

IRAC. (2019). *Clasificación del modo de acción de insecticidas y acaricidas Nueva versión incluyendo los bio-insecticidas*.

Jones, A. K., & Sattelle, D. B. (2010). Diversity of Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 683, 25–43. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6445-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6445-8_3)

Kairo, G., Biron, D. G., ben Abdelkader, F., Bonnet, M., Tchamitchian, S., Cousin, M., Dussaubat, C., Benoit, B., Kretschmar, A., Belzunces, L. P., & Brunet, J. L. (2017). Nosema ceranae, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08380-5>

Knecht, D., & Kaatz, H. H. (1990). Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie*, 21(5), 457–468. <https://doi.org/10.1051/APIDO:19900507>

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–650. <https://doi.org/10.1080/01926230290166724>

	<b>MACROPROCESO DE APOYO</b>	<b>CÓDIGO: AAAR113</b>
	<b>PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO</b>	<b>VERSIÓN: 6</b>
	<b>DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	<b>VIGENCIA: 2021-09-14</b>
		<b>PAGINA: 6 de 13</b>

Lamela, L. (2018). *Efecto de adyuvantes en propiedades físicas deposición y eficiencia de control de insecticidas en soja aplicado en diferentes condiciones meteorológicas*. Universidad de la republica.

Lara, J. (2018). Capítulo II: Toxinología descriptiva - Unidad I: Himenóptero - La abeja apis mellifera. In *Biología, toxicología y terapéutica de especies venenosas de interés veterinaria en nicaragua* (pp. 39–77).

Lehninger, A., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2018). *Principios de bioquímica: Lehninger / David L. Nelson, Michael M. Cox; coordinador de la traducción, Claudi M. Cuchillo - Universidad de Almería* (7<sup>o</sup> Edición). OMEGA. [https://indaga.ual.es/discovery/fulldisplay/alma991001582209704991/34CBUA\\_UAL:VU1](https://indaga.ual.es/discovery/fulldisplay/alma991001582209704991/34CBUA_UAL:VU1)

Li, J., Li, H., Zhang, Z., & Pan, Y. (2007). Identification of the proteome complement of high royal jelly producing bees (*Apis mellifera*) during worker larval development. *Apidologie*, 38(6), 545–557. <https://doi.org/10.1051/APIDO:2007047>

Martin-Culma, N. Y., & Arenas-Suárez, N. E. A.-S. E. (2018). Daño colateral en abejas por la exposición a pesticidas de uso agrícola. *Entramado*, 14(1), 232–240. <https://doi.org/10.18041/ENTRAMADO.2018V14N1.27113>

Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., & Sattelle, D. B. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11), 573–580. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01820-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01820-4)

Mengoni, C. (2017). *Efecto de agroquímicos sobre el comportamiento de abejas jóvenes (Apis mellifera)*.

Migdał, P., Murawska, A., Strachecka, A., Bieńkowski, P., & Roman, A. (2020). Changes in the Honeybee Antioxidant System after 12 h of Exposure to Electromagnetic Field Frequency of 50 Hz and Variable Intensity. *Insects*, 11(10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/INSECTS11100713>

Mitton Giulia. (2019). *Resistencia a xenobióticos y procesos de detoxificación. Estudios moleculares en Varroa destructor y Apis mellifera* [Universidad Nacional de Mar del Plata-CONICET]. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/80403>

Nieto, A., Roberts, S., Kemp, J., Rasmont, P., Kuhlmann, M., Criado, M. G., Biesmeijer, J. C., Bogusch, P., Dathe, H., de La Rúa, P., de Meulemeester, T., Dehon, M., Dewulf, A., Javier Ortiz-Sánchez, F., Lhomme, P., Pauly, A., Potts, S. G., Praz, C., Quaranta, M., ... Michez, D. (2014). *European Red List of Bees*. <https://doi.org/10.2779/77003>

Nufarm. (2012). *CLORPYRIFOS AGROGEN 480 EC - Ficha técnica comercial*.

Núñez, A. (2015). Participación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial en la respuesta a la isquemia y reperfusión miocárdica de ratas hipertensas espontáneas (SHR). *Naturalis*. <http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20150320001393><http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Nuño, A. (2020). *ARN, la molécula que puede sacarnos de esta pandemia*. <https://elpais.com/ciencia/2020-11-28/arn-la-molecula-que-puede-sacarnos-de-esta-pandemia.html>

Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test, Pub. L. No. 214, 1 (1998). <https://doi.org/10.1787/9789264070189-EN>

Padrón, J. (2020). *Los perfiles de hidrocarburos cuticulares en abejas: analisis de la viabilidad como potenciales marcadores del cambio global*. Universidad de la Laguna.

Parra, L. (2016). *Efectos subletales de los insecticidas clorpirifós y acetamiprid en sistemas enzimáticos de cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: tortricidae) del Valle de Rio Negro y Neuquén*. <http://rdi.uncoma.edu.ar/handle/uncomaid/178>

Pech; Elma. (2019). *Influencia nutricional en el sistema de defensa de Apis mellifera*. <https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1441>

	<b>MACROPROCESO DE APOYO</b>	<b>CÓDIGO: AAAR113</b>
	<b>PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO</b>	<b>VERSIÓN: 6</b>
	<b>DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	<b>VIGENCIA: 2021-09-14</b>
		<b>PAGINA: 7 de 13</b>

Picco, E., Rodríguez, C., & Boggio, J. C. (2011). *CLORPIRIFÓS: ASPECTOS CINÉTICOS A CONSIDERAR EN SU USO CLÍNICO COMO ANTIPARASITARIO EN VETERINARIA*.

Pistorius, J., Bischoff, G., Heimbach, U., & Stahler, M. (2010). Bee poisoning incidents in Germany in Spring 2008 caused by abrasion of active substance from treated seeds during sowing of maize. *Hazards of Pesticides to Bees*. <https://www.researchgate.net/publication/265354853>

Pizarro, R., & Montenegro, G. (2012). *Colmenas (millones) 31 Las claves del Síndrome de Despoblamiento de Colmenas*.

Quintín, N. (2010). *Extracción de la fracción proteica utilizando dos solventes (agua y tris hcl) y determinación de la actividad antimicrobiana a los extractos sobre las cepas escherichia coli, bacillus subtilis, pseudomonas sp y staphylococcus aureus - a partir de hojas de pentacalia nítida (fam. asteraceae)* [Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8445>

Quiroz, C. (2019). *Intoxicación Por Organofosforados*. <https://pdfcookie.com/documents/laboratorio-5-intoxicacion-por-organofosforadosdocx-k2p8kmz4g0l9>

Ramírez, J. (2021). *Aplicación de tratamientos térmicos en la conservación de alimentos y su efecto sobre agentes patógenos y enzimas* [Universidad técnica de machala]. [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/17332/1/E-4939\\_RAMIREZ%20MALDONADO%20JOSE%20MANUEL.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/17332/1/E-4939_RAMIREZ%20MALDONADO%20JOSE%20MANUEL.pdf)

Ritacco, M. (2015). *Procesos metabólicos en insectos*.

Rodríguez, M. (2019). *DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE PESTICIDAS SOBRE ABEJA MELÍFERA ADULTA*.

Sabench, J. (2011). *PESTICIDAS Y ABEJAS*.

Salgado, Y. (2019). *IMPACTOMETABÓLICOEINSECTICIDASSISTÉMICOS(FIPRONILEIMIDACLOPRID)Y NOSISTÉMICOS(CLORPIRIFOS)SOBRELEESTRÉSOSOXIDATIVOENApis mellifera* [Universidad de Cundinamarca]. [www.ucundinamarca.edu.co](http://www.ucundinamarca.edu.co)

Senthilkumar, M., Amaresan, N., & Sankaranarayanan, A. (2021). *Estimation of Peroxidase (POD)*. 123–125. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0\\_31](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0_31)

Solano, M. (2014). *Organofosforados, pesticida y arma química*. <http://homeostasisufv.blogspot.com/2014/03/organofosforados-pesticida-y-arma.html>

Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2000). Characteristics of imidacloprid toxicity in two Apis mellifera subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(7), 1901–1905. <https://doi.org/10.1002/ETC.5620190726>

Tomlin, C. (2009). *The pesticide manual: a world compendium* (15. ed., Issue June). BCPC Publications. [www.irc-online.org](http://www.irc-online.org)

Trum, B., & Berezsky, I. (2020). Lesión celular y muerte celular. In *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo* (Vol. 1, pp. 1458–1460). Chantal Dufresne.

UC, U. de cantabria. (2018, April 13). *MC-F-007. Capítulo 7. Daño oxidativo y envejecimiento. 7.1 El Envejecimiento Como Fenómeno Biológico*. <https://ocw.unican.es/mod/page/view.php?id=708>

Uchoa, L., & Carneiro, J. (2003). *Basic histology: text & atlas*. Lange Medical Books, McGraw-Hill, Medical Pub. Division.

UNA. (2020). *Manuela de plaguicidas de centroamérica*. <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/331-imidacloprid>

Uniprot. (2003). *Catalase - Apis mellifera ligustica (Common honeybee)*. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8I9W0>

UNR. (2016). *Inhibidores enzimáticos*.

	<b>MACROPROCESO DE APOYO</b>	<b>CÓDIGO: AAAR113</b>
	<b>PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO</b>	<b>VERSIÓN: 6</b>
	<b>DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	<b>VIGENCIA: 2021-09-14</b>
		<b>PAGINA: 8 de 13</b>

UNSAM. (2018). *Trabajo Práctico N°2: Cinética Enzimática*.

Vásquez, E., Ballesteros, H., Tello, J., Castañeda, J. S., Calvo, E. N., Ortega, C. N., & Riveros, E. L. (2011). *Polinización dirigida con abejas apis mellifera: Tecnología para el mejoramiento de la producción de cultivos con Potencial exPortador NACIONAL*. [www.produmedios.org](http://www.produmedios.org)

Wang, X., Martínez, M. A., Wu, Q., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., Anadón, A., & Yuan, Z. (2016). Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Critical Reviews in Toxicology*, 46(10), 876–899. <https://doi.org/10.1080/10408444.2016.1223014>

Weirich, G. F., Collins, A. M., & Williams, V. P. (2002). Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 33(1), 3–14. <https://doi.org/10.1051/APIDO:2001001>

Wilde, J., Frączek, R. J., Siuda, M., Bąk, B., Hatjina, F., & Miszczak, A. (2016). The influence of sublethal doses of imidacloprid on protein content and proteolytic activity in honey bees (*Apis mellifera* L.). [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/00218839.2016.1211394](http://Dx.Doi.Org/10.1080/00218839.2016.1211394), 55(2), 212–220. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1211394>

Williams, G. R., Alaux, C., Costa, C., Csáki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., Fries, I., Kuhn, R., McMahon, D. P., Medrzycki, P., Murray, T. E., Natsopoulou, M. E., Neumann, P., Oliver, R., Paxton, R. J., Pernal, S. F., Shutler, D., Tanner, G., van der Steen, J. J. M., & Brodschneider, R. (2015). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. [Https://Doi.Org/10.3896/IBRA.1.52.1.04](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.04), 52(1), 1–36. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.04>

Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139–162. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1994.74.1.139>

Zhang, W., Chen, W., Li, Z., Ma, L., Yu, J., Wang, H., Liu, Z., & Xu, B. (2018). Identification and characterization of three new cytochrome P450 genes and the use of RNA interference to evaluate their roles in antioxidant defense in *apis cerana cerana fabricius*. *Frontiers in Physiology*, 9(NOV), 1608. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.01608/BIBTEX>

	MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAR113
	PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 6
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2021-09-14
		PAGINA: 9 de 13

## RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLÉS

(Máximo 250 palabras – 1530 caracteres, aplica para resumen en español):

### Resumen en español:

Las abejas son uno de los organismos más importantes en la polinización de ecosistemas colombianos; sin embargo, el uso indiscriminado de pesticidas en monocultivos contribuye al síndrome de colapso de colmenas de abejas (CCD). Por este sentido, se realizó un estudio in vitro con abejas de la especie *Apis mellifera*, en los laboratorios de la Universidad de Cundinamarca, evaluando diferentes dosis subletales (DL50) de insecticidas del grupo de neocotinoides (Imidacloprid) y organofosforados (Chlorpyrifos). Con el fin de encontrar cambios bioquímicos en enzimas antioxidantes como catalasa (CAT) y peroxidasa (POD), involucradas en mecanismos metabólicos de desintoxicación se expusieron abejas dérmicamente a DL50, determinando su actividad enzimática y su concentración de proteínas totales ([PT]).

Los resultados obtenidos indican diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0.005$ ) en la actividad de CAT y POD entre el tratamiento control y los insecticidas Imidacloprid y Chlorpyrifos. El comportamiento de actividad de CAT y POD entre dosis presentó cambios significativos en las DL50. La [PT] mostró estadísticamente una dualidad entre los valores de Imidacloprid y Chlorpyrifos encontrando una diferencia significativa en la expresión de proteínas de cada insecticida; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas entre las DL50 aplicadas.

A partir de estos resultados, se evidenciaron efectos estresantes en el metabolismo de abejas *Apis mellifera*, comprobando el daño celular que se ocasiona al usar insecticidas altamente tóxicos y su afectación en insectos polinizadores.

### Resumen en Ingles:

Bees are one of the most important organisms in the pollination of Colombian ecosystems; however, the indiscriminate use of pesticides in monocultures contributes to bee colony collapse syndrome (HCS). In this sense, an in vitro study was carried out with bees of the species *Apis mellifera*, in the laboratories of the University of Cundinamarca, evaluating different sublethal doses (LD50) of insecticides from the group of neocotinoids (Imidachlorprid) and organophosphates (Chlorpyrifos). In order to find biochemical changes in antioxidant enzymes such as catalase (CAT) and peroxidase (POD), involved in metabolic mechanisms of detoxification, bees are exposed dermally to LD50, determining their enzymatic activity and their concentration of total grains ([PT]).

The results obtained indicate highly significant statistical differences ( $p < 0.005$ ) in the activity of CAT and POD between the control treatment and the insecticides Imidacloprid and Chlorpyrifos. The behavior of CAT and POD activity between doses of significant changes presented in the DL50. The [PT] statistically showed a duality between the values of Imidacloprid and Chlorpyrifos, finding a significant difference in the protein expression of each insecticide; however, no statistical differences were found between the LD50 applied.

From these results, stressful effects on the metabolism of *Apis mellifera* bees were evidenced, verifying the cellular damage caused by using highly toxic insecticides and their affectation in pollinating insects.

 <b>UDECA</b> UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA	<b>MACROPROCESO DE APOYO</b>	<b>CÓDIGO: AAAR113</b>
	<b>PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO</b>	<b>VERSIÓN: 6</b>
	<b>DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	<b>VIGENCIA: 2021-09-14</b>
		<b>PAGINA: 10 de 13</b>

## AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Por medio del presente escrito autorizo (Autorizamos) a la Universidad de Cundinamarca para que, en desarrollo de la presente licencia de uso parcial, pueda ejercer sobre mí (nuestra) obra las atribuciones que se indican a continuación, teniendo en cuenta que, en cualquier caso, la finalidad perseguida será facilitar, difundir y promover el aprendizaje, la enseñanza y la investigación.

En consecuencia, las atribuciones de usos temporales y parciales que por virtud de la presente licencia se autoriza a la Universidad de Cundinamarca, a los usuarios de la Biblioteca de la Universidad; así como a los usuarios de las redes, bases de datos y demás sitios web con los que la Universidad tenga perfeccionado una alianza, son: Marque con una "X":

AUTORIZO (AUTORIZAMOS)	SI	NO
1. La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer.	X	
2. La comunicación pública, masiva por cualquier procedimiento o medio físico, electrónico y digital.	X	
3. La inclusión en bases de datos y en sitios web sean éstos onerosos o gratuitos, existiendo con ellos previa alianza perfeccionada con la Universidad de Cundinamarca para efectos de satisfacer los fines previstos. En este evento, tales sitios y sus usuarios tendrán las mismas facultades que las aquí concedidas con las mismas limitaciones y condiciones.	X	
4. La inclusión en el Repositorio Institucional.	X	

De acuerdo con la naturaleza del uso concedido, la presente licencia parcial se otorga a título gratuito por el máximo tiempo legal colombiano, con el propósito de que en dicho lapso mi (nuestra) obra sea explotada en las condiciones aquí estipuladas y para los fines indicados, respetando siempre la titularidad de los derechos patrimoniales y morales correspondientes, de acuerdo con los usos honrados, de manera proporcional y justificada a la finalidad perseguida, sin ánimo de lucro ni de comercialización.

Para el caso de las Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía, de manera complementaria, garantizo(garantizamos) en mi(nuestra) calidad de estudiante(s) y por ende autor(es) exclusivo(s), que la Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía en cuestión, es producto de mi(nuestra) plena autoría, de mi(nuestro) esfuerzo personal intelectual, como consecuencia de mi(nuestra) creación original particular y, por tanto, soy(somos) el(los) único(s) titular(es) de la misma. Además, aseguro (aseguramos) que no contiene citas, ni transcripciones de otras obras protegidas, por fuera de los límites

	<b>MACROPROCESO DE APOYO</b>	<b>CÓDIGO: AAAR113</b>
	<b>PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO</b>	<b>VERSIÓN: 6</b>
	<b>DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	<b>VIGENCIA: 2021-09-14</b> <b>PAGINA: 11 de 13</b>

autorizados por la ley, según los usos honrados, y en proporción a los fines previstos; ni tampoco contempla declaraciones difamatorias contra terceros; respetando el derecho a la imagen, intimidad, buen nombre y demás derechos constitucionales. Adicionalmente, manifiesto (manifestamos) que no se incluyeron expresiones contrarias al orden público ni a las buenas costumbres. En consecuencia, la responsabilidad directa en la elaboración, presentación, investigación y, en general, contenidos de la Tesis o Trabajo de Grado es de mí (nuestra) competencia exclusiva, eximiendo de toda responsabilidad a la Universidad de Cundinamarca por tales aspectos.

Sin perjuicio de los usos y atribuciones otorgadas en virtud de este documento, continuaré (continuaremos) conservando los correspondientes derechos patrimoniales sin modificación o restricción alguna, puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación de los derechos patrimoniales derivados del régimen del Derecho de Autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “*Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores*”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables. En consecuencia, la Universidad de Cundinamarca está en la obligación de RESPETARLOS Y HACERLOS RESPETAR, para lo cual tomará las medidas correspondientes para garantizar su observancia.

**NOTA:** (Para Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía):

**Información Confidencial:**

Esta Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía, contiene información privilegiada, estratégica, secreta, confidencial y demás similar, o hace parte de la investigación que se adelanta y cuyos resultados finales no se han publicado.

**SI \_\_\_ NO \_X\_.**

En caso afirmativo expresamente indicaré (indicaremos) en carta adjunta, expedida por la entidad respectiva, la cual informa sobre tal situación, lo anterior con el fin de que se mantenga la restricción de acceso.

**LICENCIA DE PUBLICACIÓN**

Como titular(es) del derecho de autor, confiero(erimos) a la Universidad de Cundinamarca una licencia no exclusiva, limitada y gratuita sobre la obra que se integrará en el Repositorio Institucional, que se ajusta a las siguientes características:

a) Estará vigente a partir de la fecha de inclusión en el repositorio, por un plazo de 5 años, que serán prorrogables indefinidamente por el tiempo que dure el derecho

Diagonal 18 No. 20-29 Fusagasugá – Cundinamarca

Teléfono: (091) 8281483 Línea Gratuita: 018000180414

[www.ucundinamarca.edu.co](http://www.ucundinamarca.edu.co) E-mail: [info@ucundinamarca.edu.co](mailto:info@ucundinamarca.edu.co)

NIT: 890.680.062-2

	<b>MACROPROCESO DE APOYO</b>	<b>CÓDIGO: AAAR113</b>
	<b>PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO</b>	<b>VERSIÓN: 6</b>
	<b>DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	<b>VIGENCIA: 2021-09-14</b>
		<b>PAGINA: 12 de 13</b>

patrimonial del autor. El autor podrá dar por terminada la licencia solicitándolo a la Universidad por escrito. (Para el caso de los Recursos Educativos Digitales, la Licencia de Publicación será permanente).

b) Autoriza a la Universidad de Cundinamarca a publicar la obra en formato y/o soporte digital, conociendo que, dado que se publica en Internet, por este hecho circula con un alcance mundial.

c) Los titulares aceptan que la autorización se hace a título gratuito, por lo tanto, renuncian a recibir beneficio alguno por la publicación, distribución, comunicación pública y cualquier otro uso que se haga en los términos de la presente licencia y de la licencia de uso con que se publica.

d) El(Los) Autor(es), garantizo(amos) que el documento en cuestión es producto de mi(nuestra) plena autoría, de mi(nuestro) esfuerzo personal intelectual, como consecuencia de mi (nuestra) creación original particular y, por tanto, soy(somos) el(los) único(s) titular(es) de la misma. Además, aseguro(aseguramos) que no contiene citas, ni transcripciones de otras obras protegidas, por fuera de los límites autorizados por la ley, según los usos honrados, y en proporción a los fines previstos; ni tampoco contempla declaraciones difamatorias contra terceros; respetando el derecho a la imagen, intimidad, buen nombre y demás derechos constitucionales. Adicionalmente, manifiesto (manifestamos) que no se incluyeron expresiones contrarias al orden público ni a las buenas costumbres. En consecuencia, la responsabilidad directa en la elaboración, presentación, investigación y, en general, contenidos es de mí (nuestro) competencia exclusiva, eximiendo de toda responsabilidad a la Universidad de Cundinamarca por tales aspectos.

e) En todo caso la Universidad de Cundinamarca se compromete a indicar siempre la autoría incluyendo el nombre del autor y la fecha de publicación.

f) Los titulares autorizan a la Universidad para incluir la obra en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

g) Los titulares aceptan que la Universidad de Cundinamarca pueda convertir el documento a cualquier medio o formato para propósitos de preservación digital.

h) Los titulares autorizan que la obra sea puesta a disposición del público en los términos autorizados en los literales anteriores bajo los límites definidos por la universidad en el “Manual del Repositorio Institucional AAAM003”

i) Para el caso de los Recursos Educativos Digitales producidos por la Oficina de Educación Virtual, sus contenidos de publicación se rigen bajo la Licencia Creative Commons: Atribución- No comercial- Compartir Igual.

	<b>MACROPROCESO DE APOYO</b>	<b>CÓDIGO: AAAr113</b>
	<b>PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO</b>	<b>VERSIÓN: 6</b>
	<b>DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	<b>VIGENCIA: 2021-09-14</b>
		<b>PAGINA: 13 de 13</b>



j) Para el caso de los Artículos Científicos y Revistas, sus contenidos se rigen bajo la Licencia Creative Commons Atribución- No comercial- Sin derivar.



**Nota:**

Si el documento se basa en un trabajo que ha sido patrocinado o apoyado por una entidad, con excepción de Universidad de Cundinamarca, los autores garantizan que se ha cumplido con los derechos y obligaciones requeridos por el respectivo contrato o acuerdo.

La obra que se integrará en el Repositorio Institucional está en el(los) siguiente(s) archivo(s).

Nombre completo del Archivo Incluida su Extensión (Ej. Nombre completo del proyecto.pdf)	Tipo de documento (ej. Texto, imagen, video, etc.)
1.	
2.	
3.	
4.	

En constancia de lo anterior, Firmo (amos) el presente documento:

APELLIDOS Y NOMBRES COMPLETOS	FIRMA (autógrafo)
Porras Acero Miguel Ángel	

21.1-51-20.



**UDECA**  
UNIVERSIDAD DE  
CUNDINAMARCA

**Estudio de alteraciones  
bioquímicas de extractos proteicos  
de *Apis mellifera*, ocasionados por  
insecticidas sistémicos  
(Imidacloprid e Chlorpyrifos)**

**Miguel Ángel Porras Acero**

Universidad de Cundinamarca  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Programa: Zootecnia  
Fusagasugá, Cundinamarca

2022

Estudio de alteraciones bioquímicas de extractos  
proteicos de *Apis mellifera*, ocasionados por  
insecticidas sistémicos (Imidacloprid e Chlorpyrifos).

Miguel Ángel Porras Acero

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Zootecnista**

**Director:**

MSc, Jairo Enrique Granados Moreno, PhD(c)  
L. Química

**Codirector:**

Zootecnista Paola Salgado García

Universidad de Cundinamarca  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Programa: Zootecnia  
Fusagasugá, Cundinamarca

2022

*“No hay ninguna diferencia fundamental entre el hombre y los animales en su capacidad de sentir placer y dolor, felicidad y miseria”.*

*Charles Darwin.*

## **Agradecimientos**

Será difícil describir en tan corta página el agradecimiento que tengo por mi familia quien me ha apoyado en cada proceso académico de mi vida personal a pesar de las adversidades que encontré durante mi formación, por lo cual el primer agradecimiento es para mi padre y madre por apoyarme con mucho amor y cariño. A mi hermano quien ha sido mi apoyo emocionalmente y quien me aconsejo en cada uno de mis pasos que di en este lindo proceso.

