

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

---

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DO  
CORPO GORDUROSO E DOS TÚBULOS DE  
MALPIGHI DE OPERÁRIAS ADULTAS DE  
*Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807)  
(Hymenoptera, Apidae) TRATADAS COM FIPRONIL  
E ÁCIDO BÓRICO.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DO  
CORPO GORDUROSO E DOS TÚBULOS DE MALPIGHI DE  
OPERÁRIAS ADULTAS DE *Scaptotrigona postica* (Latreille,  
1807) (Hymenoptera, Apidae) TRATADAS COM FIPRONIL E  
ÁCIDO BÓRICO.**

**RAFAEL ALEXANDRE COSTA FERREIRA**

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine C. M. da Silva Zacarin

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro – SP  
Abril/2010

595.799 Ferreira, Rafael Alexandre Costa  
F383a Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de Malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico / Rafael Alexandre Costa Ferreira. - Rio Claro : [s.n.], 2010  
83 f. : il., figs., gráfs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Osmar Malaspina  
Co-Orientador: Elaine Cristina Mathias da Silva-Zacarin

1. Abelha. 2. Toxicidade. I. Título.

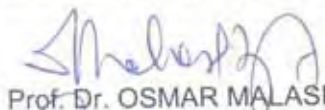
Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de Malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico

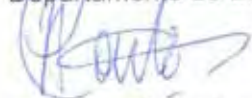
**AUTOR:** RAFAEL ALEXANDRE COSTA FERREIRA  
**ORIENTADOR:** Prof. Dr. OSMAR MALASPINA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:




Prof. Dr. OSMAR MALASPINA

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Prof. Dr. HÉLIO CONTE

Departamento de Biologia Celular e Genética / Centro de Ciências Biológicas / Universidade Estadual de Maringá



Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI  
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Data da realização: 30 de abril de 2010.

*Dedico este trabalho e todas as conquistas aos meus pais Fortunato e Conceição, meu irmão Caio e a minha namorada Paola que nunca deixaram de me apoiar*

## *Agradecimentos*

*Sou grato:*

*Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento concedido.*

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.*

*Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina, pela orientação, apoio, incentivo, a confiança depositada em mim, os ensinamentos que contribuíram enormemente para a minha formação acadêmica.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Cristina Mathias da Silva-Zacarin, pela co-orientação e acima de tudo pelo conhecimento compartilhado, pelos ensinamentos, incentivo e por me motivar a seguir buscando respostas para melhor compreensão destes insetos fascinantes e por ser essa pessoa incrível.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Eliza M. Tomotake, por todos os ensinamentos/conselhos, puxões de orelha durante a graduação, pela amizade e incentivo.*

*Aos técnicos Antônio Sérgio Pascon, Antônio Teruyoshi Yabuki, Gerson Mello Souza pelos serviços imprescindíveis prestados, para a concretização desse trabalho, além da amizade.*

*Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais e ao Departamento de Biologia, pela estrutura para o desenvolvimento do trabalho e a Seção de Pós-Graduação e a Biblioteca pela ajuda concedida.*

*Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu em especial a Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos e a técnica Claudete dos Santos Tardivo pela concessão do espaço e processamento das amostras.*

*Aos amigos e companheiros do Centro de Estudos de Insetos Sociais - CEIS, Andriago, João, Carlos, Fabiana, Marcela, Aline, Necis, Luciana, Olívia, Thaís, Cinthia, Aline Cruz, Thaísa, Roberta, Carol, Daiane, Fernanda e Carol.*

*À TURMA, Paulo “Chal”, Luciano “Bixão”, Fred, Mário “Harry”, Jordan “Abacaxi”, Andrei, Henrique, Marcela, Renata pelo companheirismo, viagens e pelas bebedeiras e outras doideiras que a convivência nos proporciona.*

*Ao pessoal do Laboratório de Mutagênese, os quais incomodei com as minhas visitas: Daniela, Jaqueline, Márcia, Bárbara, Cintya, Cris, Dânia, Renata, Tati, Thaís, pela amizade.*

*Aos amigos e companheiros da Rep. 3 e ½, Matheus, Sunao e Gleí, pela amizade, conselho, companheirismo e os bons momentos vividos como família.*

