

	MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
	PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
		PAGINA: 1 de 8

26.

FECHA	Viernes, 01 de marzo de 2019
--------------	------------------------------

Señores
UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
 BIBLIOTECA
 Ciudad

UNIDAD REGIONAL	Sede Fusagasugá
TIPO DE DOCUMENTO	Tesis
FACULTAD	Ciencias Agropecuarias
NIVEL ACADÉMICO DE FORMACIÓN O PROCESO	Pregrado
PROGRAMA ACADÉMICO	Zootecnia

El Autor(Es):

APELLIDOS COMPLETOS	NOMBRES COMPLETOS	No. DOCUMENTO DE IDENTIFICACIÓN
Salgado García	Yenny Paola	1.069.752.817

Diagonal 18 No. 20-29 Fusagasugá – Cundinamarca
 Teléfono (091) 8281483 Línea Gratuita 018000976000
 www.ucundinamarca.edu.co E-mail: 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*

	MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
	PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16 PAGINA: 2 de 8

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

APELLIDOS COMPLETOS	NOMBRES COMPLETOS
Granados Moreno	Jairo Enrique

TÍTULO DEL DOCUMENTO
IMPACTO METABÓLICO DE INSECTICIDAS SISTÉMICOS (FIPRONIL E IMIDACLOPRID) Y NO SISTÉMICOS (CLORPIRIFOS) SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN <i>Apis mellifera</i>

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

TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Aplica para Tesis/Trabajo de Grado/Pasantía
Zootecnista

AÑO DE EDICIÓN DEL DOCUMENTO	NÚMERO DE PÁGINAS
25/02/2019	96

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. insecticidas sistémicos	systemic insecticides
3. insecticidas no sistémicos	non-systemic insecticides
4. estrés oxidativo	oxidative stress
5. superóxido dismutasa	superoxide dismutase
6. ácido ascórbico	ascorbic acid

Diagonal 18 No. 20-29 Fusagasugá – Cundinamarca
Teléfono (091) 8281483 Línea Gratuita 018000976000
www.ucundinamarca.edu.co E-mail: 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



MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
	PAGINA: 3 de 8

RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLÉS

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

Resumen

El colapso de las colmenas se le atribuye en gran medida al uso de insecticidas de nueva generación, los cuales generan impactos negativos en el desarrollo y mantenimiento de las colmenas; debido que al entrar en contacto moléculas extrañas con el organismo lo llevan a un estrés oxidativo que provoca alteraciones metabólicas; Se realizó un bioensayo por contacto en laboratorio con tres insecticidas, cuatro dosis y tres replicas, para un total de 39 unidades experimentales, las cuales se sometieron a cada dosis por un periodo de 3 horas, terminadas, se congelaron a -80°C para estudios posteriores; se realizó la extracción enzimática del tejido de la cabeza y el tórax de la abeja por medio de polvos de acetona y se refrigeró a -2°C , a partir de este se determinó: Superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa y proteína; el ácido ascórbico se determinó directamente a partir de la muestra; todas las variables se midieron con diferentes técnicas analíticas, presentando diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos por insecticida y dosis ($P < 0,001$), mientras para ácido ascórbico y proteína no se evidenciaron diferencias estadísticas ($p > 0,05$), mostrando un comportamiento individual por insecticida, explicándose a través de la naturaleza química de su molécula; Las dosis subletales, sugieren un inminente riesgo para la supervivencia de las colmenas, ratificando el daño ocasionado a estos insectos por su uso autorizado y su vinculación con el declive de las colmenas.

Abstract

The collapse of the hives is largely attributed to the use of new generation insecticides, which generate negative impacts on the development and maintenance of hives; because when foreign molecules come into contact with the organism they lead to an oxidative stress that causes metabolic alterations; A laboratory bioassay was conducted with three insecticides, four doses and three replicates, for a total of 39 experimental units, which were subjected to each dose for a period of 3 hours, finished, frozen at -80

Diagonal 18 No. 20-29 Fusagasugá – Cundinamarca
Teléfono (091) 8281483 Línea Gratuita 018000976000
www.ucundinamarca.edu.co E-mail: info@ucundinamarca.edu.co
NIT: 890.680.062-2



MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
	PAGINA: 4 de 8

° C to subsequent studies; enzymatic extraction of the tissue of the head and thorax of the bee was carried out by means of acetone powders and refrigerated at -2 ° C, from which were determined: superoxide dismutase, peroxidase, catalase and protein; the ascorbic acid was determined directly from the sample; all the variables were measured with different analytical techniques, showing highly significant statistical differences between treatments by insecticide and dose ($P < 0.001$), while for ascorbic acid and protein no statistical differences were observed ($p > 0.05$), showing a behavior individual by insecticide, explained through the chemical nature of its molecule; The sub-lethal doses, suggesting an imminent risk for the survival of the hives, ratifying the damage caused to these insects by their authorized use and their connection with the decline of the hives.

AUTORIZACION 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 por cualquier procedimiento o medio físico o electrónico, así como su puesta a disposición en Internet.	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	

Diagonal 18 No. 20-29 Fusagasugá – Cundinamarca
 Teléfono (091) 8281483 Línea Gratuita 018000976000
 www.ucundinamarca.edu.co E-mail: info@ucundinamarca.edu.co
 NIT: 890.680.062-2



MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
	PAGINA: 5 de 8

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 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.

	MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
	PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
		PAGINA: 6 de 8

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 tal situación 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 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



MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
	PAGINA: 7 de 8

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.



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. PerezJuan2017.pdf)	Tipo de documento (ej. Texto, imagen, video, etc.)
1.SalgadoPaola2019.pdf	Texto
2.	
3.	
4.	

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

APELLIDOS Y NOMBRES COMPLETOS	FIRMA (autógrafo)
Salgado Garcia Yenny Paola	

12.1.50



**IMPACTO METABÓLICO DE INSECTICIDAS
SISTÉMICOS (FIPRONIL E IMIDACLOPRID) Y NO
SISTÉMICOS (CLORPIRIFOS) SOBRE EL ESTRÉS
OXIDATIVO EN *Apis mellifera***

Yenny Paola Salgado García

Universidad de Cundinamarca
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Fusagasugá, Cundinamarca
2019

**IMPACTO METABÓLICO DE INSECTICIDAS
SISTÉMICOS (FIPRONIL E IMIDACLOPRID) Y NO
SISTÉMICOS (CLORPIRIFOS) SOBRE EL ESTRÉS
OXIDATIVO EN *Apis mellifera***

Yenny Paola Salgado García

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

Director:

MSc, Jairo Enrique Granados Moreno, PhD(c)

L. Química

Universidad de Cundinamarca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Fusagasugá, Cundinamarca

2019

Resumen

El colapso de las colmenas se le atribuye en gran medida al uso de pesticidas de nueva generación, los cuales generan impactos negativos en el desarrollo y mantenimiento de las colmenas; debido que al entrar en contacto moléculas extrañas con el organismo lo llevan a un estrés oxidativo que provoca alteraciones metabólicas; Se realizó un bioensayo por contacto en laboratorio con tres insecticidas, cuatro dosis y tres replicas, para un total de 39 unidades experimentales, las cuales se sometieron a cada dosis por un periodo de 3 horas, terminadas, se congelaron a -80°C para estudios posteriores; Se realizó la extracción enzimática del tejido de la cabeza y el tórax de la abeja por medio de polvos de acetona y se refrigeró a -2°C , a partir de este se determinó: Superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa y proteína; el ácido ascórbico se determinó directamente a partir de la muestra; todas las variables se midieron con diferentes técnicas analíticas, presentando diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos por insecticida y dosis ($P < 0,001$), mientras para ácido ascórbico y proteína no se evidenciaron diferencias estadísticas ($p > 0,05$), mostrando un comportamiento individual por insecticida, explicándose a través de la naturaleza química de su molécula; Las dosis subletales, sugieren un inminente riesgo para la supervivencia de las colmenas, ratificando el daño ocasionado a estos insectos por su uso autorizado y su vinculación con el declive de las colmenas.

Palabras clave: *Apis mellifera*, insecticidas sistémicos, insecticidas no sistémicos, estrés oxidativo, superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa, ácido ascórbico.

Abstract

The collapse of the hives is largely attributed to the use of new generation pesticides, which generate negative impacts on the development and maintenance of hives; because when foreign molecules come into contact with the organism they lead to an oxidative stress that causes metabolic alterations; A laboratory bioassay was conducted with three insecticides, four doses and three replicates, for a total of 39 experimental units, which were subjected to each dose for a period of 3 hours, finished, frozen at -80°C to subsequent studies; enzymatic extraction of the tissue of the head and thorax of the bee was carried out by means of acetone powders and refrigerated at -2°C , from which were determined: superoxide dismutase, peroxidase, catalase and protein; the ascorbic acid was determined directly from the sample; all the variables were measured with different analytical techniques, showing highly significant statistical differences between treatments by insecticide and dose ($P < 0.001$), while for ascorbic acid and protein no statistical differences were observed ($p > 0.05$), showing a behavior individual by insecticide, explained through the chemical nature of its molecule; The sub-lethal doses, suggesting an imminent risk for the survival of the hives, ratifying the damage caused to these insects by their authorized use and their connection with the decline of the hives.

Key words: *Apis mellifera*, systemic insecticides, non-systemic insecticides, oxidative stress, superoxide dismutase, peroxidase, catalase, ascorbic acid.

Dedicatoria

Quiero dedicar este logro primeramente a Dios porque gracias a su voluntad todo es posible, a mi madre Stella García, que siempre me enseñó que con perseverancia y constancia todo se puede lograr. A mi amado esposo Oscar Puertas, por apoyarme incondicionalmente en todo este proceso de formación como profesional, que junto con mi hermoso hijo son el motor de mi vida. A mi hermana Milena Salgado, que desde pequeña siempre me enseñó valores de responsabilidad, respeto y compromiso, para ser cada día mejor persona y a mi sobrino Daniel Salgado, por alegrarme los días.

Agradecimientos

Para lograr nuestros objetivos, siempre necesitaremos la colaboración de personas que puedan contribuir con sus conocimientos, por lo quiero agradecer a las siguientes personas:

Por su apoyo incondicional, dedicación y ejemplo, mis más sinceros agradecimientos al profesor Jairo Enrique Granados Moreno, por su compromiso como director de trabajo de grado, donde gracias a su conocimiento y perseverancia se lograron superar todos los obstáculos, contribuyendo con mi formación profesional.

A Oscar Javier Puertas y Andres Garzon Aya, por aportar sus conocimientos como profesionales zootecnistas para el desarrollo de este proyecto.

De igual forma quiero agradecer a todo el talento humano de los laboratorios de la Universidad de Cundinamarca, por su colaboración y paciencia en el desarrollo de este proyecto.

Contenido

	Pág.
Resumen	1
Lista de figuras.....	7
Lista de tablas.....	10
1. Introducción	11
2. Revisión de Literatura	14
2.1 Marco Conceptual.....	14
2.1.1 Apicultura en Colombia y declive de la abeja <i>Apis mellifera</i>	14
2.1.2 Neonicotinoides.....	15
2.1.3 Fipronil (Fenil pirazola)	17
2.1.4 Organofosforados	18
2.1.5 Cinética enzimática.....	20
2.1.6 Ley Michaelis- Menten	21
2.1.7 Ley doble recíproco.....	23
2.1.8 Inhibición enzimática.....	23
2.1.9 Estrés Oxidativo.....	24
2.1.10 Complejo antioxidante	27
2.1.11 Ácido ascórbico.....	31
2.2 Marco Referencial.....	32
3. Materiales y Métodos.....	36
3.1 Localización del experimento	36
3.2 Instalaciones Agropecuarias.....	36
3.3 Unidades Experimentales.....	37
3.4 Tratamientos	39
3.5 Variables Evaluadas	40
3.6 Diseño Experimental.....	41
3.7 Análisis Estadístico utilizado.....	42
3.8 Procedimientos	42
3.8.1 Muestreo en campo	43
3.8.2 Análisis en Laboratorio	44
4. Resultados y Discusión	57
4.1 Resumen estadístico de las variables evaluadas	57
4.2 Actividad de las reacciones bioquímicas enzimáticas	59
4.2.1 Superóxido Dismutasa	59
4.2.2 Peroxidasa	60
4.3 Cinética enzimática.....	62
4.3.1 Relación velocidad contra el tiempo.....	62
4.3.2 Cinética Michaelis – Menten	67
4.3.3 Parámetros cinéticos	69
4.3.4 Acción de los insecticidas como inhibidores de la RBE.....	77
4.4 Ácido ascórbico.....	81

4.5	Discusión de Resultados	83
5.	Conclusiones y Recomendaciones	85
5.1	Conclusiones.....	85
5.2	Recomendaciones	86

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Reporte perdida de colmenas en Colombia por agroquímicos.....	16
Figura 2. Formula química Imidacloprid.....	17
Figura 3. Estructura química fipronil (Fenil pirazola).....	19
Figura 4. Estructura química Clorpirifos.....	20
Figura 5. Tipos de inhibición enzimática.....	25
Figura 6. Radical libre y su mecanismo de formación.....	26
Figura 7. Esquema de producción de las especies reactivas de oxígeno.....	27
Figura 8. Reacción de la SOD en la dismutación de superóxido a peróxido de hidrogeno y oxigeno molecular.....	29
Figura 9. Estructura molecular catalasa.....	30
Figura 10. Reacción catalítica de la catalasa, utilizando dos moléculas de H ₂ O ₂ para su conversión en O ₂ y Agua metabólica.....	31
Figura 11. Reacción del glutatión peroxidasa.....	31
Figura 12. Estructura molecular ácido ascórbico.....	32
Figura 13. Mapa ubicación Universidad de Cundinamarca sede Fusagasugá.....	37
Figura 14. Ubicación e Instalaciones del apiario bioapicol.....	38
Figura 15. Tabulación variables último registro técnico, relevantes para el estudio.....	39
Figura 16. Unidades experimentales.....	39
Figura 17. Distribución de tratamientos de acuerdo al diseño estadístico con arreglo bifactorial.....	42
Figura 18. Muestreo en campo, selección y división de colmena, transporte núcleo hasta laboratorio.....	44
Figura 19. Caja de Petri recubierta con toldillo.....	45
Figura 20. Preparación jarabe sacarosa 1:1.....	45
Figura 21. Solución madre: Imidacloprid, Clorpirifos y Fipronil.....	47

Figura 22. Solución Stock insecticidas Imidacloprid, Clorpirifos, Fipronil.....	47
Figura 23. Soluciones estándar.....	49
Figura 24. Inducción estrés oxidativo.....	50
Figura 25. Montaje bioensayo por contacto.....	50
Figura 26. Conservación de las muestras para estudios posteriores.....	51
Figura 27. Obtención muestras para estudio enzimático.....	52
Figura 28. Extracción enzimática de las muestras.....	52
Figura 29. Determinación de la superóxido dismutasa por espectrofotometría.....	54
Figura 30. Determinación actividad peroxidasa.....	55
Figura 31. Determinación de la actividad de la catalasa por el método permanganométrico.....	56
Figura 32. Determinación ácido ascórbico por método de folin ciocalteau.....	57
Figura 33. Determinación de la proteína por método biuret.....	58
Figura 34. Actividad de la Superóxido Dismutasa en extracto enzimático de cabeza y tórax de <i>Apis mellifera</i> bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	61
Figura 35. Actividad de la Peroxidasa en extracto enzimático de cabeza y tórax de <i>Apis mellifera</i> bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	62
Figura 36. Actividad de la Catalasa en extracto enzimático de cabeza y tórax de <i>Apis mellifera</i> bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	64
Figura 37. Actividad enzimática vs tiempo. Comportamiento de la SOD en función de las diferentes concentraciones del insecticida Imidacloprid y el tiempo.	65
Figura 38. Actividad enzimática vs tiempo. Comportamiento de la SOD en función de la concentración del insecticida clorpirifos y el tiempo.....	65
Figura 39. Actividad enzimática vs tiempo. Comportamiento de la SOD en función de la concentración del insecticida fipronil y el tiempo a temperatura ambiente.....	66
Figura 40. Actividad enzimática vs tiempo, Comportamiento de la POD en función de la concentración de los insecticidas: a. Imidacloprid; b. Clorpirifos; c. fipronil y el tiempo.....	68
Figura 41. Cinética de Michaelis – Menten, para la SOD en extracto enzimático de cabeza y tórax de <i>Apis mellifera</i> , bajo el efecto de insecticida imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	69

Figura 42. Cinética de Michaelis – Menten, para la POD en extracto enzimático de cabeza y tórax de <i>Apis mellifera</i> , bajo el efecto de insecticida imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	70
Figura 43. Cinética de Michaelis – Menten, para la CAT en extracto enzimático de cabeza y tórax de <i>Apis mellifera</i> , bajo el efecto de insecticida imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	71
Figura 44. Representación de Hanes – Woolf para los diferentes insecticidas en la actividad de SOD, en extracto enzimático de cabeza y tórax de la abeja <i>Apis mellifera</i>	72
Figura 45. Gráfica de velocidad máxima y constante de Michaelis- Menten, para SOD bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	74
Figura 46. Representación de Hanes – Woolf para los diferentes insecticidas en la actividad de POD, en extracto enzimático de cabeza y tórax de abejas <i>Apis mellifera</i>	75
Figura 47. Gráfica de velocidad máxima y constante de Michaelis- Menten, para POD bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	76
Figura 48. Representación de Hanes – Woolf para los diferentes insecticidas en la actividad de CAT, en extracto enzimático de cabeza y tórax de abejas <i>Apis mellifera</i>	77
Figura 49. Gráfica de velocidad máxima y constante de Michaelis- Menten, para CAT bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	78
Figura 50. Gráfica de inhibición, de la doble reciproca para SOD en extracto enzimático de cabeza y tórax de la <i>Apis mellifera</i> bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	79
Figura 51. Gráfica de inhibición, de la doble reciproca para POD en extracto enzimático de cabeza y tórax de la <i>Apis mellifera</i> bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	81
Figura 52. Gráfica de inhibición, de la doble reciproca para CAT en extracto enzimático de cabeza y tórax de la <i>Apis mellifera</i> bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	82
Figura 53. Comportamiento del ácido ascórbico en extracto enzimático de cabeza y tórax de <i>Apis mellifera</i> bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	83

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Características del orden de reacciones cinéticas.....	22
Tabla 2. Características de las principales especies reactivas de oxígeno (EROS).....	27
Tabla 3. Concentración dosis subletales de Imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	40
Tabla 4. Tratamientos del bioensayo por contacto para las <i>Apis melliferas</i>	40
Tabla 5. Descripción de variables evaluadas y sus métodos de analíticos.	41
Tabla 6. Equivalencia insecticida comercial en gramos.....	46
Tabla 7. Dosificación estándar Imidacloprid.....	48
Tabla 8. Dosificación estándar Clorpirifos	48
Tabla 9. Dosificación estándar Fipronil.....	49
Tabla 10. Valores promedios y significancia estadística por ANAVA doble vía.....	59
Tabla 11. Modelos de linealización para las enzimas SOD, POD y CAT en función de los insecticidas objeto de estudio.....	72
Tabla 12. Modelo de Hanes- Woolf para SOD con los diferentes insecticidas.....	73
Tabla 13. Modelo de Hanes- Woolf para SOD con los diferentes insecticidas.....	75
Tabla 14. modelo de Hanes- Woolf para SOD con los diferentes insecticidas.....	77
Tabla 15. Ecuación Cinética de Michaelis – Menten para las enzimas SOD, POD y CAT, bajo el efecto del imidacloprid, clorpirifos y fipronil.....	78

1. Introducción

La *Apis mellifera* es uno de los polinizadores más abundantes en el medio (Chauzat et al., 2009) estimándose que el 71% de cultivos destinados para la alimentación humana y animal es polinizado por las abejas (Sanchez, 2014), por lo que su repentino descenso poblacional en algunas partes del mundo como en: Estados Unidos, Europa, Medio Oriente y Japón, que reportan pérdidas de colmenas del 30%, 53% 85% y 25%, respectivamente, se le atribuyen al “síndrome de colapso de las colmenas (CCD)”, que puede explicarse a través de tres factores estresantes: 1) Abejas hambrientas; 2) Abejas enfermas; 3) Abejas envenenadas; (Agrimundo, 2013) (Greenpeace, 2013) Siendo este último en particular, uno de los factores que más ha contribuido con el descenso del número de colonias, debido que el consumo y variedad de plaguicidas se ha incrementado a la par del aumento de la población y por ende de la producción agrícola (Arroyo et al., 2013); reportándose la mayor pérdida de colmenas, entre los años 1966 a 1979 en los Estados Unidos, por la exposición a pesticidas organoclorados, carbamatos, organofosforados y piretroides (Jhonson, 2010).

En las últimas décadas los continuos avances de la agricultura moderna como: la aplicación de ingeniería genética de cultivos y la aparición de dos nuevos grupos de pesticidas (Neonicotinoides y fenil pirazola), se convirtieron en un paquete tecnológico más eficaz para el control de insectos plaga, debido que generan metabolitos tóxicos que son absorbidos por las raíces y hojas y trasladados a todas las partes de la planta, haciéndola tóxica para los insectos que puedan causar daño a los cultivos (Slujis et al, 2015). Además, de los polinizadores que obtienen su alimento a partir de la recolección de néctar y polen. Dependiendo de la dosis presente del insecticida en la planta, puede causar muerte a las abejas adultas o ser transportado hasta la colmena, contaminando las reservas de alimento y transmitiéndose a larvas vía abejas nodrizas (Lannacone y Alvarado, 2009), lo cual resulta en efectos altamente nocivos para su salud, existiendo un consenso general desde el año 2006 a través de varias investigaciones que apuntan, que la causa del declive de las abejas en este siglo sería la nueva generación de pesticidas (Nates, 2017).

En Colombia las condiciones medioambientales de los bosques alto andinos presentan un entorno ideal para el desarrollo de plagas que atacan frecuentemente los cultivos, siendo el uso indiscriminado de plaguicidas una de las técnicas más empleadas para mitigar este impacto (La crónica del Quindío, 2016), generando en los últimos tres años pérdidas de colmenas cercanas

al 34% que representan 15.677 del total de colmenas reportadas en el país, estimándose que al año desaparecen 10.500 (Nates, 2017); existiendo desde finales del año 2018, un fallo del juzgado primero penal de Cartagena, “que ordena al estado colombiano, en cabeza de sus principales entidades ambientales, agrícolas y de salud, con carácter urgente se detenga la extinción de las abejas en el país y se promuevan políticas en materia de precaución ambiental y la búsqueda de las causas que afectan la supervivencia de estos agentes polinizadores” (Montaño, 2018). No existiendo hasta la fecha, una política nacional clara que los proteja, del uso de pesticidas (Culma y Arenas, 2017), que cuentan con el respaldo de dos conceptos técnicos previos otorgados por el instituto de salud y la autoridad nacional de licencias ambientales (ANLA). Dando el respaldo para el uso y comercialización de estos pesticidas, que durante el año 2018, fueron prohibidos completamente en aplicaciones en el exterior, en 28 países de la Unión Europea, encontrándose tres plaguicidas neonicotinoides (imidacloprid, tiametoxan y clotianidina); esto en apoyo a la propuesta de la comisión Europea, la cual desde el año 2013 prohibió el uso parcial de estos pesticidas en algunos cultivos, ampliando su restricción total después de que la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) confirmara a principios del año 2018 el grave peligro que representan para las abejas (Ansede, 2018), donde, los niveles actuales de contaminación producidos por estos plaguicidas a causa de su uso autorizado exceden frecuentemente las concentraciones mínimas para producir efectos nocivos en una amplia variedad de especies no diana. (Slujis, et al, 2015).

Varios estudios científicos de abejas tratadas con dosis subletales, mostraron efectos negativos en su salud; siendo fuertemente criticados por el uso de dosis poco realistas y duración en la exposición (Tsvetkov *et al.*, 2017;). Además, afirmaciones de Bayer en 2017, sostienen que el uso de estos insecticidas es más eficiente en el rendimiento de los cultivos que la polinización entomófila prestada por las abejas, alegando que estas contribuyen al rededor de tan solo un 8% a la producción agrícola total. Mientras cada año, hasta el 40% de los rendimientos agrícolas totales se pierden debido a plagas y enfermedades, y sin productos insecticidas para la protección de los cultivos, esa situación podría duplicarse. Por lo tanto, el registro de los insecticidas para salir al mercado y ser comercializados, no contemplan los efectos subletales producidos por el ingrediente activo de cada producto (Johnson, 2010; Culma y Arenas 2017).

Generando la exposición a dosis subletales un fenómeno conocido hormesis descrito por Castro (2013) como "una dosis-respuesta bifásica, caracterizada por inhibición de altas dosis y estimulación a bajas dosis durante o después de la exposición a un tóxico ", arrojando varios

estudios de hormesis inducida estimulación de procesos biológicos para aumentar la supervivencia de los insectos, por medio de la adaptación fisiológica, Sin embargo, estas dosis subletales también pueden causar efectos adversos, como el caso del imidacloprid que mostro un efecto citotóxico para el cerebro de la abeja con alteración en la conectividad neuronal, aprendizaje y capacidad de forrajeo (Catae *et al*, 2018). En general los diferentes insecticidas, causan desbalance de la navegación individual, aprendizaje, recogida de alimento, longevidad, resistencia a las enfermedades y la fecundidad de las abejas (Whitehorn, O'Connor, Wackers, y Goulson, 2012; Culma y Arenas).

Generalmente la inhibición enzimática que produce el insecticida según su modo de acción, se vincula directamente con el desbalance de su homeostasis fisiológica (Vidau *et al*, 2011), produciendo especies de oxígeno reactivo (ROS) que se pueden derivar de fuentes endógenas y exógenas y generarse directa o indirectamente como un subproducto de la desintoxicación celular o generación de energía compensatoria, llevando a un estrés oxidativo que puede causar daño irreparable a nivel celular (Li- Biyarlay *et al*, 2016), debido que si exceden los niveles de capacidad de las defensas antioxidantes celulares, como las enzimas desintoxicantes y las moléculas captadoras de radicales (Corrales y Muñoz, 2012), producen peroxidación lipídica de las membranas celulares, modificación de proteínas, mutaciones o fragmentación del ADN y posible muerte (Li- Biyarlay *et al*, 2016).

Este trabajo tuvo como objetivo “evaluar el efecto de la dosificación de insecticidas sistémicos (fipronil e imidacloprid) y no sistémicos (clorpirifos) sobre el estrés oxidativo en la abeja *Apis mellifera*”. Buscando generar un aporte investigativo de los efectos metabólicos producidos por los insecticidas en cuestión; además, de servir como un soporte científico para reglamentar la normatividad de la protección de los polinizadores y el uso de insecticidas en la agricultura Colombiana.

2.Revisión de Literatura

2.1 Marco Conceptual

2.1.1 Apicultura en Colombia y declive de la abeja *Apis mellifera*

En Colombia la cadena apícola se centra en la explotación de todos los productos derivados de la colmena, considerándose como una actividad no competitiva para el desarrollo agropecuario del país. Aun cuando es una actividad que genera grandes beneficios para el medio ambiente y el sector, gracias a la acción polinizadora de las abejas quienes, por medio de dicho proceso aceleran el desarrollo productivo de varios cultivos (Sanchez, 2014).

De acuerdo a una encuesta realizada a lo largo del país por actores de la Cadena apícola en el año 2005, se reportaron aproximadamente, 1.295 apicultores, concentrados principalmente en los departamentos de Huila, Cundinamarca, Boyacá, Cauca, Valle del Cauca, Risaralda, Sucre y Magdalena, con un total de 23.384 colmenas. Se estima que existen 2.100 apicultores que estarían trabajando en promedio cerca de 20 colmenas, lo cual permite afirmar la existencia de cerca de 40.000 colmenas (Ministerio de agricultura y desarrollo rural, 2006), cifras que al año 2016, reportan un incremento a 96.356 colmenas, mostrando un crecimiento sostenido de esta actividad en el transcurso del tiempo (Minagricultura, 2016).

Sin embargo, durante los últimos cuatro años, se ha evidenciado pérdidas de colmenas, por diferentes presiones medioambientales, atribuidas en su gran mayoría según el Colectivo de Abejas Vivas (Vargas, 2017), a intoxicaciones masivas por agrotóxicos (Figura 1), dejando perdida en un 34% (15.677) del total (46.186) de colmenas reportadas hasta julio del año 2018; evidenciando desde el año 2006 el continuo declive de la *Apis mellifera* en diferentes partes del mundo, apuntando varias investigaciones que la mayor causa de este fenómeno estaría mediado por la nueva generación de insecticidas neonicotinoides como: imidacloprid, clotianidina y tiametoxam, produciendo un efecto neurotóxico, que afecta su capacidad de forrajeo, orientación, y por ende la supervivencia de la colmena (Nates, 2017).