Gracias a la universidad de Cundinamarca, en especial a la decana de la facultad de ciencias agropecuarias, Dra Vilma Moreno Melo y al profesor Jairo Enrique Granados por su apoyo conceptual, metodológico y procedimental para hacer realidad este trabajo. Igualmente quisiera extender mis agradecimientos para Yenny Paola Salgado García por su disposición y colaboración con el material utilizado en este ensayo también dando gracias a mis profesores de trabajo de grado del programa de zootecnia, quienes me ayudaron en mi proceso formativo profesional ; Así mismo, también quiero agradecer de manera fraternal al profesor Nelson Arenas quien me demostró que la investigación se hace con el corazón y no por motivos banales, al profe Andrés Mogollón le doy gracias por su apoyo en procesos académicos y en cuestiones éticas y morales que siempre nos acomplejan a medida que se iban presentando obstáculos difíciles de resolver pero no imposibles de solucionar. A cada uno de ellos les agradezco su esfuerzo el cual me gustaría replicar y que en este trabajo se vea valorado de la mejor manera.

A todas las personas que me acompañaron, les agradezco por su apoyo y constancia al estar en momentos difíciles y compartir muchas experiencias enriquecedoras en mi vida a todos ellos:

iiiGracias Totales!!!

## **Dedicatoria**

Este trabajo de grado está dedicado a:

A mi padre Miguel por apoyarme en todos los procesos profesionales de mi vida, sin el no hubiera sido posible este sueño del mismo modo le dedico este trabajo a mi madre Lucia por brindarme todo su amor y soporte durante muchas dificultades durante este estudio. Por otro lado le dedico este trabajo de investigación a mi hermano quien fue mi mayor pilar por su amor, enseñanzas y sacrificio en todos estos años.

A todas las personas que me apoyaron en la universidad para que se realice con éxito todos los logros de este trabajo los cuales compartieron sus conocimientos y abrieron sus puertas sin esperar nada a cambio.

## Resumen

Las abejas son uno de los organismos más importantes en la polinización de ecosistemas colombianos; sin embargo, el uso indiscriminado de pesticidas en monocultivos contribuye al síndrome de colapso de colmenas de abejas (CCD). Por este sentido, se realizó un estudio in vitro con abejas de la especie *Apis mellifera*, en los laboratorios de la Universidad de Cundinamarca, evaluando diferentes dosis subletales (DL50) de insecticidas del grupo de neocotinoides (Imidacloprid) y organofosforados (Chlorpyrifos). Con el fin de encontrar cambios bioquímicos en enzimas antioxidantes como catalasa (CAT) y peroxidasa (POD), involucradas en mecanismos metabólicos de desintoxicación se expusieron abejas dérmicamente a DL50, determinando su actividad enzimática y su concentración de proteínas totales ([PT]).

Los resultados obtenidos indican diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0.005$ ) en la actividad de CAT y POD entre el tratamiento control y los insecticidas Imidacloprid y Chlorpyrifos. El comportamiento de actividad de CAT y POD entre dosis presentó cambios significativos en las DL50. La [PT] mostró estadísticamente una dualidad entre los valores de Imidacloprid y Chlorpyrifos encontrando una diferencia significativa en la expresión de proteínas de cada insecticida; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas entre las DL50 aplicadas.

A partir de estos resultados, se evidenciaron efectos estresantes en el metabolismo de abejas *Apis mellifera*, comprobando el daño celular que se ocasiona al usar insecticidas altamente tóxicos y su afectación en insectos polinizadores.

**Palabras clave:** *Apis mellifera*, Organofosforados, Neocotinoides, Estrés oxidativo, Catalasa, Peroxidasa, Proteínas totales.

## Abstract

Bees are one of the most important organisms in the pollination of Colombian ecosystems; however, the indiscriminate use of pesticides in monocultures contributes to bee colony collapse syndrome (HCS). In this sense, an in vitro study was carried out with bees of the species *Apis mellifera*, in the laboratories of the University of Cundinamarca, evaluating different sublethal doses (LD50) of insecticides from the group of neocotinoids (Imidachlorprid) and organophosphates (Chlorpyrifos). In order to find biochemical changes in antioxidant enzymes such as catalase (CAT) and peroxidase (POD), involved in metabolic detoxification mechanisms, bees were dermally exposed to LD50, determining their enzymatic activity and total protein concentration ([PT]).

The results obtained indicate highly significant statistical differences ( $p < 0.005$ ) in the activity of CAT and POD between the control treatment and the insecticides Imidacloprid and Chlorpyrifos. The activity behavior of CAT and POD between doses presented significant changes in the LD50. The [PT] statistically showed a duality between the values of Imidacloprid and Chlorpyrifos, finding a significant difference in the protein expression of each insecticide; however, no statistical differences were found between the LD50 applied.

From these results, stressful effects on the metabolism of *Apis mellifera* bees are evidenced, verifying the cellular damage caused by using highly toxic insecticides and their affectation in pollinating insects.

**Keywords:** *Apis mellifera*, Organophosphates, Neocotinoids,; Oxidative stress, Catalase, Peroxidase, Total Proteins.

## Resumo

As abelhas são um dos organismos mais importantes na polinização dos ecossistemas colombianos; entretanto, o uso indiscriminado de agrotóxicos em monoculturas contribui para a síndrome do colapso das colônias de abelhas (SCH). Nesse sentido, foi realizado um estudo *in vitro* com abelhas da espécie *Apis mellifera*, nos laboratórios da Universidade de Cundinamarca, avaliando diferentes doses subletais (DL50) de inseticidas do grupo dos neocotinóides (Imidacloprid) e organofosforados (Clorpirifós). A fim de encontrar alterações bioquímicas em enzimas antioxidantes como a catalase (CAT) e a peroxidase (POD), envolvidas nos mecanismos metabólicos de desintoxicação, as abelhas foram expostas dermicamente à LD50, determinando sua atividade enzimática e concentração de proteína total ([PT]).

Os resultados obtidos indicam diferenças estatísticas altamente significativas ( $p < 0,005$ ) na atividade de CAT e POD entre o tratamento controle e os inseticidas Imidacloprid e Clorpirifós. O comportamento da atividade de CAT e POD entre as doses apresentou alterações significativas no LD50. O [PT] mostrou estatisticamente uma dualidade entre os valores de Imidacloprid e Clorpirifós, encontrando diferença significativa na expressão proteica de cada inseticida; no entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas entre o LD50 aplicado.

A partir desses resultados, foram evidenciados efeitos estressantes sobre o metabolismo de abelhas *Apis mellifera*, verificando-se os danos celulares causados pelo uso de inseticidas altamente tóxicos e sua afetação em insetos polinizadores.

**Palavras chave:** *Apis mellifera*, Organofosforados, Neonicotinóides, Estresse oxidativo, Catalase; peroxidase, Proteínas totais.

## CONTENIDO

1	Resumen .....	6
2	Abstract .....	7
3	Resumo .....	8
4	Introducción .....	12
5	Planteamiento del problema .....	16
1.1.	Apicultura colombiana con <i>Apis mellifera</i> .....	16
6	Justificación .....	18
7	Objetivo general .....	19
7.1	Objetivos específicos .....	19
8	Marco conceptual .....	20
8.1	Sociedad de las abejas .....	20
8.2	<i>Apis mellifera</i> .....	20
8.2.1	Funcionamiento del sistema nervioso .....	22
8.3	Estrés oxidativo .....	23
8.3.1	Radicales libres. ....	23
8.4	Especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	24
8.5	Proteínas .....	26
8.6	Proteínas y aminoácidos en los insectos .....	27
8.7	Mecanismos Regulación .....	28
8.7.1	Daño oxidativo en ADN .....	28
8.8	Sistema de defensa antioxidante .....	30
8.8.1	Enzimas .....	31
8.9	Peroxidasa (POD) .....	32
8.10	Catalasa (CAT) .....	33
8.10.1	Actividad enzimática reguladoras .....	34
8.10.2	Efectos de los inhibidores sobre la actividad enzimática .....	35
8.10.3	Neonicotinoides .....	38
8.10.4	Imidacloprid .....	39
8.10.5	Organofosforados .....	41
8.10.6	Chlorpyrifos .....	42
9	Materiales y métodos .....	43
9.1	Localización del experimento .....	43
9.1.1	Selección de unidades experimentales .....	43
9.2	Preparación Solución Madre Insecticidas (STOCK) .....	45
9.2.1	Imidacloprid Y Chlorpyrifos .....	45
9.3	Diseño experimental y tratamientos .....	45
9.4	Modelo matemático del diseño aplicado .....	47
9.5	Análisis estadístico utilizado .....	47
9.6	Dosificaciones insecticidas .....	47
9.7	Inducción al estrés oxidativo .....	48
9.8	Análisis de indicadores metabólicos .....	49
9.9	Extracción de enzimas .....	50
9.10	Determinación actividad catalasa (CAT) .....	50
9.11	Determinación superóxido dismutasa (POD) .....	51
9.12	Extracción de proteína .....	51
9.12.1	Cuantificación de proteína en extractos concentrados .....	52
9.12.2	Extracción de proteínas de abejas tratadas con imidacloprid .....	52
10	Resultados y discusión .....	54
10.1.1	Propiedades fisicoquímicas de los insecticidas .....	54

10.2	Proteína total ([PT]).....	55
10.3	Catalasa (CAT).....	62
10.4	Peroxidasa (POD).....	65
10.5	Discusión de Resultados .....	71
10.6	Conclusiones.....	72
10.7	Recomendaciones.....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Reporte de abejas envenenadas años 2016, 2017 y 2018 .....	16
Figura 2.	Clasificación jerárquica y distinción morfológica de la abeja según su casta ...	20
Figura 3.	Sistema nervioso Apis mellífera .....	21
Figura 4.	Radicales libres y su clasificación.....	24
Figura 5.	Funcionamiento de radiales libres .....	25
Figura 6.	Biosíntesis y funciones proteicas.....	26
Figura 7.	Representación daño oxidativo de especies reactivas de oxígeno (ROS) en ADN 29	
Figura 8.	Tipos de antioxidantes .....	30
Figura 9.	Modelo actuación de enzimas llave–cerradura (modelo de Fischer) .....	35
Figura 10.	Inhibición enzimática irreversible.....	36
Figura 11.	Estructura molecular imidacloprid .....	38
Figura 12.	Mecanismo acción Imidacloprid en receptores nicotínicos en la membrana post-sináptica .....	39
Figura 13.	Mecanismo de acción molécula neocotinoide.....	40
Figura 14.	Mecanismo de acción de una molécula pereciente a un organofosforado.....	41
Figura 15.	Formula molecular Chlorpyrifos .....	42
Figura 16.	Ubicación laboratorios universidad de Cundinamarca .....	43
Figura 17.	Metodología para la toma de abejas del portanucleo .....	44
Figura 18.	Preparación solución madre de insecticidas .....	45
Figura 19.	Abejas criopreservadas .....	49
Figura 20.	Curva de calibración BSA .....	52
Figura 21.	Concentración de proteína total en extractos por tratamiento .....	55
Figura 22.	Distribución de datos en concentración de proteína total en tratamientos .....	56
Figura 23.	[PT] entre DL50 en Apis mellifera .....	58
Figura 24.	Electroforesis SDS-PAGE en dosis .....	59
Figura 25.	Actividad de CAT entre tratamientos .....	63
Figura 26.	Actividad de CAT entre DL50.....	63
Figura 27.	Comportamiento actividad CAT .....	64
Figura 28.	Actividad de POD entre tratamientos .....	66

Figura 29. Actividad de POD entre DL50 control y Imidacloprid .....	67
Figura 30. Actividad de POD entre DL50 control y Imidacloprid .....	67
Figura 31. Comportamiento de actividad de POD de tratamientos.....	68
Figura 32. Dispersión de observaciones en actividad POD con DL50 Imidacloprid .....	69
Figura 33. Dispersión de observaciones en actividad POD con DL50 Chlorpyrifos .....	70

### LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental .....	46
Tabla 2. Diseño experimental .....	46
Tabla 3. Dosis letales por contacto .....	48
Tabla 4. Variables metabólicos .....	50
Tabla 5. Absorbancia BSA.....	51
Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de los ingredientes activos en los ensayos.....	54
Tabla 7. Tabla Valores promedios de entre tratamientos de [PT] .....	58
Tabla 8. Análisis electroforesis SDS-PAGE.....	60
Tabla 9. Pesos moleculares de extractos analizados .....	62
Tabla 10. Valores promedios de entre tratamientos de actividad de CAT .....	62
Tabla 11. Valores promedios de entre tratamientos de actividad POD .....	66

### LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Colony Collapse Disorder
DL	Dosis Letal
DL50	Dosis Subletal
nAChR	Neurotransmisor de Acetilcolina
RL	Radicales Libres
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RBE	Reacciones Bioquímicas Enzimáticas
CAT	Catalasa
POD	Peroxidasa
[PT]	Concentración Proteína Total
AChE	Acetilcolinesterasa
REDOX	Oxido Reducción
[SE]	Complejo Enzima-Sustrato
SNC	Sistema Nervioso Central

## 1 Introducción

La intensificación agrícola para responder a la seguridad alimentaria ha ocasionado el uso de agroquímicos para repeler e interrumpir el desarrollo de plantas, hongos e insectos no benéficos para monocultivos (Sabench, 2011). La modificación del ambiente por parte de agroquímicos ha alterado los sistemas de interacción de polinizadores con especies vegetativas, generando un declive en poblaciones de escarabajos (Coleópteros), mariposas, polillas (Lepidópteros), saltamontes (Ortópteros), avispas (Véspidos), hormigas (Formicidae) y abejas (Himenópteros) (Bartomeus & Bosch, 2018), lo descrito anteriormente, ha generado un efecto antrópico, el cual ha originado un conflicto entre agricultura industrial y especies silvestres polinizadoras, debido al uso de agroquímicos que generan daños biológicos y ambientales (Goulson et al, 2015).

*Apis mellifera* o abeja de miel es una especie principalmente utilizada para la producción de miel y otros subproductos que se producen en menor cantidad como lo son el propóleo, polen, cera o jalea real. Esta especie también es utilizada en algunos casos para servicios ecosistémicos como la polinización de cultivos para así aumentar la cantidad de frutos y dar un mejor resultado en cuanto al peso, formación y contenido de azúcar (°Brix) en frutas. También se mejoran los índices productivos de derivados apícolas entre un 20 y 60%, superior en producción de miel y polen obtenidos con este servicio, mejorando productivamente ambos sectores (Vásquez et al., 2011).

La contaminación por agroquímicos en sistemas biológicos ha sido uno de los factores determinantes en la disminución de poblaciones de abejas, estimando que el 37% de poblaciones europeas se han reducido en los últimos años (Nieto et al., 2014) generado un síndrome llamado colony collapse disorder (CCD) o Síndrome de despoblamiento de colmenas (SDC) (Pizarro & Montenegro, 2012), el cual puede tener varias causas asociadas a este trastorno, como la deforestación de su ambiente, enfermedades causadas por

parásitos o patógenos, agricultura extensiva y pérdida del hábitat e intoxicación (Benjamin & McCalum, 2008). Este efecto nocivo se asocia a pesticidas sistémicos como los neonicotinoides y organofosforados donde podemos encontrar sus principios activos como el thiametoxam, carbofuran, imidacloprid, fipronil, etc.(ICA, 2021). La melitofilia producida por cultivos genera que las abejas pecoreadoras transporten al apiario partículas intrínsecas de plaguicidas sistémicos, los cuales causan un efecto de intoxicación, produciendo una infestación de dosis subletales en abejas pecoreadoras y contaminando el alimento del panal, esto desencadena trastornos motrices y metabólicos e iniciando un deterioro gradual en su capacidad sensorial, olfativa, fisiológica y nerviosa. Provocando lentamente un desequilibrio a tal punto de generarle la muerte por intoxicación (Gunasekara et al., 2007).

La toxicidad de plaguicidas se cuantifica según la dosificación del agroquímico y el método de aplicación; utilizando una métrica expresada como dosis letal (DL) y dosis subletal (DL50), la cual hace referencia a la cantidad de un determinado material (insecticida) que cause la muerte del 50% de un grupo de unidades experimentales (abejas). Estas dosis tóxicas se determinan según la especie, edad y tipo de exposición (oral o vía dérmica) (Chmiel et al., 2020).

La toxicología de abejas ha presentado desafíos provenientes de la continua fabricación de nuevas moléculas tóxicas, dirigidas hacia un grupo de insectos diana, sin tener en cuenta los efectos secundarios que ocasionan en ecosistemas naturales y organismos que habitan en este. La utilización indiscriminada de plaguicidas convencionales como neonicotinoides y organofosforados en plantas, produce la biotransformación de este, teniendo el componente activo del insecticida como mecanismo para atacar el sistema nervioso central (SNC) del insecto diana; sin embargo, el sistema de defensa de la planta no diferencia entre insectos beneficiosos como polinizadores, los

cuales son afectados por el polen o el néctar contaminado por estas moléculas orgánicas llamadas metabolitos secundarios (Compuesto químico sintetizado por la planta) vinculados con procesos en el estrés oxidativo (Constanza et al., 2012).

Los neonicotinoides son insecticidas sistémicos derivados de la nicotina, clasificados como moduladores competitivos del receptor nicotínico de la acetilcolina (ACh) en donde encontramos insecticidas como Acetamiprid, Clotianidina, Tiacloprid, Tiametoxam e Imidacloprid, los cuales tienen como mecanismo de acción unir moléculas neurotóxicas a receptores nicotínicos del neurotransmisor acetilcolina (nAChR) en la membrana postsináptica abriendo canales de Na<sup>+</sup>. No obstante, nAChR no puede ser degradada por la enzima acetilcolinesterasa que naturalmente se encarga de regular esta vía metabólica, desencadenando una serie de síntomas como la hiperexcitación y alteración con letargia de parálisis neuromuscular (IRAC, 2019).

Los plaguicidas como los organofosforados presentan un mecanismo de acción tóxico en el sistema nervioso sináptico, enlazándose en forma covalente con la acetilcolinesterasa, inhibiendo su actividad enzimática celular hidrolítica de ACh dando como efecto la acumulación de este neurotransmisor nAChR, produciendo una sobre estimulación continua en conexiones neuromusculares, causando la hiperexcitación (Nufarm, 2012).

La exposición dosis sub letales origina un efecto llamado hormesis el cual es definido por Castro (2013) como “respuesta a una dosis de algún elemento, que se caracteriza por una estimulación por bajas dosis y una inhibición por dosis altas” durante o después de la exposición a una toxina, la cual está relacionada con los metabolitos secundarios, esta transición mecánica saturable origina una serie de respuestas biológicas las cuales pueden variar dependiendo de la concentración de la dosis, pueden ser por absorción de moléculas transportadoras específicas a través del espacio intravascular hasta

el tejido donde se biotransforma el compuesto mediante procesos enzimáticos los cuales redistribuyen el xenobiótico tratándolo de eliminar para así restaurar la célula blanco de la toxina.

La abeja de miel del género *Apis mellifera* cuenta con un mecanismo de defensa enzimático, responsable de la desintoxicación de toxinas causantes de especies reactivas de oxígeno (ROS) relacionadas con la peroxidación de lípidos y daño de proteínas, que generan procesos como la apoptosis celular y la pérdida de la actividad enzimática. Los sistemas para eliminar este tipo de ROS son el sistema inmune y el citocromo P450 (CYP450). Las enzimas antioxidantes son parte de los mecanismos moleculares que regulan el estrés y la homeostasis celular de ROS, los cuales tienen como fuentes principales el metabolismo aeróbico, la desaminación oxidativa de aminos biogénicas, la oxidación de xenobióticos y la fagocitosis. Para equilibrar las ROS evitando el origen de RL, se liberan enzimas antioxidantes como esterasas (GEs), Glutathion S-transferasas (GST), Catalasa (CAT), Superóxido Dismutasa (SOD), Peroxidasas (POD) y Glutathion Peroxidasa (GPX) (Zhang et al., 2018).

A partir de lo descrito anteriormente, esta investigación se centró en estudiar alteraciones bioquímicas en extractos proteicos de *Apis mellifera* expuestas a insecticidas sistémicos (Imidacloprid e Chlorpyrifos), analizando concentraciones de proteína total (PT) y actividades enzimáticas de catalasa (CAT) y peroxidasa (POD), identificando además, efectos colaterales ocasionados por pesticidas que producen ROS en el momento en que entrar en contacto via dermica con los sistemas celulares de *Apis mellifera*.

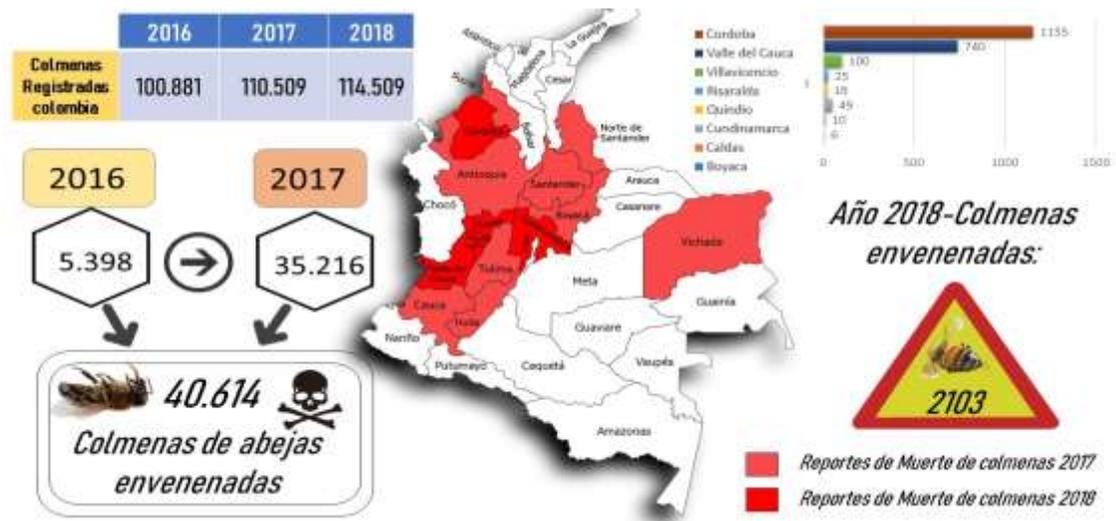
## 2 Planteamiento del problema

### 1.1. Apicultura colombiana con *Apis mellifera*.

El sector apícola en Colombia se ha registrado un poco más de 135.117 colmenas en el año 2019, con una tendencia crecer. El uso principal de *A.mellifera* en la producción de miel y de en una menor cantidad de otros productos, ha dejado ganancias económicas para el año 2019 de 41.480 millones de pesos colombianos y un consumo per cápita de 87 g de miel de abejas (SIOC, 2020). Si bien en Colombia es un país con una alta diversidad biológica para favorecer el crecimiento del sector apícola, se ha generado una serie de problemáticas asociadas a diferentes variables como la disponibilidad de alimento, patologías, parásitos, especies invasoras, cambio climático y uso indiscriminado de agroquímicos (RALLT, 2016). Actualmente 10 departamentos registran muertes masivas de colmenas por plaguicidas, afectando económicamente el sector apícola, con pérdidas aproximadas de 768.000 millones de pesos colombianos y la muerte de panales o núcleos de abejas (Barona, 2020).

**Figura 1**

*Reporte de abejas envenenadas años 2016, 2017 y 2018*



Fuente: Adaptado de Abejas Vivas (2016)

Los envenenamientos en Colombia son frecuentemente reportados en varias regiones del país (Figura 1) y a pesar de que apicultores han mostrado evidencia al Gobierno Nacional de muertes masivas de abejas por uso de plaguicidas como neonicotinoides y organofosforados, el Estado Colombiano no ha realizado ninguna acción suficiente para lograr compensar las pérdidas ambientales y económicas del sector apícola (Gómez, 2021).

La búsqueda de una política pública que regule las 39 moléculas de plaguicidas que actualmente se han registrado en 80 estudios realizados entre el año 2015 y 2021 de colmenas envenenadas por agroquímicos (Murillo & Pulido, 2022), no se ha logrado decretar alguna norma que conceda y proporcione una protección jurídica y logre replantear prácticas agrícolas que logren un uso responsable de plaguicidas y no terminen afectando ecosistemas terrestres de lepidópteros, himenópteros (abejas, avispas, abejorros) y coleópteros (escarabajos peloteros) (Giménez-Candela, 2020).