*Aos amigos de Jaboticabal, Júnior, João, Cmdte Leandro, Thaís, Tiago, e outros, que entendendo ou não o que fui fazer, sempre demonstraram sua preocupação e amizade.*

*Em especial, à minha família:*

*Aos meus pais, Fortunato e Conceição, por me ensinarem a respeitar o próximo e por me mostrarem que com luta nós podemos alcançar nossos objetivos. Agradeço, também, aos meus irmãos Caio e Verônica, por serem meus melhores amigos, no verdadeiro sentido da palavra.*

*À minha namorada, companheira, amiga, parceira, Paola, pelo amor e carinho, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos dessa caminhada, pela confiança e por ser essa mulher incrível.*

*A todos os citados ou não citados que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, seja com críticas, sugestões ou me estimulando nos momentos difíceis.*

*Agradeço a Deus.*

## RESUMO

As abelhas contribuem para a manutenção das espécies vegetais no nicho ecológico onde vivem. Alguns compostos químicos encontrados em inseticidas utilizados na agricultura (fipronil), ou lançados no meio com resíduos industriais (ácido bórico) são tóxicos para as abelhas. Assim, objetivou-se avaliar a atividade tóxica desses compostos em doses subletais, bem como, analisar as alterações morfológicas (citoplasmáticas e nucleares) do corpo gorduroso e túbulos de Malpighi. As análises estatísticas para o experimento realizado com ácido bórico (0,75% m/m) e fipronil (0,1 ng/abelha/dia) mostraram que os perfis de sobrevivência das abelhas que ingeriram a dieta contaminada foram significativamente diferentes ao perfil de sobrevivência apresentado pelo grupo controle ( $p < 0,0001$ ). As análises morfológicas confirmam que os inseticidas fipronil e ácido bórico, apresentam citotoxicidade em doses subletais, dentre essas alterações, destaca-se: nos túbulos de Malpighi aparente liberação de material celular para o lúmen, alguns núcleos picnóticos e bordo em escova que em alguns casos bloquearam o lúmen do órgão, em algumas células notou-se características morfológicas de degeneração. No corpo gorduroso de abelhas destacam-se intensa atividade de coalescência vacuolar, núcleos picnóticos e alguns núcleos dos trofócitos com aparente ramificação. Ultraestruturalmente destaca-se o aumento da porção apical das microvilosidades, dilatações das cisternas dos retículos endoplasmáticos rugoso, presença de vesículas e acúmulo de polirribossomos no citoplasma para os túbulos de Malpighi dos grupos experimentais tratados com fipronil e ácido bórico. As análises do corpo gorduroso mostram o aumento da quantidade, coalescência, depósitos lipídicos e protéicos nos vacúolos nos trofócitos do corpo gorduroso. Os resultados apresentados mostram que as doses utilizadas de ácido bórico e fipronil são subletais às abelhas, já que houve uma taxa de sobrevivência relativamente alta por um período de tempo prolongado, conduzindo, portanto, a efeitos crônicos.



## ABSTRACT

Bees help to maintain the plant species in the ecological niche where they live. Some chemicals found in pesticides used in agriculture (fipronil), or thrown in the ambient with industrial waste (boric acid) are toxic to bees. The objective was to evaluate the toxic activity of these compounds at sublethal doses, as well as analyze the morphological (cytoplasmic and nuclear) of the fat body and Malpighian tubules. In the experimental groups, the compounds were added to the diet (Candi). The concentration of fipronil used in the experiment was 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of candi and the concentration of boric acid was 0.75% (m/m). Statistical analysis for the experiment conducted with fipronil and boric acid profiles showed that the survival of bees that ingested the contaminated diet were significantly different to the profile of survival made by the control group ( $p < 0.0001$ ). Morphologically, in control group, changes found in Malpighian tubules of bees treated with boric acid and fipronil were subtle, showing apparent release of cellular material into the lumen, some pyknotic nuclei and, in some cases, brush border blocking the lumen organ, in some cells we observed morphological features of degeneration. Morphological changes are evident in the fat body of bees treated with fipronil and boric acid compared to control group. Among these changes, stand out intense activity of vacuolar coalescence, pyknotic nuclei and some nuclei of trophocytes with apparent branching. Histochemically, the cells of the Malpighian tubules showed, by the reaction of Bromophenol Blue, proteic activity more apparent in the treated groups compared to controls. The reaction of the PAS-Alcian Blue revealed the presence of glycoproteins in the apical portion of the cells of the Malpighian tubules of the treated groups. For the Feulgen reaction, we observed a high degree of chromatin compaction. The proteic activity in fat body, measured by reaction of Bromophenol Blue, there appeared differentiated between both groups. Tests for glycoproteins, by the reaction of the PAS-Alcian Blue, showed a greater amount of these substances in the treated groups. For the Feulgen reaction, the fat body cells showed higher degree of chromatin compaction. Ultrastructurally, the cells of the Malpighian tubules showed intense vacuolation in the treated groups, as well as the presence of mineralized granules, cytoplasmic concretions, evagination of the nuclear envelope, expansion of the apical portion (microvilli), release secretions into the lumen, altered mitochondrial cristae, rough endoplasmic reticulum with dilated cisterns and intense release of ribosomes to the cytoplasm, but in treated group and control group, the basal lamina