Por esto el colectivo de abejas vivas ha buscado impulsar proyectos de ley que protejan los polinizadores, donde el último recurso presentado al estado por medio de la cámara de

representantes, fue el proyecto de ley “**crear mecanismos para la defensa de polinizadores, fomento de la cría de abejas y desarrollo de la apicultura en Colombia y se dictan otras disposiciones**” (Vargas, 2017).

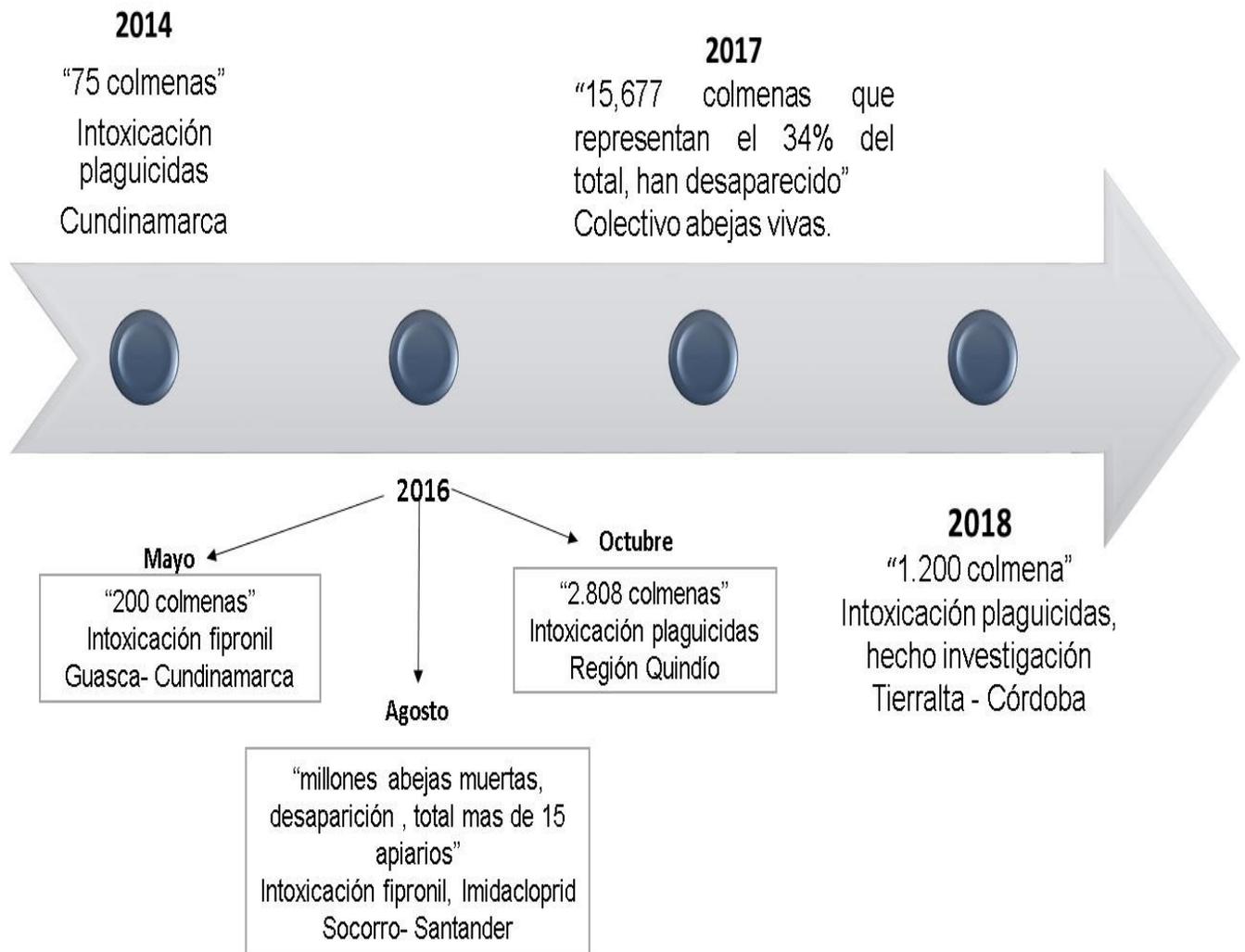


Figura 1. Reporte perdida de colmenas en Colombia por agroquímicos. Fuente: elaboracion propia, (2018).

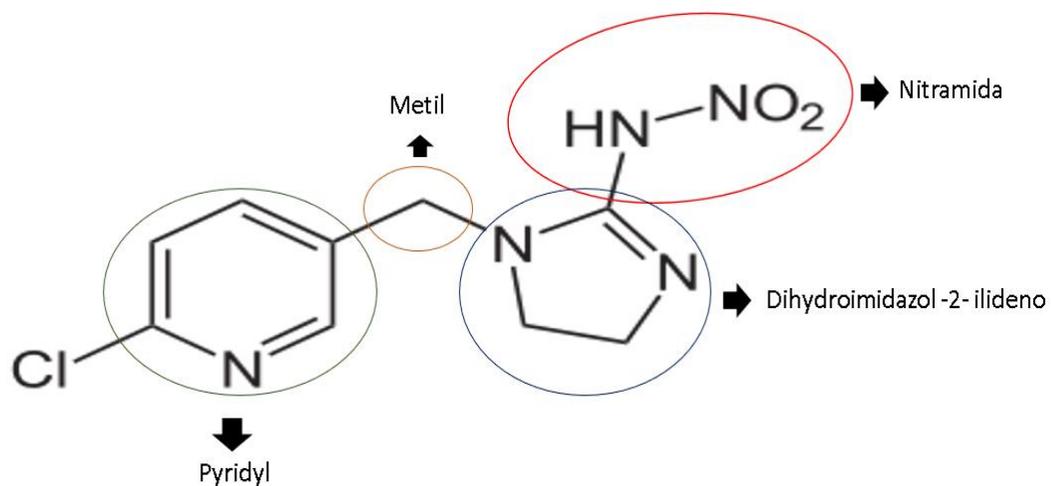
2.1.2 Neonicotinoides

Los neonicotinoides son una familia de insecticidas, entre los que se encuentran: Acetamiprid, Clotianidina, Dinotefuran, Imidacloprid, Tiacloprid, Thiametoxam; introducida en la agricultura en

los años 90, actúan de manera selectiva e irreversible en el sistema nervioso central, impidiendo la transmisión de los impulsos nerviosos, adhiriéndose a receptores nicotínicos de la acetilcolina en las células nerviosas de los insectos, paralizándolos y provocando su muerte (Agro 2.0, 2012).

Su estructura química le permite ser absorbido por el sistema vascular de la planta y liberarse a través del polen y néctar, siendo activos a dosis muy pequeñas; dependiendo la dosis, la inactivación del sistema nervioso puede provocar la muerte de los individuos, o causar una serie de trastornos como descoordinación, parálisis, pérdidas del sentido de la orientación, de la eficacia del vuelo, de la termorregulación que pueden provocar su muerte (Ojeda, 2008) (Pajuelo, 2014).

- **Imidacloprid**



N-[1- [(6- Cloro-3 Pyridyl) metil] -4,5- dihydroimidazol -2- yl] nitramida.

Figura 2. Formula química Imidacloprid. Fuente: tomado de Bayer (2011) y adaptado por Autor, 2019.

La molécula del imidacloprid en su estructura química presenta un piridyl con un cloro enlazado en el 6 carbono, que hace la molécula atractora de electrones; este piridyl está unido mediante un grupo metil con el resto de la molécula que corresponde a un dihidroimidazol, que es un

compuesto aromático, el cual puede reaccionar como un ácido o una base, siendo variable según sus modificaciones estructurales, en el carbono 2 de esta molécula está unida una nitramida, la cual posee un gran efecto aceptor de e^- , gobernando esta propiedad las moléculas que los contienen (Lehninger, Nelson y Cox, 1993).

Este insecticida pertenece al grupo químico de los neonicotinoides, con categoría toxicológica II, moderadamente peligroso y dañino; es un insecticida sistémico translaminar de fácil absorción por las raíces de las plantas distribuyéndolo acropétalmente, con acción estomacal y por contacto, que actúa como antagonista al enlazarse a los receptores nicotínicos post-sinápticos en el sistema nervioso central del insecto, generando parálisis inmediata (Bayer, 2011).

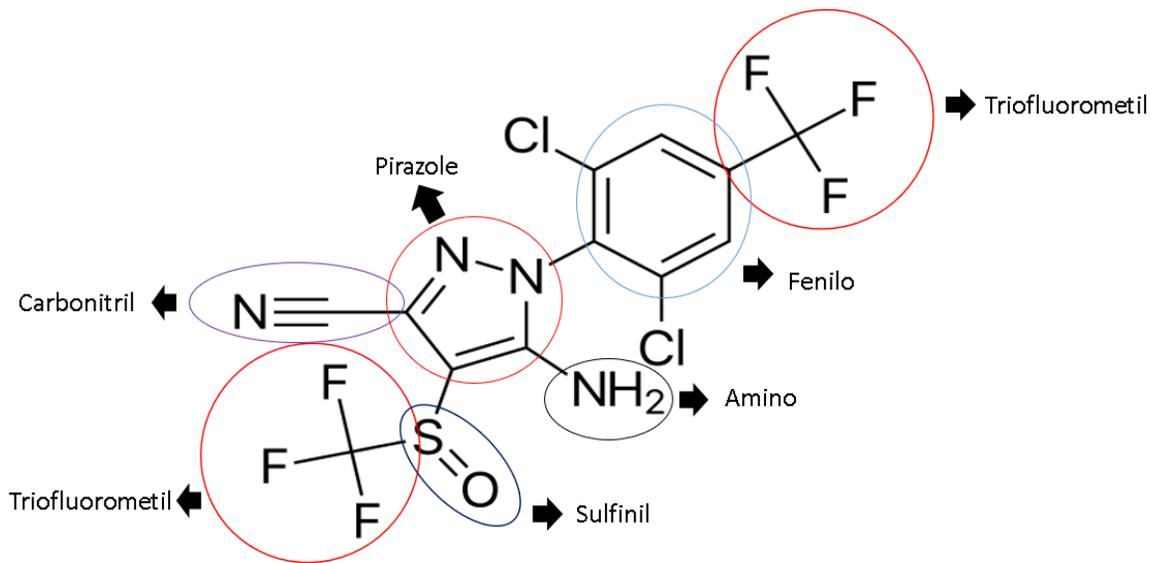
Es catalogado como el principal representante del grupo de los neonicotinoides, debido a que es de amplio espectro utilizado en el tratamiento de fitófitos en mascotas como perros y gatos, cebos para moscas, formulaciones para bovinos, manejado ampliamente en la agricultura en cultivos de algodón, rosas, tomate, tabaco, pastos, entre otros (Agro 2.0, 2012) (Bayer, 2011), en 2010 Bayer fabricó 20.000 toneladas de esta sustancia activa; relacionando su degradabilidad en el suelo a largo plazo, con potencialidad de ser contaminante de aguas subterráneas (Ansedo, 2018).

En Colombia, según el registro nacional de pesticidas aprobado por el ICA y el ministerio de agricultura, el imidacloprid es usado en cultivos de arroz, algodón, rosas, tomate, tabaco, ají, lulo, pimentón, tomate de árbol, uchuva, maíz, pastos, soja, frijón, naranja, habichuela, caucho, papa, cebolla, aguacate, lulo, berenjena, entre otros (Ica, 2018), teniendo un uso bastante amplio en una diversidad de cultivos comerciales.

2.1.3 Fipronil (Fenil pirazola)

Es un insecticida del grupo químico fenil pirazola, registrado en el mercado desde 1993 en más de 70 países con aplicación en 50 cultivos, clasificado en la categoría toxicológica III con acción sistémica, actúa por contacto e ingestión, en el sistema nervioso central de los insectos, más específicamente sobre el canal GABA, que inhibe la transmisión de los impulsos nerviosos; la unión del GABA a los canales iónicos conduce a la apertura de los canales de cloro en la membrana post-sináptica reduciendo su potencial, una vez el fipronil entra en contacto bloquea la inhibición del GABA al unirse al receptor, causando una sobre excitación del sistema nervioso

central, teniendo un modo de acción único hasta el momento en el mercado de los insecticidas, sin riesgo a resistencia cruzada con el resto de los grupos actuales de pesticidas (BASF, 2010).



(RS)- 5- amino- 1- [2,6 –dicloro -4- (trio fluorometil) fenil] – 4 (trio fluorometil sulfinil) -1 H- pirazol-3- carbonitril.

Figura 3. Estructura química fipronil (Fenil pirazola). Fuente: tomado de BASF, 2010 y adaptado por Autora, 2019.

Es catalogado como un insecticida único en su composición química, componiéndose la molécula por varios grupos químicos, entre los cuales está el amino, el pirazole, fenil, enlazado el trifluorometilo, el cual se deriva del grupo metilo, reemplazando los H+ por flúor, además está el trifluoro sulfinilo, estos grupos que contienen flúor manejan alta electronegatividad, además, el grupo nitrilo, el cual es catalogado como un ciano, el cual genera toxicidad, siendo potencialmente letal en la cadena transportadora de electrones, afectando la respiración celular (Lehninger et al, 1993).

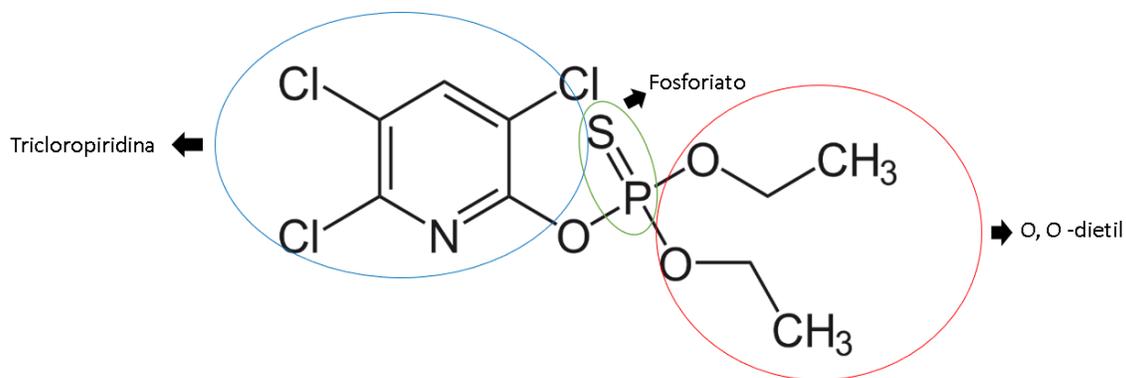
2.1.4 Organofosforados

Son un grupo de compuestos esteres del ácido fosfórico y de sus derivados, con características de inhibición de enzimas de actividad esterásica, más específicamente de la acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas; desarrollando toxicidad a través de la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas, reaccionando en la zona esterásica de la enzima formando una unión estable, que si no se logra romper, hace acción irreversible quedando

la enzima inhabilitada para su función normal, permitiendo acumulación de acetilcolina en las uniones colinérgicas neuroefectoras (efectos muscarínicos), en las uniones mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos (efectos nicotínicos) y en el sistema nervioso central (Fernández, Mancipe y Fernández, 2010).

▪ Clorpirifos

Pertenece al grupo de los organofosforados; es un insecticida no sistémico, con actividad por ingestión, contacto e inhalación, actuando igual que su grupo químico en la inhibición de acción de la acetilcolinesterasa mediante la combinación con esta enzima, por lo que la acetilcolina no se libera del sitio receptor y el mensaje del impulso nervioso continua pasando entre las terminales nerviosas del insecto, esto resulta en una excesiva transmisión de impulsos nerviosos, parálisis y finalmente la muerte del insecto (Dow Agro Science, sf); es un insecticida de amplio espectro y recomendado para el control de plagas en diversos cultivos de café, pastos, papa, tomate, entre otros (Ica, 2018).



O, O – dietil- O-3, 5, 6 – tricloropiridina – 2- il- fosforotiato.

Figura 4. Estructura química Clorpirifos. Fuente: tomado de Rocha & Garcia, 2008 y adaptado por Autrora, 2019.

En su estructura química posee una tricloropiridina, la cual tiene enlazado el elemento químico de cloro, que al igual que el fluor forman parte de los de los halógenos, siendo altamente reactivos

con tendencia atraer e⁻, por su electronegatividad; el grupo O, O- dietil y el fosforiato (Lehninger et al, 1993).

2.1.5 Cinética enzimática

La cinética se ha encargado de estudiar las velocidades de reacción y el cambio de la respuesta a variaciones en los parámetros experimentales; empezando por uno de los factores clave que afecta a la velocidad de una reacción catalizada por una enzima purificada, que es la cantidad de sustrato presente, siendo complicado determinar la cantidad de sustrato presente debido a que cambia durante el transcurso de la reacción convirtiéndose en producto; una aproximación simplificada consiste en medir la velocidad inicial V_0 cuando $[S]$ es generalmente mucho mayor que la concentración de enzima (Lehninger et al, 1993).

La afinidad de las enzimas por los sustratos e inhibidores, dan indicios sobre los mecanismos de reacción, ayudando a comprender las fuerzas que regulan las vías metabólicas; la velocidad de reacción de sustrato a producto es proporcional a la frecuencia con la que las moléculas que reaccionan forman el producto, esta reacción está dada por:

$$V_0 = K [S]^X$$

Donde:

V_0 = Velocidad inicial

K = Constante de velocidad que depende de las condiciones de reacción (T° , pH)

$[S]$ = Concentración del sustrato

X = orden de la reacción

Un término útil para describir una reacción es el orden de la reacción, la cual permite obtener conclusiones específicas con relación al mecanismo de reacción (ver tabla 1), este se determina de forma empírica y se define como la suma de los exponentes de los términos de concentración de la expresión de velocidad (González, 2015).

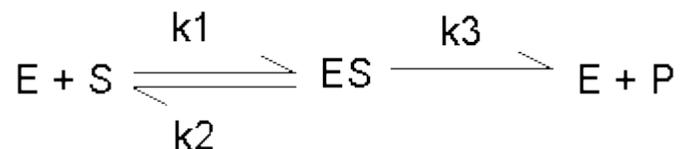
Tabla 1. Características del orden de reacciones cinéticas

	Orden cero	Primer orden	Segundo orden
Características	La velocidad de formación del producto es independiente de la concentración de sustrato.	la velocidad de formación de los productos es directamente proporcional a la concentración del sustrato.	La velocidad de formación de productos es proporcional a la concentración de dos sustratos.
Ecuación diferencial	$V_0 = k [S]^0$	$V_0 = k [S]^1$	$V_0 = k [S]^2$
Representación para una recta	[S] vs t	Ln [S] vs t	1 / [S] vs t
Signo de la pendiente	Positivo	Negativo	Positivo

Fuente: elaboración propia, 2019.

2.1.6 Ley Michaelis- Menten

“Para explicar la relación observada entre la velocidad inicial (V_0) y la concentración inicial de sustrato ([S]) Michaelis y Menten propusieron que las reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren en dos etapas: En la primera etapa se forma el complejo enzima-sustrato y en la segunda, el complejo enzima-sustrato da lugar a la formación del producto, liberando el enzima libre:



En este esquema, k_1 , k_2 y k_3 son las constantes cinéticas individuales de cada proceso que reciben el nombre de constantes microscópicas de velocidad. Según esto, se puede afirmar que:

- $v_1 = k_1 [E] [S]$
- $v_2 = k_2 [ES]$
- $v_3 = k_3 [ES]$

Se puede distinguir entre enzima libre (E) y enzima unido al sustrato (ES), de forma que la concentración total de enzima, [ET], (que es constante a lo largo de la reacción) es:

$$[ET] = [E] + [ES]$$

Como $[E] = [ET] - [ES]$, resulta que: $v_1 = k_1[S][ET] - k_1[S][ES]$

Además, como [ES] es constante, la velocidad de formación de los productos es constante:

$$v = v_3 = k_3 [ES] = \text{constante.}$$

Como $v_1 = v_2 + v_3$, podemos decir que:

$$k_1[S][ET] - k_1[S][ES] = k_2[ES] + k_3[ES]$$

Despejando [ES], queda que:

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_m + [S]}$$

En donde la expresión $(k_2+k_3) / k_1$ se ha sustituido por K_m , o constante de Michaelis-Menten. Este enlace nos aporta una explicación sobre las razones que hacen de la K_m un parámetro cinético importante, para cualquier reacción enzimática.

Si se introduce el parámetro V_{max} en la ecuación general de la velocidad, se obtiene la expresión más conocida de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Hay enzimas que no obedecen la ecuación de Michaelis-Menten. Se dice que su cinética no es Michaeliana. Esto ocurre con las enzimas alostéricas, cuya gráfica frente a [S] no es una

hipérbola, sino una sigmoide. En la cinética sigmoidea, pequeñas variaciones en la [S] en una zona crítica (cercana a la K_m) se traduce en grandes variaciones en la velocidad de reacción” (Granados, 2014).

2.1.7 Ley doble recíproco

Se utiliza como una herramienta gráfica para calcular los parámetros cinéticos de una enzima, Su utilidad consiste en que el recíproco de la cinética de Michaelis-Menten es fácilmente representable:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

El recíproco es:

$$\frac{1}{V} = \frac{(K_m + [S])}{(V_{max} [S])} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

La representación gráfica de Lineweaver-Burk permite identificar el K_m y V_{max} ; el punto de corte con el eje de ordenadas es el equivalente a la inversa de V_{max} , y el de abscisas es el valor de $-1/K_m$ (Lenhinger, 1993).

2.1.8 Inhibición enzimática

La inhibición enzimática consiste en la disminución o anulación de la velocidad de reacción catalizada por una enzima; siendo los inhibidores sustancias específicas que disminuyen parcial o totalmente la actividad enzimática, existiendo dos tipos de inhibición (ver figura 5) (Granados, 2014).

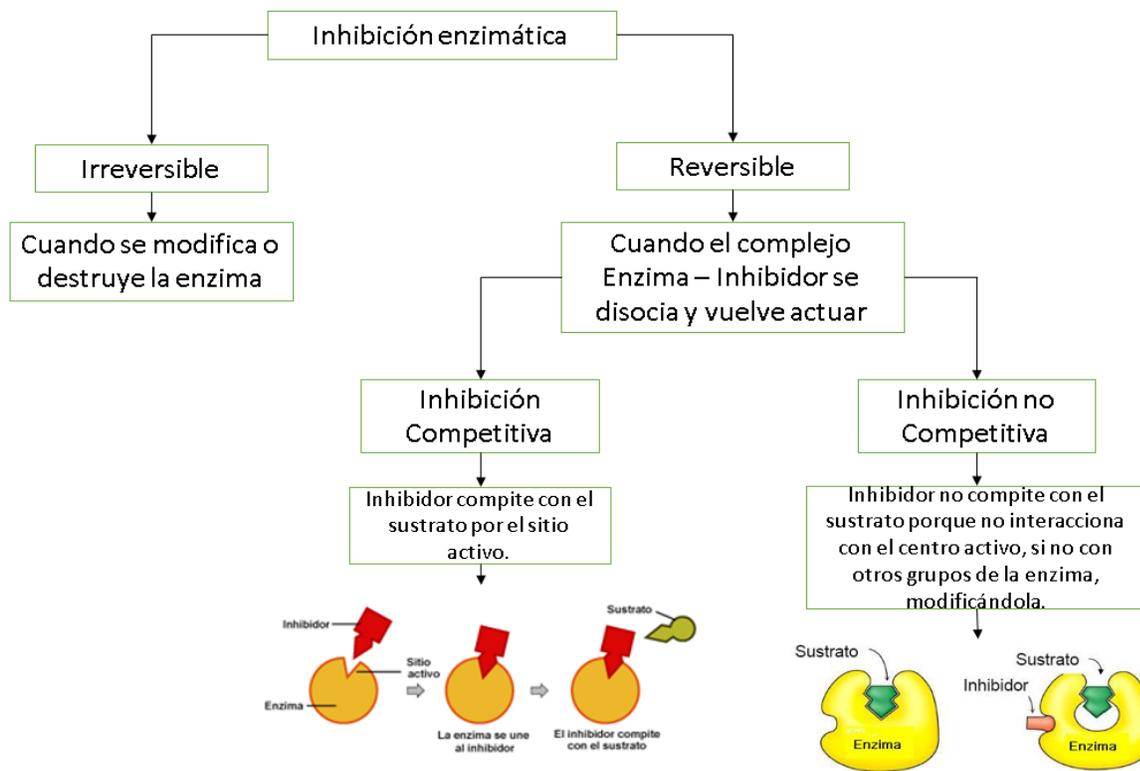


Figura 5. Tipos de inhibición enzimática. Fuente: Elaboración propia, 2019.

2.1.9 Estrés Oxidativo

El desequilibrio entre las moléculas inestables denominadas radicales libres (RL) y el sistema de defensa antioxidante se denomina estrés oxidativo caracterizado por el proceso ineficiente de generación y eliminación de especies reactivas, que hace referencia a dos tipos de moléculas: los radicales libres y los no libres, que se forman como resultado del metabolismo celular, representados dentro de los sistemas biológicos por las especies reactivas de oxígeno (ROS) y por las especies reactivas de nitrógeno (RNS) especialmente, aunque, existen otras especies reactivas derivadas de otros elementos; se originan tanto en procesos fisiológicos normales como en procesos patológicos y de intoxicación (Corrales y Muñoz, 2012).

▪ Radicales libres

Son moléculas con un número impar de electrones o un electrón libre en su última orbita, lo que le otorga poder permanganético, que las torna muy inestables y altamente reactivas con capacidad para combinarse inespecíficamente, con las diferentes moléculas que integran la

estructura celular, confiriendo capacidad de atacar cualquier tipo de biomolécula (Figura 6) (Corrales y Muñoz, 2012)

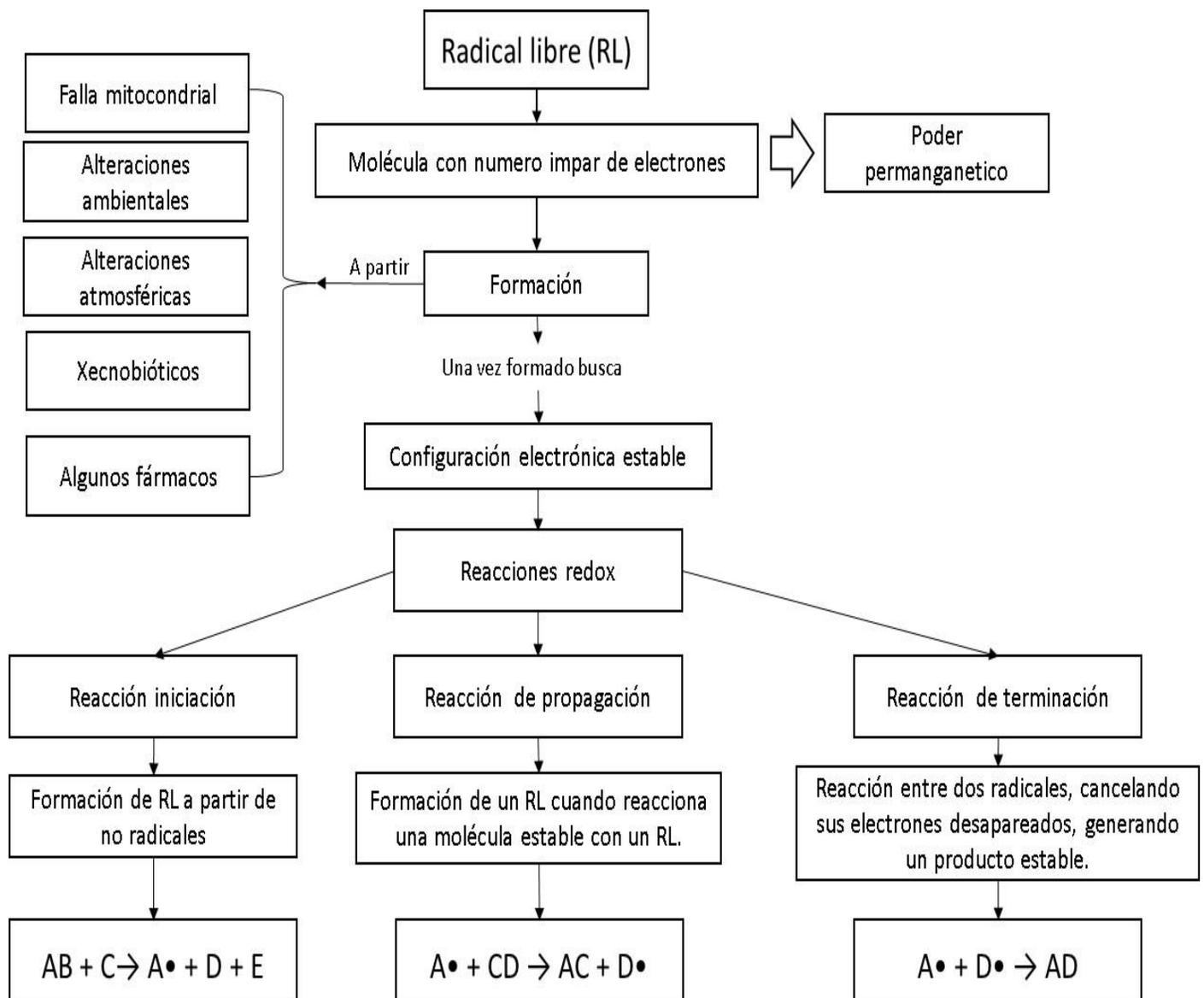


Figura 6. Radical libre y su mecanismo de formación. Fuente: Elaboración propia, 2019.