Los cambios biológicos en abejas envenenadas generan cambios metabólicos dependiendo de su mecanismo de acción de las toxinas de los insecticidas, los cuales generalmente su objetivo diana es la inhibición de la síntesis del ATP, provocando un estado alterado de la homeóstasis en la célula, la cual puede sufrir diferentes procesos metabólicos según la lesión ocasionada por la molécula del insecticida, si esta es una lesión letal puede originar dos tipos de alteraciones metabólicas, apoptosis o oncosis (Trum & Berezsky, 2020). a pesar de que se haya eliminado la causa de la lesión por medio de estas dos alteraciones biológicas, la célula no puede recuperarse y pasa a un proceso de degradación e hidrólisis llegando a un equilibrio osmótico en su entorno extracelular., no obstante aún se desconocen varios procesos biológicos de desintoxicación los cuales se correlacionan con el estrés oxidativo el cual induce a la producción de ROS causando cambios proteicos a nivel celular, originando problemas fisiológicos y

consecuentemente patológicos, contribuyendo al CCD. Se hace necesario encontrar información correlacionada con alteraciones celulares en el sistema de defensa de la abeja *Apis mellifera*, para tener conciencia en la defensa social de esta especie.

### **3 Justificación**

El continuo reporte de casos de intoxicación de abejas *Apis mellifera* por el uso indiscriminado de pesticidas a nivel nacional, comprende la falta de políticas de protección ambiental que no defienden a organismos polinizadores que generan servicios ecosistémicos directos como la polinización de especies vegetales. El daño ocasionado por este tipo de moléculas tóxicas de agroquímicos, origina efectos secundarios en procesos celulares, alterando indicadores metabólicos como la PT, biomoléculas importantes para la reproducción, crecimiento y producción de subproductos, afectando también procesos metabólicos relacionados con carbohidratos, síntesis de energía, sistemas de desintoxicación y antioxidantes, plegamiento y unión de proteínas, olfato, memoria, homeóstasis y conformación del citoesqueleto (Zaluski et al., 2020). La identificación de alteraciones proteicas asociadas al sistema de desintoxicación dará sustentación de los efectos degenerativos que producen insecticidas como Imidacloprid (neonicotinoide) y Chlorpyrifos (organofosforado), para poder idealizar las interacciones a las que se encuentran expuestas la especie *Apis mellifera* en la producción pecuaria, aportando evidencia científica para la regularización de normas ambientales que puedan generar un impacto positivo en el ecosistema de las abejas. Hasta el momento no hay una política nacional que proteja a las abejas del uso excesivo de pesticidas (Culma & Arenas, 2017) sin embargo, se han generado investigaciones que respaldan la toxicidad de estos plaguicidas y en donde 28 países de la Unión Europea ya han comenzado a regularizar su uso (Ansedo, 2015). En Colombia se hace necesario incentivar y generar más investigación sobre los plaguicidas que amenazan a polinizadores benéficos para el ecosistema y así contribuir al

desarrollo y ejecución de una norma que las proteja y sistematice el uso de plaguicidas. Igualmente esto aportara positivamente a una mejora en la calidad de los subproductos de la abeja debido a que colaboraría a que haya una menor contaminación de fitoquímicos comúnmente encontrados en subproductos apícolas. (Rincón & Tellez, 2019).

## **4 Objetivo general**

Estudiar cambios bioquímicos en perfiles proteicos y enzimáticos de *Apis mellifera* mediante diferentes DL50 (dosis subletales) ocasionados por insecticidas (Imidacloprid e Chlorpyrifos).

### **4.1 Objetivos específicos**

- 1.** Analizar efectos fisiológicos en *Apis mellifera* expuesta a concentraciones sub inhibitorias de los insecticidas Imidacloprid y Chlorpyrifos.
- 2.** Determinar alteraciones en las concentraciones proteicas enzimáticas en cada tratamiento.
- 3.** Determinar actividad enzimática de peroxidasa y catalasa en extractos proteicos obtenidos de *Apis mellifera* expuestas a insecticidas (Imidacloprid e Chlorpyrifos).

## 5 Marco conceptual

### 5.1 Sociedad de las abejas

Las abejas son insectos sociales que viven en colonias organizadas por tres castas (figura 2) que se distinguen morfológica y funcionalmente, debido a que cada una cumple un deber diferente dentro de la colonia.

#### Figura 2

*Clasificación jerárquica y distinción morfológica de la abeja según su casta*



Fuente: adaptado de Lara, (2018)

Dentro de esta sociedad encontramos la reina como la única hembra fértil y la única que puede ser fecundada, se distingue anatómicamente por su longitud y alas cortas en relación con su cuerpo. Su función es la reproducción y cohesión del enjambre. Los zánganos son los machos de la colmena, cumplen una doble función, fecundar la reina y proporcionar calor al nido de la cría. Las obreras son hembras que constituyen casi la totalidad de la población de la colmena cumpliendo la mayoría de las funciones como nodrizas, aseadoras, ventiladoras, constructoras, guardianas y pecoreadoras, estas últimas son las que salen de la colmena a recolectar polen, néctar, agua y propóleo. (Lara, 2018).

### 5.2 *Apis mellifera*

Es un insecto del orden Himenóptero, familia *Apidae*, género *Apis*, especie *mellifera*. Cuya región de origen comprende el norte de África, el este de Asia y el sudoeste de Europa, introducida en el continente americano por colonizadores europeos en el siglo

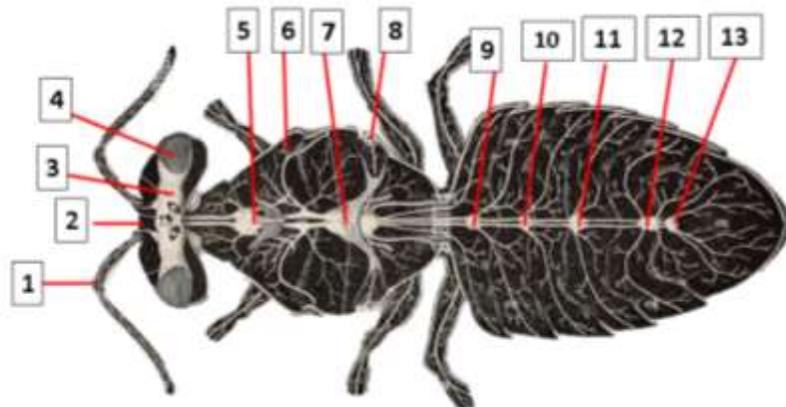
XVII (Guzmán-Novoa. Ernesto et al., 2011). Esta cuenta con tres tagmas: cabeza, tórax y abdomen, este último esta fusionado con el primer segmento abdominal, el cual es estrechamente perceptible en su cintura.

Las abejas tienen un cerebro el cual se divide en tres partes, iniciando desde la cabeza y extendiéndose detrás una cadena ganglionar en posición vertical para cumplir con el funcionamiento de todos los órganos (Figura 3). también recibe, procesa y emite respuestas de diversos estímulos producidos por órganos sensoriales como ojos antenas pelos, palpos de la maxila y el labio (Carlos & Pérez, 2002). Este sistema está compuesto por un protocerebro, conformado por los lóbulos ópticos y un deutocerebro, constituido por dos lóbulos antenales y por ultimo encontramos el tritocerebro el cual es el más pequeño de los tres. El protocerebro controla las antenas y órganos visuales. Las actividades como caminar, volar y respirar son llevadas por los ganglios corporales (deutocerebro y tritocerebro) (Lara, 2018).

### Figura 3

#### *Sistema nervioso Apis mellífera*

1. Nervio de la antena
2. Ocelo
3. Cerebro
4. Ojo Compuesto
5. Primer ganglio
6. Nervio del ala anterior
7. Segundo ganglio
8. Nervio de ala superior
9. Tercer ganglio
10. Cuarto ganglio
11. Quinto ganglio
12. Sexto ganglio
13. Séptimo ganglio



Fuente: Adaptado de Lara, (2018)

### **5.2.1 Funcionamiento del sistema nervioso**

Los estímulos nerviosos son realizados por células nerviosas denominadas neuronas, conformadas por un núcleo celular, dendritas, cuerpo celular, axón y la arborización terminal. En estado de reposo están cargadas negativamente, cuando están excitadas cambiando su carga de negativo (-) a positivo (+). Este estímulo viaja a través de las dendritas hasta la arborización. Hay algunos productos químicos que alteran la carga eléctrica generando impulsos continuos que no permiten la contracción muscular (Cruces, 2016). La transmisión de neurona a neurona muscular es denominada como sinápsis nerviosa, formando una conexión llamada brecha sináptica para el paso de neurotransmisores.

En la neurona pre-sináptica se producen excitadores o inhibidores, estos llegan a receptores específicos en la membrana de la dendrita a la neurona post-sináptica abriendo canales para el paso de electrolitos (cationes y aniones). La conducción del estímulo es finalizada en el momento que el neurotransmisor es hidrolizado por enzimas para terminar el proceso muscular (Cruces, 2016).

La alteración de una neurona está relacionada con intercambio de iones hidrosolubles en la membrana hidrofóbica, utilizando glucoproteínas huecas denominadas como poros o canales, los cuales se abren o cierran dependiendo del voltaje (Uchoa & Carneiro, 2003). Los neurotransmisores excitadores actúan en receptores ubicados en las dendritas post-sinápticas para abrir los canales de sodio.

La ACh genera un estímulo corto el cual debe terminar con la intervención de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) la cual se encarga de descomponer (hidrolizar) rápidamente la ACh, separando la colina del acetilo, terminando el estímulo.

### **5.3 Estrés oxidativo**

Las reacciones bioquímicas enzimáticas (RBE) que estén relacionadas con la captación de oxígeno, pérdida de electrones, deshidrogenación y captación de electrones o pérdida de oxígeno son denominadas óxido-reducción (REDOX). La energía requerida por los seres vivos se obtiene por medio de estas reacciones REDOX en forma de ATP (adenosín trifosfato). Un ser vivo al estar expuesto a factores que puedan producir una ruptura del equilibrio homeostático por causa de sustancias o agentes oxidantes y mecanismos antioxidantes, denominado como estrés oxidativo el cual se origina a partir de reacciones químicas relacionadas con la actividad enzimática. Todo organismo que consume oxígeno está expuesto a subproductos tóxicos como RL y  $H_2O_2$ , denominados especies reactivas del oxígeno (ROS), de estas reacciones se derivan dos en especial llamadas radicales libres de oxígeno (RLO) y radicales libres del nitrógeno (RLN) (UC, 2018)

#### **5.3.1 Radicales libres.**

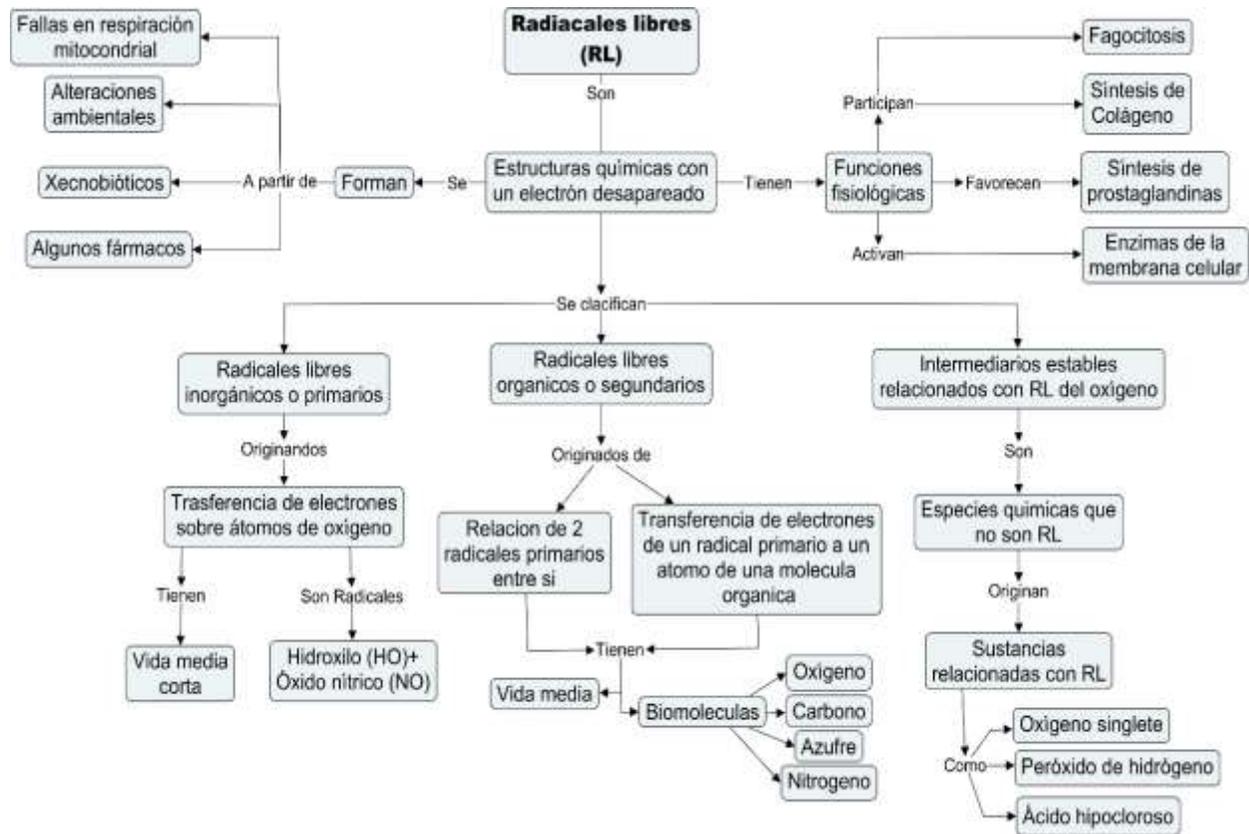
Son especies químicas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital del extremo, modificándose espacialmente y generando inestabilidad molecular y una alta reactividad siendo idóneos para combinarse inespecíficamente con otras moléculas del entorno debido a que estas presentan características de ubicación y difusión en mecanismos conexos a la respiración mitocondrial. La cadena de transporte de electrones a nivel mitocrosomal, procesa reacciones de oxidación las cuales ocasionan daño celular (oxidativo) al interactuar con biomoléculas del organismo (Diaz, 2002).

Las ROS aglomeran RL y otras especies no radicales que participan en reacciones que llevan a la elaboración de agentes oxidantes (Figura 4). Dentro de las principales ROS encontramos el Radical hidroxilo (HO), Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), Anión superóxido

(O<sub>2</sub>), Oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), Oxígeno nítrico (NO), Peróxido (ROO), Semiquinona (Q) y Ozono (Díaz, 2002).

**Figura 4**

*Radicales libres y su clasificación.*



*Nota.* Clasificaron de radicales libres según su función y reacción Fuente: Elaboración propia (2022)

### 5.4 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Este grupo de moléculas contienen oxígeno con diferente actividad química, son metabolitos de oxígeno parcialmente reducidos que poseen una fuerte capacidad oxidante, aunque dicha capacidad varía dentro de las diferentes especies que existen, denominadas ROS (especies reactivas del oxígeno), RNS (especies reactivas del nitrógeno) y especies reactivas del cloruro.



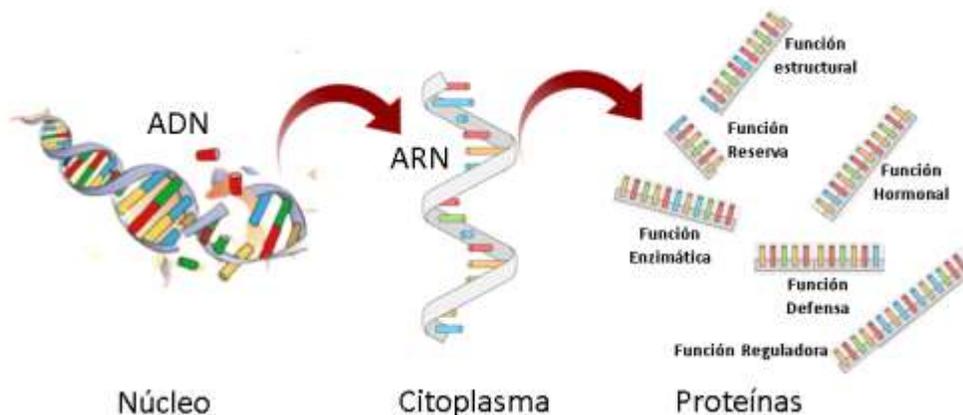
moléculas acepta electrones de otras, formando ROS con una estructura molecular que la hace tóxica para la célula. Los ROS son consecuencia del metabolismo aeróbico mitocondrial presente en los peroxisomas, transporte de electrones, NADPH oxidasa, óxido nítrico sintetasa desacoplada y el sistema del citocromo P450. Estas son las fuentes más importantes en la producción de ROS (Felipe et al., 2003).

## 5.5 Proteínas

Las proteínas son macromoléculas biológicas constituidas por biomoléculas elementales denominadas aminoácidos, los cuales se unen mediante grupos amino inicial y carboxilo terminal, generando enlaces peptídicos, estos determinan sus diversas estructuras (primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria) a fin de cumplir múltiples funciones específicas como la detección de alteraciones celulares, defensa ante agentes externos, reparación de daños y regulación de funciones. Están sujetas a cambios físicos y funcionales, según lo determine su proceso biológico (Lehninger et al., 2018).

**Figura 6**

*Biosíntesis y funciones proteicas*



*Nota.* Síntesis y estructura en cadena de ADN, ARN y proteínas con sus diferentes funciones. Fuente: Nuño, (2020),Burge, (2017)

Estas nacen en el momento de la traducción, maduran a través de la postraducción como proteólisis parcial, alternando estados según su trabajo o reposo por medio de

factores reguladores como la desaminación llegando a su muerte cuando se degradan los aminoácidos que la componen. Las proteínas intervienen en prácticamente todos los procesos celulares (Alberts et al., 2021).

## **5.6 Proteínas y aminoácidos en los insectos**

Las abejas tienen un sistema circulatorio abierto, el cual funciona mediante la hemolinfa, la cual circula por todo los tejidos de los insectos. Esta es similar a la sangre de los vertebrados pero con una composición diferente. Tiene diversas funciones inmunológicas y de almacenamiento de energía. Este sistema transporta varias moléculas alrededor del cuerpo (nutrientes y hormonas). La sangre de vertebrados, a diferencia de la hemolinfa, contiene concentraciones relativamente altas de iones inorgánicos, aminoácidos, azúcares, proteínas y otras sustancias (Gianazza et al., 2021).

Las proteínas de la hemolinfa cumplen diversas funciones entre las cuales se encuentra la defensa inmunitaria, estas proteínas se componen de cobre y hemocianina (transportadora de oxígeno) en donde se combina con hemocitos (suero de hemolinfa). Estas proteínas pueden cambiar según la etapa de desarrollo de *Apis mellifera*, encontrando aminoácidos importantes como la caseína en todas sus etapas de crecimiento y otros como valina, cistina, histidina, leucina y glicina son se encuentran en menor concentración durante su etapa de pupa (Feng et al., 2014).

La hemolinfa es importante en la síntesis de proteínas, ya que cumple funciones de transporte de nutrientes, productos de excreción, hormonas, gases y mantenimiento de presiones arteriales. Sin embargo, esta no tiene funciones en el sistema respiratorio por su bajo contenido de oxígeno, aunque en ella se elimina el CO<sub>2</sub>. La hemolinfa constituye hasta el 40% del peso total del cuerpo y una composición de un 90% agua, componentes inorgánicos (Na, K, Mg, P, Cl y trazas de Cu, Zn, Al y Mn) lípidos, proteínas y azúcares (Ritacco, 2015).

## **5.7 Mecanismos Regulación**

Los insectos tienen diversos mecanismos para sobrevivir a biomoléculas tóxicas, dentro de las cuales encontramos moléculas con resistencia metabólica, la cual tiene como fundamento el aumento de enzimas metabólicas con funciones de detoxificación específicamente enzimas monooxigenasas, glutatión-S-transferasas (GSTs) y esterasas encontradas en el citocromo P450 (CYP 450s). Las cuales reducen la posibilidad de que la toxina o xenobiótico interactúe con la molécula blanco. También crean insensibilidad del sitio blanco, produciendo modificaciones del sitio específico sobre el que actúa el plaguicida, impidiendo la interacción con sitio diana. Dentro de estos mecanismos encontramos un sistema de penetración reducida a través de la cutícula o paredes del tracto digestivo. Uno de los sistemas que trabaja con proteínas de la hemolinfa es el de secuestro, pues este sistema utiliza enzimas o proteínas para transportar el plaguicida de un sitio blanco a un sitio de reserva (ej: cuerpos grasos), para así almacenarlos y eliminarlos (Mitton Giulia, 2019).

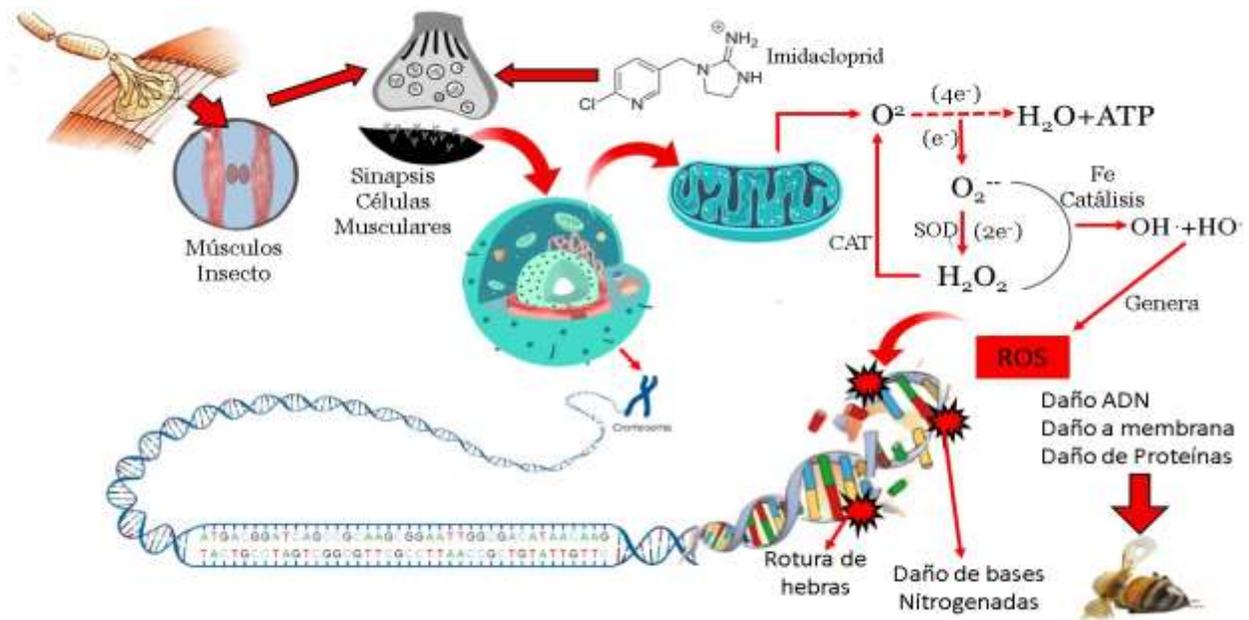
### **5.7.1 Daño oxidativo en ADN**

Las altas concentraciones de ROS pueden causar daño oxidativo en el ADN, lesionando bases nitrogenadas y originando rupturas de una sola hebra, dando lugar a mutaciones relacionadas con enfermedades, desnutrición, envejecimiento y la muerte celular. El daño irreversible a moléculas vitales para la supervivencia o multiplicación en la división celular, causan un deterioro en la actividad biológica, la apoptosis, la transformación o la muerte celular. Esta muerte celular por apoptosis ya sea por el daño a biomoléculas liberadas en el espacio extracelular o por generar daño por estrés oxidativo (Figura 7) ocasionando daños en el ADN, alterando procesos biológicos como la replicación, transcripción y traducción (Gebicki & Gebicki, 1999).

Dado que las proteínas son esenciales en el funcionamiento celular al determinar su función, se estudian perfiles proteicos que tengan correlación con un estado celular alterado en un momento determinado y a su vez esté relacionado con perfiles genómicos o transcritómicos, aportando al desarrollo de procesos metabólicos y fisiológicos del organismo.