and plasma membrane were shown to be intact. In fat body, among the changes highlighted in the treated groups compared to control group, we highlight the intense vacuolation, vacuolar coalescence, rough endoplasmic reticulum with intense release of ribosomes into the cytoplasm, and ferritin accumulation in cisterns. As in the Malpighian tubules, the basal lamina and plasma membrane of the fat body cells proved to be intact. The results showed that the dose of fipronil and boric acid are sub-lethal to bees, since there was a relatively high survival rate for an extended period of time, leading thus to chronic effects.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	8
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	9
3.1. Corpo Gorduroso .....	11
3.2. Sistema excretor .....	13
3.3 Inseticidas.....	15
3.3.1. Fipronil.....	16
3.3.2 Ácido Bórico.....	17
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
4.1. Material.....	19
4.2. Métodos.....	20
4.2.1. Teste de fornecimento de pasta cãndi contaminada .....	20
4.2.2. Bioensaio - tratamento com fipronil.....	20
4.2.3. Bioensaio – tratamento com ácido bórico.....	21
4.2.3. Bioensaio – tratamento com solvente .....	21
4.2.4. Análise morfológica por Microscopia de Luz .....	21
4.2.5. Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	23
<b>5. RESULTADOS</b> .....	24
5.1. Bioensaios de Toxicidade .....	24
5.2. Análise Morfológica por Microscopia de Luz .....	26
5.2.1. Túbulos de Malpighi.....	26
5.2.2. Corpo Gorduroso .....	27
5.3. Análise Histoquímica .....	28
5.4. Análise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	29
5.4.1. Fipronil - 0,1ng/abelha .....	29
5.4.2. Ácido Bórico - 0,75%.....	31
<b>6. DICUSSÃO</b> .....	49
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	59
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	60

## 1. INTRODUÇÃO

---

A espécie *Scaptorigona postica* (Latreille, 1807) também conhecida como “mandaguari”, está inserida na subfamília Meliponinae e agrupada na tribo Trigonini, constitui o grupo de abelhas com grau de organização social, comportamento classificado como eussocial, em razão das suas rainhas terem perdido a capacidade de viverem isoladas.

As castas nas abelhas eussociais refletem uma divisão das funções reprodutivas (rainhas) e de manutenção da colônia (operárias) entre fêmeas, assim as rainhas são indivíduos férteis e as operárias em geral consideradas estéreis. No entanto, na maioria dos meliponídeos, diferentemente, do que ocorre em *Apis*, as operárias desenvolvem ovários mesmo na presença da rainha e põem ovos, alguns dos quais servem de alimento para as rainhas e outros podem originar machos (BEIG; SAKAGAMI, 1964; BEIG, 1971; BEGO, 1983; KOEDAM et al., 2005; OLIVEIRA, 2005; VELTHUIS et al., 2005).

Os meliponídeos, compreendidos pelas abelhas sem ferrão, são reconhecidos como os principais polinizadores de algumas culturas, tais como melancia (*Citrus lanatus* L.), cebola (*Allium cepa* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), café (*Coffea arabica* L.) entre outras (MACIEIRA; PRONI, 2004).