▪ Especies Reactivas de Oxígeno (EROS)

El oxígeno en su forma natural es un birradical que posee dos electrones desapareados, pudiendo reaccionar solamente con moléculas que tengan una configuración electrónica semejante a la suya, aunque en los procesos de transferencia de electrones o de absorción de energía se pueden generar especies reactivas de oxígeno, que involucra, los radicales libres de

oxígeno y moléculas no radicales derivadas de este elemento, ya que cuando el oxígeno oxida un compuesto este se reduce gracias a la ganancia de electrones formando especies de oxígeno reactivo (Figura 7).

El tipo más frecuente es el radical libre de oxígeno, en cuya estructura está presente el oxígeno como centro funcional, generando ERO como el radical hidroxilo (OH^\cdot), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y Anión superóxido ($\text{O}_2^\cdot^-$). Si bien el H_2O_2 , no es un radical libre por no poseer electrones libres, es una molécula muy reactiva y puede ser precursora de radicales OH en presencia de metales de transición (Tabla 2) (Corrales y Muñoz, 2012; Viada et al, 2017).

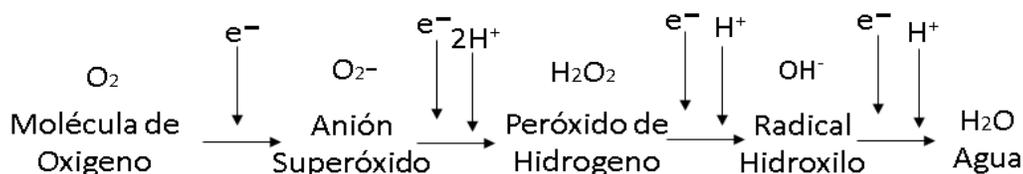


Figura 7. Esquema de producción de las especies reactivas de oxígeno. Fuente: Meneghini. 1987 referenciado por (Corrales y Muñoz, 2012).

Tabla 2. Características de las principales especies reactivas de oxígeno (EROS)

EROS	Símbolo	Características
Anión superóxido	$\text{O}_2^\cdot^-$	Intermedio en la reducción de O_2 a H_2O . Buen reductor y mal oxidante. Es importante porque genera más EROS, tales como OH y H_2O_2 .
Hidroxilo	HO^\cdot	El oxidante más potente en sistemas biológicos. Se genera a partir de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss.
Peróxilo	ROO^\cdot	Baja capacidad oxidante, pero alta difusibilidad.
Alcóxilo	RO^\cdot	Capacidad de oxidación media con lípidos

Peróxido de Hidrogeno	H_2O_2	Se origina de O_2^- por la dismutación por la enzima SOD. Puede originar FR muy reactivo cuando reacciona con metales de transición.
Ácido Hipocloroso	HClO	Formado por reacción de mieloperoxidasa, está presente en los neutrófilos en H_2O_2
Oxígeno Singlete	1O_2	Oxígeno excitado molecularmente a través de la luz solar y la radiación. Altamente oxidante.

Fuente: Review Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Yu P. 1994. Referenciado por (Corrales y Muñoz, 2012).

2.1.10 Complejo antioxidante

Los organismos evolutivamente desarrollan sistemas de defensa antioxidantes para poder neutralizar las especies de oxígeno reactivo, retardando o previniendo la oxidación de un sustrato oxidable, que puede ser un lípido, proteína, DNA, o cualquier otro tipo de biomolécula. El sistema de defensa antioxidante está compuesto por una serie de complejos enzimáticos y no enzimáticos que actúan conjuntamente para proteger a la célula; considerándose la primera línea de defensa la acción enzimática, encargándose de evitar el acúmulo de ROS como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, entre otros, catalizando la transferencia de electrones de un sustrato hacia los RL (Corrales & Muñoz, 2012; Viada et al, 2017).

El complejo enzimático comprende:

- **Superóxido dismutasa (SOD)**

La superóxido dismutasas son una familia de metaloenzimas que catalizan la dismutación o reacciones redox donde un elemento es al mismo tiempo oxidado y reducido, cuando la suma de sus potenciales es igual a cero, siendo en este caso específico los radicales superóxido para oxígeno y peróxido de hidrogeno; se han identificado 3 isoformas, que tienen un metal diferente como cofactor, midiéndolas por su sensibilidad a la desnaturalización en presencia de cianuro de potasio (KCN) y peróxido de hidrogeno; La isoforma Superóxido Dismutasa Cobre y Zinc (SOD Zn/Cu) se caracteriza por ser sensible a KCN y H_2O_2 , la isoforma Superóxido Dismutasa hierro

(SOD Fe) únicamente sensible a H_2O_2 y la isoforma Superoxido Dismutasa manganeso (SOD Mn) es resistente a KCN y H_2O_2 (Pulido, 2014).

Esta enzima cataliza la dismutación del radical libre superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el cual es menos reactivo y puede llegar a ser degradado por otras enzimas como la catalasa o la glutatión peroxidasa (Corrales y Muñoz, 2012); La reacción enzimática de la SOD se lleva a cabo en dos pasos, primero el O_2^- llega al centro de reacción y se une a una arginina, el O_2^- dona su electrón, el cual es transferido al Cu, que se transforma en Cu^{+2} , esto provoca que el enlace entre la histidina y el Cu se rompa, y protona al nitrógeno de la histidina, el O_2 formado se disocia de la arginina y se libera. La segunda parte de la reacción comienza de manera similar a la primera, el O_2^- llega al centro catalítico de la enzima y se une a una arginina; cerca del centro catalítico, se protona una molécula de agua; el electrón que recibió el Cu es transferido al O_2^- lo cual oxida al metal a su forma Cu^{+2} . Los dos electrones que posee el superóxido, forman inmediatamente dos enlaces covalentes con dos protones donados uno por la molécula de agua y otro del nitrógeno de la histidina, con lo cual se libera H_2O_2 y la enzima se (Magaña, 2014).

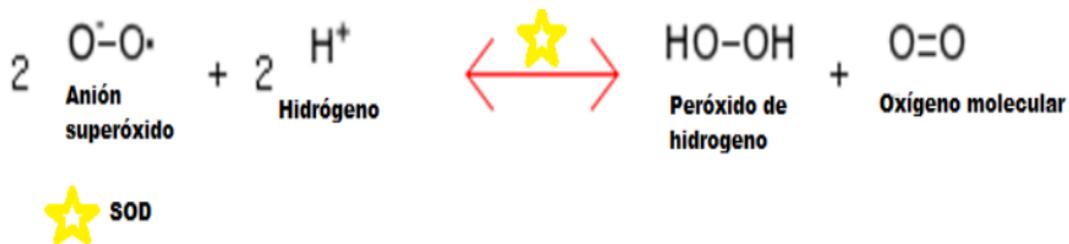


Figura 8. reacción de la SOD en la dismutación de superóxido a peróxido de hidrogeno y oxígeno molecular. Fuente (Magaña, 2014).

▪ Catalasa (CAT)

Es una heteroproteína mono funcional, que presenta como sitio activo un grupo hemo que se encuentra en estado oxidado (Fe^{+3}), clasificándola como hemoproteína (ver figura 9); se concentra principalmente en los peroxisomas y las mitocondrias (Corrales y Muñoz, 2012), posee un peso molecular en un rango de 210- 280 KD, consta de cuatro subunidades idénticas que se mantiene unidas por interacción no covalente; se encarga de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Figura 10), evitando así, la formación de radicales

hidroxilos y oxígeno singlete, que son especies de oxígeno reactivos, capaces de causar daño irreversible en la célula.

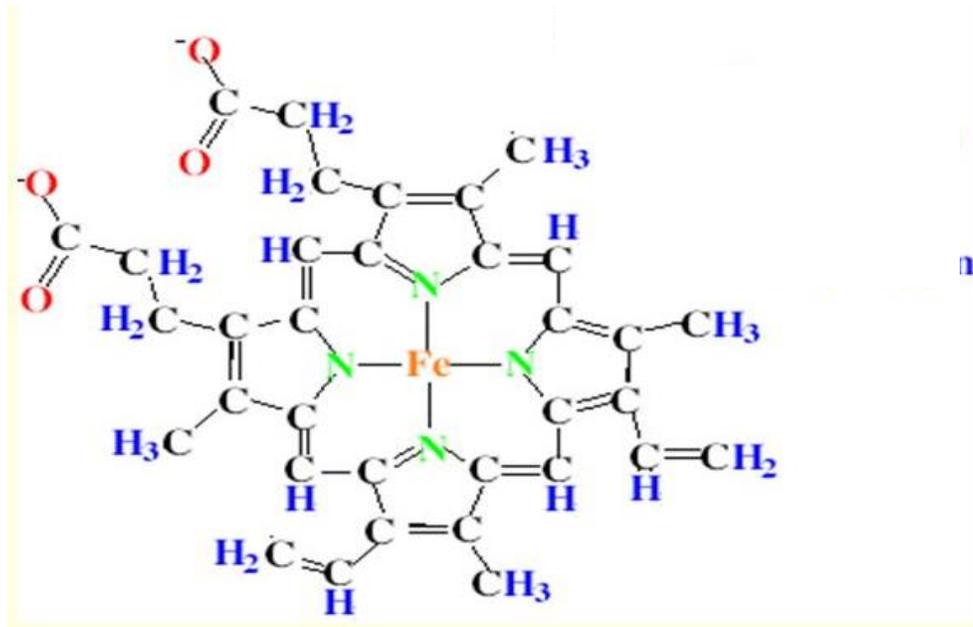


Figura 9. Estructura molecular catalasa. Fuente: Díaz, 2002.

Al igual que las otras enzimas su velocidad de reacción depende de factores como: el pH, temperatura y concentración de sustrato; la catalasa se encuentra en todas las células de metabolismo aerobio, destacándose por su alta actividad comparada con las otras enzimas, de acuerdo a la naturaleza de su sitio activo, puede ser inhibida en forma irreversible por las sustancias que forman complejos como el, encontrando entre sus principales inhibidores el cianuro sulfuroso, monóxido de carbono, monóxido de nitrógeno y la hidroxidamina, entre otros (Lenhinger et al,1993; Díaz, 2002; Magaña, 2014).

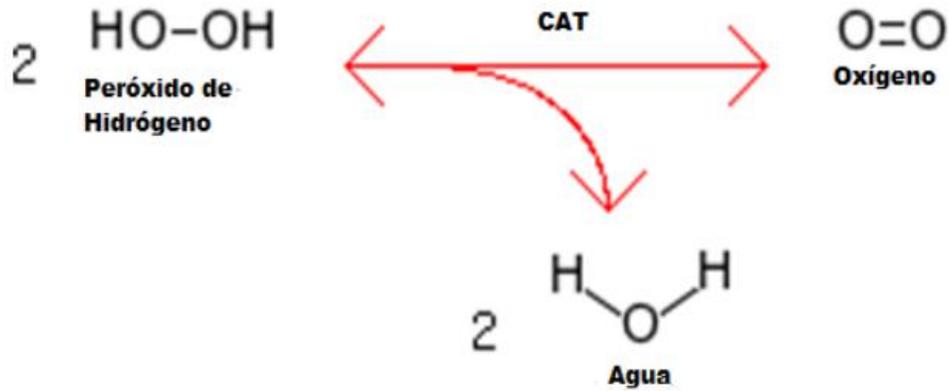


Figura 10. Reacción catalítica de la catalasa, utilizando dos moléculas de H_2O_2 para su conversión en O_2 y Agua metabólica. Fuente (Magaña, 2014).

▪ Peroxidasa (POD)

Las peroxidasas conforman una familia de isoenzimas presentes en casi todo organismo vivo, pertenecientes a la clase de oxidoreductasas; por lo general, contiene un grupo hemo y llevan a cabo la oxidación de especies reactivas de oxígeno, siendo altamente específica para el aceptor de hidrogeno, como el peróxido de hidrogeno, en animales las peroxidasas son específicas en tejidos y células, incluyendo: glutatión peroxidasa, mieloperoxidasa, lactoperoxidasas, entre otras (Vergara, 2015).

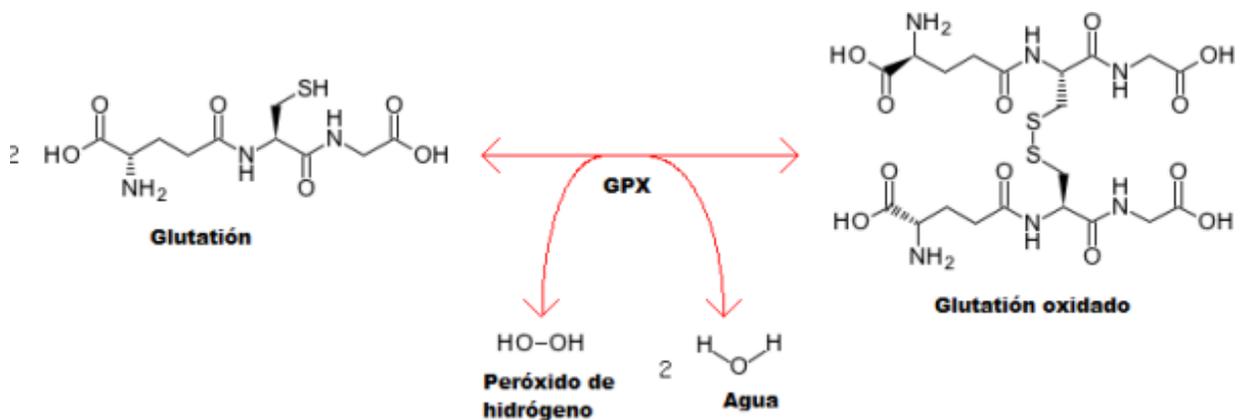


Figura 11. Reacción del glutatión peroxidasa. Fuente (Magaña, 2014)

La glutatión peroxidasa es una selenoproteína que actúa como agente reductor, forma parte del sistema glutatión, señalado como el principal sistema antioxidante en el organismo, cataliza la

reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente (Corrales & Muñoz, 2012), protegiendo la membrana de células que funcionan en presencia de oxígeno; esta enzima ha demostrado estar involucrada en la resistencia del estrés oxidativo en *Apis mellifera* (Li- Biyarlay *et al*, 2016).

2.1.11 Ácido ascórbico

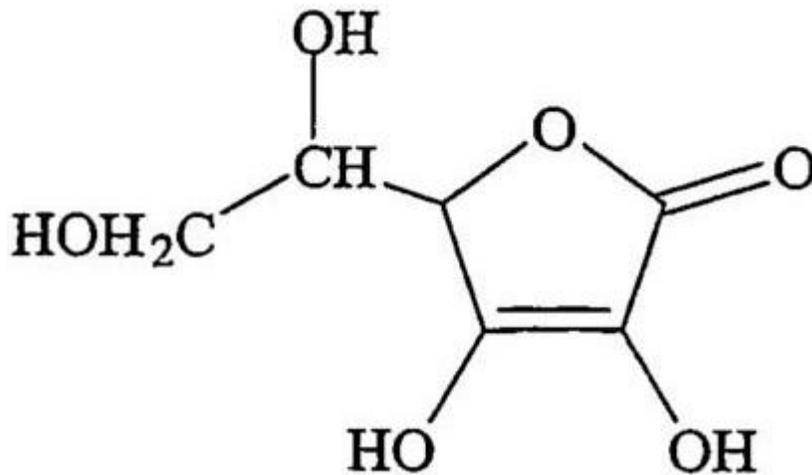


Figura 12. Estructura molecular ácido ascórbico. Fuente: Corrales & Muñoz, 2012

El ácido ascórbico tiene una estructura de lactona, con dos grupos hidróxilos enólicos, además de un grupo alcohol primario y otro secundario. La estructura endiol motiva sus cualidades antioxidantes, siendo fácilmente oxidados a dicetonas (Lenhinger *et al*, 1993).

Es una de las moléculas de segunda barrera antioxidante, pertenece al complejo no enzimático y se encuentra a nivel intra y extracelular en la forma de ascorbato, actúa directamente sobre los radicales superóxido, hidroxilo y algunos hidroperóxidos lipídicos, además de actuar sobre el tocoferoxilo, transformándolo a vitamina E y pueden ser eficaces cuando se encuentran excesivas cargas de iones de hierro y cobre (Bandyopadhyay y Banerjee, 1999; Corrales y Muñoz, 2012).

2.2 Marco Referencial

El declive de la *Apis mellifera* se le atribuye a diferentes presiones medio ambientales como: el cambio climático, cultivos genéticamente modificados, monocultivos, introducción de virus, enfermedades y el uso indiscriminado de insecticidas, no identificando una única causa para su descenso poblacional, por lo que a través de esta problemática se han desarrollado distintos trabajos de investigación que buscan identificar el agente causal de la disminución de colonias en todo el mundo.

En la actualidad el uso de pesticidas es uno de los factores al que más se le atribuye la disminución de las poblaciones de *Apis mellifera* a nivel mundial, enfocándose distintos trabajos científicos a investigar, a nivel genético, fisiológico y metabólico, la respuesta que tiene esta especie a los diferentes insecticidas y sus concentraciones.

Claudinos en 2006, comparo el genoma de *Apis mellifera* con el de otros insectos, encontrando que posee menos genes codificadores de proteína, habiendo una diferencia marcada en tres superfamilias de proteínas que codifican enzimas desintoxicantes xenobioticas, llevando estas deficiencias a contribuir con la sensibilidad de la abeja a los insecticidas, reportando Jhonson *et al* (2010), la mayor perdida de colmenas que correspondian al 45% del total en los EEUU por plaguicidas, entre los años 1966 a 1979, que combinado con la introducción de los acaros parasitos, contribuyo a la perdida dramática de colonias, apareciendo a su vez, los cultivos genéticamente modificados y dos nuevas clases de pesticidas sistémicos (neonicotinoides y fenilpirazoles), introducidos en los años 90 al mercado, mostraron alta efectividad posicionándose rápidamente en el mercado mundial como pesticidas de primera necesidad para combatir insectos plaga.

Años más tarde, los estudios científicos se enfocaron en estudiar primeramente la vinculación entre la exposición del insecticida y el cambio de comportamiento en *Apis mellifera*, sin conocerse bien los efectos metabólicos subyacentes a la exposición, desencadenando los siguientes estudios:

Yao *et al* (2013), aislaron el gen mitocondrial de la tiorredoxina peroxidasa (AccTpx-3) de *Apis cerana cerana*, la cual desempeña un importante papel en la homeostasis celular y la protección de las células por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), resultando la

expresión de la transcripción AccTpx-3 regulada por estresores abióticos, la proteína recombinante AccTpx-3 actuó como un potente antioxidante que resistió el estrés oxidativo inducido por paraquat y protegió el ADN del daño oxidativo. En conjunto, estos resultados sugieren que la proteína AccTpx-3 es una enzima antioxidante que puede proteger a los organismos del estrés oxidativo.

Jia et al (2014), caracterizó el gen del citocromo c oxidasa (AccSCO2) de *Apis cerana cerana* (Acc), debido que en las células eucariotas esta enzima, es la última en la cadena de transporte de electrones respiratorios de las mitocondrias, el estudio mostro que la expresión de AccSCO2 fue inducida por frío (4 ° C), CdCl₂, HgCl₂, luz ultravioleta (UV), H₂O₂ y fue inhibida por diferentes tratamientos con pesticidas; midiendo a su vez, las actividades enzimáticas antioxidantes de la superóxido dismutasa (SOD), la peroxidasa (POD) y la catalasa (CAT), siendo menores en las abejas silenciadas por AccSCO2, que en las abejas control.

Slujis et al (2015), realizaron la revision de mas de 800 estudios científicos acerca de los impactos del grupo problema de agroquimicos en donde se encuentra los neonicotinoides y el fipronil, que en la actualidad ocupan un tercio del mercado mundial de insecticidas; despertando gran preocupacion acerca de los impactos en la biodiversidad que llevan una amplia variedad de especies, ya que son utilizados en el recubrimiento de semillas, fumigaciones foliares, empapado del suelo, control de plagas, uso en animales domesticos; ademas, de ser un compuesto soluble en agua, con alta residualidad en suelos, sedimentos, y aguas subterraneeas; En las abejas, las exposiciones controladas a niveles de campo realistas han demostrado afectar negativamente la navegación individual, el aprendizaje, la recogida de alimento, la longevidad, la resistencia a las enfermedades y la fecundidad, abriendo paso a distintos debates sobre su uso y su eventual restricción, evidenciando que los niveles actuales de contaminación a causa de su uso autorizado exceden las concentraciones mínimas para producir efectos negativos en una amplia variedad de especies.

Llibar-yi et al (2016). Estudiaron la resistencia al estrés oxidativo en dos grupos de zánganos de abejas *mellíferas* expuestos a diferentes concentraciones de paraquat, tomándolas como modelo realista, ya que están regularmente expuestas a diferentes presiones medioambientales y xenobióticos como pesticidas, herbicidas, fungicidas, etc. Lo que puede desencadenar la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) y activar como primera medida de defensa su complejo enzimático y en segunda instancia moléculas captadoras, evitando la peroxidación lipídica de las membranas celulares, modificación de proteínas, mutaciones o fragmentación del

ADN, que desencadena en muerte celular; arrojando el estudio, que el nivel de carbonilación de proteínas no fue significativamente diferente entre los grupos, sugiriendo que la supervivencia de un factor estresante oxidativo agudo se debe a la tolerancia, no a la prevención o reparación, del daño oxidativo a los lípidos.

Zhu *et al* (2016), estudiaron los mecanismos moleculares de los genes de las familias de las monooxigenasas del citocromo P450 para resistir el daño por ROS, ya que se ha demostrado que son enzimas multifuncionales e importantes en el metabolismo oxidativo de los compuestos endógenos y xenobióticos, haciendo una actividad similar a la peroxidasa, pudiendo participar en la protección de organismos contra especies reactivas de oxígeno (ROS).

Christen, Mittner , Fent. (2016), realizaron un estudio con dosis ambientales realistas, para dilucidar los efectos moleculares ocasionados por grupo de insecticidas neonicotinoides (acetamiprid, clotianidina, imidacloporid, tiametoxam) en 2017 Christen, y Fent, realizaron el mismo estudio pero con dos organofosforados, clorpirifos y malatión; el piretroide cipermetrina, y el activador del receptor de rianodina, clorantraniliprol; en los dos estudios se evaluaron las alteraciones transcripcionales de genes seleccionados en tres tiempos de exposición, en abejas mellíferas enjauladas, expuestas a diferentes concentraciones de estos compuestos, dirigiendo la expresión génica a varias transcripciones, incluidas las subunidades del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (nAChRa1, nAChRa2), el gen multifuncional vitelogenina, genes relacionados con el sistema inmunitario, genes que pertenecen al sistema de desintoxicación , el gen de la catalasa relacionada con el estrés y dos genes relacionados con la formación de la memoria, pka y creb, indicando cambios expresionales en diferentes tiempos de exposición, para los neonicotinoides, los cuatro insecticidas indujeron fuertes alteraciones en la expresión de los genes relacionados con el sistema inmunitario que sugieren implicaciones negativas para la salud de las abejas, así como las transcripciones de la enzima citocromo P450 que sugieren una interferencia con el metabolismo.

Catae *et al* (2017), evaluó la toxicidad oral del Imidacloprid, un neonicotinoide ampliamente utilizado en la agricultura moderna; abejas africanizadas fueron sometidas a dosis subletales, administradas a los 1, 4 y 8 días estableciendo una centésima parte de la CL50, estudiando los efectos estructurales por microscopia electrónica de transmisión en el cerebro y el Intestino medio, además de la distribución de proteínas involucradas; se detectaron alteraciones en las células del intestino medio de las abejas como: daño nuclear y mitocondrial, en el cerebro se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$), el insecticida causó espacio

entre las células de Kenyon, condensación la cromatina y pérdida densidad de electrones y crestas mitocondriales.

Shi et al (2018), estudio el efecto metabólico producido por el tiacloprid un neonicotinoide, en las abejas a través de la exposición oral subletal, de 0.12 µg de alimento contaminado por abeja; analizando los cambios metabólicos que ocurren en la cabeza de la abeja, mediante técnicas LC-MS combinados con GC-MS, mostrando los resultados, 115 metabolitos diferenciales, Incluyendo diversos aminoácidos, ácidos grasos, fosfolípidos y otros, los cuales, fueron significativamente afectados en las abejas tratadas con tiacloprid en comparación con el control, asociando los metabolitos con alto nivel de abundancia, enriquecidos en vías de amplio rango del estrés oxidativo y desintoxicación.

Hayat *et al* (2018), estudio el daño del ADN y la actividad enzimática antioxidante mediante la glutatión s transferasa y la catalasa, en un total de 54 muestras de abejas *Apis florea* y *Apis dorsata*, tratadas con insecticidas y libres de insecticidas, encontrando en siete muestras de *A. florea* y cinco muestras de *A. dorsata* Siete insecticidas: clorpirifos, dimetoato, imidacloprid, forato, emamectina, clorfenapir, acetamiprid; siendo el clorpirifos, el insecticida más detectado, encontrándose en cuatro muestras (7.4%), con una concentración promedio de 0.03 µg / g de muestra; pudiendo inferir que áreas tratadas con insecticidas pueden causar daños en el ADN de organismos no diana; la actividad de GST disminuyo significativamente ($P < 0.01$) en los grupos control y tratados con insecticida, respectivamente, indicando que el estrés que ejercen los insecticidas en los insectos expuestos son suficientes para disminuir la actividad GST, por otro lado la actividad de la Catalasa no tuvo cambios estadísticamente significativos respecto al control, sin embargo, se observó un ligero aumento de su actividad en los grupos tratados con insecticidas, sugiriendo el inicio de oxidación por el estrés causado en las abejas debido a la exposición a insecticidas.

3. Materiales y Métodos

3.1 Localización del experimento

El proyecto de investigación se desarrolló en el laboratorio de química de la Universidad de Cundinamarca, en el municipio de Fusagasugá, el cual se encuentra situado a una distancia de 65Km de Bogotá D.C. $4^{\circ}20'14''N$ $74^{\circ}21'52''O$, con una altura promedio de 1765 m.s.n.m. y una temperatura promedio de $19,4^{\circ}C$. (Alcaldía Fusagasugá, 2017) (Figura 13).



Figura 13. Mapa ubicación Universidad de Cundinamarca sede Fusagasugá. Fuente: tomado y adaptado de Alcaldía Fusagasugá (2017).

3.2 Instalaciones Agropecuarias

Las abejas empleadas en el estudio se obtuvieron de un apiario 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 *Apis mellifera*, establecidas hace tres años, sin ningún reporte de muerte por agroquímicos, con registros técnicos que permitió identificar características de estados sanitarios, tipo de raza, identificada como un híbrido producto del cruce de las subespecies de *Apis mellifera*, denominada abeja africanizada, explotada comercialmente en el país (Vásquez, Martínez, Ortega y Maldonado, 2012).



Figura 14. Ubicación e Instalaciones del apiario bioapicol: **a.** ubicación apiario; **b.** encierro apiario; **c.** colmenas.

3.3 Unidades experimentales

Para el bioensayo se utilizaron abejas obreras en edades mixtas, las cuales son hembras infértiles por poseer ovarios rudimentarios, encargadas de realizar todas las funciones especializadas en la colmena, de acuerdo a su edad y estado fisiológico, se estima que representan cerca de un 90 a 95% del total de la colmena, por lo que el desarrollo y supervivencia de la misma depende, de su desempeño (Silva, Arco y Gómez, 2006).

Para seleccionar la colmena del bioensayo, se realizó la tabulación del último registro técnico de seguimiento y evaluación, de cada una de las colmenas, otorgándole valores a cada variable generalizada en los registros (Figura 14), descartando así, las colmenas que presentaban infestación por varroa, además de las que tenían una población y reservas de alimento deficiente, ya que según los referenciado por Blacquiere, Smagghe, Cornelis , Gestel , y Mommaerts (2012), dependiendo de variables como: estado nutricional, sanitario y conformación de la colmena, pueden ser más susceptibles a los efectos causados por exposición a los insecticidas, provocando error experimental en el bioensayo; después de evaluar estos criterios de selección, se realizó una selección al azar de la colmena para la obtención de las unidades experimentales del estudio.