**Figura 7**

*Representación daño oxidativo de especies reactivas de oxígeno (ROS) en ADN*



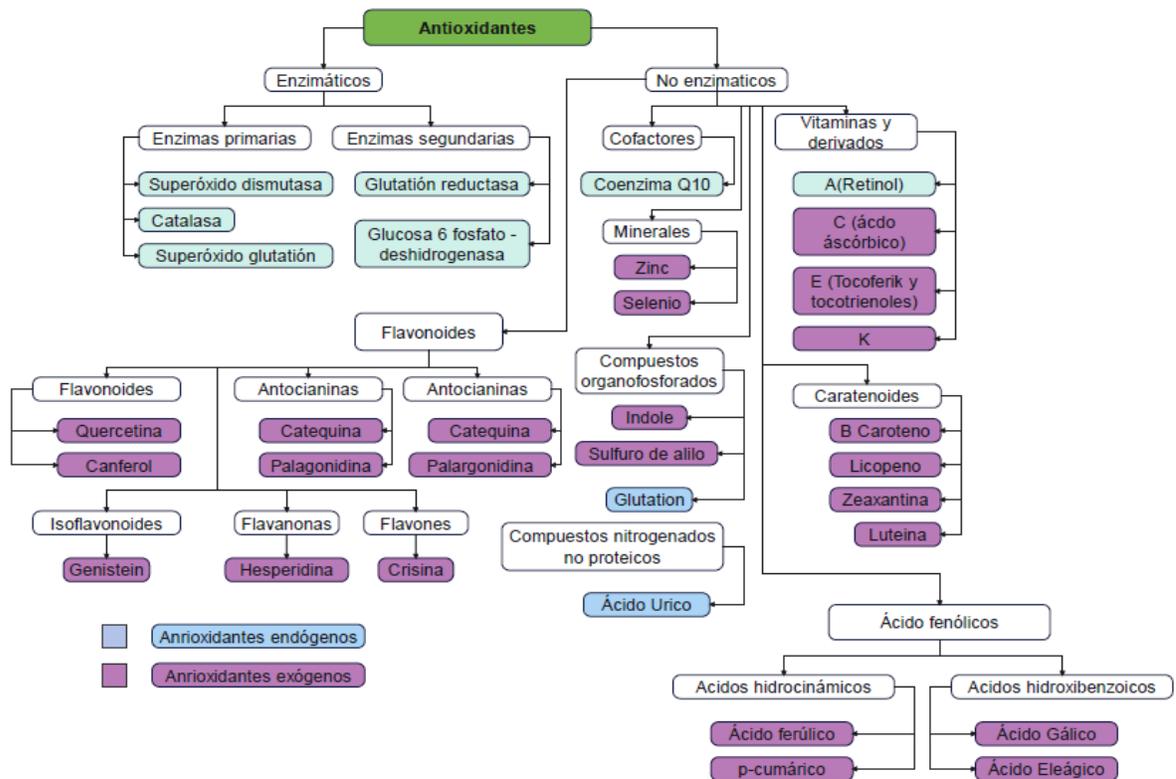
*Nota.* Representación de producción celular de ROS, generados durante RBE REDOX en las vías metabólicas de la mitocondria. Al acumularse ROS por fallas metabólicas, causando afectaciones u oxidaciones en el contenido celular como lo son lípidos, proteínas y ADN de la membrana celular provocando modificaciones post-traduccionales en proteínas celulares. Fuente: Adaptado de (Chainy et al., 2016; He et al., 2021; Kohen & Nyska, 2002).

## 5.8 Sistema de defensa antioxidante

Es un sistema de defensa biológico antioxidante determinado por un grupo de sustancias que actúa en bajas concentraciones con respecto al sustrato oxidante, retrasando o previniendo significativamente la oxidación de la reacción celular. Los sustratos oxidables se consideran moléculas orgánicas o inorgánicas dentro de la célula como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y moléculas de ADN. Los antioxidantes impiden la oxidación de otras moléculas, actuando rápidamente con los RL, sacrificando un electrón de su estructura molecular para evitar alteraciones moleculares en lípidos, proteínas, ADN, etc.

**Figura 8**

*Tipos de antioxidantes*



*Nota.* Tipo de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos clasificados en antioxidantes endógenos y exógenos. Fuente: Elaboración propia (2022)

El antioxidante conecta con el RL cediéndole un electrón para oxidarse a su vez transformándose en un RL débil no tóxico, para mantener los niveles de ROS en la célula regulados y estabilizados. El organismo, ha desarrollado mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (Figura 8) con funcionando en tanto medios hidrosolubles y liposolubles de fuentes exógenas y otras endógenas (Felipe et al., 2003).

### **5.8.1 Enzimas**

Con la excepción de un pequeño grupo de moléculas del RNA catalítico, todas las enzimas son biocatalizadores de origen proteico (apoenzima) con una estructura enlazada a un componente no proteico, denominado coenzima, las cuales emplean una función catalítica dependiendo de la integridad de su formación proteica nativa, si esta se desnaturaliza o se disocia en subunidades, la actividad catalítica suele desaparecer. Si se descompone en sus aminoácidos constituyentes, siempre se destruye su actividad catalítica. Estas son esenciales para la actividad de estructuras primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias de las proteínas.(Lehninger et al., 2018).

Las acciones para ejecutar cualquier acción metabólica o fisiológica se dan por medio de enzimas catalizadoras, estas solucionan problemas en ambientes específicos dentro de la cual una reacción puede transcurrir más rápidamente. La característica de una reacción catalizadora enzimáticamente tiene lugar dentro de los confines de una bolsa denominada “sitio activo”. La molécula fijada en un sitio activo y sobre la que actúa la enzima se denomina sustrato . El sitio activo de una enzima, está cubierto por aminoácidos compuesto con grupos sustituyentes que se unen al sustrato y catalizan su transformación química, el sitio activo se recubre de sustrato y como resultado se obtiene una disolución. El complejo enzima-sustrato ([ES]) permite definir modelos matemáticos que expresen el comportamiento cinético de las reacciones catalizadas (Lehninger et al., 2018).

## 5.9 Peroxidasa (POD)

Los moduladores del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se dividen en diversas enzimas que son capaces de descomponer este producto causante de ROS, este se genera ya sea por óxido-reducción del anión superóxido o por la acción de varias oxidasas, reduciéndolo en agua por varias enzimas incluyendo catalasa y peroxidasas. Estos últimos se distinguen según el cofactor de su sitio activo que puede ser del grupo hemo (hemo peroxidasas) o residuos de cisteína o selenocisteína con actividad redox (no hemo peroxidasas) (Bindoli & Rigobello, 2013a).

Las peroxidasas pertenecen a la familia de isoenzimas, también conocidas como óxido-reductasas, las cuales están presentes en todos los organismos, estas pueden llevar a cabo la oxidación de ROS, reaccionando específicamente con el hidrógeno (Salgado, 2019). Esta enzima es específica de cada tejido y célula del organismo, encontrando mieloperoxidasa, lactoperoxidasa, glutatión peroxidasa, ácido glutámico o glutamato, etc. Esta enzima incluye a cofactores-REDOX como NAD- Y NADP-peroxidasas, ácido graso-peroxidasa, citocromo-peroxidasas, glutatión peroxidasa y otras enzimas no específicas. Hay un polimorfismo en las peroxidasas, las cuales se clasifican en tres tipos: Tipo I, Tipo II, Tipo III, las cuales carecen de péptidos señal, presentando secuencias en el extremo N-terminal que codifican un péptido señal, están selladas por una gran familia multigénica (Ramírez, 2021).

Las peroxidasa (POD) es una no hemo peroxidasa la cual participa en diversos procesos fisiológicos de múltiples organismos como defensa en el metabolismo del peróxido de hidrógeno.

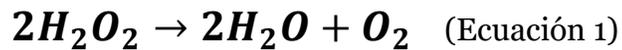


Dentro de estas POD encontramos las glutatión peroxidasas (GSX) las cuales reducen el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los hidroperóxidos de ácido grasos y los hidroperóxidos sintéticos, por

medio de la oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bindoli & Rigobello, 2013). Estas catalizan la oxidación de una variedad de sustratos, dándole un rol importante en la inmunidad innata de los insectos.

### 5.10 Catalasa (CAT)

La catalasa (CAT) es una peróxido-reductasa involucrada en procesos catalíticos o de peroxidación al intervenir en la destrucción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> el cual es originado en el metabolismo celular, previniendo la formación de radicales de hidroxilo libres descomponiendo el peróxido de hidrogeno en O<sub>2</sub> Y H<sub>2</sub>O (Céspedes et al., 1996). DL<sub>50</sub>



La ecuación 1, corresponde a la RBE de la catalasa, mediante la cual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se disocian de dos moles de moléculas de H<sub>2</sub>O y una mol de O<sub>2</sub>. esto puede suceder de manera espontánea pero si se agrega una baja cantidad de hierro, posiblemente incrementa la velocidad en varios miles de veces puesto que el hierro actúa como un catalizador. CAT puede acelerar la catálisis de esta reacción unas 40 millones de veces más teniendo en cuenta que esta utiliza un átomo de hierro para llevar a cabo su reacción química (Lehninger et al., 2018).

CAT está unida a 4 moléculas de NADPH, 1 en cada subunidad, pero no presentan interacción con el grupo hemo presentes en cada subunidad y no intervienen en su función antioxidante. La estructura de la CAT en su mayoría de veces se compone de 1. un amino terminal, 2. un Barril β, 3.un asas en volante, 4. Un dominio de hélices y una catalasas de mayor peso molecular con un dominio 5. flavodoxina de carboxilo terminal (Huerta, 2021).

En insectos, la actividad de CAT es ocasionada por el estrés oxidativo causado por insecticidas teniendo en cuenta que la actividad de esta enzima es mayor en invertebrados

que en vertebrados. Esta enzima se presenta en el citosol y en la mitocondria distribuyéndose ampliamente a nivel intracelular (Parra, 2016). Esta enzima codifica la proteína de 513 aminoácidos (Uniprot, 2003), localizada en el cromosoma 6 de *Apis mellifera* específicamente en citosol y tiene como característica una alta capacidad de reacción pero una poca afinidad por el sustrato dependiendo del pH, temperatura y concentración del sustrato (Corona & Robinson, 2006a).

La reacción de CAT es rápida, destruyendo el H<sub>2</sub>O en dos procesos, primero una molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se une y se rompe. Un átomo de O<sub>2</sub> se extrae y se une al átomo de Hierro (Fe) y el resto se libera como H<sub>2</sub>O. Luego, se une una segunda molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. También se rompe y las piezas se combinada con el átomo de oxígeno unido al hierro, liberando H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> gaseosos. La CAT queda atrapada en medio de una reacción de dos pasos, el átomo de O<sub>2</sub> queda unida al Fe lista para que se la segunda molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Histidina y una Asparagina ayudan en la reacción con el átomo de hierro sujetado por un grupo hemo. Esta enzima comparte su función con glutatión peroxidasa (GSH-Px) pero con una afinidad hacia diferentes a sustratos. En presencia de niveles bajos de hidrogeno y oxigeno los peróxidos orgánicos son catalizados preferentemente por la peroxidasa, sin embargo cuando se presentan altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se metaboliza por medio de CAT teniendo en cuenta que esta puede variar según la función de la celular y tejido del organismo (Yu, 1994).

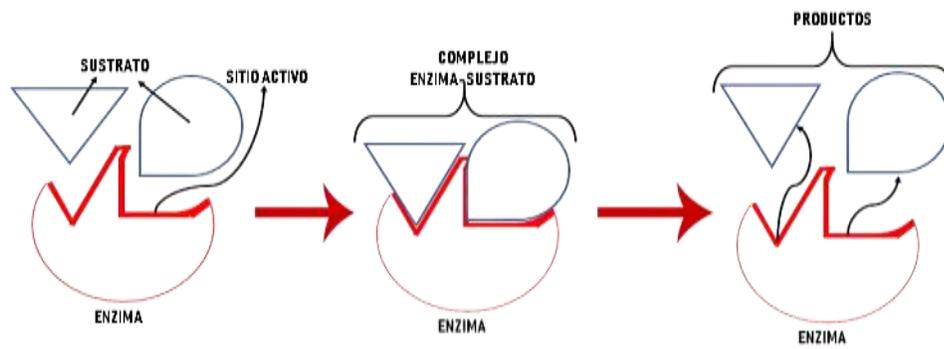
### ***5.10.1 Actividad enzimática reguladoras***

Es una rama de la enzimología que cuantifica los factores que afectan a la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Dentro de los factores más importantes en el ambiente de estas reacciones se encuentra la concentración de enzimas, tiempo de incubación, pH, fuerza iónica, temperatura, concentración de sustratos, concentración de inhibidores y concentración de activadores (UNSAM, 2018).

El funcionamiento de una enzima se origina mediante la interacción de una molécula o sustrato específico el cual se va a unir a un sitio específico de la enzima al que vamos a llamar sitio activo. El complejo Enzima – Sustrato([ES]) es donde se lleva a cabo reacciones que generen un tipo de molécula llamada producto, este se libera y la enzima vuelve a su estado inicial (Figura 9).

### Figura 9

*Modelo actuación de enzimas llave-cerradura (modelo de Fischer)*



*Nota.* La enzima se une a la molécula de sustrato para formar el complejo [ES]. El complejo se fragmenta dando lugar al producto y la enzima después de este proceso vuelve a su estado natural para reaccionar con otra molécula de sustrato. Fuente: Elaboración propia (2022)

### 5.10.2 Efectos de los inhibidores sobre la actividad enzimática

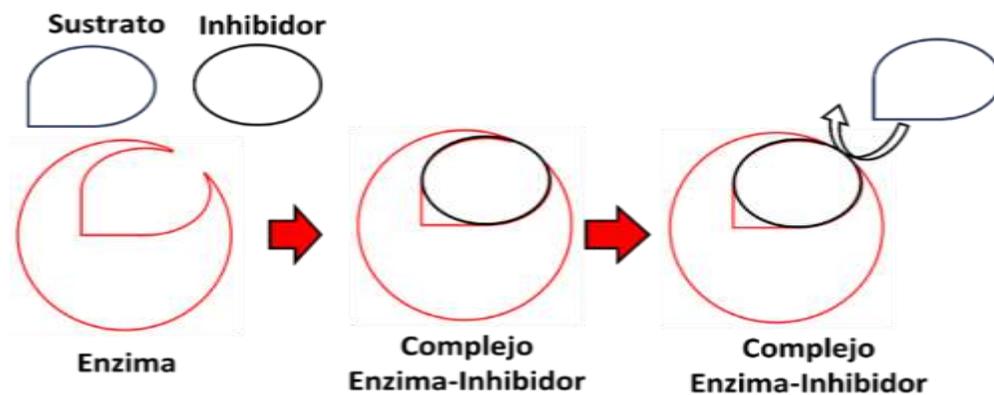
Ciertas moléculas tienen una función catalítica en una enzima denominados inhibidores los cuales ocupan temporalmente el centro activo por ser semejante a la estructura del sustrato original. Las moléculas pueden ser reguladoras, las cuales aumentan o disminuyen su actividad según el proceso que realicen, cuando estas aumentan su actividad las enzimas toman la denominación de activadores, contrario aquellas que reducen su actividad enzimática denominadas inhibidores. Hay dos tipos de inhibición enzimática la cual puede ser irreversible o reversible, esta última se divide en tres clases, inhibición competitiva, competitiva y no competitiva (UNR, 2016).

### 5.10.2.1 Inhibición irreversible

Se unen por un enlace covalente o destruyen un grupo funcional en la estructura de la enzima inactivándola, los aminoácidos con función catalítica son clave en el sitio activo para determinar cuál inhibidor se ha unido covalentemente para inactivar la enzima (Figura 10). Esta inhibición también es denominada “envenenamiento” por el mecanismo de acción de moléculas tóxicas como los plaguicidas (Lehninger et al., 2018).

**Figura 10**

*Inhibición enzimática irreversible*



*Nota:* Inhibidor ocupando el sitio activo en la enzima impidiendo la biosíntesis del sustrato. Fuente: Elaboración propia (2022).

Estos compuestos tóxicos inhiben irreversiblemente la enzima AChE, interviniendo en la actividad del sistema nervioso. Se conoce que toxinas de compuestos organofosforados inactivan la enzima formando un enlace éster fosfórico con el grupo hidroxilo de un determinado aminoácido serina, grupo esencial para procesos de catálisis.

### 5.10.2.2 Inhibición reversible

La inhibición reversible es la disminución de la actividad enzimática realizada por un agente químico o ligando al contrario con la desnaturalización que detiene permanentemente la actividad enzimática por un agente químico. Este inhibidor se

caracteriza por un equilibrio entre una enzima y un inhibidor, equilibrado por medio de una constante de equilibrio la cual mide la afinidad de la enzima por el inhibidor, el efecto del inhibidor desaparece de la enzima al retirarse y dependiendo de su concentración a través del tiempo (CBQ, 2018).

Estos inhibidores se combinan momentáneamente con una enzima o en algunas ocasiones con el [ES] distinguiéndose tres tipos de inhibición reversible:

- **Inhibición competitiva:** Inhibición competitiva: el inhibidor presenta una similitud estructural con el sustrato, compitiendo por acceder al centro activo; sin embargo, esta no posee ningún enlace susceptible de ser atacado por alguna enzima, formando con la enzima libre un complejo enzima-inhibidor con características cinéticas análogas a las de un [ES], que lógicamente no puede descomponerse de inmediato para dar lugar a una enzima libre y a producto (CBQ, 2018).
- **Inhibición no competitiva:** El inhibidor se combina con la enzima libre o con el [ES] pero interfiere en la acción de ambos, estos pueden unirse a un lugar de la enzima diferente al centro activo, induciendo una alteración en la función de esta, dificultando la formación del [ES] o la descomposición de esta para dar lugar a un producto. Esta inhibición forma dos estados inactivos: complejo enzima-inhibidor ([EI]) y Enzima-Sustrato-Inhibidor ([ESI]) las cuales no permiten descomponerse y dar lugar a productos y una enzima libre (CBQ, 2018).

### 5.10.3 *Neonicotinoides*

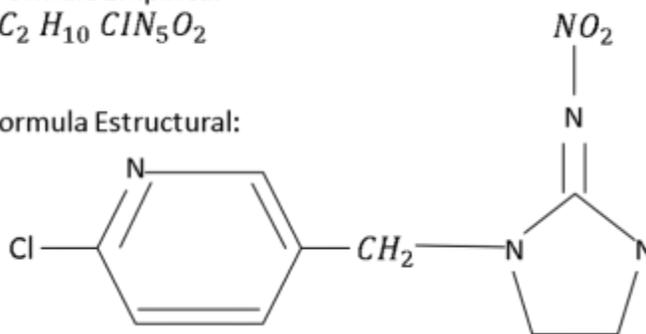
Los neonicotinoides pertenecen a un grupo de insecticida sistémico derivado de la nicotina , aplicados a cultivos agrícolas para controlar plagas no deseadas, sin embargo, este no es selectivo con el tipo de organismo que el productor quiere eliminar debido a que afecta a varios tipos de insectos polinizadores como las abejas (Blacquièrè et al., 2012). Los efectos causados por exposición directa son generalmente inusuales y poco comunes pero se considera peligrosamente tóxicas y agudas por tener una mayor concentración (figura 11) (Pistorius et al., 2010), comúnmente las abejas pecoreadoras están expuestas a concentraciones más bajas, originando efectos subletales fisiológicamente, afectando el comportamiento en el aprendizaje, búsqueda de alimento y daño metabólico en la expresión de genes, provocando una inmunidad más baja frente a enfermedades, virus y parásitos (Brandt et al., 2016).

**Figura 11**

*Estructura molecular imidacloprid*

Formula Empírica:  
 $C_2 H_{10} Cl N_5 O_2$

Formula Estructural:



*Nota:* Estructura molecular y empírica de molécula de Imidacloprid. Fuente: Adaptado de – Porras (s.f.).

Las moléculas de los neonicotinoides son absorbidas por raíces y hojas, que transportan el principio activo a todas las partes de la planta, haciéndola tóxica, debido a que la mayoría tiene un mecanismo de acción directo que afecta el SNC por causa de su estructura similar a ACh la cual tiene como función la estimulación para generar un impulso nervioso y

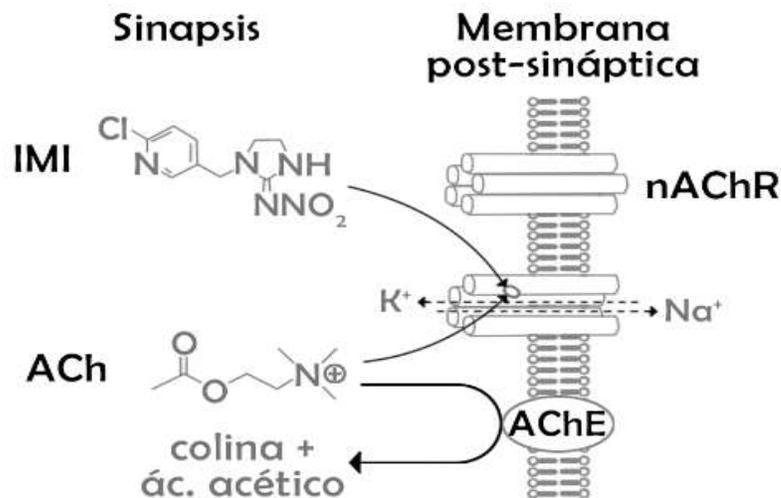
teniendo como diferencia que la molécula del plaguicida se une de manera irreversible al receptor de la membrana postsináptica de la unión neuromuscular bloqueando la AChE causando hiperexcitación debido a que esta enzima es la que finaliza la acción de excitación neurotransmisora de la ACh (Brom, 2015a).

#### 5.10.4 *Imidacloprid*

El imidacloprid es un el referente de los insecticidas neonicotinoides para controlar una amplia gama de insectos, afectando indirectamente otras especies como abejas mellíferas. Los neocotinoides actúan como neurotransmisores teniendo como objetivo perturbar el sistema nervioso, actuando sobre el receptores nAChR uniéndose al sitio de unión de ACh(Jones & Sattelle, 2010).

#### Figura 12

*Mecanismo acción Imidacloprid en receptores nicotínicos en la membrana post-sináptica*

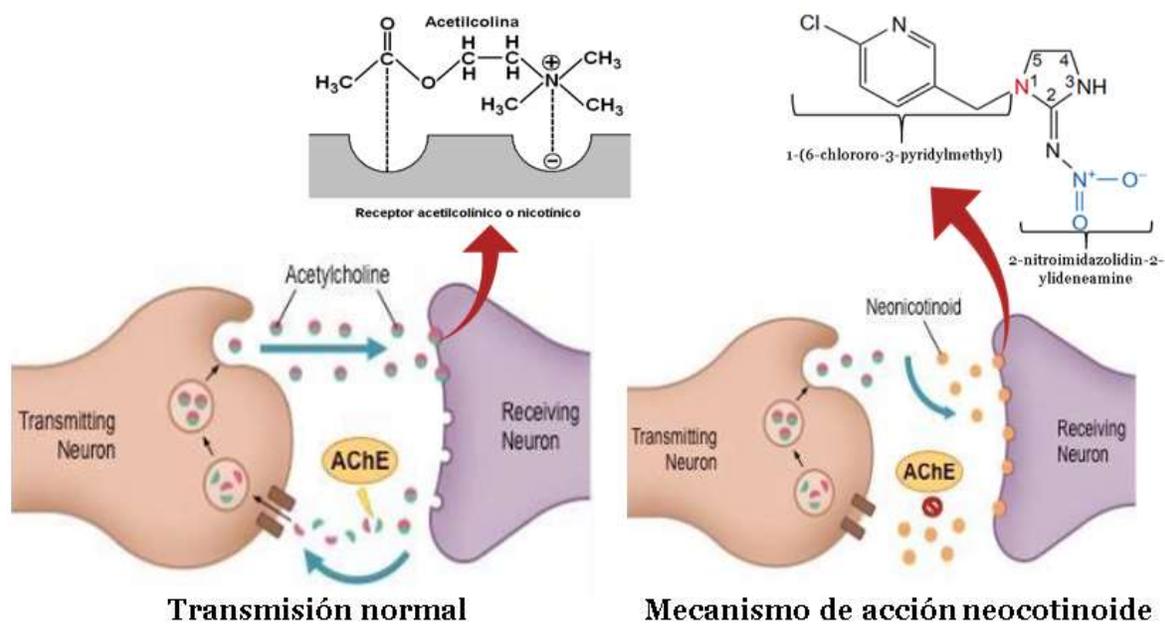


*Nota.* La figura 14, describe como la ACh se une al receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) y activa el canal para dar entrada y salida de  $K^+$  y  $Na^+$ , después es hidrolizada por acetilcolinesterasa (AChE) previniendo la sobre estimulación y bloqueo de nAChR. El imidacloprid (IMI) se ubica en los (nAChR) inhibiendo AChE dejando abierto el canal produciendo sobre excitación, parálisis y muerte. Fuente: Mengoni (2017).

Los neonicotinoides imitan la acción de la ACh uniéndose a los nAChR postsinápticos de manera agonista teniendo como efecto la activación sináptica generada por la ACh y finalizada por la enzima AChE sin embargo los neonicotinoides y la nicotina son insensibles en la actividad de esta enzima (Figura 12). Como resultado los nAChR están permanentemente activados generando impulsos nerviosos continuos causando hiperexcitación, parálisis, inmunodepresión y muerte (Mengoni, 2017).

### Figura 13

#### Mecanismo de acción molécula neocotinoide



*Nota.* La figura 13 de la izquierda, se observa como AChE fragmenta ACh anticipando la sobreestimulación y bloqueo de nAChR. En la imagen de la derecha se observa como la molécula de imidacloprid bloquea los nAChR originando la liberación de ACh la cual no puede ser degradada por la enzima AChE. Fuente. Adaptación de Rodríguez (2019); (Brom, 2015b); Matsuda et al (2001).

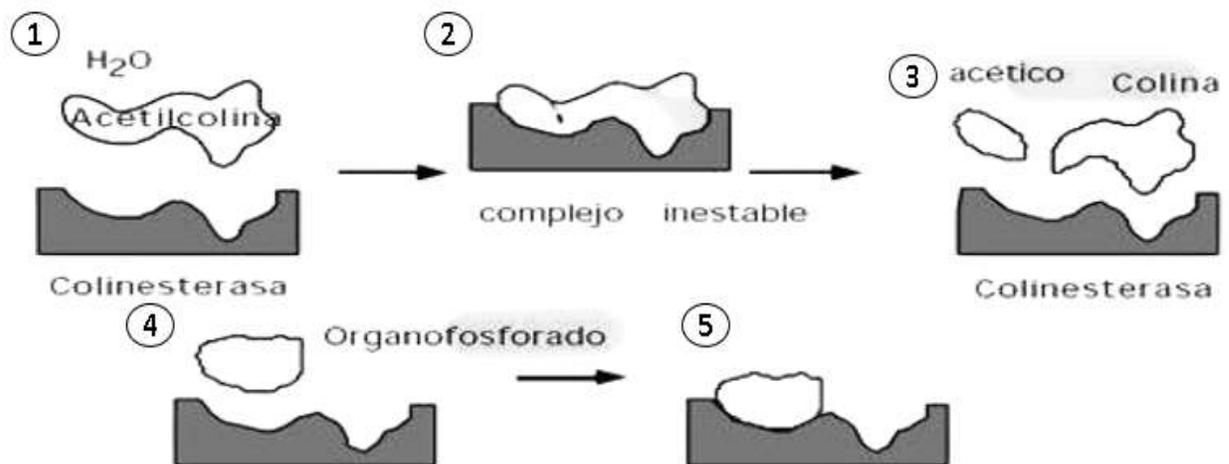
La molécula de imidacloprid está formada por una estructura molecular, específicamente un piridil con un cloro enlazado ubicado en el carbono 6, haciéndola una molécula atrayente de electrones. Esta molécula es la que se une a los receptores nAChR, manteniendo la hiperexcitación causando daños celulares.

### 5.10.5 Organofosforados

Los organofosforados son uno de los plaguicidas más utilizados en cultivos agrícolas. La estructura molecular de este grupo de pesticida, cuenta con esterres orgánicos formados por la unión de alcoholes y ácidos orgánicos dado como subproducto del agua y el ácido fosfórico. Esta estructura química presenta actividades neurotóxicas teniendo como característica que sus compuestos son volátiles y levemente liposolubles, de manera que es de fácil absorción para el insecto (Guacaneme et al., 2014). La metabolización de esta molécula empieza a través de los receptores nicotínicos los cuales contienen canales de  $\text{Na}^+$ , reaccionando con la zona esterásica de la AChE formando una unión estable inhibiendo la enzima ACh, acumulándose en la región sináptica de uniones colinérgicas neuroefectoras, uniones mioneurales del exoesqueleto y ganglios autónomos nerviosos y SNC (Hurtado & Gutierrez, 2005).

**Figura 14**

*Mecanismo de acción de una molécula pereciente a un organofosforado.*



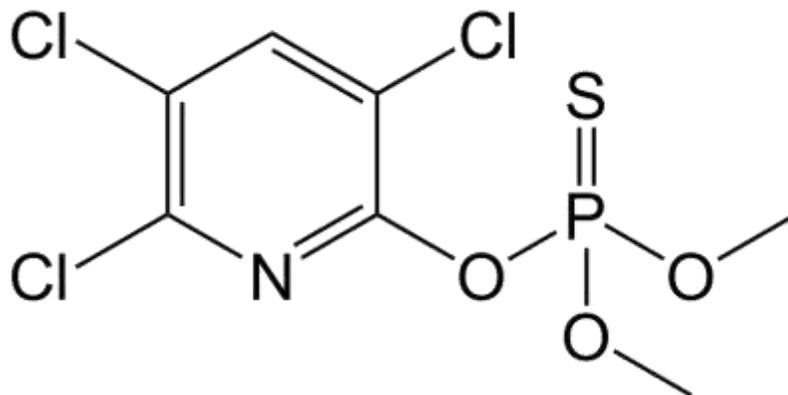
*Nota.* La descripción del proceso 1, 2, 3 señalados en la figura 14 representa el comportamiento normal de la AChE con la ACh+  $\text{H}_2\text{O}$  (1,2,3) obteniendo los productos acético y colina. Mientras que el proceso 4 y 5, muestra el mecanismo de inhibición irreversible que ejerce la molécula de un componente organofosforado sobre ACh al ocupar el sitio activo en AChE. Fuente: adaptada de Solano (2014).

### 5.10.6 *Chlorpyrifos*

Es un insecticida de amplio espectro utilizado para el control de plagas en cultivos con un mecanismo de acción por ingestión o contacto, intoxicando al organismo por medio del SNC, inhibiendo la AChE, provocando el bloqueo de la degradación de ACh. La unión entre el fósforo y la enzima es mucho más fuerte y estable que lo que se establece en el carbono del acetato de la ACh y la enzima, esto determina que la fosforilación o sea la recuperación de la enzima, se realice a una velocidad sumamente lenta lo que equivale a una inhibición irreversible (Quiroz, 2019). Esto genera la estimulación de nAChR de los órganos efectores del sistema nervioso parasimpático, seguido de parálisis o desgaste de todos los ganglios nerviosos parasimpáticos afectando continuamente la musculatura esquelética por la activación nicotínica y la estimulación ocasional posterior de los receptores colinérgicos centrales (Picco et al., 2011).

**Figura 15**

*Formula molecular Chlorpyrifos*



*Nota:* Formula estructural de molécula de Clorpirifos insecticida organofosforado. Fuente: (Salgado, 2019)

Su estructura química se compone por una tricloropiridina enlazada al cloro siendo esta combinación altamente reactiva con disposición atraer e<sup>-</sup> por su carga electronegativa (Salgado, 2019)

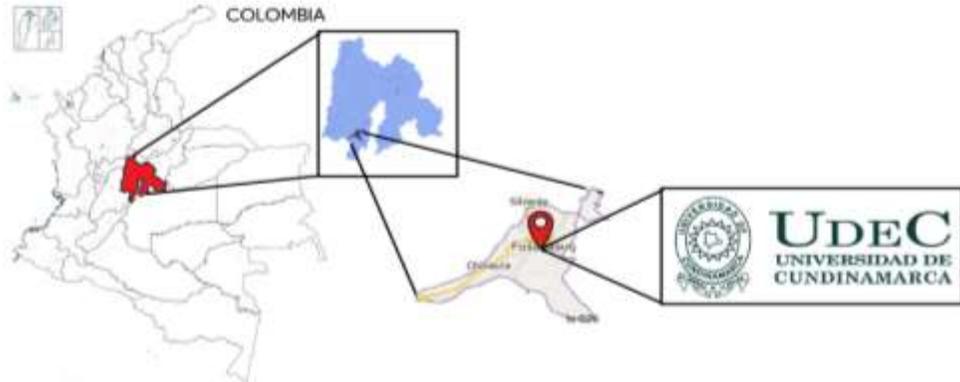
## 6 Materiales y métodos

### 6.1 Localización del experimento

El proyecto se llevó a cabo en los laboratorios de la universidad de Cundinamarca, en el municipio de Fusagasugá el cual se encuentra situado a una distancia de 65 Km de Bogotá D.C con coordenadas  $4^{\circ}20'14''N$   $74^{\circ}21'52''O$  y con una altura promedio de 1765 m.s.n.m. y una temperatura promedio de  $19,4^{\circ}C$ . (Alcaldía Fusagasugá, 2017).

#### Figura 16

*Ubicación laboratorios universidad de Cundinamarca*



Fuente: Adaptación de Alcaldía de Sylvania, (2012), Alcaldía de Fusagasugá (2021)

#### 6.1.1 Selección de unidades experimentales

Las abejas que se emplearon en el estudio se obtuvieron de un apiario proveniente de la empresa apícola (Bioapicol) establecido en la vereda Noruega baja del municipio de Sylvania Cundinamarca, que se encuentra a una temperatura promedio de  $18^{\circ}C$  y una humedad relativa del 75% (Alcaldía de Sylvania, 2012) el apiario cuenta con 35 colmenas de abejas de la especie *Apis mellifera*, establecidas hace cuatro años y sin ningún reporte de muerte por agroquímicos y con registros técnicos productivos, permitiendo la identificación de las características del estado sanitario, el cual presenta una nula o en algunos casos una baja incidencia de enfermedades o parasitismo.

## Figura 17

### *Metodología para la toma de abejas del portanucleo*



Fuente: Elaboración propia (2022)

Se tomo un portanucleo, encerrándolo en una jaula de velo para hacer seguro el entorno y se evitar una fuga masiva de abejas en el laboratorio, ya estando dentro del velo se procedió a quitar la espuma de la piquera o entrada que mantenía encerradas a las abejas y a su vez se conectó un tubo de policarbonato transparente para observar el paso de estas hacia las jaulas, elaboradas igualmente de velo con una pequeña entrada y con una caja de petri para brindar alimento ad libitum (1 Kg de azúcar diluido en 1000 L de agua) durante las horas a las que estuvieran expuestas al insecticida. Las condiciones de temperatura y msnm, no variaron debido a que las condiciones climáticas son muy similares a las registradas en la producción apícola. Esto se comprobó por medio de termómetro (Fusagasugá laboratorios 20 °C; Sylvania producción apícola 22 °C) y la msnm por medio de los registros de las arcadias de los municipios (Fusagasugá 1765 msnm– Sylvania 1470 msnm) (Alcaldía Municipal Sylvania, 2019); (Alcaldía de Fusagasugá, 2021). Estos parámetros se midieron para mantener un entorno controlado proporcionando un control a variables desconocidas que puedan causar estrés en las abejas o sujetos de prueba en la investigación.

Técnica propuesta por EPA (Environmental Protection Agency) para la evaluación de riesgos de polinizadores. Este tipo de exposición es clasificada de Nivel I en EPA, (2014).

## 6.2 Preparación Solución Madre Insecticidas (STOCK)

### 6.2.1 Imidacloprid Y Chlorpyrifos

Para preparar el stock de Imidacloprid se utilizó dos balones volumétricos de 1000 mL, se adiciono 2.1 mL de Imidacloprid y en otro balón 1.4 mL de Chlorpyrifos (Ráfaga 4 EC), se añadió 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada en ambos balones y se disolvieron con agitador a magnético por 30 min hasta que se observó disolución total de los insecticidas. Se aforo con H<sub>2</sub>O destilada.

**Figura 18**

*Preparación solución madre de insecticidas*



Fuente: Elaboración propia (2022)

## 6.3 Diseño experimental y tratamientos

Se utilizo un modelo estadístico de bloques al azar, cada insecticida representa un bloque con cuatro tratamientos diferentes los cuales costan de cuatro concentraciones del

insecticida, cada tratamiento con tres replicas. El tratamiento control también como con tres replicas a las cuales se les dosifico H2O destilada.

**Tabla 1**

*Diseño experimental*

Insecticidas	Replica 1	Replica 2	Replica 3
Control	0 ppm	0 ppm	0 ppm
Imidacloprid	2 ppm	2 ppm	2 ppm
	4 ppm	4 ppm	4 ppm
	8 ppm	8 ppm	8 ppm
	16 ppm	16 ppm	16 ppm
Chlorpyrifos	2 ppm	2 ppm	2 ppm
	4 ppm	4 ppm	4 ppm
	8 ppm	8 ppm	8 ppm
	16 ppm	16 ppm	16 ppm

*Nota.* Diseño experimenta mencionando las dosis del control y los principios activos de los insecticidas utilizados en la investigación. Fuente: Elaboración propia (2022).

**Tabla 2**

*Diseño experimental*

B	R1	R2	R3
B 1	T1	T1	T1
B 2	T2	T2	T2
	T3	T3	T3
	T4	T4	T4
	T5	T5	T5
B 3	T6	T6	T6
	T7	T7	T7
	T8	T8	T8
	T9	T9	T9

**Nota:** en la tabla izquierda las letras hacen referencia a, B (Bloques), T (Tratamientos) y R (Replicas). En el cuadro derecho está representado los insecticidas (Bloques) aplicados, las DL50 (tratamientos) y las réplicas por cada DL50 aplicado. Fuente: Elaboración propia (2022).

## 6.4 Modelo matemático del diseño aplicado

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, \dots, \tau \quad j = 1, \dots, B$$

$Y_{ij}$  = Variable respuesta: PT, ACAT, POD

$\mu$  = media general

$\tau$  = efecto del  $i$  – ésimo tratamiento (DL50)

$\beta_j$  = efecto del  $j$  – bloque (Insecticidas)

$\varepsilon_{ij}$  = error experimental en la unidad  $j$  del tratamiento  $i$  (replicas)

## 6.5 Análisis estadístico utilizado

Los datos se evaluaron mediante Análisis de Varianza (ANOVA) en software InfoStat (2020) comparando bloques (insecticidas) y tratamientos (DL50) con el fin de determinar diferencias estadísticas cuando estas se presentaran , se aplicó prueba de comparación múltiple de medias mediante Test Duncan.

## 6.6 Dosificaciones insecticidas

La toxicidad aguda por contacto de los pesticidas para abejas obreras *Apis mellifera* se tomó de los estudios realizados por (Suchail et al., 2000); (Codling et al., 2017) referidos en la tabla 3, aplicando una dosis subletal media por abeja (DL50) según lo estipulado en la base de datos de Tomlin (2009), ECOTOX (Agencia de Datos de Protección Ambiental de EE.UU) y AgriTox (Agencia Nacional de Seguridad Alimentaria, Ambiental y Ocupacional). Las dosificaciones estándar en abejas se realizaron en escala, como se sugiere en los protocolos de OECD/OCDE (1998).

Las DL50 establecidas en Colombia por la resolución N°01505 de septiembre de 2018 para el producto comercial “ZERO INSECTOS IMIDACLOPRID 70 WD” cuyo

ingrediente activo es imidacloprid, predetermino que la toxicidad aguda o DL50 por contacto es de 0.081 ( $\mu\text{g}/\text{abeja}$ ) y se clasifico como altamente tóxica para la especie *Apis mellifera* (ANLA, 2018). Así mismo la ANLA estableció la DL50 en la resolución 00640 del 04 de mayo de 2018 para el producto comercial “CLORFOS ® CHALVER 45 EC” del cual su ingrediente activo es chlorpyrifos, determinando que la DL50 por contacto es de 0.059 ( $\mu\text{g}/\text{abeja}$ ) también clasificandolo como altamente tóxica (ANLA, 2018). Teniendo en cuenta lo anterior se prepararon 4 DL50 reportadas por Suchail et al., (2000) para imidacloprid y para chlorpyrifos se tomó de Codling et al., (2017), sin exceder estas DL50.

**Tabla 3**

*Dosis letales por contacto*

Principio activo del insecticida	Concentraciones ng/abeja				Autor
	DL50 1	DL50 2	DL50 3	DL50 4	
Imidacloprid	3	6	12	24	(Suchail et al., 2000)
Chlorpyrifos	7	15	30	60	(Codling et al., 2017)

Fuente: Adaptado de Codling et al., (2017) y Suchail et al., (2000).

### 6.7 Inducción al estrés oxidativo

Para inducir al estrés oxidativo de las abejas *Apis mellifera* se siguieron y adaptaron lineamientos estipulados en la guía para la evaluación de riesgo de polinizadores determinada por la APA OCSP 850.3020 “Honey Bee Acute Contact Toxicity Test”, recomendando que si el insecticida puesto a prueba tiene una composición basada en el ingrediente activo analizado y sin ningún otro compuesto químico, se debe observar los efectos secundarios que adoptan las abejas 1 hora después de la aplicación del

ingrediente activo, para analizar comportamientos atípicos y poder tomar muestras e investigar procesos metabólicos de desintoxicación de *Apis mellifera* (EPA, 2012).

Para exponer a las abejas a las DL50 de Imidacloprid y Chlorpyrifos se rociaron las cajas de velo con DL50 respectivas al diseño experimental. Se observó el comportamiento de las abejas por dos horas antes de pasarlas al ultrarefrigerador, a una temperatura de -80°C, causando una detención en la actividad enzimática, de acuerdo con la metodología propuesta en la investigación (PT, actividad de CAT y POD).

### **Figura 19**

#### *Abejas criopreservadas*



Fuente: elaboración propia (2022)

Pasadas las 2 horas se diseccionaron las muestras, separando el abdomen y cabeza, según lo sugerido por Forêt et al., (2007); Pech(2019); Kairo et al., (2017). Estos trabajos de investigación mencionados anteriormente han encontrado actividad enzimática relacionada a procesos de desintoxicación.

### **6.8 Análisis de indicadores metabólicos**

Se analizaron dos enzimas antioxidantes que están presentes en la actividad metabólica del insecto en el momento que el organismo se intoxica. Los análisis se

orientaron en la búsqueda de cambios en CAT y POD. Los métodos analíticos que se utilizaron para medir la concentración de estas enzimas antioxidantes fueron:

#### **Tabla 4**

*Variables metabólicas*

<b>Variable evaluada</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Método</b>
Proteína Total	PT	Buffer tris HCl pH 7 (Quintin, 2010) Adaptado por granados (2021)
Catalasa	CAT	Permanganometría (R. Castro et al., 2006)
Peroxidasa	POD	Guayacol (Senthilkumar et al., 2021)

Fuente: Adaptado de Salgado (2018)

### **6.9 Extracción de enzimas**

Se tomó 3 g de muestra (Abdomen y cabeza), luego se colocaron en un embudo y probeta para hacer filtrar con 30 mL de acetona fría, se desechó el filtrado y se pasó el sobrenadante a un beaker, agregando 15 mL de Buffer fosfato pH 7.0, agitándolo 5 minutos y posteriormente centrifugándolo 20 minutos a 8.500 rpm, finalmente, el filtrado se depositó en tubos de ensayo que estaban en baño de hielo (4°C) para preservar la extracción enzimática.

### **6.10 Determinación actividad catalasa (CAT)**

Para determinar actividad de catalasa se tomó 1 mL de extracto enzimático y se añadió 0.5 mL de Buffer fosfato pH 7.0; 0.5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.05 M y 1.5 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Se agitó en vortex por 10 segundos, pasando el tubo de ensayo a baño de hielo por 3 min. Después de este tiempo se agito suavemente y agregando 1 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:3. Se Paso el extracto a un beaker. Utilizando una bureta digital para titular KMnO<sub>4</sub> 0.01 N en el

extracto enzimático, agitándolo el beaker suavemente, hasta que el extracto adopto un color rosa pálido, registrado el  $\text{KMnO}_4$  0.01 N gastado.

### 6.11 Determinación superóxido dismutasa (POD)

Se tomó 0.5 mL de extracto enzimático y se agregó 4,5 mL de Guayacol /  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.05 M en un tubo de ensayo en baño de hielo, agitándolo por 5 minutos. Se calibró espectrofotómetro con longitud de onda de 470 nm, utilizando un blanco de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. La absorbancia de la solución enzimática se leyó cada 5 segundos durante 120 segundos.

### 6.12 Extracción de proteína

La proteína se determinó por método Bradffor (1976) utilizando albumina de suero bovino (BSA) como estándar. Se tomaron lecturas en espectrofotometría UV con una longitud de onda de 595 nm.

#### Tabla 5

*Absorbancia BSA*

Lecturas para curva de calibración de proteína albumina									
mg/mL	B	0.1	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Absorbancia	0.000	0.015	0.0705	0.119	0.149	0.181	0.1995	0.241	0.2545

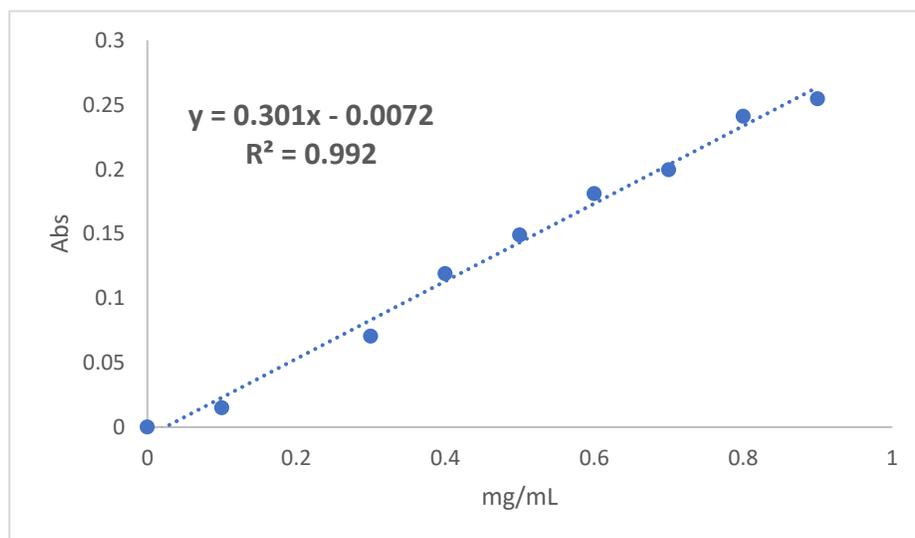
Nota. Curva de calibración albumina.

Se preparó solución concentrada de BSA 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , pesando 4 g, disolviéndolo en 4 mL de agua destilada para homogeneizar la solución. Se realizó una curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de BSA, las soluciones se prepararon con concentraciones de 100-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a partir de BSA y agua destilada (Buffer) teniendo como volumen final 1 mL.

### 6.12.1 Cuantificación de proteína en extractos concentrados

**Figura 20**

Curva de calibración BSA



**Nota:** Curva estándar de albumina de suero bovino. La absorbancia se midió a 562 nm. En la curva se determinó la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Fuente: Elaboración propia (2022).

Los extractos proteicos se cuantificaron por medio de la técnica Lowry adaptado, utilizando Tris-HCl pH 8 el cual se adecuo para analizar tejido del *Apis mellifera*. Se elaboro 4 curvas de calibración con albumina bovina como punto de comparación en el análisis de extractos proteicos de *Apis mellifera*.

### 6.12.2 Extracción de proteínas de abejas tratadas con imidacloprid

La extracción de proteínas se realizó de acuerdo con el método modificado de Zhong et al. (2005). Previo a la extracción de proteína, las abejas tratadas con insecticida se lavaron tres veces con solución salina y se separó cabeza y abdomen. Las abejas (1 mg abejas/10  $\mu$ L tampón) se mezclaron en tampón de fosfato (BF) pH 7.6, que contiene 32,5 mmol/L  $K_2HPO_4$ , 2,6 mmol/L  $KH_2PO_4$ , 400 mmol/L de NaCl. La mezcla se homogeneizó durante 20 minutos en hielo y digirió durante 2 min, centrifugado a 8.000 RPM durante

10 min. Luego se centrifugó a 8.000 RPM por 10 minutos. El sobrenadante se retiró a otro tubo para un uso posterior. Los precipitados (1 mg abejas/2  $\mu$ L tampón) se mezclaron con BF y luego se centrifugaron a 8.000 RPM durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y se mezcló en un tubo que contenía sobrenadante como un extracto de proteínas soluble en PB, mientras que el precipitado (1 mg de abejas/10  $\mu$ L de tampón), que contenía las proteínas insolubles en PB se mezclaron en tampón RIPA como buffer de lisis (LB) (0.5M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5M NaCl, 2.5% ácido desoxicólico, 10% NP-40, 10mM EDTA.). Se homogeneizaron las mezclas, durante 10 minutos en baño de hielo y se colocaron durante 2 minutos, centrifugándose a 8.000 RPM durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregó lo filtrado al tubo que contenía el extracto de proteínas solubles en PB. Se añadió tricloroacético (TCA) a los sobrenadantes recogidos hasta una concentración final del 10%, y luego la mezcla se mantuvo en hielo durante 10 minutos para la precipitación y desalinización de proteínas. Posteriormente, la mezcla se centrifugó dos veces a 8.000 RPM durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y los precipitados (1 mg de muestra/4  $\mu$ L de tampón) se resuspendieron en LB, la mezcla se homogeneizó durante 5 min en hielo y lisaron durante 2 minutos, posteriormente se ajustó a pH 7 con 2 mol/L NaOH. La mezcla que contenían los extractos proteicos de abejas obreras se almacenaron a -70 °C para su posterior uso.