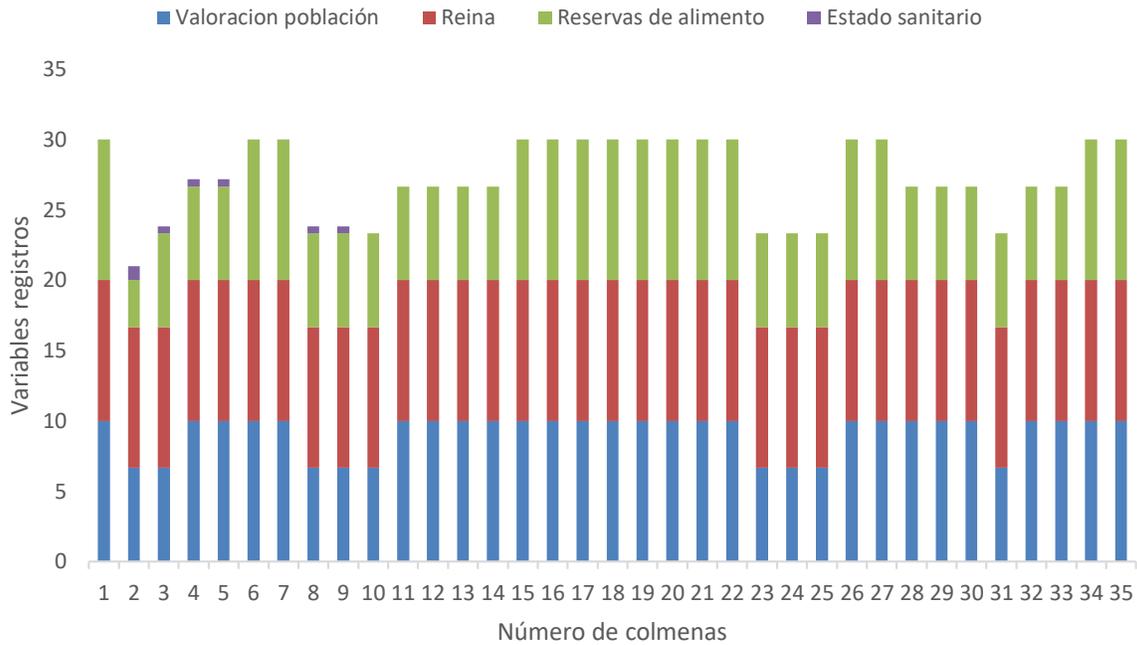


Figura 15. Tabulación variables último registro técnico, relevantes para el estudio. Valoración población: Fuerte (10) – Media (6,66) – Débil (3,33); Presencia reina: Si (10) – No (0); Reservas de alimento: Excelente (10) – Buena (6,66) – Deficiente (3,33); Estado sanitario: porcentaje infestación por varroa (0%= 0) (5% = 0,5) (10% =1).

Las unidades experimentales correspondieron a 100 abejas obreras en edades mixtas, del género *Apis mellifera*, provenientes de la misma colmena (Figura 15), de un apiario sin antecedentes de mortalidad por agroquímicos, de acuerdo a la metodología de Christen y Fent (2017).



Figura 16. Unidades experimentales, a. Colmena seleccionada; b. unidades experimentales.

3.4 Tratamientos

Las dosis a utilizar se determinaron basándose en DL50 reportadas en algunos estudios por contacto, de los insecticidas del presente estudio; disminuyendo gradualmente las dosis en un 50%, hasta obtener cuatro dosis (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración dosis subletales de Imidacloprid, clorpirifos y fipronil.

Compuesto	Concentraciones ng/ abeja				DL 50 contacto ng/abeja	Autor
	DS 1	DS 2	DS 3	DS 4		
Imidacloprid	20	40	80	160	183,83	(Christen, Mittern, Fent, 2016)
Clorpirifos	10	20	40	80	87,8	(Al Nagggar et al., 2015)
Fipronil	0,5	1	2	4	5,05	(Lannacone & Alvarado, 2009)

Fuente: elaboración propia, 2018.

Para los tratamientos se utilizaron tres insecticidas con cuatro concentraciones cada uno y el tratamiento control, que se explican en la tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos del bioensayo por contacto para las *Apis mellifera*.

Tratamientos	Dosis Subletal	Insecticida (ng/abeja)	Insecticida
T1	DS 1	10	Imidacloprid
T2	DS 2	20	
T3	DS 3	40	
T4	DS 4	80	
T5	DS 1	20	Clorpirifos
T6	DS 2	40	
T7	DS 3	80	
T8	DS 4	160	
T9	DS 1	0,5	Fipronil
T10	DS 2	1	
T11	DS 3	2	

T12	DS 4	4	
T13	DS 0	0	Testigo

Los tratamientos se determinaron a las dosis subletales establecidas para cada insecticida, siguiendo como referencia la dosis letal 50, por contacto reportada para el género *Apis mellifera*. Fuente: elaboración propia, 2018.

3.5 Variables evaluadas

Para la obtención de los datos, se recolectaron las muestras de cada una de las unidades experimentales, inducidas a estrés oxidativo a través de diferentes insecticidas y concentraciones, siguiendo la guía de la agencia de protección ambiental (EPA) OCSP 850.3020 (Prueba de toxicidad aguda por contacto en la abeja), pasadas tres horas las unidades experimentales se alojaron en un ultra congelador a -80°C por 24 horas; posterior se procedió a retirar la cabeza y el tórax obteniendo la muestra para el estudio de las diferentes variables, por medio de distintas técnicas analíticas; la tabla 5, muestra las variables del complejo enzimático y no enzimático evaluadas, junto con su respectivo método analítico.

Tabla 5. Descripción de variables evaluadas y sus métodos de analíticos.

Variable evaluada	Símbolo/ Unidad	Método
Superoxido Dismutasa	SOD (uA/h/g proteína)	Nitroazul tetrazolio adaptado por Granados, 2018.
Catalasa	CAT (mmoles H_2O_2 /g. minuto)	Permanganometría
Peroxidasa	POD (uA/h/g proteína)	Guayacol
Ácido ascórbico	Vit. C (mg/100g)	Folin Ciocalteau
Proteína	P(mg)	Biuret

Fuente: elaboración propia, 2018.

3.6 Diseño experimental

Se utilizó un arreglo bifactorial en un diseño completamente al azar, utilizando como el primer factor los insecticidas y como el segundo factor las cuatro concentraciones de los insecticidas, con doce tratamientos, tres replicas por tratamiento y una unidad experimental por cada replica para un total de 36 unidades experimentales.

Adicionalmente se realizó un tratamiento control con tres replicas en el cual no se aplicó ningún insecticida; la distribución de factores y tratamientos (Figura 17).

Factor A (insecticidas)	Factor B (concentraciones- dosis)	Tratamiento	Replicas
I ₁	DS 1	I ₁ DS 1 : T ₁	R1; R2; R3
	DS 2	I ₁ DS 2 : T ₂	R1; R2; R3
	DS 3	I ₁ DS 3 : T ₃	R1; R2; R3
	DS 4	I ₁ DS 4 : T ₄	R1; R2; R3
I ₂	DS 1	I ₂ DS 1 : T ₅	R1; R2; R3
	DS 2	I ₂ DS 2 : T ₆	R1; R2; R3
	DS 3	I ₂ DS 3 : T ₇	R1; R2; R3
	DS 4	I ₂ DS 4 : T ₈	R1; R2; R3
I ₃	DS 1	I ₃ DS 1 : T ₉	R1; R2; R3
	DS 2	I ₃ DS 2 : T ₁₀	R1; R2; R3
	DS 3	I ₃ DS 3 : T ₁₁	R1; R2; R3
	DS 4	I ₃ DS 4 : T ₁₂	R1; R2; R3
CONTROL	DS 0	DS 0: T ₁₃	R1; R2; R3

Figura 17. Distribución de tratamientos de acuerdo con el diseño estadístico con arreglo bifactorial.

- **Modelo matemático del diseño aplicado**

$$y_{klj} = \mu + \alpha_l + \gamma_j + \xi_{lj} + \epsilon_{klj}$$

y_{klj} : respuesta

μ : media general

α_l : factor A (insecticidas)

γ_j : factor B (dosis)

ξ_{lj} : interacción entre factor A y B.

ϵ_{klj} : error

3.7 Análisis estadístico utilizado

Se hallaron estadígrafos de tendencia central y de dispersión para cada variable evaluada; Así mismo, los datos se sometieron al análisis de varianza de doble vía (MANOVA) con el fin de determinar diferencias estadísticas entre tratamientos, visualizando el factor A (insecticidas), factor B (concentración – dosis) y su interacción; igualmente, se utilizó la comparación múltiple de Medias, mediante el Test Duncan; Los datos fueron evaluados mediante Excel (office 365) e Infostat (2018).

3.8 Procedimientos

Para llevar a cabo el presente estudio se realizaron pruebas piloto, permitiendo estandarizar y adaptar las técnicas analíticas y de manejo; lo que permitió disminuir el error experimental del bioensayo, incrementando la fiabilidad de los datos y resultados obtenidos.

3.8.1 Muestreo en campo

La selección de la colmena se realizó como se explicó anteriormente (Figura 18), una vez seleccionada, se realizó una división para crear un núcleo de abejas de 5 cuadros, de los cuales 3 eran cuadros de cría y 2 cuadros con alimento, con presencia de la reina y en promedio 1,5 kg de abejas obreras en edades mixtas; asegurando que tuvieran una adecuada ventilación y su transporte fuera de fácil manejo, con reservas de alimento para evitar deficiencias energéticas que pudieran influir en la variable respuesta.

El día a realizar el bioensayo, se tapó la piquera a las 5:30 a.m. asegurando que todas las abejas estuvieran en la porta núcleos, trasladándolo a las 7: am. hasta el laboratorio.

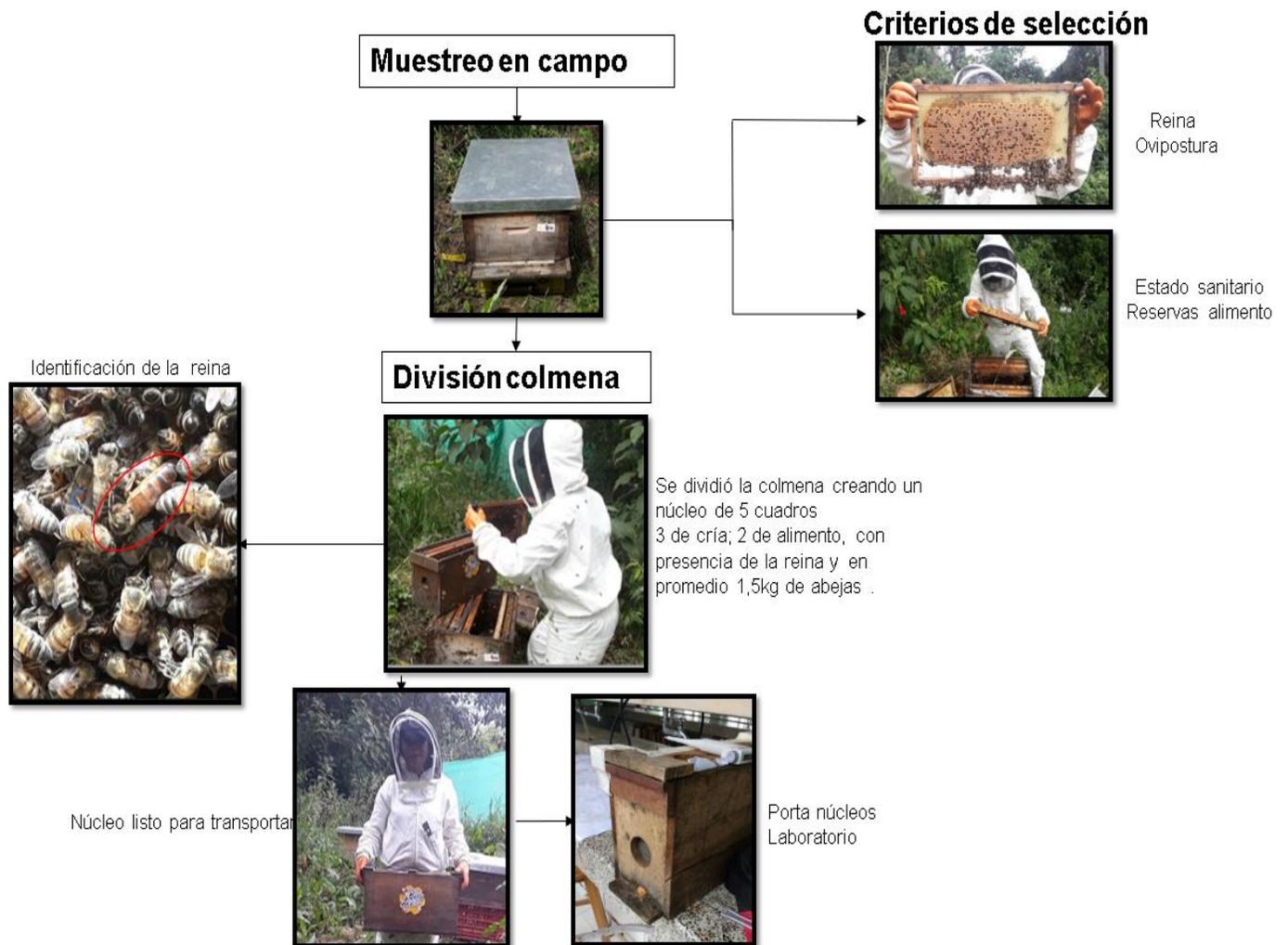


Figura 18. Muestreo en campo, selección y división de colmena, transporte núcleo hasta laboratorio.

3.8.2 Análisis en Laboratorio

- **Confinamiento**

Las *Apis mellifera* fueron colocadas en cajas de Petri plásticas, previamente lavadas y desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5%; las cajas se cubrieron con toldillo blanco fijado por una liga de caucho y silicona líquida, permitiendo una adecuada ventilación, cada caja conto con un recipiente plástico redondo (2x 2cm y 1,5cm alto), para el alimento.

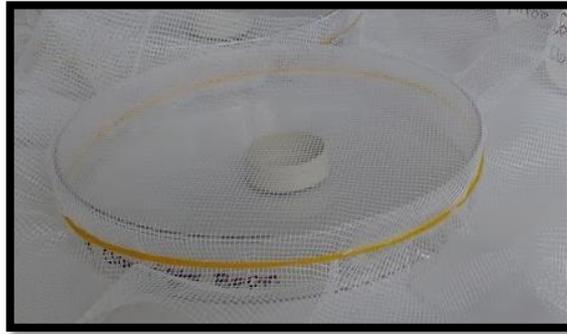


Figura 19. Caja de Petri recubierta con toldillo

- **8.3.2. Preparación alimento**

Se preparó una solución de sacarosa en relación 1:1 P/V, colocando en una plancha de agitación y calentamiento 800mL de agua destilada en un beaker a una temperatura de 45°C, adicionando 800g de sacarosa al 99%, hasta su disolución total.

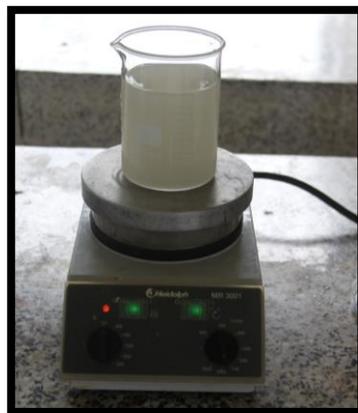


Figura 20. Preparación jarabe sacarosa 1:1.

8.3.3 Diluciones insecticidas

Las diluciones de cada insecticida se prepararon de la siguiente manera:

- **Solución madre insecticida al 0,5%**

Se realizaron cálculos para obtener una concentración de cada insecticida al 0,5% que equivale a 1,25g, los insecticidas utilizados se encontraban en presentación comercial a distintas concentraciones por lo que se realizaron cálculos para determinar cuántos mL de insecticida utilizar para llegar a dicha concentración (Tabla 6).

Tabla 6. Equivalencia insecticida comercial en gramos

Insecticida	Concentración producto comercial g/ L	Equivalencia en mL a 1,25g de ingrediente activo
Imidacloprid	350	3,57
Clorpirifos	480	2,6
Fipronil	200	6,25

Fuente: elaboración propia, 2018.

Una vez calculados los ml de insecticida, en un balón aforado de 250mL se agregó 100mL de agua destilada y los mL según el insecticida a utilizar, se agito hasta disolver completamente y se aforo hasta 250mL y de nuevo se agito, luego se rotulo como “Solución madre (según insecticida correspondiente) al 0,5%”



Figura 21. Solución madre: Imidacloprid, Clorpirifos y Fipronil.

- **Stock insecticida al 0,1%**

Se agregó en un balón aforado de 100mL, 50mL de agua destilada y 20mL de solución madre, se agito hasta disolver y se aforo hasta 100mL, se rotulo como "Stock (según corresponda insecticida) al 0,1%", que equivale a 1000 ppm de insecticida.



Figura 22. Solución Stock insecticidas Imidacloprid, Clorpirifos, Fipronil.

▪ Dosificaciones (Stándares)

Para las dosificaciones de cada insecticida se utilizaron dosis subletales tomando como referencia DL50, reportadas por artículos científicos; Se calculó los micro litros adicionar de la solución stock, para preparar las soluciones de acuerdo a su concentración (Tablas 7, 8, 9).

Tabla 7. Dosificación estándar Imidacloprid

Tratamiento	Dosis (ng/abeja)	[] insecticida (ng/μL)	[] insecticida (ppm)	μL stock	Agua destilada
T1	10	2	2	100	
T2	20	4	4	200	Aforar hasta
T3	40	8	8	400	50ml
T4	80	16	16	800	

ng/ μl: nanogramo por microlitro de solución; ppm: partes por millón; μl stock: microlitro solución stock. Fuente: elaboración propia, 2018.

Tabla 8. Dosificación estándar Clorpirifos

Tratamiento	Dosis (ng/abeja)	[] insecticida (ng/μL)	[] insecticida (ppm)	μL stock	Agua destilada
T1	20	4	4	200 μL	
T2	40	8	8	400 μL	Aforar hasta
T3	80	16	16	800 μL	50ml
T4	160	32	32	1600 μL	

ng/ μl: nanogramo por microlitro de solución; ppm: partes por millón; μl stock: microlitro solución stock. Fuente: elaboración propia, 2018.

Tabla 9. Dosificación estándar Fipronil

Tratamiento	Dosis (ng/abeja)	[] insecticida (ng/ μ L)	[] insecticida (ppm)	μ L stock	Agua destilada
T1	0,5	0,1	0,1	5	
T2	1	0,2	0,2	10	Aforar hasta
T3	2	0,4	0,4	20	50ml
T4	4	0,8	0,8	40	

ng/ μ l: nanogramo por microlitro de solución; ppm: partes por millón; μ l stock: microlitro solución stock. Fuente: elaboración propia, 2018.

Una vez obtenidos los cálculos se agregó 30mL de agua destilada en un balón aforado de 50mL, se adiciono los μ L de la solución stock correspondiente, se agito 30 segundos y se aforo hasta 50 mL, rotulando como “Solución estándar del insecticida a la concentración en ppm correspondiente”.



Figura 23. Soluciones estándar, **a.** soluciones standar imidacloprid; **b.** soluciones estandar clorpirifos; **c.** soluciones estándar fipronil.

8.4 Inducción estrés oxidativo

Para la inducción del estrés oxidativo se siguió la guía de la agencia de protección ambiental (EPA) OCSPP 850.3020 (Prueba de toxicidad aguda por contacto en la abeja), con algunas modificaciones, donde las abejas no fueron sometidas a temperaturas inferiores a 4°C, ni a la exposición de gas carbónico para su manejo; introduciéndolas directamente del portanúcleo a la caja de Petri por medio de una manguera de polietileno transparente con diferentes agujeros para introducir la micropipeta y tabletas de plástico que regulaban la entrada y la salida de las abejas en la manguera, durante el paso se dosificó cada abeja con 5 μ L de solución de insecticida en el

tórax; las abejas se mantuvieron en las cajas de Petri con alimento ad libitum durante el periodo de exposición que fue de 3 horas.

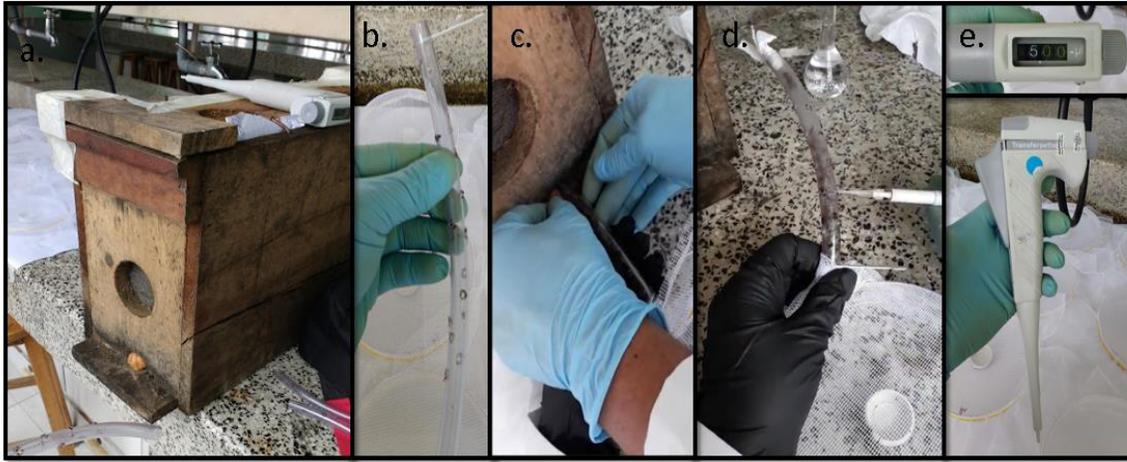


Figura 24. Inducción estrés oxidativo, **a.** Portanúcleo con material biológico para los bioensayos; **b.** Manguera de polietileno transparente con diferentes agujeros; **c.** Paso de abejas del portanúcleo a la manguera; **d.** Dosificación insecticidas y transpaso a cajas de petri; **e.** Micropipeta.

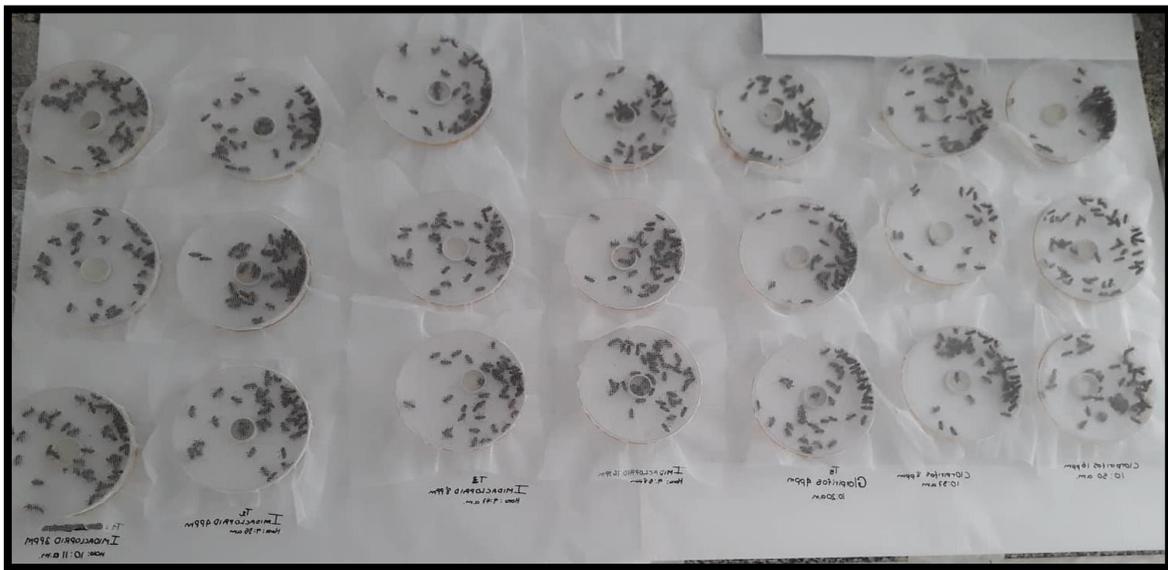


Figura 25. Montaje bioensayo por contacto.

8.5.1. Conservación del material biológico

Transcurridas las 3 horas de la exposición a los insecticidas, las abejas empezaron a disminuir su actividad y se conservaron las muestras en bolsas resellables, guardadas en un ultracongelador a -80°C , para posteriores pruebas.



Figura 26. Conservación de las muestras para estudios posteriores.

8.5.2. Obtención muestra para el estudio enzimático

Pasadas las 24 horas, se procedió a retirar la cabeza y el tórax de cada abeja, desechando el abdomen, evitando error experimental, por el contenido enzimático que puede presentarse en esta parte, por la asimilación del alimento (Mancini, 2010), además los insecticidas en estudio afectan el sistema nervioso de la abeja; una vez obtenida la muestra real para el estudio

enzimático se procedió a pesar en balanza analítica y distribuir la cantidad de muestra obtenida entre las variables a evaluar.

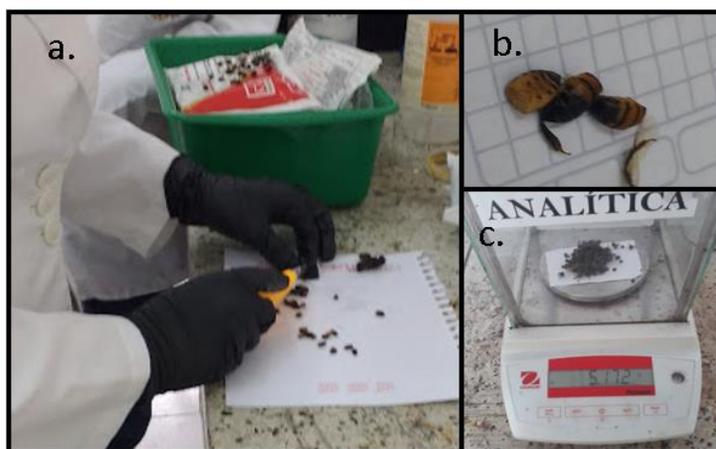


Figura 27. Obtención muestras para estudio enzimático, **a.** Corte cabeza y tórax abejas; **b.** abdomen abejas; **c.** peso muestra real para evaluación enzimática.

8.6. Extracción enzimática

Para la extracción enzimática se realizó un homogenizado mecánico de 3 gramos de la muestra en un mortero con 15mL de acetona durante 5 minutos, luego se filtró el macerado y se adiciono otros 15mL de acetona, se desechó el filtrado y se colocó el macerado en un vaso de precipitado agregando 15mL de buffer fosfato pH 7,0, se agito por dos minutos, luego se filtró en tubos de ensayo que se encontraban en baño de hielo, y se almacenaron a -2°C para posteriores estudios; los reactivos utilizados estaban a 3°C .



Figura 28. Extracción enzimática de las muestras

8.7. Determinación superóxido Dismutasa (SOD)

Procedimiento:

Se preparó tetrazolio a una concentración 0,019 mM, en 50 ml en agua destilada, agregando 1 gota de azul de bromofenol por cada 5 mL de tetrazolio; luego se preparó las siguientes mezclas en partes iguales:

- Tetrazolio + EDTA
- Hidroxilamida + Carbonato de calcio

Posteriormente en un tubo de ensayo se depositaron 100 μ l de extracto enzimático y para el blanco 100 μ l de agua destilada, 1,750 μ l de la mezcla Tetrazolio + EDTA y por último se adicionaron 2,750 μ l de la mezcla Hidroxilamina + Carbonato de Calcio, se realizó todo por triplicado, y se leyó a 560 nm, durante cuatro horas en intervalos de 10 a 15 minutos.