### **Cuantificación de proteínas y electroforesis de proteínas**

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976) usando BSA como estándar. La absorción se midió a 595 nm en un espectrofotómetro UV. Se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS con un gel separador al 10% a 100 mA de corriente. Los cambios se visualizaron en los patrones de bandas y se analizaron cualitativamente en software GelAnalyzer 19.1 y poder estimar pesos moleculares.

## 7 Resultados y discusión

### 7.1.1 Propiedades fisicoquímicas de los insecticidas

Para entender cómo se comportan los insecticidas en el ambiente, se midieron dos parámetros fisicoquímicos: pH y Conductividad Eléctrica ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ ). Esto describe el comportamiento fisicoquímico de la molécula en el ambiente.

**Tabla 6**

*Propiedades fisicoquímicas de los ingredientes activos en los ensayos*

Insecticida	$\bar{X}$ pH	$\bar{X}$ Conductividad Eléctrica ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )
Imidacloprid	$5.380 \pm 0.204$	$16.667 \pm 3.055$
Chlorpyrifos	$7.283 \pm 0.030$	$15.667 \pm 0.577$

Fuente : Autor (2022)

Los insecticidas no mostraron cambios significativos en sus propiedades fisicoquímicas en las dosis analizadas demostrando que la molécula de imidacloprid mantiene un pH ácido de  $5.380 \pm 0.204$  contrario a Chlorpyrifos  $7.283 \pm 0.030$  el cual mantuvo un pH neutro. La conductividad eléctrica de Imidacloprid fue de  $16,667 \pm 3,055 \mu\text{S}/\text{cm}$  y para Chlorpyrifos  $15.667 \pm 0.577$  clasificando esta propiedad fisicoquímica como muy baja (Lamela, 2018). El pH del insecticida al entrar en contacto con un organismo afecta directamente el pH de la cutícula del insecto, generando estrés en la epidermis, otro factor es la conductividad eléctrica de los insecticidas, la cual afecta el metabolismo de los insectos expuestos, debido a la carga de iones presentes en las gotas (DL50) aplicadas a *Apis mellifera* (Padrón, 2020), este factor se relaciona con los electrolitos y minerales debido a que estos dos factores aumentan según la conductividad eléctrica, esto quiere decir que Imidacloprid al tener mayor conductividad eléctrica que Chlorpyrifos, presenta una mayor concentración de electrolitos y minerales, índice relacionado con el pH ácido.

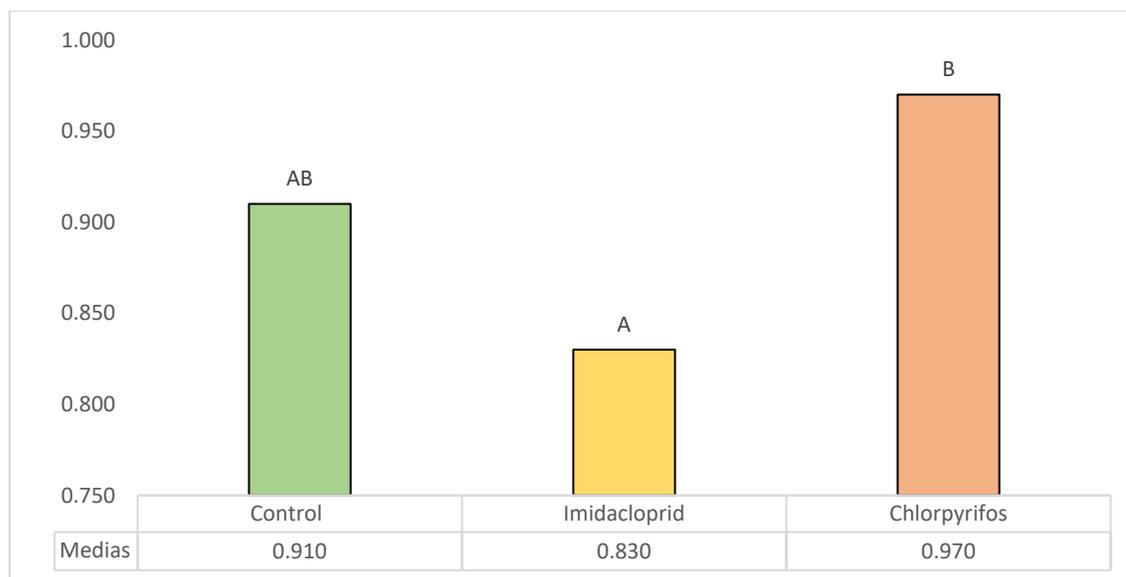
Sin embargo Chlorpirifos al presentar una conductividad eléctrica menor que Imidacloprid, indicaría que hay una mayor concentración de materia orgánica y una menor concentración de electrolitos y minerales.

## 7.2 Proteína total ([PT])

Los extractos proteicos obtenidos de *Apis mellifera* que se obtuvieron según la metodología utilizada por Li et al., (2007). Utilizando BSA para elaborar curva de calibración (Figura 18) y utilizando su  $R^2$  como referencia para poder determinar proteína de cada tratamiento.

### Figura 21

Figura 1. Concentración de proteína total en extractos por tratamiento



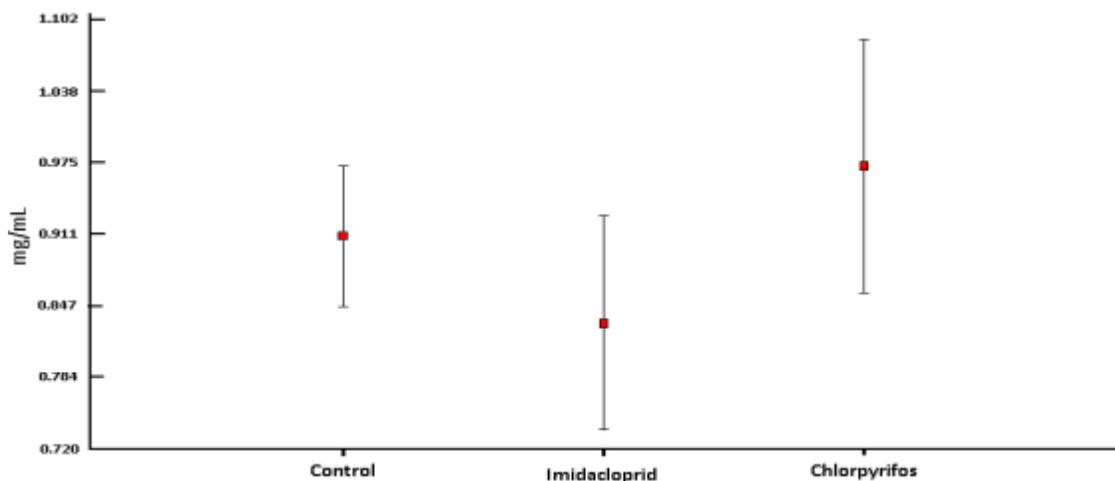
**Nota:** [PT] por tratamiento. Los datos mostrados son las medias de las observaciones con letras <sup>A</sup> <sup>B</sup> que representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos. Fuente: Autor (2022).

La [PT] entre tratamientos en la figura 21 muestra cambios significativos ( $p < 0.05$ ) de acuerdo al test de rangos múltiples de Duncan, mostrando significancia mediante letras asignadas, control<sup>AB</sup>, Imidacloprid<sup>A</sup>, Chlorpyrifos<sup>B</sup>.

Las observaciones entre tratamientos con análisis ANOVA presentaron cambios significativos con un p-valor 0.0097. Se aprecia cambios en significativos [PT] ( $p < 0.005$ ) entre el insecticida Imidacloprid y Chlorpyrifos, mientras que el tratamiento control muestra una dualidad con los insecticidas Imidacloprid y Chlorpyrifos con estadígrafo de Duncan el cual indica que las diferencias entre medias que comparten letra no son estadísticamente significativas. De igual manera se destaca que Chlorpyrifos genero una mayor [PT] y por lo contrario Imidacloprid tuvo una [PT] menor que el control.

## Figura 22

Distribución de datos en concentración de proteína total en tratamientos



Nota. diagrama de barras con dispersión estándar de los tratamientos. Fuente: Autor.

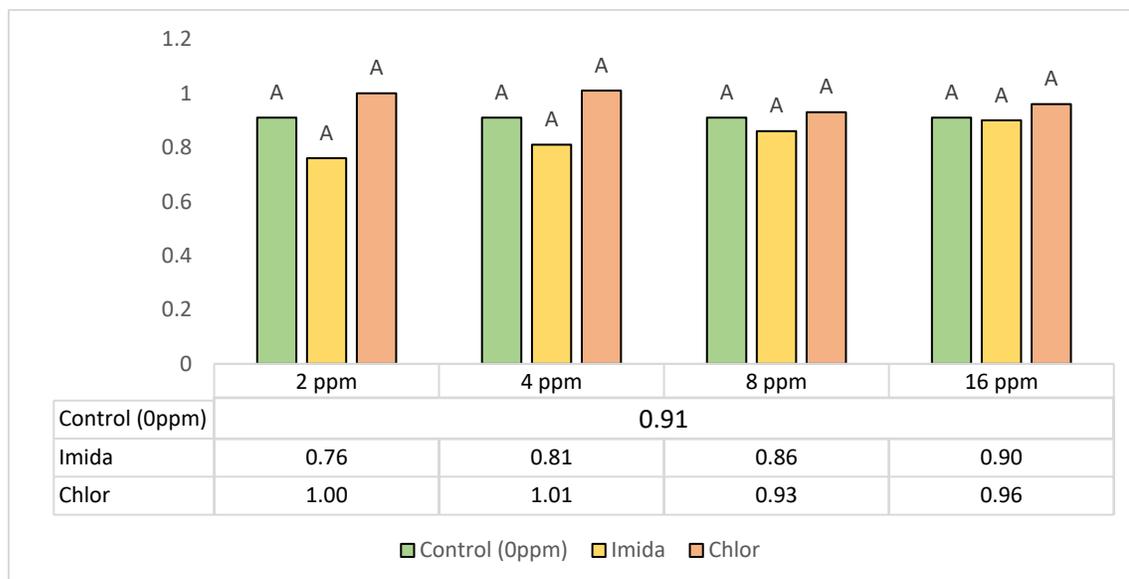
La [PT] en la figura 22 indica que el tratamiento control tiene una dispersión en su [PT] ( $0.910 \pm 0.063$ ) menor que los tratamientos Imidacloprid ( $0.832 \pm 0.095$ ) y Chlorpyrifos ( $0.972 \pm 0.113$ ). La distribución de los datos entre los tratamientos de los

insecticidas, fueron mayores, mostrando una mayor [PT], identificando una alteración en la [PT] como efecto de las dosis aplicadas.

Los cambios significativos entre tratamientos concuerdan con los estudios realizados por Wilde et al., (2016), los cuales aplicaron DL50 de 5 y 200 ppm de imidacloprid en abejas *Apis melliferas*, mostraron cambios significativos en la [PT], encontrando una reducción del 7% [PT] en ambos muestreo en comparación al tratamiento control. Las diferencias entre el grupo control e imidacloprid refleja que un cambio bioquímico en los niveles de [PT], causando estrés y afectando el comportamiento y funciones fisiológicas para combatir RL producidos por ROS. El efecto de este insecticida se relaciona y ubica en las glándulas hipofaríngeas (HPGs) según Hatjina et al., (2013), quienes exponen una reducción del 14,5% al 16,3% de diámetro en lóbulos de las GPHs y una afectación en la respiración abdominal. Los cambios de estos lóbulos afectan la colmena debido a que la síntesis de jalea real tiene lugar en las GPHs, aportando el 82% de proteínas a esta sustancia (Knecht & Kaatz, 1990). Una mayor concentración de proteína en el grupo de Chlorpirifos respecto al tratamiento Imidacloprid, presume una alteración bioquímica en la expresión de proteínas de *Apis mellifera* creando efectos crónicos a largo tiempo ya que se ha evidenciado un déficit en la respuesta inmune, en el ciclo reproductivo y en la supervivencia de la colmena (Martin-Culma & Arenas-Suárez, 2018). Se presume que estas alteraciones tienen efectos en la expresión de genes que reflejan cambios fisiológicos y de comportamiento (Fent et al., 2020). Si bien en este estudio encontré alteraciones en [PT] en los diferentes tratamientos, estos no determinan las proteínas asociadas a la desintoxicación de xenobióticos como Imidacloprid y Chlorpirifos. Se puede relacionar la interacción de proteínas que hacen frente al estrés oxidativo en procesos metabólicos endógenos para combatir RL que dañan lípidos, proteínas, y ADN.

**Figura 23**

[PT] entre DL50 en *Apis mellifera*



**Nota:**  $\bar{x}$  de [PT] entre DL50. La letra <sup>A</sup> indica que no hubo diferencias significativas de acuerdo a prueba de Duncan. Fuente: Autor.

En la figura 23 se expone las medias de [PT] entre dosis, encontrándose, que no se hallaron diferencias significativas entre las DL50 aplicadas y su [PT].

**Tabla 7**

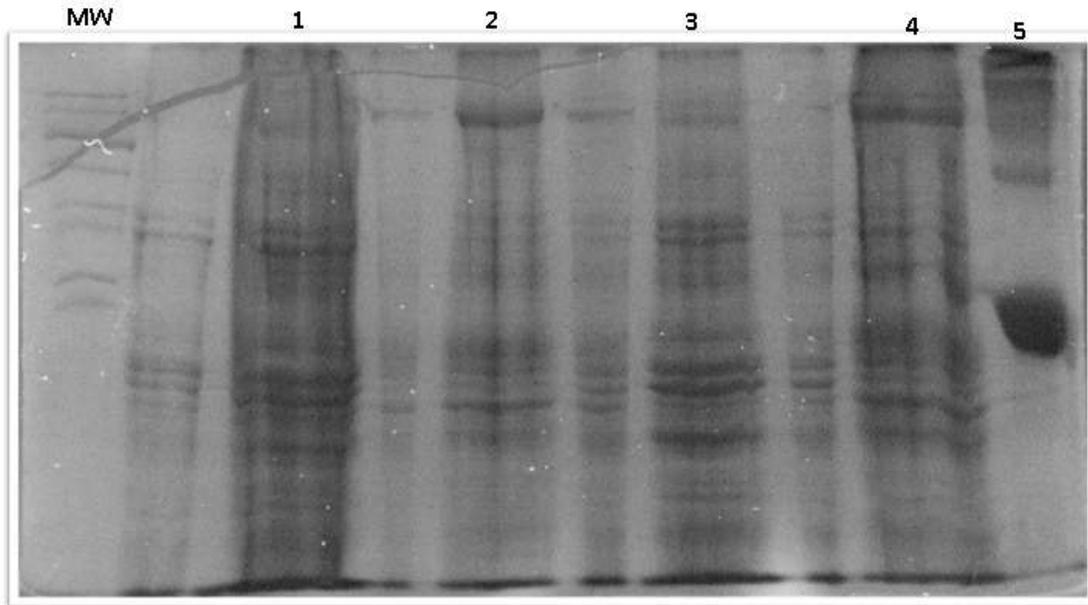
Tabla Valores promedios de entre tratamientos de [PT]

		Tratamientos			
[PT] (mg/ml)	control 0.91±0.063	Imidaclopid 2 ppm	Imidaclopid 4 ppm	Imidaclopid 8 ppm	Imidaclopid 16 ppm
		0.76±0.124	0.81±0.008	0.86±0.088	0.90±0.099
		Chlorpyrifos 2 ppm	Chlorpyrifos 4 ppm	Chlorpyrifos 8 ppm	Chlorpyrifos 16 ppm
		1.00±0.094	1.01±0.125	0.93±0.176	0.96±0.096

Fuente: Autor (2022)

## Figura 24

*Electroforesis SDS-PAGE en dosis*

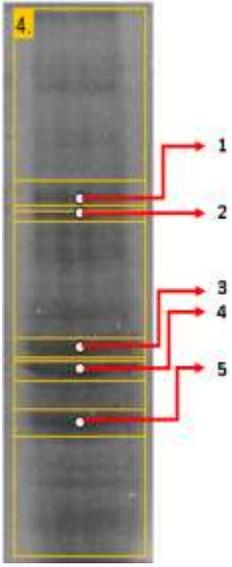
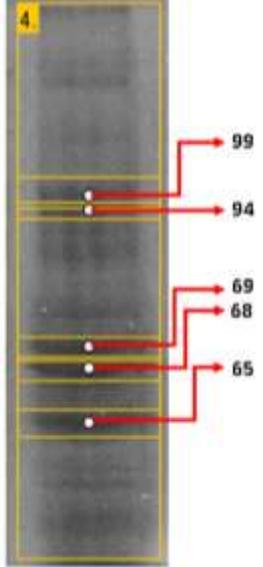
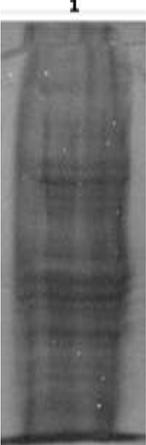
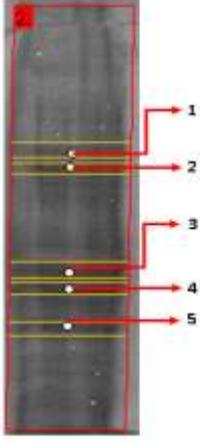
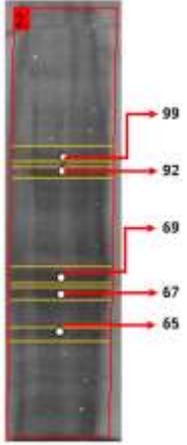


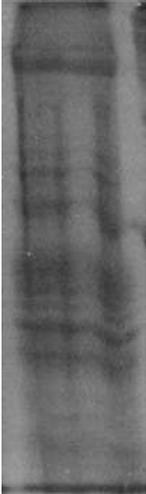
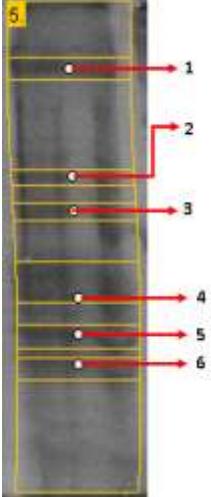
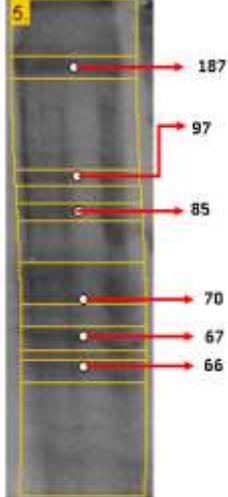
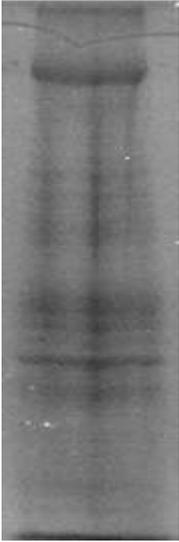
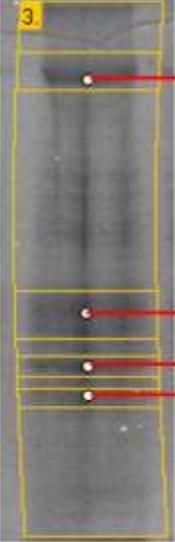
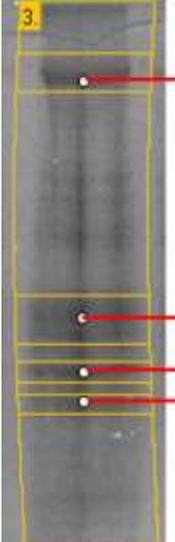
**Nota:** Imagen de electroforesis en gel de poliacrilamida de una dimensión de extractos proteicos de *Apis mellifera* con dos tratamientos. Carril MW (Marcador para peso molecular); Carril 1 (Abdomen expuesto imidacloprid); carril 2 (Cabeza expuesto imidacloprid); carril 3 (Tratamiento control Abdomen); carril 4 (Tratamiento control cabeza); Carril 5 (Albúmina)

La tabla 7 muestra el análisis de los extractos de proteínas de abdomen y cabeza procesados en el software GelAnalyzer, el cual identifica en el carril de las muestras, las bandas y la longitud de estas, determinado el peso de molecular (KDa) de las proteínas en los extractos analizados.

**Tabla 7**

*Análisis electroforesis SDS-PAGE*

Parte taxonómica	Original	Análisis carriles en software GelAnalyzer (Bandas)	Peso Molecular
Abdomen - Control			
Abdomen - 24 ppm - Imidacloprid			

<p>Cabeza - Control</p>			
<p>Cabeza - 24 ppm - Imidacloprid</p>			

Fuente: Autor (2022).

Se aprecia en la tabla 9 el peso molecular de las bandas de los extractos proteicos del tratamiento control y DL<sub>50</sub> (24 ppm) de Imidacloprid. Estos no presentaron diferencias significativas en el abdomen de la abeja, sin expresar algún cambio en las bandas de los carriles 1 y 3. Los pesos moleculares en los extractos de la cabeza, no mostraron cambios significativos; sin embargo, en el tratamiento de imidacloprid no se observaron 2 fracciones de proteasas activas en comparación con el tratamiento. Esto se

relacionaría con la [PT] en las DL50 de imidacloprid (Figura 30) la cual fue menor en comparación al tratamiento control.

**Tabla 9**

*Pesos moleculares de extractos analizados*

Abdomen						
Nº Bandas	1	2	3	4	5	-
Imidacloprid	99	94	69	68	65	-
Control	99	92	69	67	65	-
Cabeza						
Nº Bandas	1	2	3	4	5	6
Imidacloprid	182	X	X	71	67	66
Control	187	97	85	70	67	66

Nota: Peso molecular (KDa) de las secciones taxonómicas estudiadas. Fuente: Autor (2022)

### 7.3 Catalasa (CAT)

Actividad de CAT se definió como la cantidad de enzima requerida para descomponer 1 mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Tabla 10**

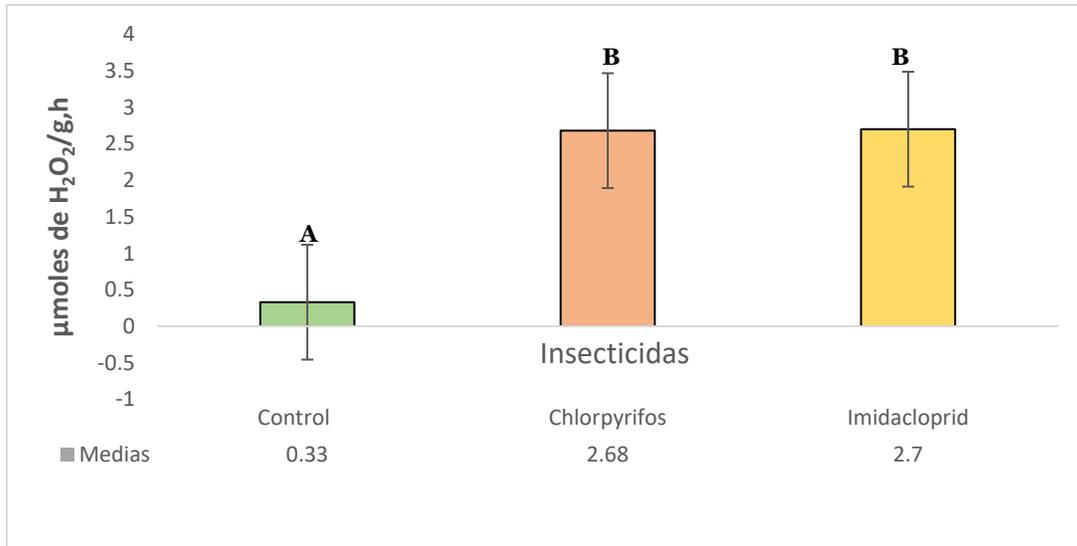
*Valores promedios de entre tratamientos de actividad de CAT*

Tratamientos					
CAT (µmoles de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /g,h)	control 0.33±0.16	Imidacloprid 2 ppm	Imidacloprid 4 ppm	Imidacloprid 8 ppm	Imidacloprid 16 ppm
		4.30±0.14	2.31±0.14	1.26±0.14	2.93±0.14
		Chlorpyrifos 2 ppm	Chlorpyrifos 4 ppm	Chlorpyrifos 8 ppm	Chlorpyrifos 16 ppm
		1.26±0.16	1.06±0.16	2.81±0.16	5.59±0.16

Fuente: autor

**Figura 25**

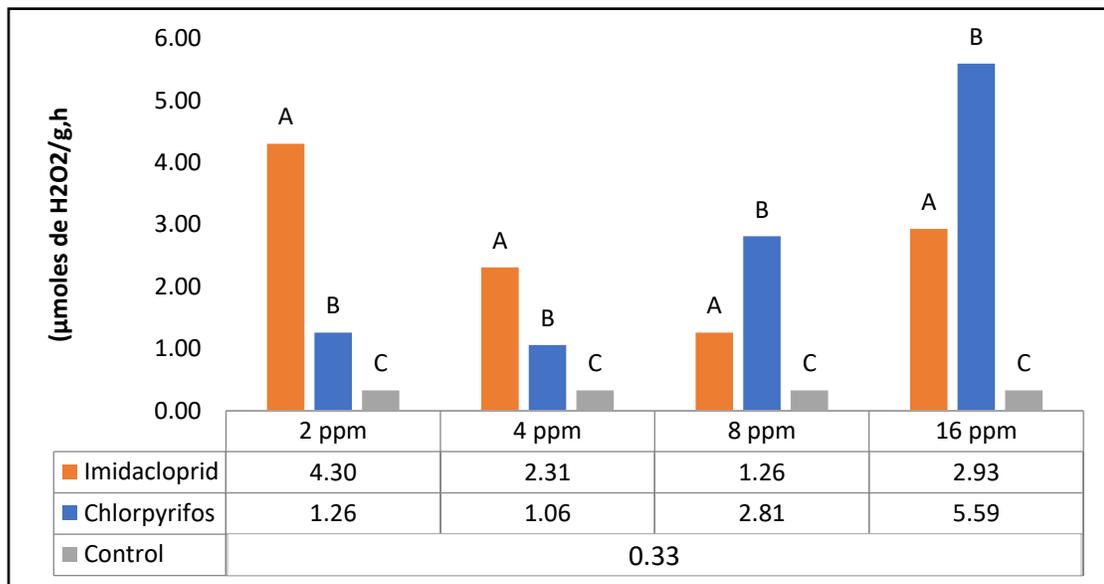
*Actividad de CAT entre tratamientos*



*Nota.* Los datos mostrados son las medias de las observaciones con letras <sup>AB</sup> que representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre control e insecticidas por medio de prueba de Duncan. Fuente: Autor (2022)

**Figura 26**

*Figura 2. Actividad de CAT entre DL50*



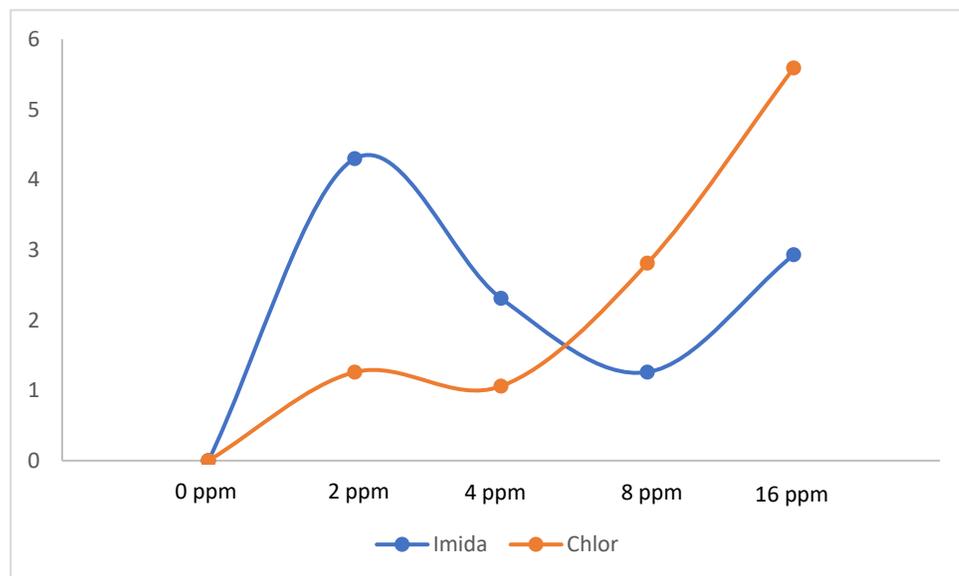
*Nota:* X de actividad de CAT entre DL50. Las letras <sup>ABC</sup> indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre DL50 de acuerdo a la Prueba de Duncan.

La actividad de CAT en la figura 25 muestra cambios significativos ( $p < 0.05$ ) entre el control y los insecticidas con un p-valor 0.0174 en prueba estadística de ANOVA, el método de prueba de Duncan encontró cambios significativos entre el control y los insecticidas, mostrando la significancia mediante letras asignadas al control<sup>A</sup>; Chlorpyrifos<sup>B</sup> e Imidacloprid<sup>B</sup>.

En la figura 26 se observa cambios significativos ( $p < 0.05$ ) entre DL50 con un p-valor 0.0077 en prueba estadística de ANOVA, encontrando cambios significativos entre DL50 analizadas mediante prueba de Duncan, observando cambios significativos entre la DL50 en los tratamientos 2 ppm, 4 ppm, 8 ppm, 16 ppm .

**Figura 27**

*Comportamiento actividad CAT*



*Nota.* Comportamiento de actividad de CAT en DL50 de Imidacloprid Y Chlorpyrifos. Fuente: Autor (2022).

El comportamiento de la actividad de CAT en los tratamientos mostró un aumento significativo respecto al control, indicando que esta enzima antioxidante se activa frente al estrés oxidativo, el cual es generador por RL. Esto puede deberse a al daño de la membrana, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, como lo indica Hodgson & Blake (2010).

Este estudio corrobora esta investigación de Balieira et al., (2018) quien reporta actividad de CAT en *Apis mellifera* en muestras control de  $1.27 \pm 0.33$  (U/mg proteína) con un incremento en la actividad enzimática en dos DL50 aplicadas de 0.7 ng/mL y 2.0 ng, la primera demostró  $3.55 \pm 0.55$  (U/mg proteína) y la segunda  $4.13 \pm 0.23$  (U/mg proteína). Se Contrasto DL50 aplicadas dentro de este estudio, demostrando que la actividad CAT está en los mismos parámetros mencionados por Balieira et al., (2018). En otro estudio reportado por Migdał et al., (2020), se observa actividad enzimática de CAT, la cual aumenta con la aplicación de DL50 de insecticida Amitraz, con valores de entre 4 y 10 (U/mg proteína).

Lo anterior se puede explicar en razón a la acción de estrés oxidativo que generó el insecticida en *Apis mellifera*, con la consecuente producción de los radicales libres peróxidos los cuales, probablemente son atacados inmediatamente y degradados por la RBE de la CAT, dado que es una enzima peróxido-reductasa los cuales, que transforma el radical peróxido en  $H_2O$  y  $O_2$  molecular. De modo que el comportamiento de Imidacloprid produce una RBE irreversible, ocupando los nAChR, inhibiendo la AChE la cual degrada ACh, esta genera una sobreexcitación en los músculos de *Apis mellifera*, originando una producción de RL los cuales son los causantes del estrés oxidativo.

#### **7.4 Peroxidasa (POD)**

La actividadde POD puede definirse como la cantidad de enzima ( $\Delta A/g.h$ ) requerida para descomponer  $H_2O_2$ . Este estudio encontró cambios significativos ( $p < 0.005$ ) entre insecticidas y DL50.

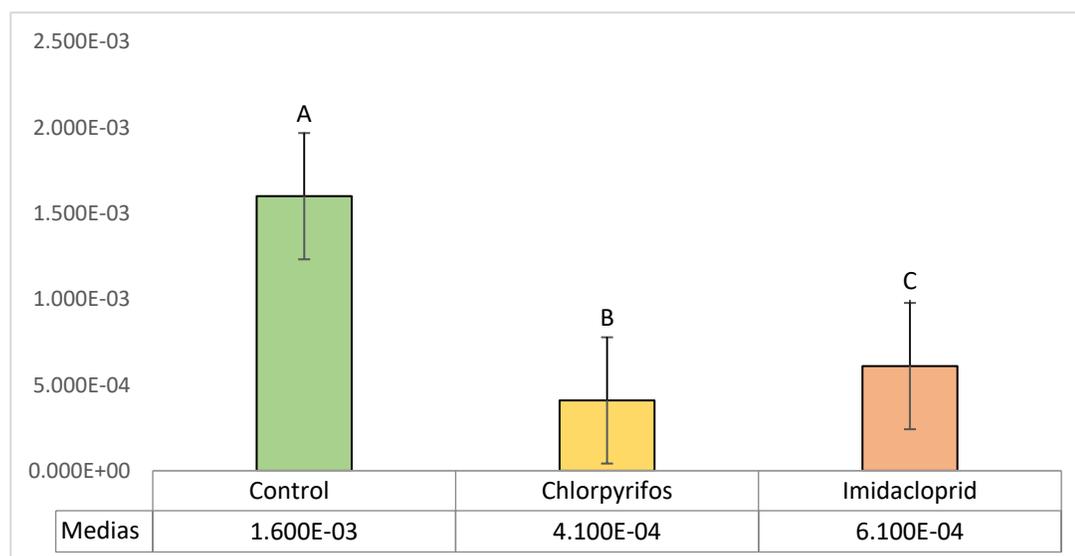
**Tabla 11***Valores promedios de entre tratamientos de actividad POD*

		Tratamientos			
POD ( $\Delta A/g.h$ )	control	Imidacloprid 2 ppm	Imidacloprid 4 ppm	Imidacloprid 8 ppm	Imidacloprid 16 ppm
		2.722 $\pm$ 0.00042	1.750 $\pm$ 0.00063	1.205 $\pm$ 0.00041	1.540 $\pm$ 0.00037
	3.907 $\pm$ 0.0012	Chlorpyrifos 2 ppm	Chlorpyrifos 4 ppm	Chlorpyrifos 8 ppm	Chlorpyrifos 16 ppm
		1.812 $\pm$ 0.00078	1.106 $\pm$ 0.00035	0.460 $\pm$ 0.0012	0.236 $\pm$ 3.309

Fuente: autor

**Figura 22**

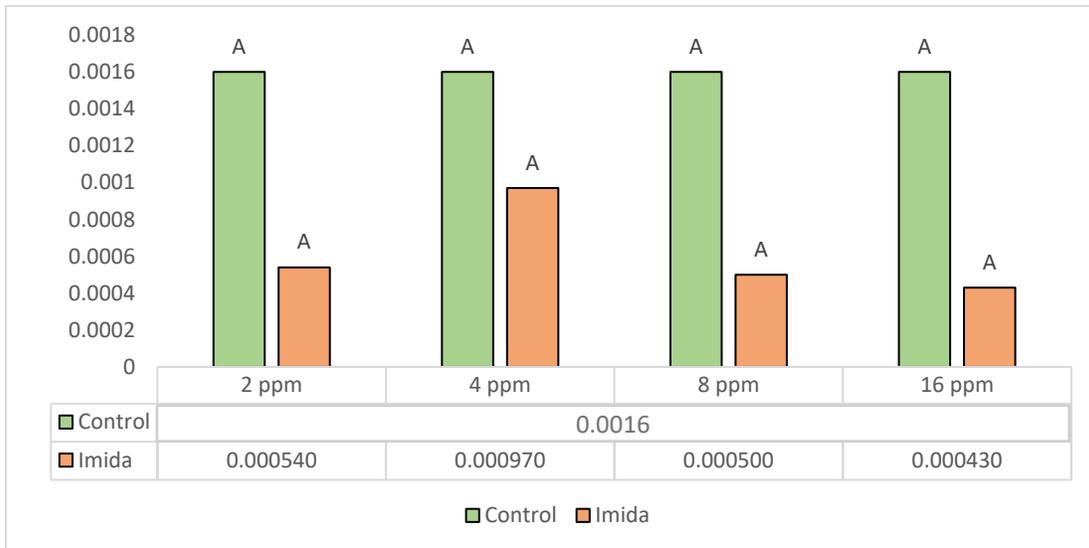
Actividad de POD entre tratamientos



Nota. Medias de actividad de POD. Los datos mostrados son las medias de las observaciones obtenidas e identificadas con letras <sup>AB</sup> las cuales representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre control e insecticidas. Comparación realizada con prueba de Duncan. Fuente: Autor.

**Figura 29**

*Actividad de POD entre DL50 control y Imidacloprid*

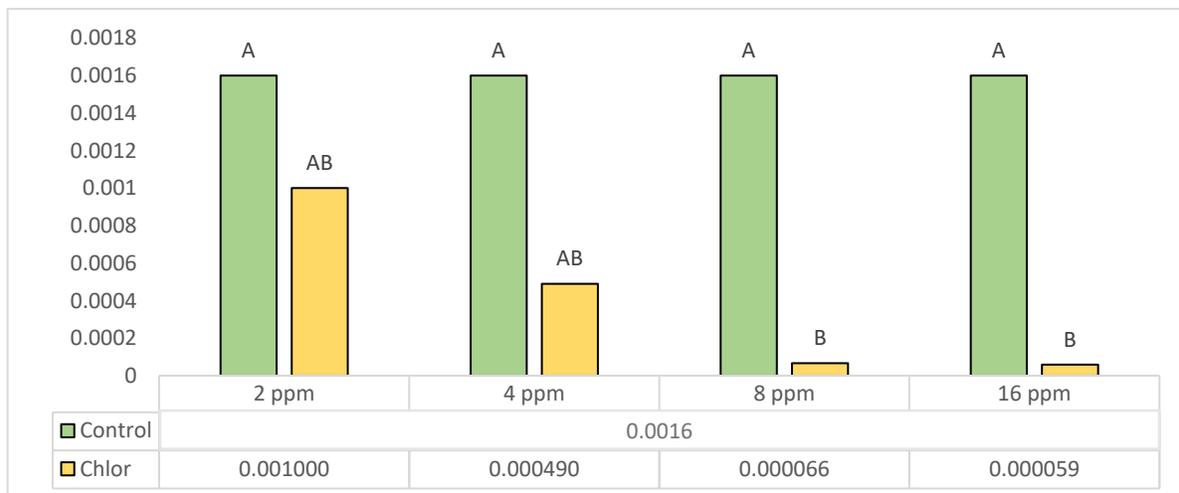


Nota. Medias de actividad de POD entre tratamientos. Las letras <sup>A</sup> indican que no se hallaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo a Prueba de Duncan.

Se puede observar en la figura 29 la actividad de POD ( $\Delta A/Seg$ ) en los extractos obtenidos de *Apis mellifera*, indicando que en el insecticida Imidacloprid disminuyó la actividad enzimática en las cuatro DL50 en comparación con el control,

**Figura 30**

*Actividad de POD entre DL50 control y Imidacloprid*



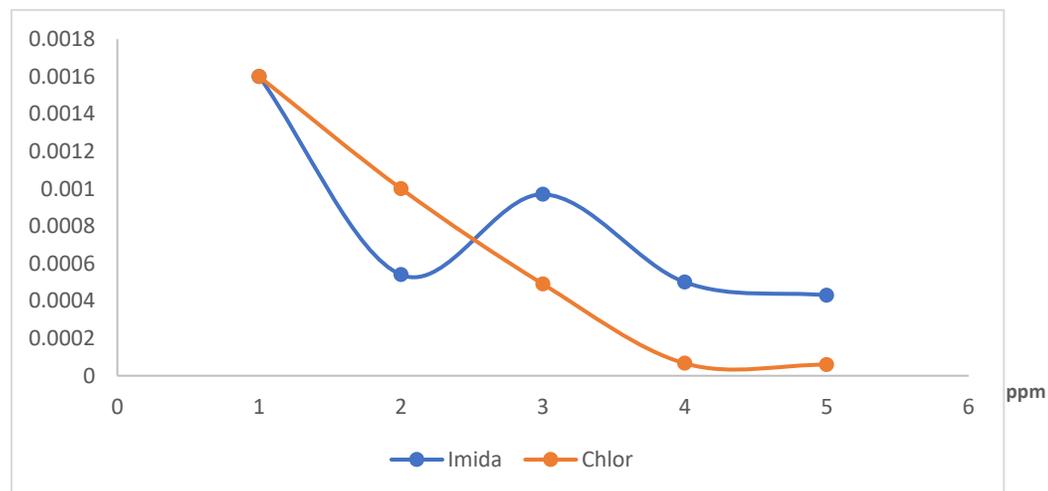
Nota. Medias de actividad de POD entre tratamientos. Las letras <sup>A</sup> y <sup>B</sup> indican que se hallaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo a Prueba de Duncan.

Chlorpyrifos mantuvo una dualidad en las DL50 de 2 y 4 ppm comparadas con 0 ppm indicando que las medias que tienen las mismas letras no muestran diferencias significativas entre ellas ( $p > 0.005$ ) de igual forma las DL50 de 8 y 16 ppm comparadas con 0 ppm, indica que se hallaron diferencias significativas ( $p < 0.005$ ).

En la figura 23 se observan las DL50 con cambios significativos ( $p < 0.005$ ) entre el control y los tratamientos analizados por prueba de Duncan. Indicando que el control mantiene una mayor actividad de POD que los demás tratamientos con insecticidas.

### Figura 31

*Comportamiento de actividad de POD de tratamientos*



Nota. Comportamiento de actividad de POD en DL50 de Imidacloprid Y Chlorpyrifos.

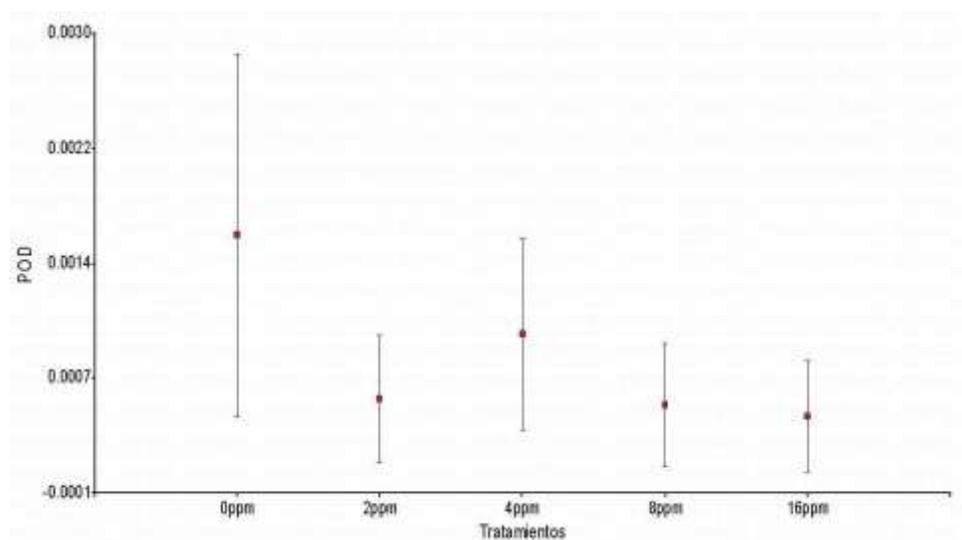
Fuente: Autor

El comportamiento de la actividad de POD en relación con los insecticidas es corroborado por Corona & Robinson (2006), indicando que los insectos carecen de POD para catalizar la reducción de  $H_2O_2$ ; Sin embargo Decio et al., (2021) encontraron actividad enzimática de POD en *Apis mellifera* expuestas a una dieta dosificada con

Tiametoxam – TMX (0.0227 ng/ $\mu$ L en alimento), detectando actividad de glutatión-peroxidasa en cabeza e intestino, esta enzima pertenece al grupo de las peroxidasa la cual tiene como función la protección del efecto deteriorativo de los hidroperóxidos ( $H_2O_2$ ).

### Figura 32

*Dispersión de observaciones en actividad POD con DL50 Imidacloprid*



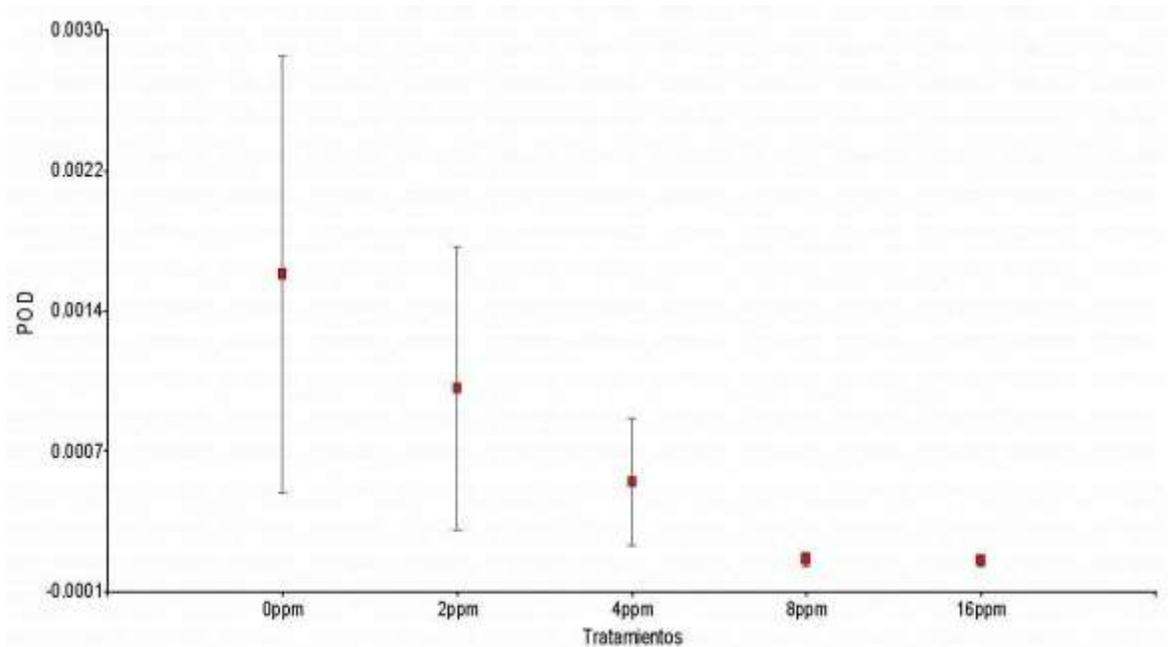
*Nota:* Gráfica de barras con desviación estándar en la actividad de POD en cada tratamiento. Fuente: Autor.

El método de guayacol para encontrar actividad enzimática de POD en este estudio no detecto cambios enzimáticos entre tratamientos Del insecticida Imidacloprid (Figura 32)por medio de prueba de Duncan. Sin embargo, en el tratamiento de 0 ppm (control), se tiene una desviación estándar entre datos mayor que las desviaciones estándar de DL50. Las DL50 de 2, 8, Y 16 ppm mantienen una desviación estándar muy parecida entre sus datos pero menor que el control, mientras que el tratamiento de 4 ppm tiene una desviación estándar mayo que los demás tratamientos y menor que tratamiento control Mostrando que las lecturas de DL50 de 0 ppm (control) fue mayor que las demás DL50 del

insecticida Imidacloprid, posiblemente porque tuvieron una menor actividad de POD debido a una reducción o inhibición de la actividad de esta enzima.

### Figura 33

*Dispersión de observaciones en actividad POD con DL50 Chlorpyrifos*



*Nota:* Gráfica de barras con desviación estándar en la actividad de POD en cada tratamiento. Fuente: Autor.

La figura 33 muestra la distribución de datos observados indicando una menor actividad de POD al aumentar las DL50 aplicadas, mostrando un mecanismo irreversible en la RBE al aumentar las DL50. Esto evidencia que la POD no puede regular altas dosis de Chlorpyrifos originando estrés oxidativo en *Apis mellifera*. evidenciando como esta molécula por contacto es altamente toxica y puede llegar a causar efectos irreversibles al ocasionar daños originados desde el sistema parasimpático y desgastando los ganglios nerviosos como se indica en la figura 14 (Picco et al., 2011)

## 7.5 Discusión de Resultados

El crecimiento de producciones apícolas en Colombia ha crecido un 5% en los últimos años (Coneo, 2021). Sin embargo, los casos reportados de CCD en Colombia (Figura 1) han generado sospechas de pesticidas, utilizados en cultivos. A pesar de que se ha comprobado que los herbicidas, insecticidas y fungicidas afectan el ecosistema de polinizadores como lo son las abejas, no se han generado leyes para la protección de estas, en el marco de la conservación de fauna y flora.