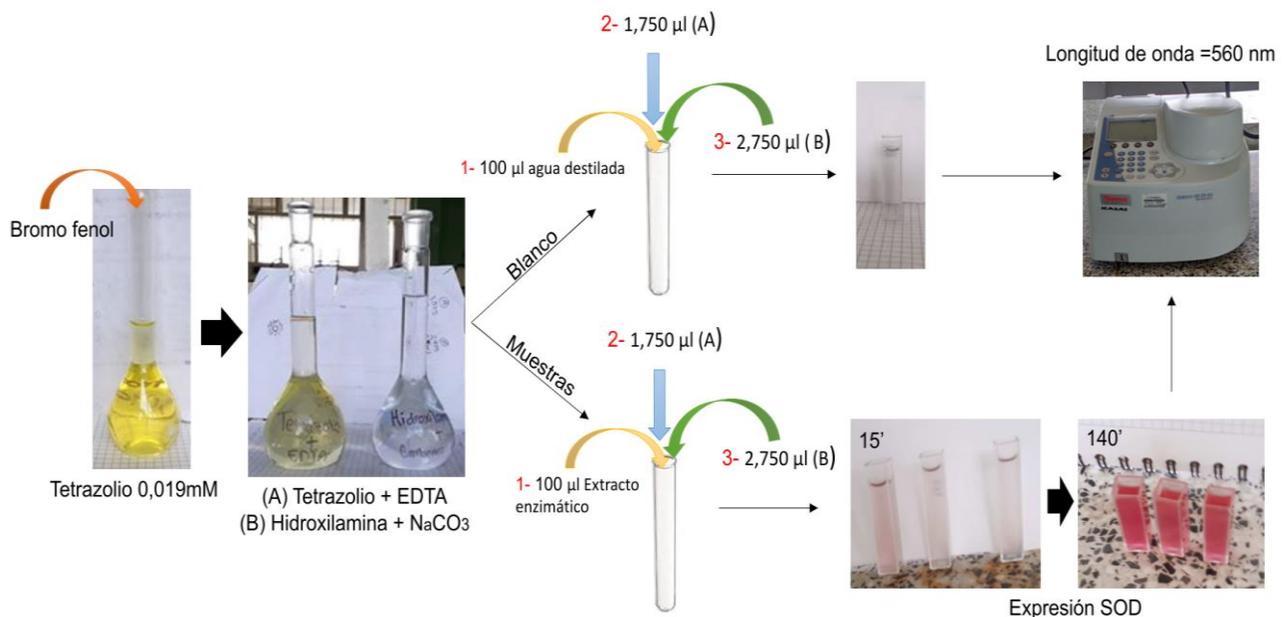


Figura 29. Determinación de la superóxido dismutasa por espectrofotometría.

8.8. Determinación peroxidasa

Procedimiento:

En un tubo de ensayo se agregó 1 mL de buffer fosfato pH 6,0, 2 mL de Guayacol 0,040 M en H₂O₂ 0,05 y 1 mL de extracto enzimático, se agito por 30 segundos y se reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 470nm, tomando lectura cada minuto, durante 1 hora, se realizó el ensayo por triplicado, cabe resaltar que los reactivos utilizados estaban a una temperatura de 3°C.

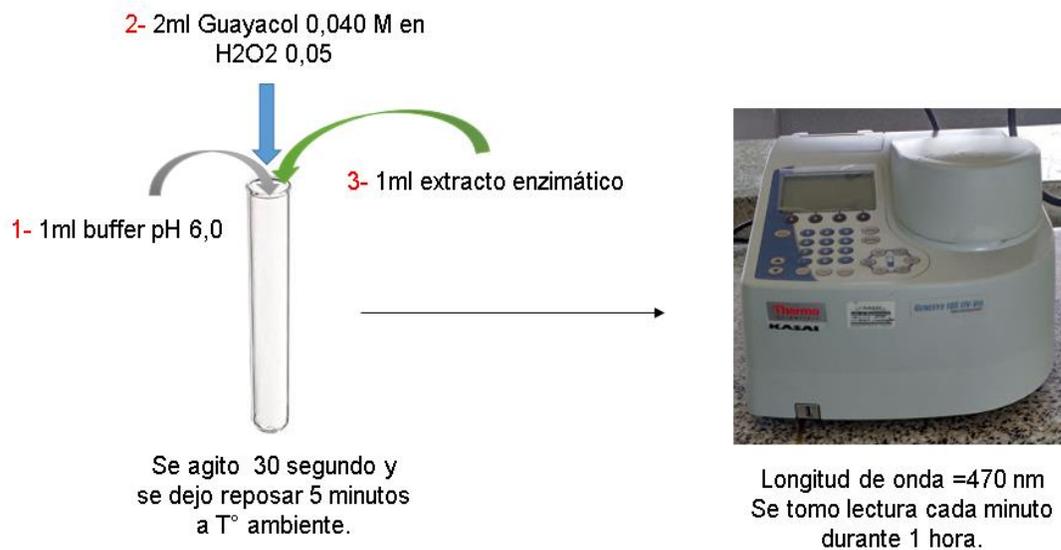


Figura 30. Determinación actividad peroxidasa

8.7. Determinación actividad Catalasa (CAT)

Procedimiento

Para las muestras experimentales se adicionaron en un tubo de ensayo 1,0 mL de H₂O₂ 0,05M; 5ml de Buffer fosfato pH 7,0; 1ml de extracto enzimático; se incubo en baño de hielo a 2°C, durante cinco minutos, pasado el tiempo se adiciono 1mL de H₂SO₄ 2N, se agitaron los tubos

durante 20 segundos, titulando con KMnO_4 0,001, hasta aparecer un color rosado pálido y permanecer por 30 segundos (figura 31)

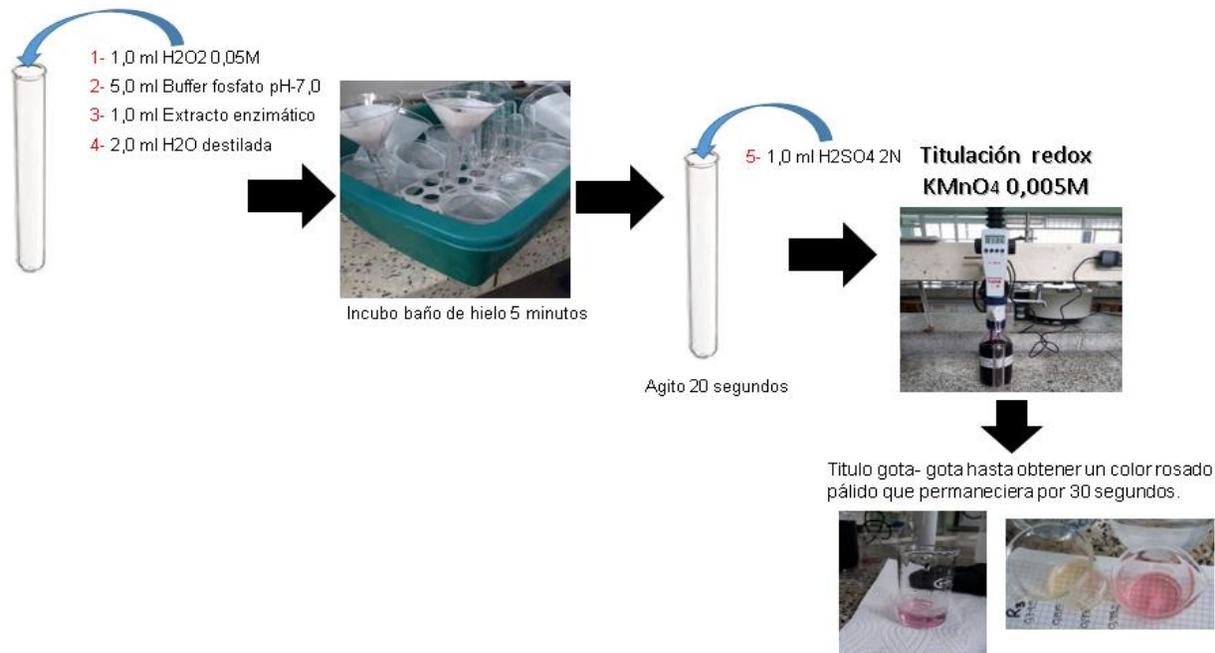


Figura 31. Determinación de la actividad de la catalasa por el método permanganométrico.

8.8. Determinación ácido ascórbico

Procedimiento

Se pesaron 2 gramos de muestra y se homogenizaron mecánicamente en un mortero con 3,33ml de ácido oxálico durante cinco minutos, una vez obtenido el homogenizado, se centrifugo a 6.000 rpm durante una hora, luego en un tubo de ensayo se agregó 0,8ml de sobrenadante de la muestra, 1,8ml de agua bidestilada y por ultimo 0,4ml de Folin Ciocalteau, se agito durante 20 segundos y se dejó reposar 10 minutos, para la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm.

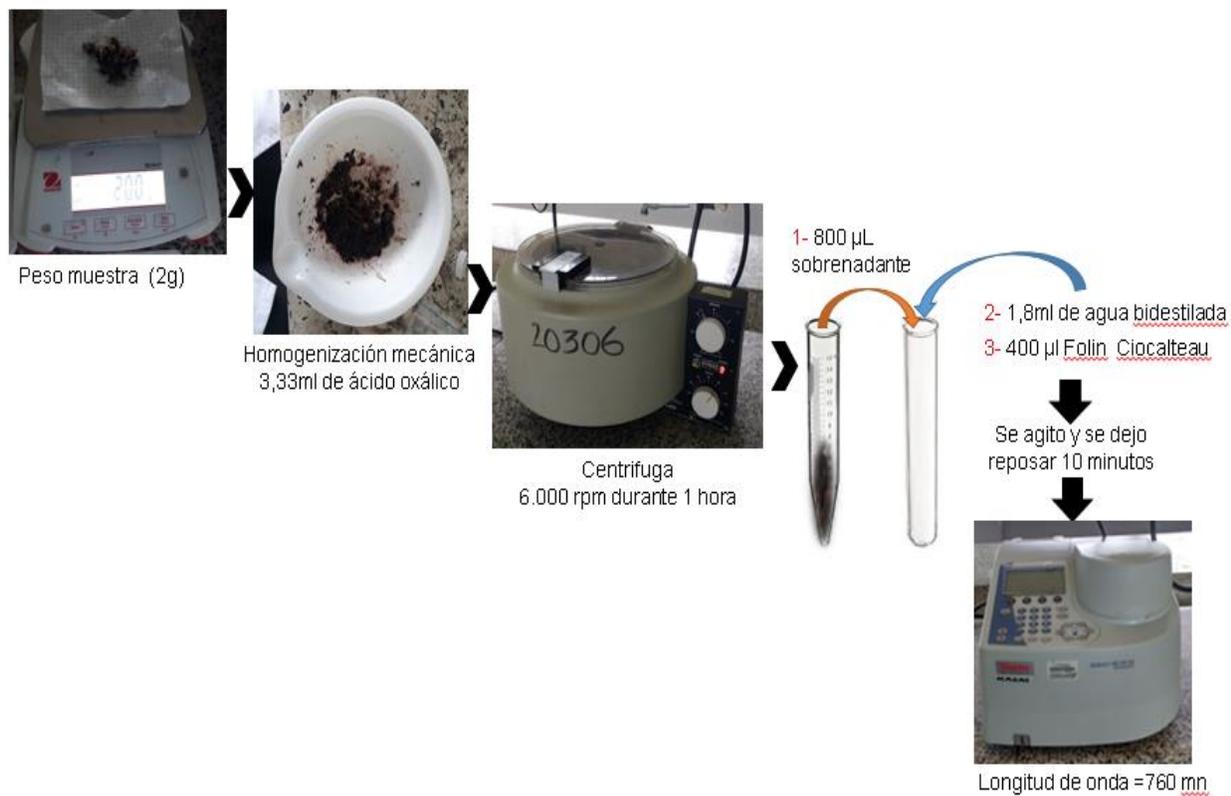


Figura 32. Determinación ácido ascórbico por método de folin ciocalteau.

8.8. Determinación proteína

Procedimiento:

En un tubo de ensayo se agregó 1ml de buffer fosfato pH 7,0 a una temperatura de 3°C, 1 ml de extracto enzimático y 3ml de biuret, se agito durante 30 segundos y se incubo a baño maría a 37°C durante 5 minutos, se dejó enfriar y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540nm.

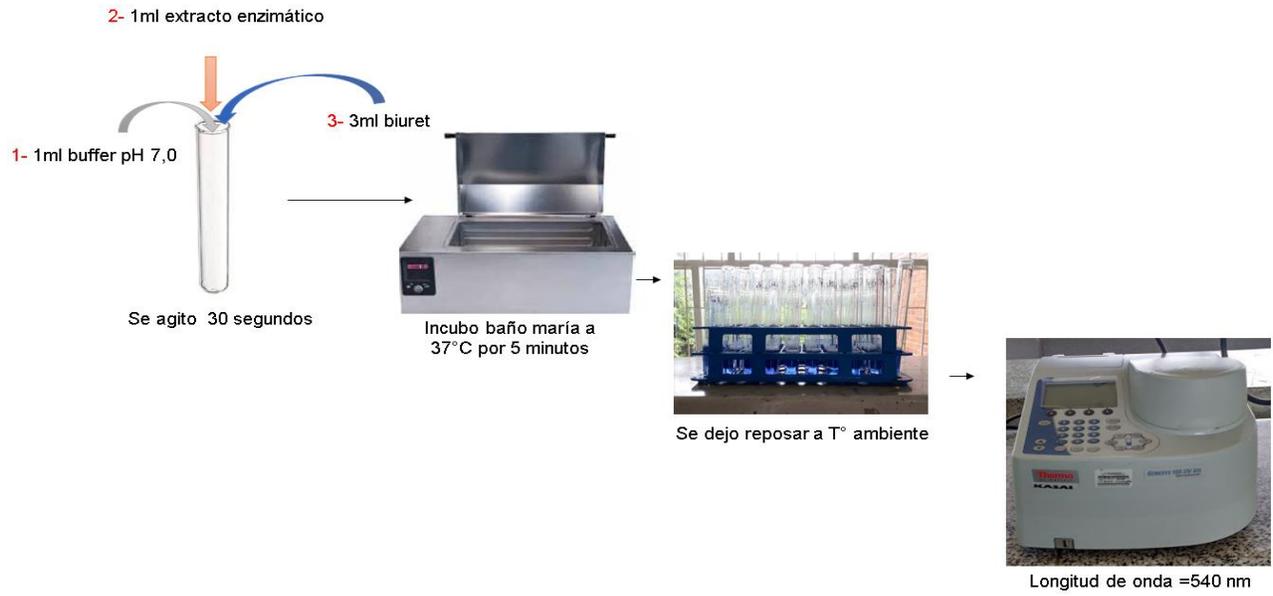


Figura 33. Determinación de la proteína por método biuret.

4. Resultados y Discusión

4.1 Resumen estadístico de las variables evaluadas

Tabla 10. Valores promedios y significancia estadística por ANAVA doble vía.

Insecticidas	Dosis	Indicadores Bioquímicos				
		SOD ($\mu\text{A/g/h}$)	POD ($\mu\text{A/g/h}$)	CAT (mmoles $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/g}$)	AA mg/100g	P (mg)
	Estándar	18,642 \pm 3,287	4,936 \pm 1,719	0,339 \pm 0,055	7,5834 \pm 0,330	6,348
Imidacloprid	Ds 1	27,604 \pm 4,196	3,925 \pm 0,233	0,217 \pm 0,007	5,7110 \pm 1,197	5,042
	Ds 2	47,077 \pm 1,148	8,669 \pm 1,123	0,166 \pm 0,055	6,3508 \pm 1,487	5,226
	Ds 3	48,996 \pm 5,507	3,177 \pm 1,058	0,315 \pm 0,041	7,1290 \pm 0,674	5,314
	Ds 4	49,322 \pm 4,296	10,109 \pm 0,105	0,389 \pm 0,063	6,6903 \pm 1,019	5,655
Clorpirifos	Ds 1	33,893 \pm 3,140	7,117 \pm 2,153	0,420 \pm 0,031	6,0844 \pm 1,398	7,285
	Ds 2	40,159 \pm 1,289	8,158 \pm 1,595	0,420 \pm 0,057	5,0973 \pm 0,593	6,418
	Ds 3	43,914 \pm 4,138	8,298 \pm 1,330	0,457 \pm 0,092	7,2256 \pm 0,838	7,031
	Ds 4	13,30 \pm 2,434	7,384 \pm 1,088	0,457 \pm 0,080	5,9304 \pm 1,272	6,803
Fipronil	Ds 1	32,092 \pm 6,721	14,785 \pm 2,693	0,331 \pm 0,035	6,1184 \pm 0,748	6,426
	Ds 2	57,586 \pm 2,219	30,544 \pm 2,206	0,373 \pm 0,099	5,7606 \pm 1,373	4,683
	Ds 3	46,161 \pm 5,491	21,431 \pm 0,975	0,158 \pm 0,033	7,2753 \pm 0,578	6,637
	Ds 4	33,191 \pm 2,790	28,211 \pm 1,541	0,146 \pm 0,058	7,0768 \pm 0,330	6,728
A(insecticidas)	Fc	40,61**	598,00**	90,94**	0,83 NS	0,65 NS
B(dosis)	Fc	171,14**	112,30**	1,53 NS	7,58**	-
AxB	Fc	29,99**	64,68**	27,68**	0,60 NS	-

Ds 1: dosis subletal 1; Ds 2: dosis subletal 2; Ds 3: dosis subletal 3; Ds 4: dosis subletal 4, las concentraciones de las dosis se explicaron anteriormente; SOD: Superóxido dismutasa; POD: Peroxidasa; $\mu\text{A/g/h}$: unidades de absorbancia/hora/gramo proteína; CAT: Catalasa; mmoles $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/g}$: milimoles de

peróxido de hidrogeno/ minuto/gramo proteína; AA: ácido ascórbico; P: proteína; Significancia estadística: **P< 0,01; NS: P>0,05

La tabla anterior, resume los resultados obtenidos en el análisis estadístico de las variables estudiadas; presentando diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0,01$), para SOD y POD, entre insecticidas, dosis y su interacción; mientras CAT, solo obtuvo diferencias estadísticas para insecticidas y su interacción, no obteniendo significancia estadística para dosis; esto puede deberse, al entrar contacto la célula con xenobióticos como los pesticidas objetos de este estudio, conduce a un desbalance en su homeostasis fisiológica, como resultado de la desintoxicación celular o generación de energía compensatoria (Li-Biyarlay et al, 2016), produciendo ROS, que debido a su poder permanganético, se tornan inestables y altamente reactivas con capacidad para combinarse inespecíficamente, con las diferentes moléculas que integran la estructura celular (Viada, Gómez y Campaña, 2017), desencadenando un incremento en la expresión enzimática del mecanismo de defensa antioxidante, que dependiendo de su capacidad redox, puede estabilizar la célula o producir apoptosis a una oxidación moderada y necrosis a una oxidación alta (Corrales y Muñoz, 2012). Se destaca el incremento de la superóxido dismutasa en todos los tratamientos incluyendo el testigo con variaciones según el insecticida y la dosis, por ser el primer mecanismo de barrera enzimática contra el estrés oxidativo, de acuerdo con Jida et al, 2017.

El ácido ascórbico no presentó diferencias estadísticas por efecto de los insecticidas y su interacción, mientras para el efecto dosis, si se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,001$), explicándose su variación a través de su funcionamiento como la segunda barrera antioxidante, actuando en equipo con el mecanismo enzimático antioxidante, en la estabilización de la célula, donde en el incremento de la concentración de la dosis, su acción antioxidante puede variar (Corrales & Muñoz, 2012).

La proteína, no presentó efectos estadísticos significativos ($p > 0,05$), lo cual concuerda con lo descrito por Christen y Karfl, 2016, como un indicador de la fiabilidad de los datos, teniendo en cuenta que la actividad enzimática se define en base a la concentración de proteína en las muestras.

4.2 Actividad de las reacciones bioquímicas enzimáticas

4.2.1 Superóxido Dismutasa

La actividad enzimática de la superóxido dismutasa, se aprecia en la figura 34, con variación estadística altamente significativa entre los tratamientos ($p < 0,01$), variando su actividad desde 13,30 uA-h-g del tratamiento clorpirifos 160 ppm, con la actividad más baja del bioensayo, hasta 57,59 uA-h-g, con la actividad más alta correspondiente al tratamiento con fipronil 1ppm; mostrando un comportamiento diferente para cada insecticida, evidenciando que en el imidacloprid, al incremento de la dosis, aumento de la actividad enzimática (Figura 34). En clorpirifos la actividad aumento gradualmente hasta la tercera dosis y en la cuarta descendió por debajo de la primera dosis y el grupo testigo; para el fipronil se evidencio, que la primera dosis se comportó similar al testigo, aumentando su actividad con la segunda dosis de 1 ppm, siendo la más alta de todo el bioensayo, disminuyendo su actividad en las dos siguientes.

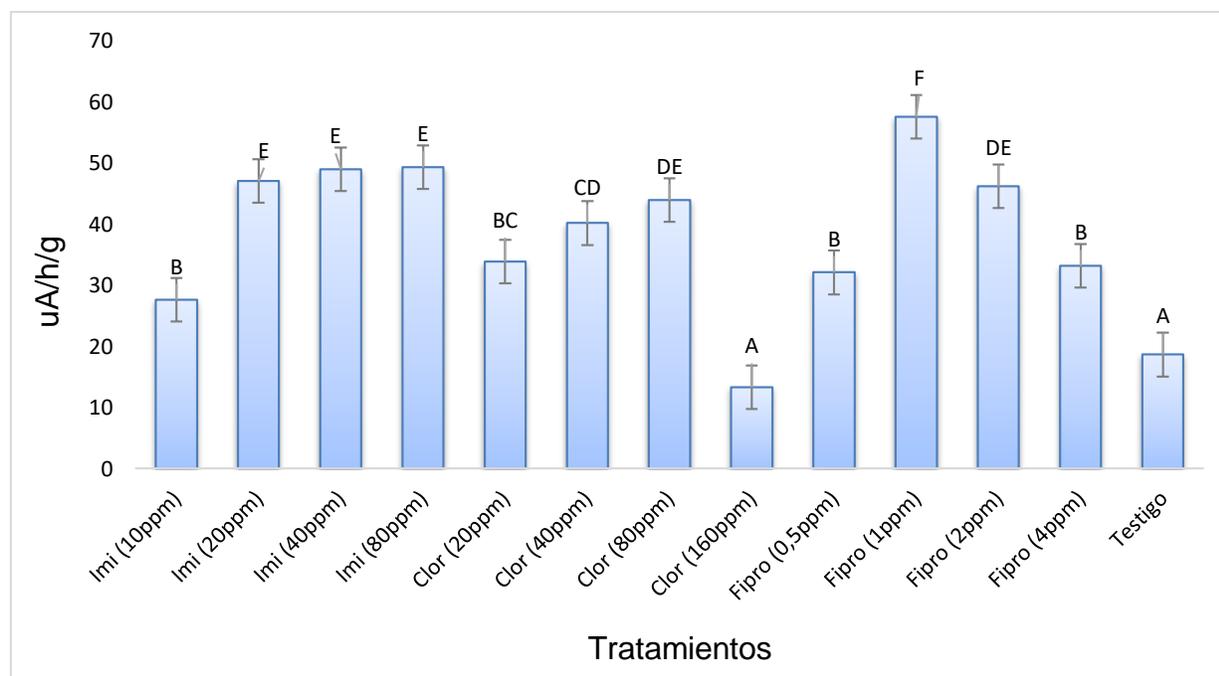


Figura 34. Actividad de la Superóxido Dismutasa en extracto enzimático de cabeza y tórax de *Apis mellifera* bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil; medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,01$).

La figura anterior evidencia la expresión de la SOD, sin importar el tratamiento, debido que es considerada como el primer mecanismo de acción antioxidante enzimática que se activa, en las células eucariotas, las cuales se encuentran constantemente en presencia de oxígeno para su

funcionamiento, destinando alrededor del 4 a 5% de electrones transportados por la cadena respiratoria de la mitocondria a la producción del anión superóxido ($O_2\bullet$) (Gómez y Cuevas, 2007), siendo una de las primeras especies reactivas generadas por diversos sistemas celulares. (Lewandowski, Kepinska, Milnerowicz, 2018), por lo que son susceptibles a sufrir estrés oxidativo, al entrar en contacto con xenobióticos, como los pesticidas, (Jia et al, 2017).

4.2.2 Peroxidasa

Se presentó variación estadística de la peroxidasa altamente significativa ($p < 0,01$) entre los tratamientos, mostrando un comportamiento individual por insecticida, evidenciando en el imidacloprid una variación en la actividad a medida que incrementó la concentración, no presentando diferencias estadísticas entre la primer y tercera dosis y el testigo; en el clorpirifos su actividad vario muy poco, manteniéndose estable en todos los tratamientos; El fipronil, incremento su actividad notoriamente hasta la segunda dosis, siendo la más alta para el bioensayo, descendiendo a partir de esta, encontrándose diferencias estadísticas entre los tratamientos de este pesticida y los demás del bioensayo.

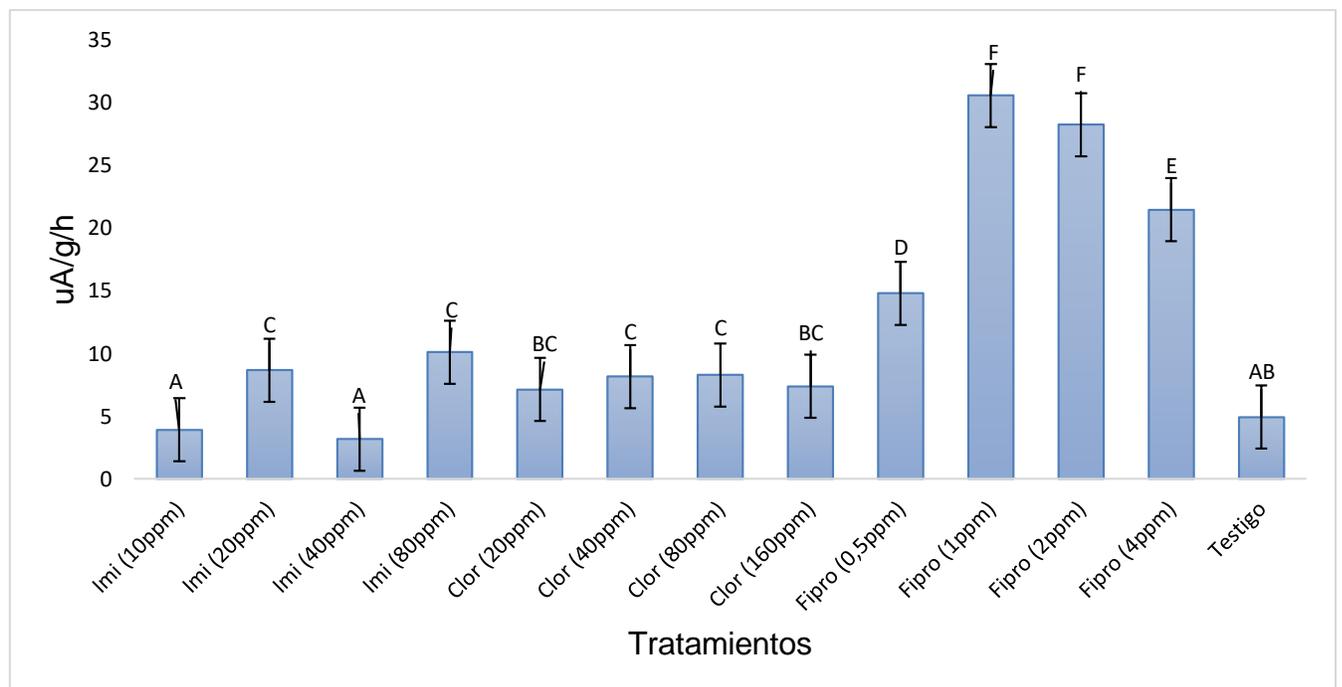


Figura 35. Actividad de la Peroxidasa en extracto enzimático de cabeza y tórax de *Apis mellifera* bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil; medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,01$).

En la figura anterior se evidencia el comportamiento de la peroxidasa bajo el efecto de los insecticidas de estudio, observando una variación dependiente del insecticida y la dosis, siendo el fipronil, el insecticida que mostro una mayor actividad enzimática, traduciéndose en una mayor defensa antioxidante por parte de la célula, debido que el fipronil por su estructura química, al entrar en contacto con el organismo se originan metabolitos, que causan toxicidad en diferentes modelos celulares, siendo la mitocondria una de la más afectada, abriendo paso a la producción de ROS (Tavares et al, 2015).

Otro estudio comprobó mediante el aislamiento del gen de la peroxidasa tioredoxina en *Apis cerana cerana*, el cual se encuentra a nivel mitocondrial, que juega un papel importante en la eliminación de peróxido de hidrogeno y manteniendo el estado redox en la célula, es eficaz contra el daño oxidativo en insectos (Yao et al, 2013).

4.2.3 Catalasa

La actividad de catalasa se muestra en la figura 36, con variación estadística significativa entre los tratamientos ($p < 0,01$), variando desde $0,146 \pm 0,058$ mmol/h/g del tratamiento con fipronil de 4ppm, que presento la actividad más baja hasta $0,457 \pm 0,092$ mmol/h/g, que fue la actividad más alta con clorpirifos 160ppm; mostrando el siguiente comportamiento: Clor (160 ppm) > Clor (80 ppm) > Clor (40 ppm) > Clor (20 ppm) > Imi (80ppm) > Fipro (1 ppm) > Testigo > Fipro (0,5ppm) > Imi (40 ppm) > Imi (10ppm) > Fipro (2 ppm) > Fipro (4 ppm); se puede observar que la actividad varía de acuerdo al insecticida, mostrando el Imidacloprid y clorpirifos un incremento, a medida del aumento de la concentración de la dosis del insecticida, ocurriendo lo contrario para el fipronil, ya que a medida que se aumentó la dosis, la actividad enzimática disminuyo gradualmente, mostrando la menor actividad de todo el bioensayo, esto concuerda con lo reportado por Hayat et al, 2018, quien realizó un muestreo en dos géneros de *Apis mellifera*, en cultivos comerciales, determinando que las mínimas dosis de insecticidas inducen a cambios en la expresión de esta enzima, sirviendo como un sistema de alerta desencadenado por la exposición de insecticidas y otros xenobióticos.

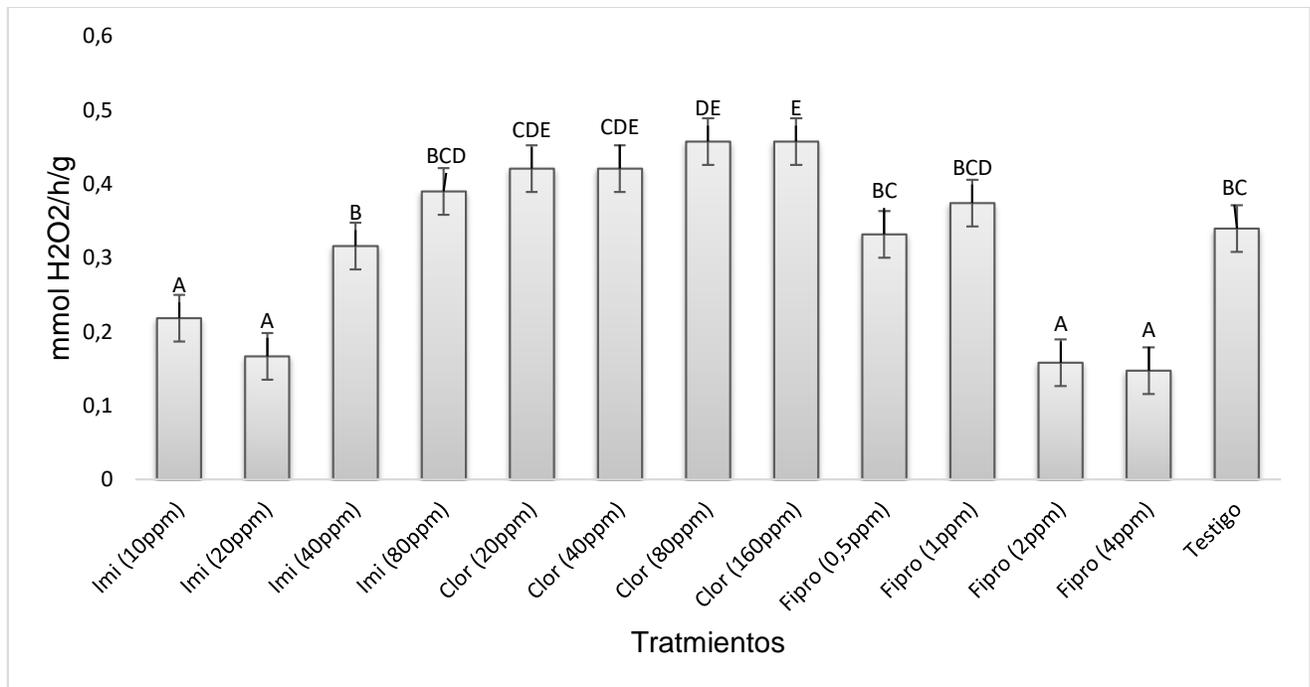


Figura 36. Actividad de la Catalasa en extracto enzimático de cabeza y tórax de *Apis mellifera* bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil; medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,01$).

4.3 Cinética enzimática

4.3.1 Relación velocidad contra el tiempo

Inicialmente para observar la velocidad de reacción, se llevó a cabo mediante el método integral, siendo el más confiable para estimar constantes cinéticas y ordenes de reacción a partir de datos experimentales; se graficó velocidad contra tiempo, según los resultados de la integración obtenida, en cero, primer y segundo orden cinético; permitiendo concluir específicamente la relación del mecanismo de reacción, seleccionando el orden al que mejor se ajustó la enzima, mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

- Superóxido Dismutasa

En las Figuras 37, 38 y 39, se aprecia, el comportamiento de la SOD por insecticida y el testigo, permitiendo visualizar el comportamiento de la enzima, la cual presentó un mayor ajuste de la cinética de orden cero, indicando que la formación del producto es independiente de la concentración del sustrato.

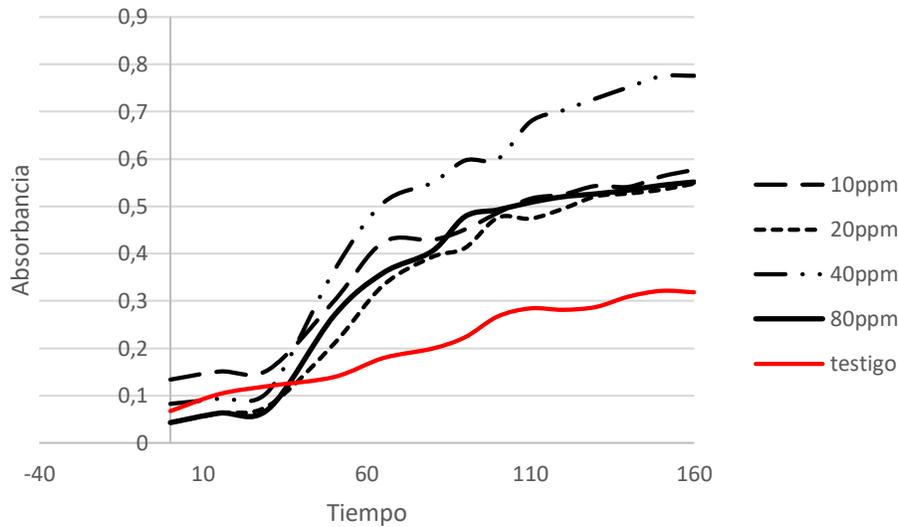


Figura 37. Actividad enzimática vs tiempo. Comportamiento de la SOD en función de las diferentes concentraciones del insecticida Imidacloprid y el tiempo.

En la anterior figura, se observa el aumento de la actividad gradual de la SOD, a medida del incremento la concentración del insecticida imidacloprid, mostrando que las dosis utilizadas en este estudio no afectaron el sitio activo de la enzima, permitiendo una respuesta satisfactoria de la defensa antioxidante, teniendo alta capacidad antioxidante.

Estos resultados difieren con lo reportado por Jia et al,2017, donde se expuso un grupo de abejas *Apis cerana*, a diferentes insecticidas, entre ellos el Imidacloprid con una concentración 10 μ M, midiendo su actividad a las 12 horas y 36 horas, notando que la actividad enzimática se mantenía constante ($p>0,05$).

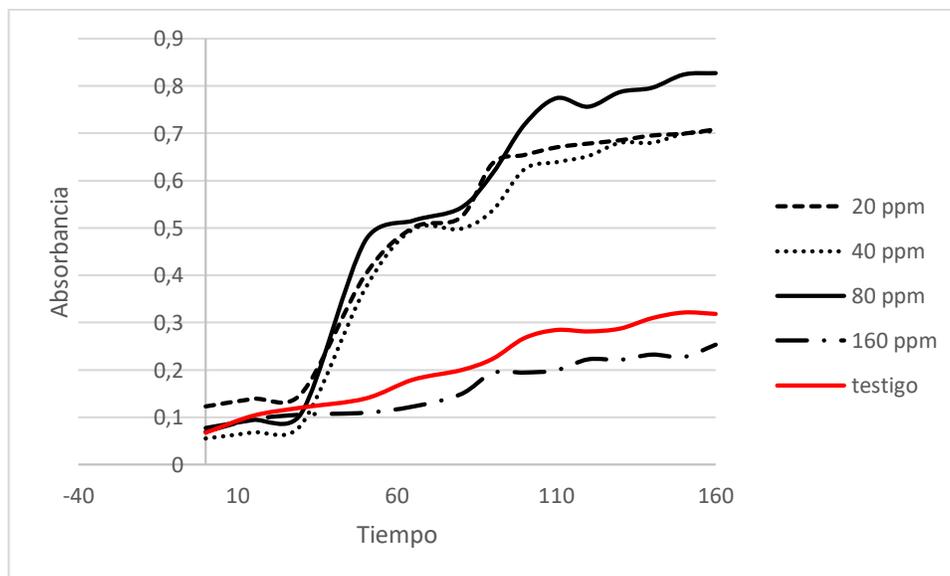


Figura 38. Actividad enzimática vs tiempo. Comportamiento de la SOD en función de la concentración del insecticida clorpirifos y el tiempo.

La actividad enzimática, para tratamientos con clorpirifos, se comportó de igual manera que el Imidacloprid hasta la tercera dosis, incrementando su actividad acorde al aumento de la concentración, mostrando una respuesta satisfactoria al contacto con el insecticida; ocurriendo lo contrario en la cuarta dosis de 160ppm, donde, la actividad de la enzima disminuyó notablemente respecto a las otras dosis y el testigo del bioensayo, pudiendo inferir que el insecticida a esta concentración afectó el sitio activo, desnaturalizando la enzima, haciéndola perder su capacidad antioxidante.

Este comportamiento se puede explicar, debido que la SOD presenta en su sitio activo en dos de las tres isoformas, que se encuentran a nivel mitocondrial y extracelular (Gómez, 2008), Cu- Zn, y la exposición a diferentes estresores ambientales conducen a la inhibición de la enzima, por la quelación de este ion, desplegando la estructura de la enzima, que afecta los residuos vitales para el mantenimiento de su actividad (Lewandowski, Kepinska, Milnerowicz, 2018), concordando con el aumento de la hidrólisis del insecticida clorpirifos, en presencia de cobre y otros metales, tiende a formar quelatos (Bayer, 2013) pudiendo inferir que a partir de 160 ppm del ingrediente activo clorpirifos, se produce quelación del sitio activo de la enzima, inhibiéndola, dejando al organismo sin defensa contra el daño de ROS, que puede desencadenar una cascada catalítica en la célula (Li- Biyarlay, 2016).

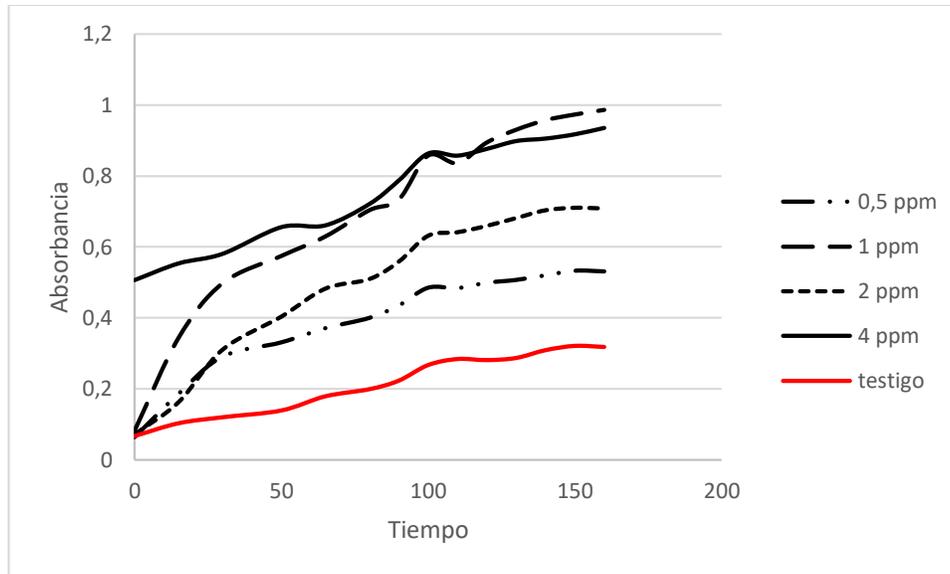


Figura 39. Actividad enzimática vs tiempo. Comportamiento de la SOD en función de la concentración del insecticida fipronil y el tiempo a temperatura ambiente.

La actividad de la SOD para el tratamiento con el fipronil, mostro un comportamiento inhibitorio a partir de la segunda dosis, descendiendo la actividad a medida que incrementaba la concentración, relacionándolo según lo reportado por Wang et al. 2016, con varios estudios in vitro e in vivo con fipronil, que la generación de ROS inducida por este insecticida es dependiente al incremento de la dosis del mismo; siendo la mitocondria un objetivo importante del fipronil, relacionando el estrés oxidativo con la toxicidad inducida por la formación de diferentes metabolitos en el organismo; además, lo reportando por Roat et al, 2012, afirma que las abejas africanizadas al contacto con el fipronil, presentaron una DL50 tópica de 1,6ng, en comparación con razas europeas las cuales han sido reportadas por (Tingle et al. 2003) DL50 de 13 ng / *A. mellifera* (subespecie europea) y 6.2 ng / abeja (Decourtye et al. 2002) para *Apis Lingüística*, sugiriendo que la abeja africanizada parece mostrar más sensibilidad al fipronil que las razas europeas.

- Peroxidasa

Se observó el comportamiento de la enzima peroxidasa en función de la concentración de los insecticidas y el tiempo, ajustándose al primer orden, indicando que su velocidad de reacción depende de la concentración de un único sustrato, por lo que variaciones en la concentración de las dosis de los insecticidas afecta directamente su velocidad de reacción (Figura 40).

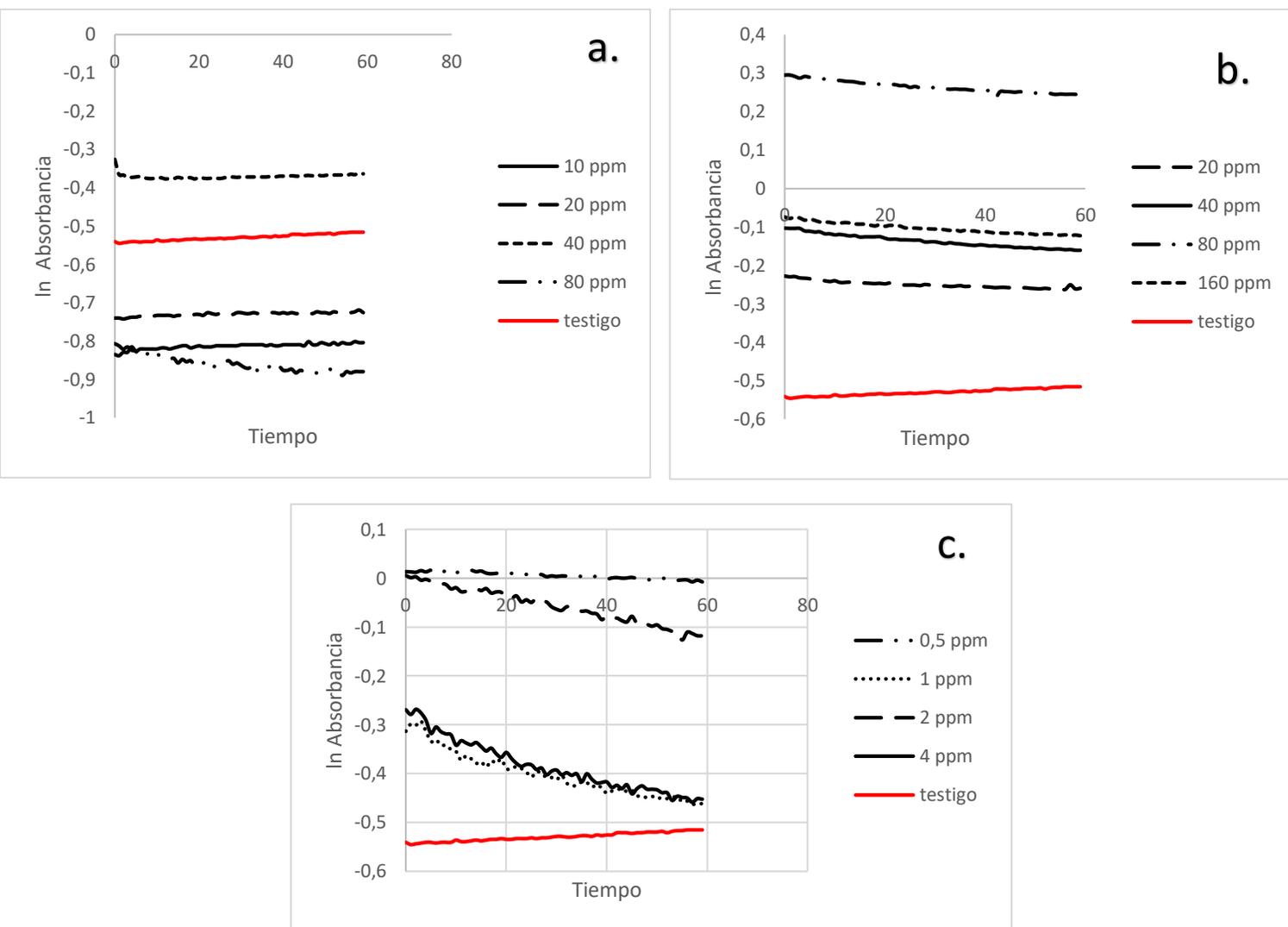


Figura 40. Actividad enzimática vs tiempo, Comportamiento de la POD en función de la concentración de los insecticidas: **a.** Imidacloprid; **b.** Clorpirifos; **c.** fipronil y el tiempo.

En general, la actividad de la enzima peroxidasa en los diferentes insecticidas, mostro un comportamiento que vario dependiendo la concentración de la dosis, explicándose por ser una cinética de primer orden, en donde su velocidad de reacción depende únicamente de un sustrato (Yao et al, 2013). En dicho estudio se indica que esta enzima posee alta especificidad por el sustrato H_2O_2 , incrementando su actividad como respuesta a un estresor medioambiental, que al entrar en contacto con la célula y más exactamente con la mitocondria producen ROS, en este caso en particular peróxido de hidrogeno, activándose como una defensa antioxidante que busca estabilizar la célula, para un correcto funcionamiento.

4.3.2 Cinética Michaelis – Menten

La grafica velocidad en $\mu\text{A/g/h}$ contra concentración en ppm, dadas por las dosis subletales establecidas anteriormente, para SOD y POD; Catalasa, la velocidad se graficó en $\text{mmoles de H}_2\text{O}_2/\text{min/g}$ contra concentración, para establecer la relación con la cinética de Michaelis – Menten (Figuras 41, 42 y 43).

- Superóxido dismutasa

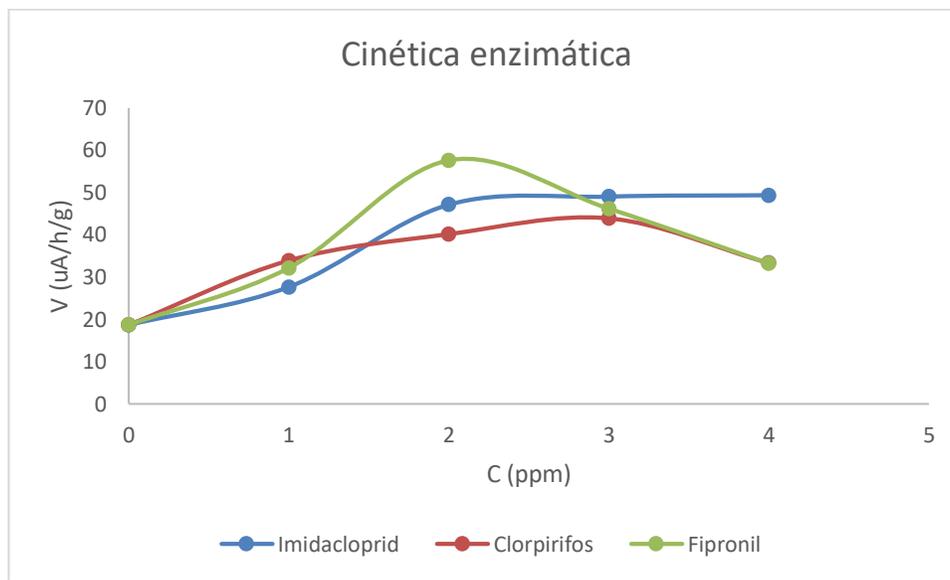


Figura 41. Cinética de Michaelis – Menten, para la SOD en extracto enzimático de cabeza y tórax de *Apis mellifera*, bajo el efecto de insecticida imidacloprid, clorpirifos y fipronil.

La curva de cinética para el imidacloprid, fue la que más se ajustó al modelo de Michaelis – Menten, dando como resultado una asíntota, donde inicialmente presenta una velocidad de reacción lineal, que se estabiliza con el incremento de la concentración de sustrato; la actividad enzimática bajo el efecto de clorpirifos, se mostró estable hasta la tercera dosis, descendiendo su actividad en la cuarta dosis; la actividad para los tratamientos con fipronil, evidenciaron una velocidad de reacción rápida, llegando la segunda dosis a la mayor actividad del bioensayo, descendiendo al incrementar la concentración de la dosis.

- Peroxidasa

Se observó la cinética para esta enzima evidenciando un comportamiento muy similar a la SOD, en los diferentes insecticidas, repitiendo el mismo patrón, donde el imidacloprid se mantiene constante, el clorpirifos varía muy poco, tendiendo a disminuir su actividad a partir de la cuarta dosis, y el fipronil alcanza una velocidad de reacción muy rápida en la segunda dosis, descendiendo su actividad al incremento de la concentración (Figura 42).

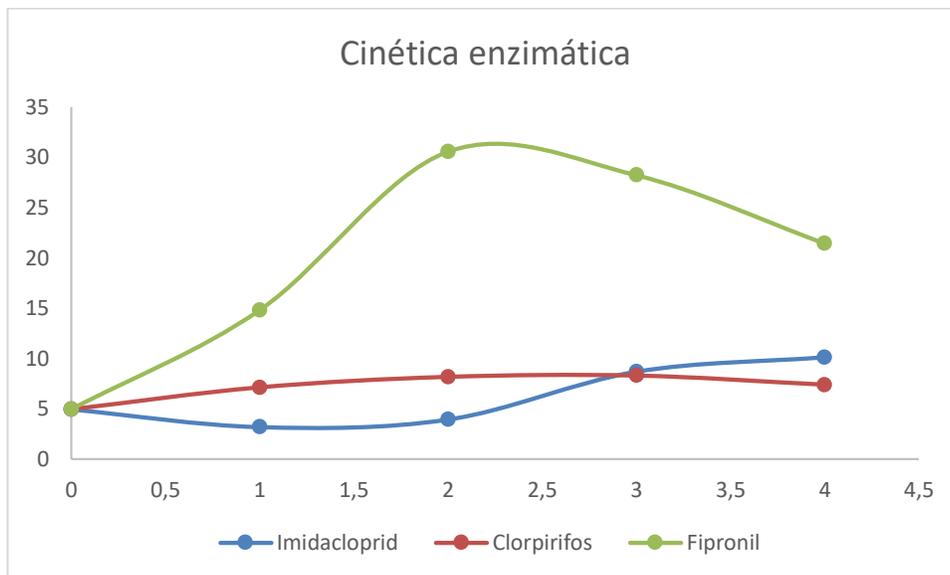


Figura 42. Cinética de Michaelis – Menten, para la POD en extracto enzimático de cabeza y tórax de *Apis mellifera*, bajo el efecto de insecticida imidacloprid, clorpirifos y fipronil.

- Catalasa

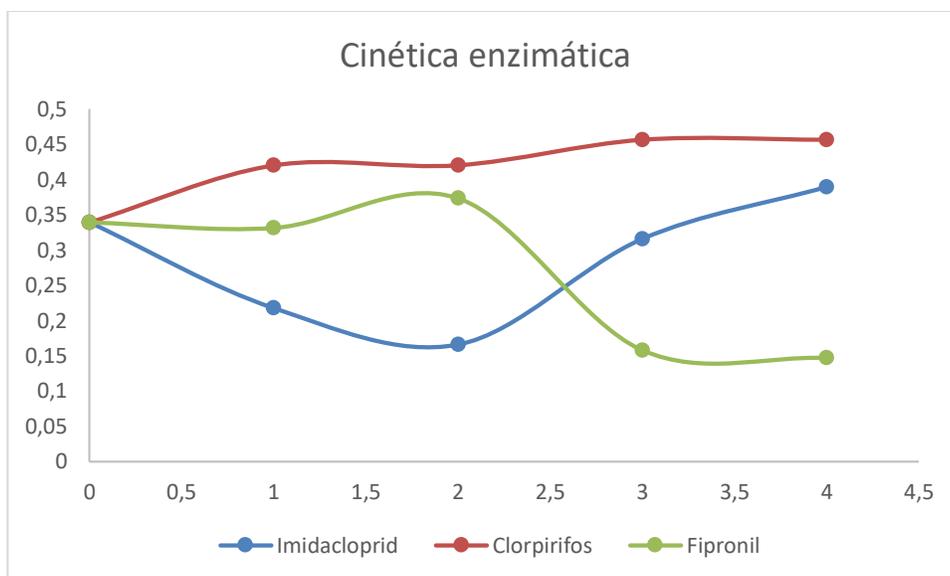


Figura 43. Cinética de Michaelis – Menten, para la CAT en extracto enzimático de cabeza y tórax de *Apis mellifera*, bajo el efecto de insecticida imidacloprid, clorpirifos y fipronil.

la cinética para esta enzima varia, de acuerdo al comportamiento de las dos enzimas anteriores, presentando el imidacloprid una actividad que descendió en las dos primeras dosis respecto al testigo, normalizando su actividad desde la tercera dosis; la cinética del clorpirifos se mantuvo constante, con variación mínima; el fipronil no obtuvo una velocidad de reacción alta, manteniendo una variación mínima hasta la segunda dosis, descendiendo su actividad enzimática drásticamente a partir del incremento de la concentración de las otras.

4.3.3 Parámetros cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis - Menten, se realizó mediante los modelos de linealización de la doble recíproca, Hanes-Woolf y Eadie - Hofstee, permitiendo determinar los parámetros básicos como la constante de Michaelis y la velocidad máxima de la reacción; seleccionando el modelo con el ajuste más cercano a la unidad, a través de la correlación de Pearson.

El modelo de Hanes- Woolf, fue el modelo que se ajustó significativamente a las enzimas tratadas en el presente estudio.

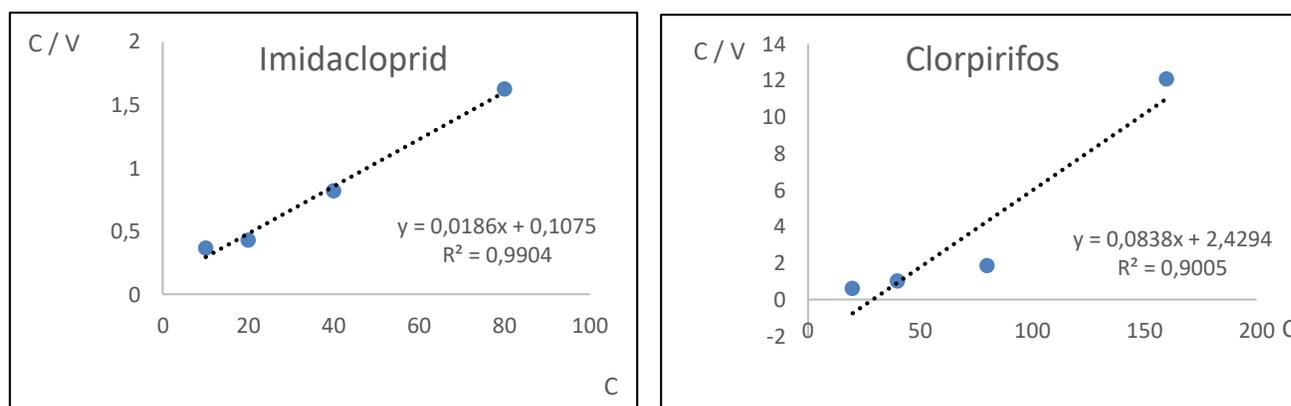
Tabla 11. Modelos de linealización para las enzimas SOD, POD y CAT en función de los insecticidas objeto de estudio.