Este estudio examinó 2 tipos de insecticidas con una clasificación de toxicidad extrema en abejas (UNA, 2020), corroborando que la actividad de enzimas antioxidantes (CAT y POD) y la [PT] presento cambios bioquímicos al aplicar DL50 de los dos insecticidas. La información actual de estudios sobre los efectos secundarios en la fisiología de *Apis mellifera*, generados por exposición a insecticidas como Imidacloprid y Chlorpyrifos son escasos; sin embargo, las pocas investigaciones reportadas en Journal of Apicultural Research han corroborado con la información de este estudio. Lo reportado por Wilde et al., (2016) coincide en los datos obtenidos, aunque su metodología para la extracción de proteínas fue diferente.

Estudios recientes especifican los sistemas de desintoxicación de la abeja *Apis mellifera*, los cuales abarcan una superfamilia de enzimas responsables de la desintoxicación de toxinas las cuales son las monooxigenasas del citocromo P450, glutatión transferasa Y carboxilesterasas (Weirich et al., 2002). También se pueden encontrar proteínas de resistencia a múltiples xenobióticos y proteínas de transporte de ATP, este último nucleótido se ve afectado por efectos de los insecticidas, inhibiendo su producción en la mitocondria (Wang et al., 2016), originando ROS, como un producto de la desintoxicación o la descompensación de energía como respuesta celular al estabilizar la homeostasis intracelular. Como producto de estas reacciones metabólicas se generan

radicales libres los cuales se caracterizan por contener una carga eléctrica inestable, desencadenando procesos catalíticos que generan sistemas de defensa críticos como apoptosis celular (Giannuzzi, 2018). La activación de las enzimas investigadas en este estudio (CAT y POD) regulan estos RL en la célula, frenando la muerte celular y el inicio de efectos secundarios en funciones fisiológicas del organismo relacionadas con patologías o al contrario produciendo estados críticos que generan hormesis y finalmente la muerte (Constanza & Muñoz, 2010).

Las enzimas antioxidantes CAT y POD en este estudio confirman su actividad ante daños oxidativos de EROS, generadores de estrés oxidativo en la célula. La actividad de CAT en *Apis mellifera* frente a insecticidas presenta una actividad bioquímica debido a que esta enzima cataliza el peróxido de hidrógeno, evitando que se formen radicales libres (hidroxilo y oxígeno singulete). POD demostró actividad catalítica frente al tratamiento control, encontrando procesos antioxidantes, generados por el estrés oxidativo causado por los insecticidas (Imidacloprid y Chlorpyrifos).

## **7.6 Conclusiones**

El CCD de *Apis mellifera* está relacionado con el uso indiscriminado de pesticidas como Imidacloprid o Chlorpyrifos, debido a que estos agroinsumos tienen una estructura química y un ingrediente activo que no distingue entre insectos polinizadores, originando estrés oxidativo, que desencadenan una serie de eventos metabólicos que pueden terminar en el declive de colmenas completas.

Se hallaron cambios bioquímicos de CAT y POD, en abejas *Apis mellifera* expuestas a dosis subletales dérmicas, evidenciando cambios bioquímicos en sus concentraciones, activando mecanismos metabólicos de defensa, para combatir toxinas que generan radicales libres que llegan a causar daño celular originando problemas en su funcionamiento fisiológico.

Se encontraron cambios significativos entre tratamiento en la [PT] observando un aumento en Chlorpyrifos y una inhibición en Imidacloprid, indicando la expresión de proteínas de resistencia o catálisis proteica.

Las imágenes de SDS-PAGE en extractos proteicos de cabeza de *Apis mellifera* expuestas a imidacloprid revelaron la inhibición de dos fracciones de bandas concordando con la [PT] en el tratamiento de imidacloprid.

## **7.7 Recomendaciones**

Se sugiere utilizar métodos estandarizados para la manipulación de abejas *Apis mellifera* en laboratorio para estudios in vitro, como lo sugiere (Williams et al., 2015) para obtener un error experimental menor y no producir estrés en la abeja ocasionando datos imprecisos. Asimismo se aconseja determinar el tiempo de exposición al insecticidas con el objetivo de encontrar variaciones en las concentraciones enzimáticas.

A pesar de que este estudio utilizo electroforesis SDS-PAGE en tratamientos con imidacloprid no se pudieron realizar los estudios con el tratamiento de Chlorpyrifos por fallas en mecánicas en la fuente de poder del equipo.

Se recomiendan estudios más profundos en la identificación de neurotóxicos que afecten procesos biológicos que alteraren funciones fisiológicas en abejas *Apis mellifera*, hallando proteínas involucradas en el sistema nervioso como lo sugiere Williams et al., (2015).

- 10celula. (n.d.). *Las principales 16 partes de la célula y sus funcione*. Retrieved July 3, 2022, from <https://10celula.com/partes/>
- Abejas Vivas. (2016). *Envenenamiento abejas*. <https://www.facebook.com/AbejasVivas/>
- Alberts, B., Hopkin, K., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2021). *Introducción a la biología celular* (5a ed.). Panamericana.
- Alcaldia de Fusagasuga. (2021). *Informacion Municipal*. <https://www.fusagasuga-cundinamarca.gov.co/Paginas/default.aspx>
- Alcaldia Municipal Sylvania. (2019). *Información del Municipio*. <https://www.sylvania-cundinamarca.gov.co/MiMunicipio/Paginas/Informacion-del-Municipio.aspx>
- ANLA. (2018). *Resolucion N°00640 04*.
- Balieira, K. V. B., Mazzo, M., Bizerra, P. F. V., Guimarães, A. R. de J. S., Nicodemo, D., & Mingatto, F. E. (2018). Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. *Apidologie*, 49(5), 562–572.  
<https://doi.org/10.1007/S13592-018-0583-1>
- Bartomeus, I., & Bosch, J. (2018). *Pérdida de polinizadores: evidencias, causas y consecuencias*. <https://doi.org/10.7818/ECOS.1542>
- Benjamin, A., & McCalum, B. (2008). A world without bees. *A World without Bees*, vi + 298 pp.  
[https://books.google.com/books/about/A\\_World\\_Without\\_Bees.html?id=YzkgAQAAMAAJ](https://books.google.com/books/about/A_World_Without_Bees.html?id=YzkgAQAAMAAJ)

- Bindoli, A., & Rigobello, M. P. (2013a). Peroxidase Biochemistry and Redox Signaling. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, 407–412.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00179-1>
- Bindoli, A., & Rigobello, M. P. (2013b). Peroxidase Biochemistry and Redox Signaling. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, 407–412.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00179-1>
- Blacquièrè, T., Smagghe, G., van Gestel, C. A. M., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 973–992. <https://doi.org/10.1007/S10646-012-0863-X>
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., & Büchler, R. (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 86, 40–47.  
<https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2016.01.001>
- Brom, M. (2015a). *Degradación de imidacloprid en cultivo de lechuga y reducción de residuos por medio de lavado*.
- Brom, M. (2015b). *Degradación de imidacloprid en cultivo de lechuga y reducción de residuos por medio de lavado*.  
<https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/644728>
- Burge, K. (2017). *La célula. 8. Ciclo celular. Fase S. Atlas de Histología Vegetal y Animal*.  
<https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/8-s.php>
- Carlos, J., & Pérez, F. (2002). *Estudio del desarrollo post-embrionario en el ciclo holometabólico de la obrera de Apis mellifica mellifica L* [Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/3146/>

Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo.

*Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1).

[https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-)

00152019000100091

Castro, G. (2013). Dependencia de la dosis en los mecanismos de toxicidad y la evaluación

de riesgo en toxicología. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*.

<https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/1345>

Castro, R., Baquero, L., & Narváez, C. (2006). CATALASA, PEROXIDASA Y

POLIFENOLOXIDASA DE PITAHAYA AMARILLA (*Acanthocereus pitajaya*). *Revista*

*Colombiana de Química*, 11.

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-)

28042006000100009

CBQ. (2018, September 5). *INHIBICIÓN ENZIMÁTICA*.

<https://clasesparticularescbq.com/2018/09/06/inhibicion-enzimatica/>

Céspedes, E., Hernández, I., & Llopiz, N. (1996). Enzimas que participan como barreras

fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Revista Cubana Invest*

*Bioméd*, 15(2). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-)

03001996000200001&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Chainy, G. B. N., Paital, B., & Dandapat, J. (2016). An Overview of Seasonal Changes in

Oxidative Stress and Antioxidant Defence Parameters in Some Invertebrate and

Vertebrate Species. *Scientifica*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6126570>

Chmiel, J. A., Daisley, B. A., Pitek, A. P., Thompson, G. J., & Reid, G. (2020).

Understanding the Effects of Sublethal Pesticide Exposure on Honey Bees: A Role for

Probiotics as Mediators of Environmental Stress. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 22. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2020.00022/BIBTEX>

Codling, G., Naggar, Y. al, Giesy, J. P., & Robertson, A. J. (2017). Neonicotinoid insecticides in pollen, honey and adult bees in colonies of the European honey bee (*Apis mellifera* L.) in Egypt. *Ecotoxicology* 2017 27:2, 27(2), 122–131. <https://doi.org/10.1007/S10646-017-1876-2>

Coneo, M. (2021, June 9). La producción anual del sector apícola solo cubre un tercio de la demanda nacional. *La Producción Anual Del Sector Apícola Solo Cubre Un Tercio de La Demanda Nacional*. <https://www.agronegocios.co/agricultura/la-produccion-anual-del-sector-apicola-solo-cubre-un-tercio-de-la-demanda-nacional-3198053#>

Constanza, L., María, M., & Ariza, M. (2012). *Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno*.

Constanza, L., & Muñoz, M. (2010). *Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno*.

Corona, M., & Robinson, G. E. (2006a). Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 687. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.2006.00695.X>

Corona, M., & Robinson, G. E. (2006b). Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 687. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.2006.00695.X>

Cruces, E. (2016). *LOS NEONICOTINOIDES Y SU USO SEGURO EN LA AGRICULTURA*.

Decio, P., Miotelo, L., Pereira, F. D. C., Roat, T. C., Marin-Morales, M. A., & Malaspina, O. (2021). Enzymatic responses in the head and midgut of Africanized *Apis mellifera*

contaminated with a sublethal concentration of thiamethoxam. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 223, 112581. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112581>

EPA, E. P. A. (2012). *Ecological Effects Test Guidelines - OCSPP 850.3020: Honey Bee Acute Contact Toxicity Test*. <http://www.epa.gov/ocspp>

EPA, E. P. A. (2014). *Guía de evaluación de riesgos de plaguicidas para las abejas*. <http://www.epa.gov/espp/consultation/ecorisk-overview.pdf>

Felipe, L., García, J., & Larios, H. M. (2003). El estrés oxidativo actúa como activador de la muerte celular. In L. Gaona (Ed.), *Biología Celular y Molecular* (1st ed.). Pearson Educación.

Feng, M., Ramadan, H., Han, B., Fang, Y., & Li, J. (2014). Hemolymph proteome changes during worker brood development match the biological divergences between western honey bees (*Apis mellifera*) and eastern honey bees (*Apis cerana*). *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-563>

Fent, K., Haltiner, T., Kunz, P., & Christen, V. (2020). Insecticides cause transcriptional alterations of endocrine related genes in the brain of honey bee foragers. *Chemosphere*, 260, 127542. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.127542>

Forêt, S., Wanner, K. W., & Maleszka, R. (2007). Chemosensory proteins in the honey bee: Insights from the annotated genome, comparative analyses and expression profiling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2006.09.009>

- Gebicki, S., & Gebicki, J. M. (1999). Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides. *Biochemical Journal*, 338(Pt 3), 629. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3380629>
- Gianazza, E., Eberini, I., Palazzolo, L., & Miller, I. (2021). Hemolymph proteins: An overview across marine arthropods and molluscs. *Journal of Proteomics*, 245, 104294. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2021.104294>
- Giannuzzi, L. (2018). *Toxicología general y aplicada*. Universidad Nacional de La Plata (EDULP) . <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/1031>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6229). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1255957>
- Guacaneme, D., Orozco, V., Moreno, E., & Chaparro, L. (2014). *Organofosforados y Carbamatos Características generales y problemas generados por la utilización de estos plaguicidas*. <https://es.scribd.com/document/444144946/Organofosforados-y-carbamatos-caracteris-docx>
- Gunasekara, A. S., Truong, T., Goh, K. S., Spurlock, F., & Tjeerdema, R. S. (2007). Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticide Science*, 32(3), 0706180001–0706180001. <https://doi.org/10.1584/JPESTICS.R07-02>
- Gusman-Novoa, ernesto, Correa, A., Espinosa, L., & Gusman, guadalupe. (2011). Colonización, impacto y control de las abejas melíferas africanizadas en México. *Veterinaria México*, 42(2), 149–178. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0301-50922011000200005&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0301-50922011000200005&script=sci_abstract)

- Hatjina, F., Papaefthimiou, C., Charistos, L., Dogaroglu, T., Bouga, M., Emmanouil, C., & Arnold, G. (2013). Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie* 2013 44:4, 44(4), 467–480. <https://doi.org/10.1007/S13592-013-0199-4>
- He, B., Liu, Z., Wang, Y., Cheng, L., Qing, Q., Duan, J., Xu, J., Dang, X., Zhou, Z., & Li, Z. (2021). Imidacloprid activates ROS and causes mortality in honey bees (*Apis mellifera*) by inducing iron overload. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 228, 112709. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112709>
- Hodgson, E., & Blake, B. (2010). TOXICANT EFFECTS ON THE NERVOUS SYSTEM. In Ernest Hodgson (Ed.), *A TEXTBOOK OF MODERN TOXICOLOGY THIRD EDITION* (3rd ed., pp. 308–323). Wiley-Interscience.
- Huerta, T. (2021). *Catalasa*. <https://www.udocz.com/apuntes/165446/catalasa>
- Hurtado, C., & Gutierrez, M. (2005). ENFOQUE DEL PACIENTE CON INTOXICACIÓN AGUDA POR PLAGUICIDAS ORGANOS FOSFORADOS. *Revista Facultad de Medicina*, 53, 244–258. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-00112005000400006&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-00112005000400006&script=sci_abstract&tlng=es)
- Registro Nacional de Plaguicidas Químicos de uso Agrícola, (2021).
- IRAC. (2019). *Clasificación del modo de acción de insecticidas y acaricidas Nueva versión incluyendo los bio-insecticidas*.
- Jones, A. K., & Sattelle, D. B. (2010). Diversity of Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 683, 25–43. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6445-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6445-8_3)

- Kairo, G., Biron, D. G., ben Abdelkader, F., Bonnet, M., Tchamitchian, S., Cousin, M., Dussaubat, C., Benoit, B., Kretzschmar, A., Belzunces, L. P., & Brunet, J. L. (2017). *Nosema ceranae*, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–14.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-08380-5>
- Knecht, D., & Kaatz, H. H. (1990). Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie*, 21(5), 457–468.  
<https://doi.org/10.1051/APIDO:19900507>
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–650.  
<https://doi.org/10.1080/01926230290166724>
- Lamela, L. (2018). *Efecto de adyuvantes en propiedades físicas deposición y eficiencia de control de insecticidas en soja aplicado en diferentes condiciones meteorológicas*. Universidad de la republica.
- Lara, J. (2018). Capítulo II: Toxinología descriptiva - Unidad I: Himenóptero - La abeja *apis mellifera*. In *Biología, toxinología y terapéutica de especies venenosas de interés veterinaria en nicaragua* (pp. 39–77).
- Lehninger, A., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2018). *Principios de bioquímica : Lehninger / David L. Nelson, Michael M. Cox ; coordinador de la traducción, Claudi M. Cuchillo - Universidad de Almería (7° Edición)*. OMEGA.  
[https://indaga.ual.es/discovery/fulldisplay/alma991001582209704991/34CBUA\\_UA](https://indaga.ual.es/discovery/fulldisplay/alma991001582209704991/34CBUA_UA)  
L:VU1

- Li, J., Li, H., Zhang, Z., & Pan, Y. (2007). Identification of the proteome complement of high royal jelly producing bees (*Apis mellifera*) during worker larval development. *Apidologie*, 38(6), 545–557. <https://doi.org/10.1051/APIDO:2007047>
- Martin-Culma, N. Y., & Arenas-Suárez, N. E. A.-S. E. (2018). Daño colateral en abejas por la exposición a pesticidas de uso agrícola. *Entramado*, 14(1), 232–240. <https://doi.org/10.18041/ENTRAMADO.2018V14N1.27113>
- Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., & Sattelle, D. B. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11), 573–580. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01820-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01820-4)
- Mengoni, C. (2017). *Efecto de agroquímicos sobre el comportamiento de abejas jóvenes (Apis mellifera)*.
- Migdał, P., Murawska, A., Strachecka, A., Bieńkowski, P., & Roman, A. (2020). Changes in the Honeybee Antioxidant System after 12 h of Exposure to Electromagnetic Field Frequency of 50 Hz and Variable Intensity. *Insects*, 11(10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/INSECTS11100713>
- Mitton Giulia. (2019). *Resistencia a xenobióticos y procesos de detoxificación. Estudios moleculares en Varroa destructor y Apis mellifera* [Universidad Nacional de Mar del Plata- CONICET]. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/80403>
- Nieto, A., Roberts, S., Kemp, J., Rasmont, P., Kuhlmann, M., Criado, M. G., Biesmeijer, J. C., Bogusch, P., Dathe, H., de La Rúa, P., de Meulemeester, T., Dehon, M., Dewulf, A., Javier Ortiz-Sánchez, F., Lhomme, P., Pauly, A., Potts, S. G., Praz, C., Quaranta, M., ... Michez, D. (2014). *European Red List of Bees*. <https://doi.org/10.2779/77003>

Nufarm. (2012). *CLORPYRIFOS AGROGEN 480 EC - Ficha tecnica comercial*.

Núñez, A. (2015). Participación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial en la respuesta a la isquemia y reperfusión miocárdica de ratas hipertensas espontáneas (SHR) . *Naturalis*.  
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20150320001393><http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Nuño, A. (2020). *ARN, la molécula que puede sacarnos de esta pandemia*.  
<https://elpais.com/ciencia/2020-11-28/arn-la-molecula-que-puede-sacarnos-de-esta-pandemia.html>

Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test, Pub. L. No. 214, 1 (1998).  
<https://doi.org/10.1787/9789264070189-EN>

Padrón, J. (2020). *Los perfiles de hidrocarburos cuticulares en abejas: analisis de la viabilidad como potenciales marcadores del cambio global*. Univerddad de la Laguna.

Parra, L. (2016). *Efectos subletales de los insecticidas clorpirifós y acetamiprid en sistemas enzimáticos de cydia pomonella (L.) (lepidoptera : tortricidae) del Valle de Rio Negro y Neuquén*. <http://rdi.uncoma.edu.ar/handle/uncomaid/178>

Pech; Elma. (2019). *Influencia nutricional en el sistema de defensa de Apis mellifera*.  
<https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1441>

Picco, E., Rodríguez, C., & Boggio, J. C. (2011). *CLORPIRIFÓS: ASPECTOS CINÉTICOS A CONSIDERAR EN SU USO CLÍNICO COMO ANTIPARASITARIO EN VETERINARIA*.

- Pistorius, J., Bischoff, G., Heimbach, U., & Stahler, M. (2010). Bee poisoning incidents in Germany in Spring 2008 caused by abrasion of active substance from treated seeds during sowing of maize . *Hazards of Pesticides to Bees* .  
<https://www.researchgate.net/publication/265354853>
- Pizarro, R., & Montenegro, G. (2012). *Colmenas (millones) 31 Las claves del Síndrome de Despoblamiento de Colmenas.*
- Quintin, N. (2010). *Extracción de la fracción proteica utilizando dos solventes (agua y tris hcl) y determinación de la actividad antimicrobiana a los extractos sobre las cepas escherichia coli, bacillus subtilis, pseudomonas sp y staphylococcus aureus - a partir de hojas de pentacalia nítida (fam. asteraceae)* [Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8445>
- Quiroz, C. (2019). *Intoxicacion Por Organofosforados.*  
<https://pdfcookie.com/documents/laboratorio-5-intoxicacion-por-organofosforadosdocx-k2p8kmz4g0l9>
- Ramirez, J. (2021). *Aplicacion de tratamientos termicos en la conservacion de alimentos y su efecto sobre agentes patógenos y enzimas* [Universidad tecnica de machala].  
[http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/17332/1/E-4939\\_RAMIREZ%20MALDONADO%20JOSE%20MANUEL.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/17332/1/E-4939_RAMIREZ%20MALDONADO%20JOSE%20MANUEL.pdf)
- Ritacco, M. (2015). *Procesos metabólicos en insectos.*
- Rodriguez, M. (2019). *DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE PESTICIDAS SOBRE ABEJA MELÍFERA ADULTA.*
- Sabench, J. (2011). *PESTICIDAS Y ABEJAS.*

Salgado, Y. (2019).

*IMPACTO METABÓLICO DE INSECTICIDAS SISTÉMICOS (FIPRONIL E IMIDACLOPRID) Y NOSISTÉMICOS (CLORPIRIFOS) SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN *Apis mellifera**  
a [Universidad de Cundinamarca]. [www.ucundinamarca.edu.co](http://www.ucundinamarca.edu.co)

Senthilkumar, M., Amaresan, N., & Sankaranarayanan, A. (2021). *Estimation of*

*Peroxidase (POD)*. 123–125. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0\\_31](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0_31)

Solano, M. (2014). *Organofosforados, pesticida y arma química*.

<http://homeostasisufv.blogspot.com/2014/03/organofosforados-pesticida-y-arma.html>

Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2000). Characteristics of imidacloprid toxicity in

two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(7), 1901–1905. <https://doi.org/10.1002/ETC.5620190726>

Tomlin, C. (2009). *The pesticide manual : a world compendium* (15. ed., Issue June).

BCPC Publications. [www.irac-online.org](http://www.irac-online.org)

Trum, B., & Berezsky, I. (2020). Lesión celular y muerte celular. In *Enciclopedia de salud*

*y seguridad en el trabajo* (Vol. 1, pp. 1458–1460). Chantal Dufresne.

UC, U. de cantabria. (2018, April 13). *MC-F-007. Capítulo 7. Daño oxidativo y*

*envejecimiento*. 7.1 El Envejecimiento Como Fenómeno Biológico .

<https://ocw.unican.es/mod/page/view.php?id=708>

Uchoa, L., & Carneiro, J. (2003). *Basic histology : text & atlas*. Lange Medical Books,

McGraw-Hill, Medical Pub. Division.

UNA. (2020). *Manuela de plaguicidas de centroamérica*.

<http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/331-imidacloprid>

Uniprot. (2003). *Catalase - Apis mellifera ligustica (Common honeybee)*.

<https://www.uniprot.org/uniprot/Q8I9W0>

UNR. (2016). *Inhibidores enzimaticos*.

UNSAM. (2018). *Trabajo Práctico N°2: Cinética Enzimática*.

Vásquez, E., Ballesteros, H., Tello, J., Castañeda, J. S., Calvo, E. N., Ortega, C. N., & Riveros, E. L. (2011). *Polinización dirigida con abejas apis mellifera : Tecnología para el mejoramiento de la producción de cultivos con PoTencial exPorTador NACIONAL*. [www.produmedios.org](http://www.produmedios.org)

Wang, X., Martínez, M. A., Wu, Q., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., Anadón, A., & Yuan, Z. (2016). Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Critical Reviews in Toxicology*, 46(10), 876–899.  
<https://doi.org/10.1080/10408444.2016.1223014>

Weirich, G. F., Collins, A. M., & Williams, V. P. (2002). Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 33(1), 3–14. <https://doi.org/10.1051/APIDO:2001001>

Wilde, J., Frączek, R. J., Siuda, M., Bąk, B., Hatjina, F., & Miszczak, A. (2016). The influence of sublethal doses of imidacloprid on protein content and proteolytic activity in honey bees (*Apis mellifera* L.).  
[Http://Dx.Doi.Org/10.1080/00218839.2016.1211394](http://Dx.Doi.Org/10.1080/00218839.2016.1211394), 55(2), 212–220.  
<https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1211394>

Williams, G. R., Alaux, C., Costa, C., Csáki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., Fries, I., Kuhn, R., McMahon, D. P., Medrzycki, P., Murray, T. E., Natsopoulou, M. E., Neumann, P., Oliver, R., Paxton, R. J., Pernal, S. F., Shutler, D., Tanner, G., van der Steen, J. J. M., & Brodschneider, R. (2015). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.04*, 52(1), 1–36. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.04>

Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139–162. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1994.74.1.139>

Zhang, W., Chen, W., Li, Z., Ma, L., Yu, J., Wang, H., Liu, Z., & Xu, B. (2018). Identification and characterization of three new cytochrome P450 genes and the use of RNA interference to evaluate their roles in antioxidant defense in *Apis cerana cerana fabricius*. *Frontiers in Physiology*, 9(NOV), 1608. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.01608/BIBTEX>