Enzima	Modelos linealización		
	Doble reciproca	Woof	Hofstee
SOD			
Imidacloprid	0,88 NS	0,99*	0,56 *
Clorpirifos	0,25 NS	0,90*	0,24 NS
Fipronil	0,07 NS	0,97*	0,06 NS
POD			
	Doble reciproca	Woof	Hofstee
Imidacloprid	0,09 NS	0,32*	0,01 NS
Clorpirifos	0,24 NS	0,99 *	0,16 NS
Fipronil	0,07 NS	0,97*	0,06 NS
CAT			
	Doble reciproca	Woof	Hofstee
Imidacloprid	0,13 NS	0,86*	0,07 NS
Clorpirifos	0,94 *	0,99 *	0,91*
Fipronil	0,48 *	0,99*	0,58 *

Sign: significancia estadística; (p>0,05) NS; (p<0,001) *; (p<0,0001) **.

- Superóxido dismutasa

Se muestra el ajuste del modelo de Hanes – Woolf, de la enzima SOD bajo el efecto de los insecticidas utilizados en el estudio (Figura 44).



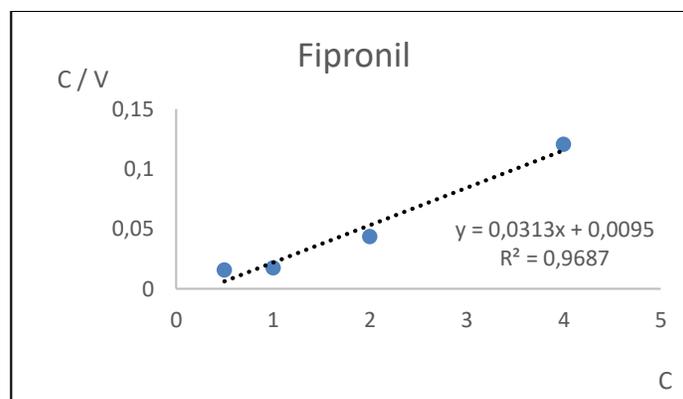


Figura 44. Representación de Hanes – Woolf para los diferentes insecticidas en la actividad de SOD, en extracto enzimático de cabeza y tórax de la abeja *Apis mellifera*.

El ajuste de los datos, se expresan en ppm / uA/g/h vs ppm, obteniendo la ecuación de regresión, con un R² significativo, que señala la validez de la transformación de los datos en este estudio (Tabla 12) (Figura 44).

Tabla 12. Modelo de Hanes- Woolf para SOD con los diferentes insecticidas.

Insecticida	Ecuación regresión	R ²	Sign.
Imidacloprid	C/V = 0,0186 C + 0,1075	0,9904	**
Clorpirifos	C/V = 0,0838C - 2,4294	0,9005	*
Fipronil	C/V = 0,0313C - 0,0095	96,87	**

Sign: significancia estadística; (p<0,001) *; (p<0,0001) **.

A partir de la ecuación de regresión se determinaron los valores de constante de Michaelis y velocidad máxima para cada insecticida (ver figura 45), evidenciando una velocidad máxima de: 53,7634 uA/g/h y 31,9488 uA/g/h, con una Km de: 5,779 ppm y 0,3035 ppm, para imidacloprid y fipronil, respectivamente; indicando que existe una alta afinidad de la enzima por el sustrato, predominando la forma ES, mostrando alta eficiencia del sistema enzimático.

El clorpirifos mostro una Vmax: 11,9331 uA/g/h, mientras un Km: 28,9904 ppm, indicando que ocurre lo contrario a los insecticidas imidacloprid y fipronil, mostrando poca afinidad de la enzima por el sustrato, predominando las formas de enzima y sustrato libres.

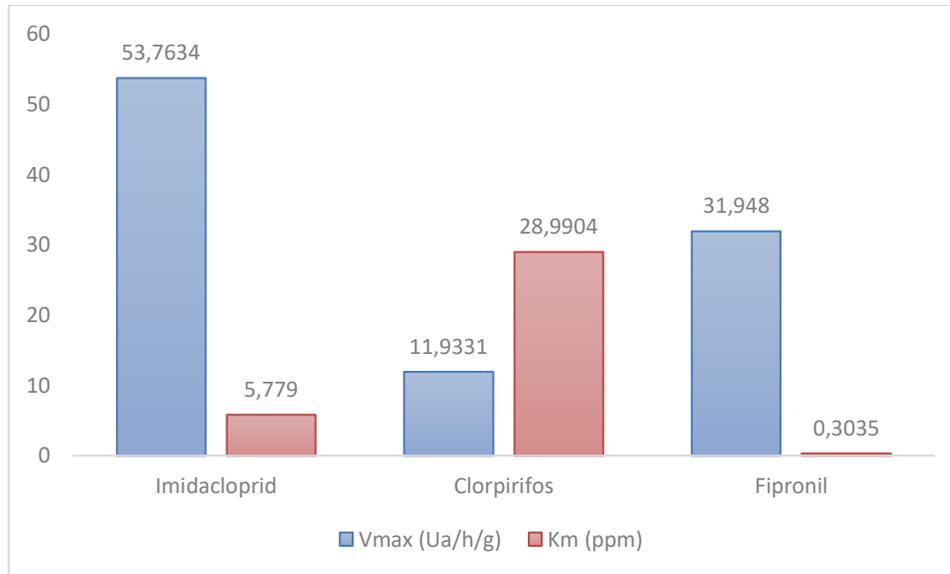


Figura 45. Gráfica de velocidad máxima y constante de Michaelis- Menten, para SOD bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.

La Km, además de proporcionar información sobre la afinidad de la enzima por el sustrato, también es una medida útil sobre la rapidez con la que aumenta la velocidad de reacción respecto a la concentración del sustrato, indicando que Km es la concentración del sustrato a la que una enzima trabaja a la mitad de su velocidad máxima.

- Peroxidasa

Se muestra el ajuste del modelo de Hanes – Woolf, de la enzima POD bajo el efecto de los insecticidas utilizados en el estudio (Figura 46).

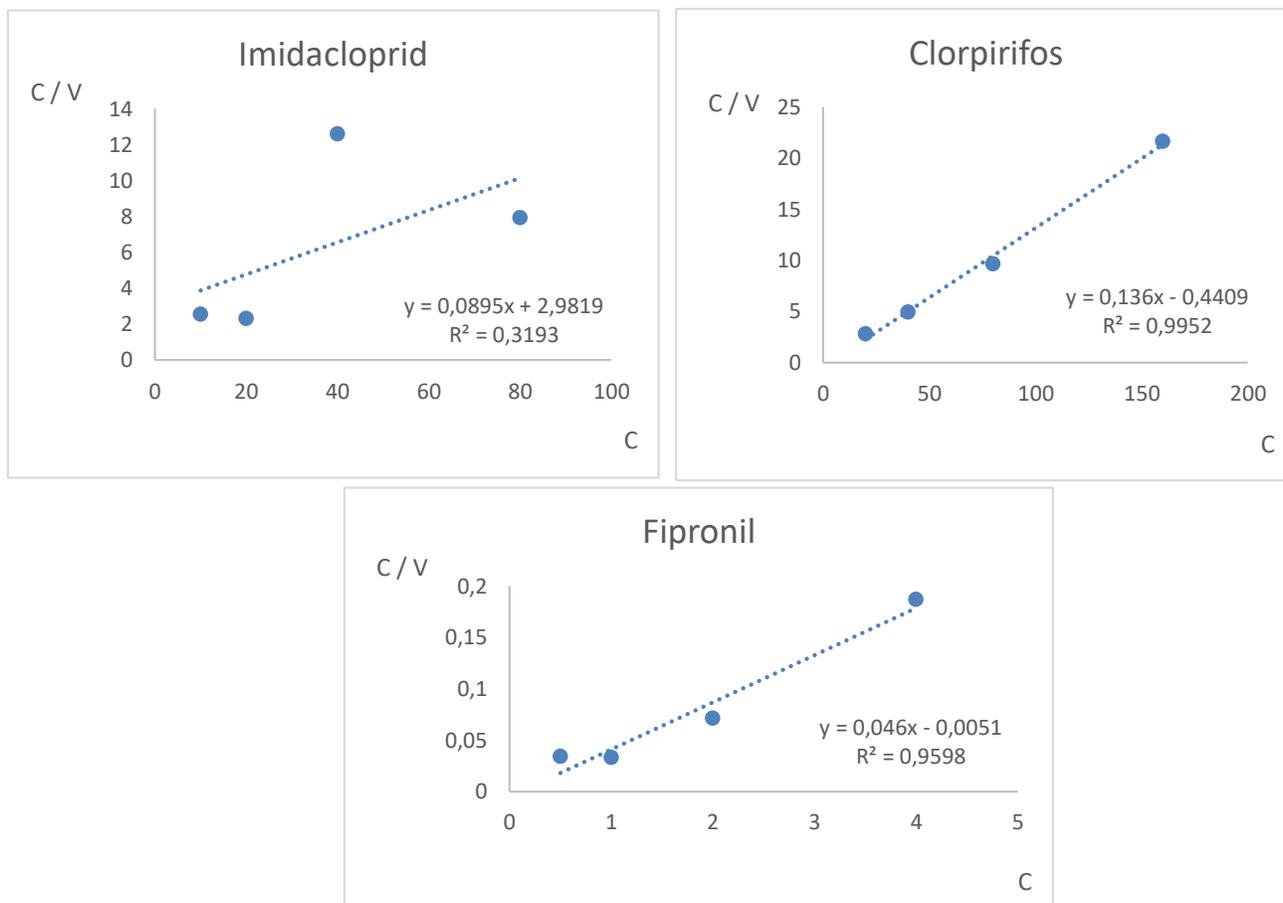


Figura 46. Representación de Hanes – Woolf para los diferentes insecticidas en la actividad de POD, en extracto enzimático de cabeza y tórax de abejas *Apis mellifera*

El ajuste de los datos para los insecticidas clorpirifos y fipronil, fue significativo con un R^2 , superior a 0,95 y 0,99, respectivamente, sin embargo, para el imidacloprid se obtuvo un R^2 bajo correspondiente a 0,3193, pero con significancia estadística para la actividad enzimática de peroxidasa. Las unidades, se expresan en ppm / uA/g/h vs ppm, obteniendo las ecuaciones de regresión (Tabla 13) (Figura 46)

Tabla 13. Modelo de Hanes- Woolf para POD con los diferentes insecticidas.

Insecticida	Ecuación regresión	R^2	Sign.
Imidacloprid	$C/V = 0,0895 C + 2,9819$	0,3193	*
Clorpirifos	$C/V = 0,136C - 0,04409$	0,9952	**
Fipronil	$C/V = 0,046C - 0,0051$	0,9598	**

Sign: significancia estadística; ($p < 0,001$) *; ($p < 0,0001$) **.

Los parámetros cinéticos se obtuvieron a partir de la ecuación de regresión, mostrando el siguiente comportamiento según los resultados obtenidos (Figura 47); El imidacloprid presento una V_{max} : 11,1731 uA/g/h y K_m : 33,317 ppm, mostrando poca afinidad de la enzima por el sustrato, predominando las formas de enzima y sustrato libres, mostrando poca eficiencia del sistema enzimático.

Para el clorpirifos y el fipronil, se determinaron V_{max} de 7,3529 uA/g/h y 21,7391 uA/g/h, con K_m de 3,2419 ppm y 0,1108 ppm, respectivamente, concluyendo que existe una alta afinidad de la enzima por el sustrato, predominando la forma ES, mostrando alta eficiencia del sistema enzimático.

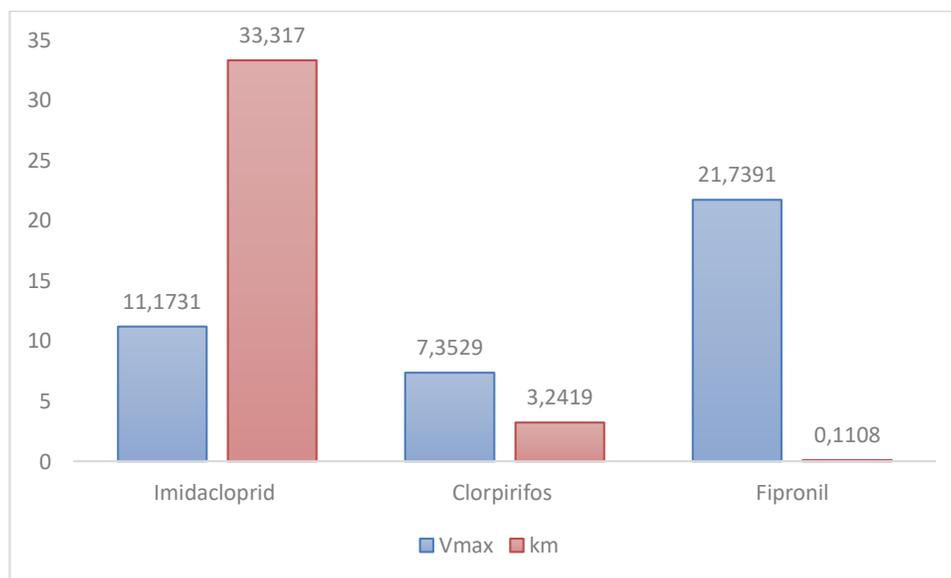


Figura 47. Gráfica de velocidad máxima y constante de Michaelis- Menten, para POD bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.

- Catalasa

Mostro que el ajuste del modelo de Hanes – Woolf, de la enzima CAT bajo el efecto de los insecticidas utilizados en el estudio (Figura 48).

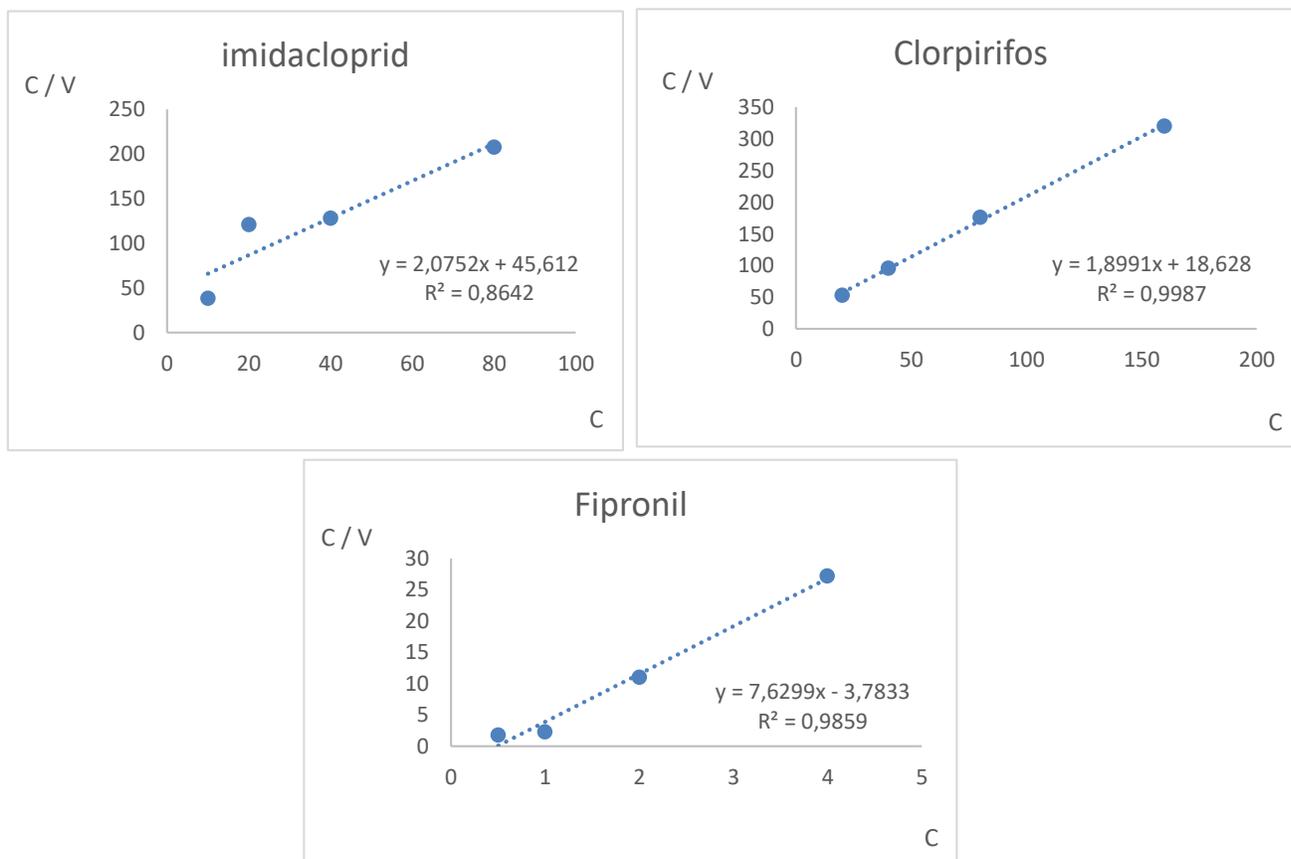


Figura 48. Representación de Hanes – Woolf para los diferentes insecticidas en la actividad de CAT, en extracto enzimático de cabeza y tórax de abejas *Apis mellifera*.

Las unidades, se expresan en ppm / mmoles H₂O₂/ min/ g vs ppm, el ajuste de los datos fue estadísticamente significativo para todos los insecticidas, obteniendo las ecuaciones de regresión (Tabla 14) (Figura 48).

Tabla 14. Modelo de Hanes- Woolf para SOD con los diferentes insecticidas.

Insecticida	Ecuación regresión	R ²	Sign.
Imidacloprid	$C/V = 2,0752 C + 45,612$	0,8642	*
Clorpirifos	$C/V = 1,8991C - 18,628$	0,9987	**
Fipronil	$C/V = 7,6299C - 3,7833$	0,9859	**

Sign: significancia estadística; (p<0,001) *; (p<0,0001) **.

Los parámetros cinéticos para todos los insecticidas, mostraron una Vmax baja en comparación a la Km, la cual fue mayor, indicando que existe poca afinidad de la enzima por el sustrato,

predominando las formas de enzima y sustrato libres, lo que podría deberse a una inhibición enzimática, haciendo ineficiente este sistema antioxidante por el contacto con las moléculas de los insecticidas.

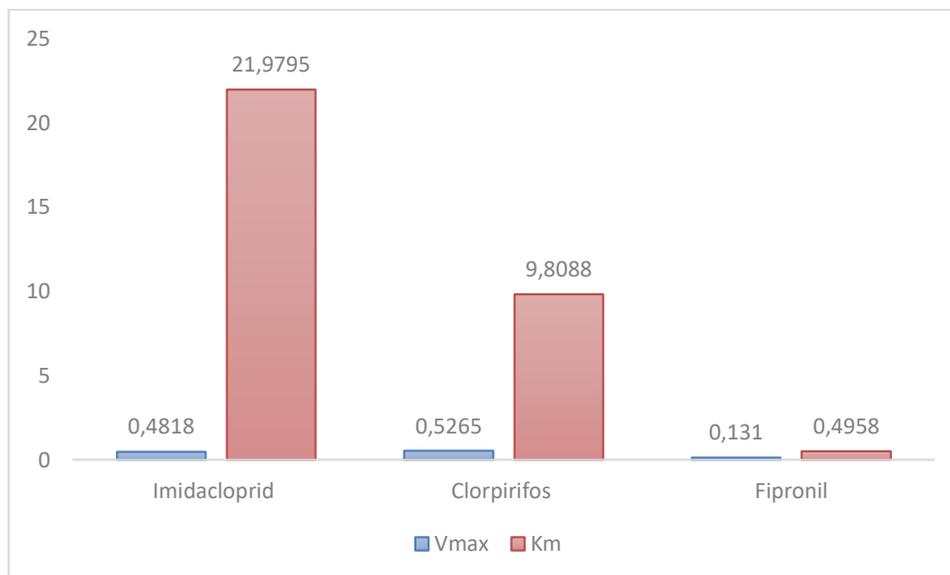


Figura 49. Gráfica de velocidad máxima y constante de Michaelis- Menten, para CAT bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.

A partir de los parámetros cinéticos hallados, se reemplazaron los valores en la ecuación, obteniendo para cada enzima bajo el efecto de cada insecticida la ecuación de Michaelis – Menten (Tabla 15).

Tabla 15. Ecuación cinética de Michaelis – Menten para las enzimas SOD, POD y CAT, bajo el efecto del imidacloprid, clorpirifos y fipronil.

Enzima	Ecuación Michaelis- Menten		
	Imidacloprid	Clorpirifos	Fipronil
SOD	$V = \frac{53,7634 * C}{5,779 + C}$	$V = \frac{11,331 * C}{28,9904 + C}$	$V = \frac{31,9488 * C}{0,3035 + C}$
POD	$V = \frac{11,1731 * C}{33,317 + C}$	$V = \frac{7,3529 * C}{3,2419 + C}$	$V = \frac{21,7391 * C}{0,1108 + C}$
CAT	$V = \frac{0,4818 * C}{21,9795 + C}$	$V = \frac{0,5265 * C}{9,8088 + C}$	$V = \frac{0,1310 * C}{0,4958 + C}$

4.3.4 Acción de los insecticidas como inhibidores de la RBE

La actividad enzimática se ve afectada, por moléculas inhibidoras del sustrato que pueden unirse a la enzima reduciendo total o parcialmente su actividad catalítica; se realizó una proyección de acuerdo a la ecuación de regresión en las enzimas bajo el efecto de los diferentes insecticidas, observando su comportamiento y el tipo de inhibición que causan en las enzimas del complejo antioxidante en la *Apis mellifera*, (Figuras 50, 51 y 52).

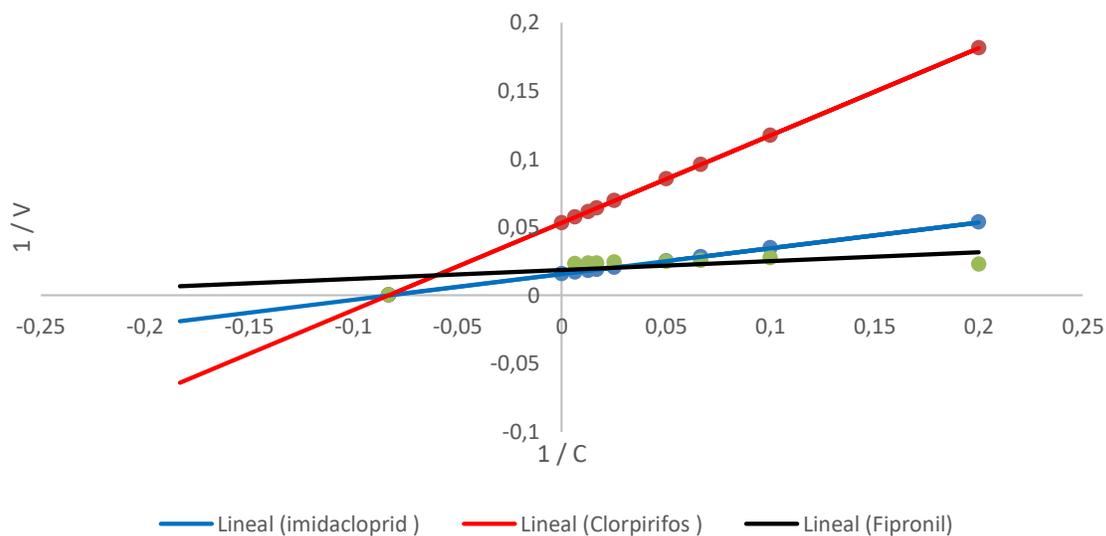


Figura 50. Gráfica de inhibición, de la doble recíproca para SOD en extracto enzimático de cabeza y tórax de la *Apis mellifera* bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.

En la anterior grafica se aprecia que el clorpirifos no ejerce inhibición competitiva, respecto a los otros insecticidas usados en el estudio, esto indica que se puede reducir la velocidad máxima de la reacción, pero su K_m , sigue siendo la mismo, en pocas palabras, la afinidad de la enzima por el sustrato no varía, concordando con los parámetros cinéticos determinados anteriormente, donde presento baja afinidad de la enzima por el sustrato, indicando que se encuentra la enzima y el sustrato en estado libre (Lenhinger, 1993).

Los insecticidas imidacloprid y fipronil, evidenciaron un comportamiento competitivo entre ellos, por la enzima, indicando una reducción en la velocidad de reacción, aunque su velocidad máxima sigue siendo la misma a concentraciones altas de sustrato, anteriormente en los parámetros

cinéticos se evidencio alta afinidad de la enzima por el sustrato, sugiriendo un sistema eficaz antioxidante por parte de la enzima para controlar la concentración de sustrato.

Sin embargo, esta inhibición competitiva entre los dos insecticidas puede deberse a la naturaleza química de su molécula, recordando que se conocen tres isoformas de la superóxido dismutasa en células eucariotas, las cuales se dividen en dos grupos: 1. Intracelular se encuentra SOD 1 (Cu- Zn DOS) y SOD 2 (Mn- SOD), 2. extracelular SOD3 (Cu- Zn SOD 3), además de diferenciarse por su sitio activo (Lewandowski et al, 2018), lo que concuerda con la estructura química del fipronil, que posee grupos como el trifluoro sulfinilo, trifluoro metil en los dos costados de la molécula, que le otorgan una alta electronegatividad para ligar otros grupos de moléculas; además, posee un grupo nitrilo categorizado como un grupo ciano, siendo potencialmente letal, inhibiendo el sistema central del proceso de respiración celular, disminuyendo el ATP celular, concordando con lo reportado por Jia et al, (2014), quien afirma que se ha demostrado que el ion cianuro inhibe eficazmente la acción de la Cu- Zn SOD, por unirse al ion cobre, disminuyendo su actividad provocando una serie de reacciones que implican directamente la generación de ROS, llevando a las células a sufrir estrés oxidativo bajo el efecto de este insecticida, por su afinidad a la mitocondria, generando un desbalance metabólico (Wang et al, 2016).

El imidacloprid por su parte presenta un cloro en la sexta posición de la piridina en un costado de la molécula, mientras en la otra se desprende del carbono 2 del dihidroimidazol, una nitroamida, estos compuestos, le otorga un efecto aceptor de e^- , confiriéndole esta propiedad a toda la molécula, pudiendo causar el efecto de competir con el fipronil por el sitio activo de la enzima, al tener la capacidad de unirse al cobre, oxidándolo (Banasiak, sf).

-POD

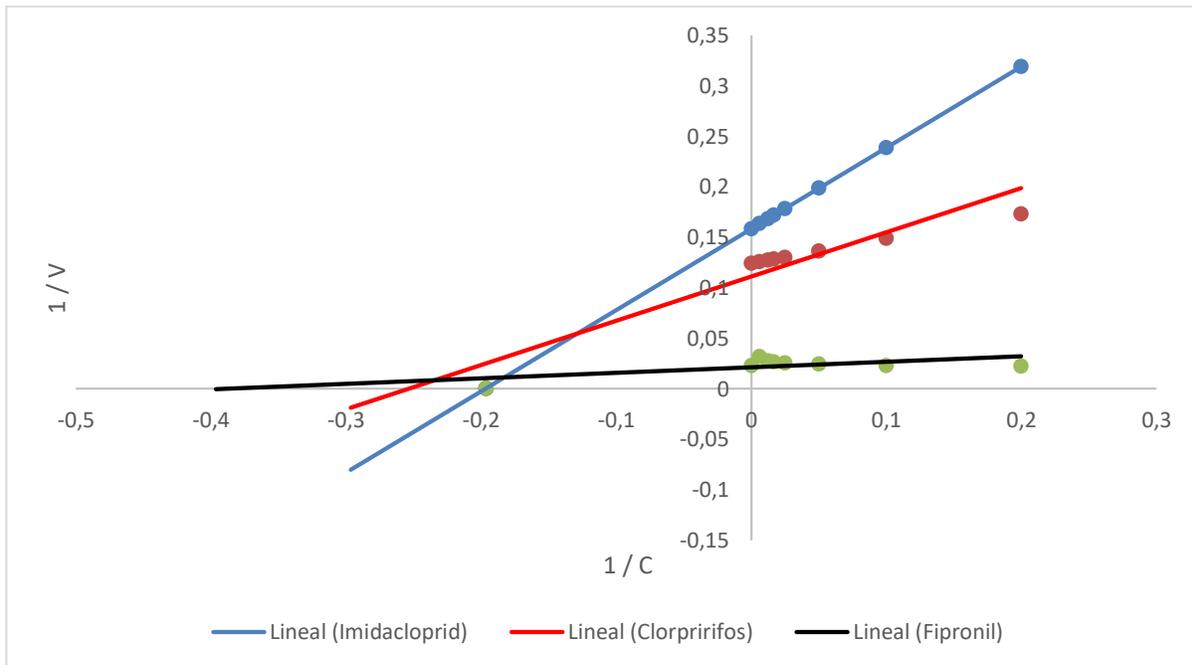


Figura 51. Gráfica de inhibición, de la doble recíproca para POD en extracto enzimático de cabeza y tórax de la *Apis mellifera* bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.

Se observa la inhibición ejercida en la POD, bajo el efecto de los insecticidas, mostrando que no presenta inhibición competitiva entre estos, reduciendo la velocidad de reacción, manteniéndose Km y por lo tanto la afinidad por la enzima (Figura 51).

En general la peroxidasa, ha mostrado ser un mecanismo efectivo en la protección contra el daño oxidativo a nivel celular, existiendo tres isoformas de esta enzima oxidoreductasa que se encuentran a nivel celular, en la mitocondria, donde se produce la reducción de H_2O_2 (Yao et al, 2013), concluyendo este mismo autor que la peroxidasa juega un papel importante en la protección contra el daño oxidativo en *Apis cerana cerana*, ampliando su potencial de vida; la peroxidasa ha demostrado la alta especificidad para el aceptor de hidrogeno, como el peróxido de hidrogeno (Vergara, 2015), explicando su cinética de primer orden, donde su actividad depende de la concentración de un sustrato.

- CAT

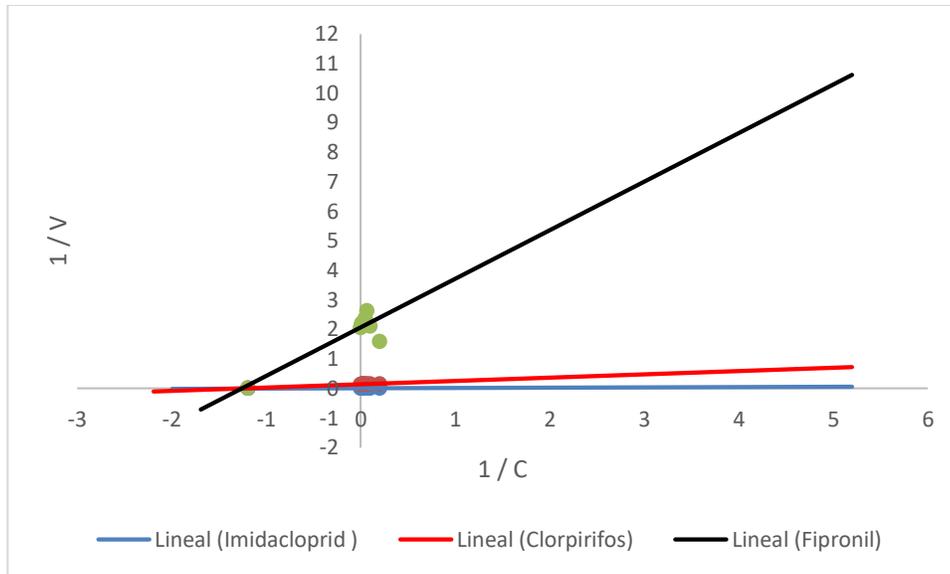


Figura 52. Gráfica de inhibición, de la doble recíproca para CAT en extracto enzimático de cabeza y tórax de la *Apis mellifera* bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil.

Al igual que la enzima peroxidasa, la catalasa bajo el efecto de los insecticidas presenta una inhibición no competitiva, debido que las catalasas descomponen el peróxido de hidrogeno, en agua y oxígeno celular; también puede actuar al catalizar reacciones como la peroxidasa, cumpliendo la misma función (Díaz, 2002); esta enzima está presente en los peroxisomas y las mitocondrias (Corrales y Muñoz, 2012), presenta en su sitio activo Fe^{+++} , la cual la hace susceptible a la inhibición irreversible por complejos como el cianuro sulfuroso, coincidiendo el descenso de la actividad enzimática con el incremento de la concentración de la dosis del insecticida fipronil, el cual posee en su molécula grupo nitrilo que se comporta como un ciano, además del trifluoro sulfínilo (Magaña, 2014), lo que concuerda con los resultados del presente estudio.

4.4 Ácido ascórbico

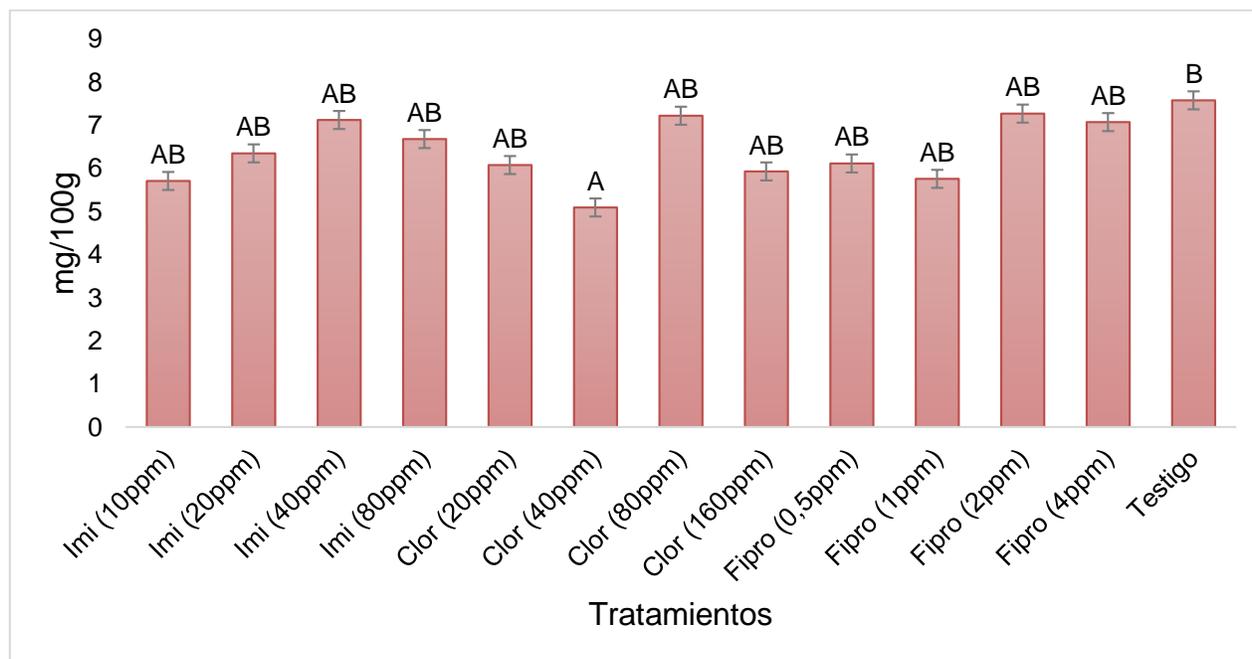


Figura 53. Comportamiento del ácido ascórbico en extracto enzimático de cabeza y tórax de *Apis mellifera* bajo efecto de imidacloprid, clorpirifos y fipronil; medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,01$).

Se aprecia el comportamiento del ácido ascórbico, el cual no obtuvo diferencias estadísticas para insecticidas y su interacción con las concentraciones ($p > 0,005$), presentando diferencia estadística en el comportamiento respecto a la dosis (Figura 53). Observando mediante la prueba de comparación de medias de Duncan, diferencia estadística entre el testigo y el tratamiento con clorpirifos 40 ppm, que presentó el comportamiento más bajo, del bioensayo, en general la actividad del ácido ascórbico en los tratamientos con este insecticida fue variable; el imidacloprid evidenció un comportamiento estable, mientras en el fipronil, se observa un ascenso del contenido de ácido ascórbico a medida que incremento la concentración; en general se observa que la respuesta del ácido ascórbico es acorde con la actividad enzimática presentada por la influencia de estos insecticidas, evidenciando en el imidacloprid un comportamiento enzimático de SOD, POD y CAT, estable al incremento de la concentración del insecticida, mientras Clorpirifos mostró un comportamiento variable en todo el bioensayo; Fipronil, por el contrario a medida que aumento su concentración disminuyó su actividad enzimática a partir de la segunda dosis en todas las enzimas medidas en este estudio, concordando con el aumento de la concentración del ácido ascórbico, ejerciendo su papel de segunda barrera en el daño oxidativo,

al captar moléculas donadoras de H⁺(Bandyopadhyay y Banerjee, 1999) (Corrales y Muñoz, 2012), en general la concentración de ácido ascórbico en el extracto enzimático en cabeza y tórax de la *Apis mellifera* concuerda con lo reportado por (Brigg, 1962), el cual reporta valores de contenido de ácido ascórbico en tejido fresco de *Apis mellifera*, encontrándose entre 18,3 hasta 18,9. Esto puede diferir por la muestra tomada.

4.5 Discusión de Resultados

En la actualidad no existe un único factor para el declive de la *Apis mellifera*, siendo el uso indiscriminado de pesticidas uno de los factores al que más se le atribuye el descenso poblacional de esta especie a nivel mundial (Li- Biyarlay et al, 2016), enfocándose los diferentes estudios científicos a evaluar el cambio comportamental, a la exposición de los diferentes insecticidas y sus concentraciones, siendo poco conocido los cambios subyacentes metabólicos de las dosis subletales, (Christen y Fent, 2017).

Donde su capacidad antioxidante, se ha vinculado a una sensibilidad de la abeja por los insecticidas debido que poseen menos genes codificadores de proteínas desintoxicantes, los cuales han estado directamente relacionadas con la respuesta al daño oxidativo (Claudinos, 2006), concordando con lo reportado por Roat et al, 2012, donde, la *Apis mellifera Scutellata*, presenta mayor sensibilidad a los pesticidas por soportar una DL50, menor a lo reportado por otros autores, donde la *Apis mellifera Carnica* y *lingüística*, soportan una DL50 11 y 4 veces mayor, respectivamente para el fipronil.

Aunque estudios más recientes, han relacionado directamente a la mitocondria, con el estrés oxidativo, la cual es responsable de la síntesis de casi todo el ATP que se requiere para mantener la estructura y la función celular (Wang, et al, 2016), por lo que efectos tóxicos derivados directa e indirectamente, conducen a una disfunción mitocondrial, como cambios en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa, que agotan el ATP (Tavares, 2015), desencadenan la producción de ROS, como un producto de la desintoxicación o generación de energía compensatoria, llevando a un estrés oxidativo (Vidau et al, 2011)(Li- Biyarlay et al, 2016) que puede causar daño irreparable a nivel celular, provocando una cascada de procesos catabólicos, que pueden causar apoptosis o necrosis celular, si las enzimas no logran estabilizar el sistema redox en la célula (Wang, et al, 2016).

Las enzimas desintoxicantes como la SOD, POD y CAT, han demostrado ser eficientes contra el estrés oxidativo en células eucariotas, (Gómez, 2008) (Corrales y Muñoz, 2012), encentrándose a nivel intra y extracelular en la mitocondria y peroxisomas (Li- Biyarlay et al, 2016) (Vergara, 2015) (Yao et al, 2013), mostrando el mismo comportamiento en *Apis cerana cerana*, donde la SOD desempeña un papel importante en respuestas de estrés celular y procesos antioxidantes

como respuesta a diferentes estresores medioambientales (Jia et al,2014), igualmente la POD, ha mostrado un alto poder antioxidante al proteger la célula del estrés oxidativo generado por contacto con pesticidas como el paraquat (Yao et al, 2013), la catalasa en *Apis florea* y *Apis dorsata*, sugieren un poder antioxidante dependiente de las condiciones a las que la enzima sea expuesta (Hayat, et al 2018).;Apreciándose en general un alto poder antioxidante contra el daño celular, sin embargo, pueden ser inhibidas por ciertas moléculas, impidiéndoles llevar a cabo su función antioxidante, la SOD puede ser inhibida eficazmente en presencia de cianuro, al ligarse este ion al sitio activo de la enzima Cu- Zn (Pulido, 2014)(Lewandowski et al, 2018) o ligar otras moléculas para formar unas más estables que pueden cambiar estructuralmente su conformación química inhibiendo su actividad (Lewandowski et al, 2018), la POD , ha demostrado alta afinidad para aceptores de hidrogeno, siendo altamente especifica (Vergara, 2015), mientras CAT, puede ser inhibida de forma irreversible principalmente por el cianuro sulfuroso y monóxido de carbono (Díaz, 2002) (Magaña, 2014), por lo que su actividad y poder antioxidante son susceptibles a este tipo de moléculas, las cuales se pueden formar a partir de metabolitos secundarios en el organismo al contacto con pesticidas (Hayat, 2018), mostrando el clorpirifos una alta afinidad por el Cu y otros metales, para formar moléculas más estables como los quelatos (Bayer, 2013), mientras el imidacloprid puede llegar a formar hasta cuarenta metabolitos secundarios en el organismo (Banasiak, 2018), que pueden ser más tóxicos que su molécula original, de igual manera el fipronil, el cual posee una estructura molecular más compleja y electronegativa que el imidacloprid, dada por la carga de flúor y grupos como el nitrilo, pirazole, que le otorgan un poder altamente aceptor de e⁻, desencadenan más de 20 metabolitos secundarios, que se han comprobado que son más tóxicos que su molécula original (Tavares, 2018).

Estudios moleculares con dosis subletales de imidacloprid, en *Apis mellifera* han demostrado que se producen cambios a nivel cerebral en las células de Kenyon, condensación la cromatina y pérdida densidad de electrones y crestas mitocondriales (Catae, 2017), de igual manera el fipronil, induce cambios estructurales a nivel celular (Lewandowski et al, 2018), vinculándose directamente con la supervivencia de esta especie (Slujis ,et al, 2015), al generar desbalance de la navegación individual, aprendizaje, recogida de alimento, longevidad y resistencia a las enfermedades (Whitehorn, O'Connor, Wackers, y Goulson, 2012), traduciendo a su vez, en pérdidas económicas para los apicultores, debido a que el desarrollo y mantenimiento de las colmenas se ve afectado al igual que los servicios ecosistémicos que presta esta especie, estimándose que sin el servicio de polinización la productividad de los cultivos

descenderían hasta en un 75% (Heldringstraat, 2013), poniendo en riesgo la seguridad alimentaria del planeta (Silva, 2015)

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

- Aunque el declive de la *Apis mellifera*, no se ha relacionado con un solo factor, puede estar directamente relacionado con el uso de pesticidas de nueva generación como los neonicotinoides y el fipronil, debido a la naturaleza química de su ingrediente activo, que pueden conferir alta electronegatividad e inhibición de moléculas fundamentales para el correcto funcionamiento de las células, ocasionando un estrés oxidativo que puede desencadenar una cascada catalítica si no se cuenta con un sistema de defensa antioxidante eficiente.
- Los efectos ocasionados por las dosis subletales, mostraron causar un desbalance metabólico en el presente estudio, lo que puede desencadenar la pérdida de su capacidad de forrajeo, longevidad y resistencia a las enfermedades, vinculándose directamente con la supervivencia de la especie y su productividad en los sistemas apícolas, siendo importante incluir estos efectos generados por el ingrediente activo, para el registro de comercialización los pesticidas.
- La determinación de dosis letales, para las *Apis mellifera*, muestra gran variación de acuerdo a la subespecie, siendo importante desarrollar estudios en la abeja *Apis mellifera* colombiana, la cual es un híbrido entre abejas alemanas (*Apis mellifera mellifera*) e italianas (*Apis mellifera ligustica*), caucasicas (*Apis mellifera caucasica*) y africanas (*Apis mellifera scutellata*), dominando los genes africanizados, que pueden influir en la respuesta al contacto con insecticidas, y su sensibilidad a ellos, encontrando muy pocos estudios a nivel metabólico y molecular en esta especie.

5.2 Recomendaciones

- Adaptar protocolos para inducción de estrés oxidativo y dosis ambientales, para la *Apis mellifera*, con el fin de reducir o mitigar el error experimental, en estudios de actividad enzimática.
- Establecer estudios de actividad enzimática en abejas *Apis mellifera*, simulando diferentes condiciones ambientales durante la exposición a insecticidas.
- Realizar futuros estudios comparativos en análisis de la actividad enzimática entre técnicas analítica y kits de reactivos enzimáticos.

Referencias

Agrimundo. (2013). *Situación mundial del síndrome del colapso de las abejas (2)*. Recuperado de <http://www.agrimundo.gob.cl/>

Agro 2.0. (20 noviembre de 2012). Neonicotinoides, mecanismo acción y propiedades. *Agro 2.0*. Recuperado de: <http://www.agro20.com/>.

[Alcaldía de Silvania. \(2012\). Plan de ordenamiento territorial. Recuperado de: www.silvania-cundinamarca.gov.co/i.](http://www.silvania-cundinamarca.gov.co/i)

Al Nagggar, Y., Codling, G., Vogt, A., Naiem, E., Mona, M., Seif, A., Giesy, J. (2015). Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera L.*) and their potential hazard to bee colonies in Egypt. *Ecotoxicology and Environmental*, 114:1–8. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.

Ansedo, M. (28 abril de 2018). La UE prohíbe el uso de tres insecticidas dañinos para las abejas en cultivos al aire libre. *El País*. Recuperado de: <https://elpais.com/>.

Arroyo, G. S., Martínez V. C., Carbajal, L. Y., Arroyo, M. A., Segura C. M., Villalobos, P. R., y Walzeiski, S. (2013). Riesgo genotóxico por la exposición ocupacional a plaguicidas en América Latina. *Contaminación ambiental*, (29), 159-180.

Banasiak, U. (sf). Metabolites del imidacloprid. *Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA), Kleinmachnow, Germany*.

Bandyopadhyay, U., Das, D., Banerjee, K. R. (1999). Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Current science*, 5 (10): 10-19.

BASF (2005). Regent TS: La solución para el gusano de alambre. Recuperado de: <https://www.agro.basf.es/>

Bayer. (2010). Hoja de Seguridad para Materiales de acuerdo a NTC4435 REGENT 200 SC. Recuperado de: <https://www.cropscience.bayer.co/>.

Bayer. (2011). Hoja Técnica de Seguridad del Material de acuerdo a NTC4435, CONFIDOR SC350 56X100ML BOT CO. Recuperado de: <https://www.cropscience.bayer.co/>.

- Bayer. (2017). Seguridad de los insecticidas neonicotinoides para las abejas. Recuperado de: beecare.bayer.com
- Blacquiere, J., Smaghe, G., Cornelis, A., Gestel, V., Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Toxicology*, 21(4):973-92. doi: 10.1007/s10646-012-0863-x.
- Brigg, M. H. (1962). Some aspects of the metabolism of ascorbic acid in insects. *Comp. Biochem. Physiol.*, (5): 241- 252.
- Catae, F. A., Roatl, C. T., Vieiral, P. M., Menegassol, R. A., Palmal, S. M., y Malaspinal, O. (2018). Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Ecotoxicology*, (2):109-12. doi: 10.1007/s10646-017-1874-4.
- Castro, G. D. (2013). Dependencia de la dosis en los mecanismos de toxicidad y la evaluación de riesgo en toxicología. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, (3): 561-585.
- Corrales, C. L., Muñoz, M.A. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Ciencias biomédicas*, (10): 135-250.
- Chauzat, M. P., Carpentier, P., Martel, A. C., Bougeard, S., Cougoule, N., Porta, P., ... Faucon, J. P. (2009). Influence of Pesticide Residues on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Health in France. *Environmental Entomology*, 38(3), 514–523. doi:10.1603/022.038.0302.
- Christen, V., Mittner F., Fent. K. (2016). Molecular effects of neonicotinoids in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Science & Technology*, 50 (7): 4071-81. doi: 10.1021/acs.est.6b00678
- Christen, V., Fent. K. (2017). Exposure of honey bee (*Apis mellifera*) to different classes of insecticides exhibit distinct molecular effect patterns at concentrations that mimic environmental contamination. *Environmental Pollution*, 226: 48-59. doi: 10.1016/j.envpol.2017.04.003.
- Culma, N. Y., Arenas, N. E. (2017). Daño colateral en abejas por la exposición a pesticidas de uso agrícola. *Ciencias Agrícolas*, 14 (1): 232- 240.

- Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R. M., Biswas, S., Schuler, M. A., Berenbaum, M. R., ... Oakeshott, J. G. (2006). A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 615–636. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00672.
- Diáz, A. (2002). La estructura de las catalasas. *REB* 22 (2): 76-84.
- Dow Agro Science. (sf). Ficha técnica insecticida, Lorsban™ 480 EM (Clorpirifos etil. Recuperado de: <https://www.dowagro.com/>.
- Fernández, A. D., Mancipe, G. L., Fernández, A. D. (2010). Intoxicación por organofosforados. *Revista Med* (1): 84-92.
- Greenpeace. (2013). *El declive de las abejas, peligro para los polinizadores y la agricultura de Europa*. Recuperado de <http://archivo-es.greenpeace.org/>.
- Gómez, Q. L. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo, capítulo: superóxido dismutasa. Manual moderno.
- González, M. J. (2015). Bioquímica y biología molecular. Lejona, España. Universidad del País Vasco.
- Granados, M. J. (2014). Cinética Enzimática. Universidad Nacional Abierta y A Distancia.
- Hayat, K., Afzal, M., Aqueel, M. A., Ali, S., Saeed, M. F., Khan, Q. M., ... Damalas, C. A. (2018). Insecticide exposure affects DNA and antioxidant enzymes activity in honey bee species *Apis florea* and *A. dorsata*: Evidence from Punjab, Pakistan. *Science of The Total Environment*, 635, 1292–1301. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.221
- Ica. (01 octubre de 2018). Registros nacionales. Recuperado de: <https://www.ica.gov.co/>.
- Johnson, R. M., Dahlgren, L., Siegfried, D. B., Ellis, D. M. (2013). Effect of in-hive miticides on drone honey bee survival and sperm viability, *Journal of Apicultural Research*, 52 (2), 88-95. doi: [10.3896/IBRA.1.52.2.18](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.2.18)
- Johnson, R. M., Ellis, D.M., Mullin, A.C., Frazier, M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity – USA, *Apidologie*, 41 (3), 312-331. doi:doi.org/10.1051/apido/2010018
- Jia, H., Sun, R., Shi, W., Yan, Y., Li, H., Guo, X., & Xu, B. (2014). Characterization of a mitochondrial manganese superoxide dismutase gene from *Apis cerana cerana* and its

role in oxidative stress. *Journal of Insect Physiology*, 60, 68–79. doi:10.1016/j.jinsphys.2013.11.004

La crónica del Quindío. (20 Octubre de 2016). Muerte de 2.808 colmenas deja millonarias pérdidas para apicultores. *Cronica del Quindío*. Recuperado de <http://www.cronicadelquindio.com/>

Lannacone, J. O., Alvarado, L. (2009). Impacto del fipronil y del cartap en abejas. *Research gate*, vol (13):173-181.

Lenhinger, A. L., Nelson, D. L., Cox. M. M. (1993). Principios de Bioquímica., segunda edición. Barcelona, España: Ediciones Omega.

Lewandowski, L., Kepinska, M., Milnerowicz, H. (2018). Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase activity by selected environmental xenobiotics. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (58):105–113.

Li- Biyarlay, H., Huang, M., Finstrom, S., Strand , K., Tarpy , R., y Rueppel, O. (2016). Honey bee (*Apis mellifera*) drones survive oxidative stress due to increased tolerance instead of avoidance or repair of oxidative damage. *Experimental Gerontology*, (83):15-21. doi: [10.1016/j.exger.2016.07.003](https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.07.003).

Magaña, A. I. (2014). *Actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa , en el espermatozoide y líquido seminal de conejo Nueva Zelanda y su relación con el sobrepeso*. (Tesis de maestría).Universidad Autonoma Metropolitana, México.

Ministerio de agricultura y desarrollo rural. (2006). *La cadena de las abejas y la apicultura en colombia* . Recuperado de: <https://sioc.minagricultura.gov.co/>.

Minagricultura. (2016). *Cadena productiva de las abejas y la apicultura*. Recuperado de: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Apicola/>.

Montaño, J. (28 de noviembre de 2018). Histórico: juez ordena proteger la vida de las abejas en Colombia. *El Tiempo*. Recuperado de: <https://www.eltiempo.com/>.

Nates, P. (17 julio de 2017). Sin freno, muerte masiva de abejas. *Unimedios*. Recuperado de <https://agenciadenoticias.unal.edu.co/>.

- Ojeda, O. P. (2008). *Estudio de apiarios como herramienta ecotoxicológica para evaluar la calidad de ambientes agropecuarios* (Tesis de maestría). Universidad de la República, Uruguay.
- Pajuelo, A. G. (2014). Neonicotinoides versus abejas. A. G. Pajuelo. Recuperado de: <http://www.mieldemalaga.com/>.
- Pulido, P. S. (2014). Evaluación de la actividad enzimática de Superóxido Dismutasa Cu/Zn en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo diferentes condiciones de déficit hídrico. (Tesis doctoral) Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Roat, T. C., Carvalho, S. M., Nocelli, R. C. F., Silva-Zacarin, E. C. M., Palma, M. S., & Malaspina, O. (2012). *Effects of Sublethal Dose of Fipronil on Neuron Metabolic Activity of Africanized Honeybees*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(3), 456–466. doi:10.1007/s00244-012-9849-1
- Rocha, E., Garcia, F. (2008). Insecticidas clásicos y biopesticidas modernos: Avances en el entendimiento de su mecanismo de acción. *Biotecnología*, 12(1), 50-62.
- Sanchez, A. (2014). *Sistemas de producción y economía apícola en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Caso de tres organizaciones de productores*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Silva-G. D., Arcos-D A.L. y Gómez-D. J.A. (2006). Guía ambiental apícola. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá D. C., Colombia.
- Shi, T., Burton, S., Wang, Y., Xu, S., Zhang, W., & Yu, L. (2018). Metabolomic analysis of honey bee, *Apis mellifera* L. response to thiacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. doi:10.1016/j.pestbp.2018.08.003
- Sluijs, V., Rogers, A., Belzunces, Lexmond, B., Bonmatin, Chagnon, . . y. Wiemers. (2015). Conclusiones de la evaluación mundial integrada sobre los riesgos de los neonicotinoides y el fipronil para la biodiversidad y el funcionamiento del ecosistema. *Springer*, 148-154.
- Tavares, MA, Palma, IDF, Medeiros, HCD, Guelfi, M., Santana, AT, y Mingatto, FE (2015). *Efectos comparativos del fipronil y sus metabolitos sulfona y desulfenilo en las*

mitocondrias aisladas de hígado de rata. Toxicología ambiental y farmacología, 40 (1), 206-214. doi: 10.1016 / j.etap.2015.06.013

- Tsvetkov, N., Samson-Robert, O., Sood, K., Patel, HS., Malena, DA., Gajiwala, PH., Maciukiewicz, P., Fournier, V., Zayed, A. (2017). Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science*, 356(6345), 1395-1397. doi: 10.1126/science.aam7470.
- Valderrama, D. J-A. (2014). Determinación de la actividad catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) en embriones de yamú (*Brycon amazonicus*) conservados a -14 °c. (Tesis pregrado). Universidad de la Salle, Bogotá.
- Vargas, J. M. (2017). Radican proyecto que busca ser salvavidas para las abejas de Colombia. *El Tiempo*. Recuperado de: <https://www.eltiempo.com/>.
- Vásquez, R., Martínez, R., Ortega, C. y Maldonado, W. (2012). Manual técnico de apicultura- Abejas (*Apis mellifera*). Bogotá, Colombia: Produmedios.
- Vergara, E. A. (2015). Evaluación de peroxidasa de rábano inmovilizada en nanopartículas magnéticas. (Tesis pregrado). Universidad de las Américas Puebla, México.
- Viada, P. E., Gómez, R. L., Campaña, M. I. (2017). Estrés Oxidativo. *Correo científico médico*. (1): 60-76.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fonthbonne, R., Vignes, B., Brunet, J. L., . . . Belzumces, F. (2011). Exposure to Sublethal doses of Fipronil and Thiacloprid Highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema caranae*. *Plos*
- Yao, P., Lu, W., Meng, F., Wang, X., Xu, B., & Guo, X. (2013). Molecular cloning, expression and oxidative stress response of a mitochondrial thioredoxin peroxidase gene (AccTpx-3) from *Apis cerana cerana*. *Journal of Insect Physiology*, 59(3): 273–282. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.11.005
- Yan, H., Meng, F., Jia, H., Guo, X., y Xu, B. (2012). The identification and oxidative stress response of a zeta class glutathione S-transferase (GSTZ1) gene from *Apis cerana cerana*. *Journal of Insect Physiology*, 58 (6): 782–791. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.02.003
- Zhu, M., Zhang, W., Liu, F., Chen, X., Li, H., & Xu, B. (2016). Characterization of an *Apis cerana cerana* cytochrome P450 gene (AccCYP336A1) and its roles in oxidative stresses responses. *Gene*, 584(2), 120–128. doi:10.1016/j.gene.2016.02.016.

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. doi:10.1080/10408444.2016.1223014

Whitehorn, P., O'Connor, S., Wackers, F., & Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, (336): 351-352. doi: 10.1126/science.1215025