As operárias campeiras são excelentes insetos polinizadores e, portanto, contribuem para a manutenção da biodiversidade das espécies vegetais no

nicho ecológico onde vivem (MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006). Sugere-se que um terço da alimentação humana dependa direta ou indiretamente da polinização por abelhas (WILLIAMS, 1995). No entanto, para o controle de artrópode-praga, os produtores, geralmente, fazem uso de produtos fitossanitários que, normalmente, são de amplo espectro de ação, atuando não somente sobre a praga, mas também em insetos benéficos.

Há muito tempo, trabalhos têm revelado a presença de níveis alarmantes de agrotóxicos nos ecossistemas, com acúmulos significativos no solo, na água, no ar, nas plantas, nos animais e nos alimentos que, por meio desses últimos, podem chegar ao homem, ocasionando danos à sua saúde (EDWARDS, 1973, Usepa, TINGLE et al, 2003). Com este uso extensivo de agrotóxicos, o impacto ambiental por esses químicos é crescente. A ação impactante de um produto químico está relacionada com a sua característica, por isso é dependente do potencial de dispersão do agente, da concentração encontrada no ambiente, além da própria toxicidade do produto.

A apicultura é considerada como uma das mais antigas atividades agropecuárias do mundo e, devido ao uso de produtos fitossanitários no controle de pragas e doenças, as populações de abelhas podem ser adversamente afetadas por esses produtos, os quais podem causar repelência ou morte desses insetos (CARVALHO, 2006).

De acordo com estimativas da FAO (2004), 73% das espécies vegetais cultivadas no mundo são polinizadas por alguma espécie de abelha, 19% por moscas, 6,5% por morcegos, 5% por vespas, 5% por besouros, 4% por borboletas e 4% por pássaros. Kevan e Phillips (2001), avaliando o potencial de organismos polinizadores, estimaram que somente o Canadá faturou seis milhões de dólares com a produção de sementes de alfafa oriundas da polinização realizada por *Apis mellifera*. Em proporções mundiais a contribuição para a economia, devido a presença de polinizadores, foi estimada em torno de 54 bilhões de dólares por ano (KENMORE; KRELL, 1998).

Pesquisadores vêm tentando desenvolver técnicas que permitam avaliar e determinar o efeito de produtos químicos sobre abelhas em condições de laboratório e campo. Segundo Carvalho (2006), exposições via contato, pulverização, fumigação e ingestão, mostram resultados rápidos e confiáveis,

sendo essas as técnicas mais eficientes. Atkins et al. (1991) avaliaram a toxicidade de 399 produtos a abelhas e verificaram que 20% eram extremamente tóxicos, 15% moderadamente e 65% pouco ou não tóxico, porém 50% dos compostos utilizados nas diversas culturas dos Estados Unidos foram considerados moderadamente e altamente tóxicos às abelhas.

Correlacionando o hábito alimentar das abelhas com a dificuldade de se avaliar o efeito de produtos químicos sobre esses insetos, Bendahou et al. (1999) forneceram diretamente às colônias, durante cinco meses consecutivos, xarope de açúcar contaminado com inseticidas a base de cipermetrina. Durante 18 semanas de tratamento, observou-se a mortalidade de abelhas nas colméias, mas também se evidenciou a presença de efeitos subletais quando realizados testes laboratoriais em amostras de abelha, como glucosemia, alteração da atividade da enzima ATPase, além de outras perturbações fisiológicas e comportamentais.

Pham-Delegue et al. (2002) propuseram alguns ensaios para avaliar os efeitos sobre o comportamento de abelhas quando expostas a contaminação em doses subletais. Uma das técnicas empregada foi a avaliação da frequência de entrada e saída das abelhas da colônia por meio de censo direto. Outras técnicas estão relacionadas com o comportamento de orientação e com testes de resíduos de pesticidas em produtos e subprodutos das abelhas, avaliando a possível contaminação, empregando, por exemplo, técnicas de cromatografia.

El Hassani et al. (2005) avaliaram diferentes doses de fipronil administradas às abelhas tanto topicamente como por meio de alimento contaminado, e concluíram que, quando aplicado no tórax do inseto na dosagem de 0,001 µg/abelha, provocou dificuldade do inseto em detectar presença de açúcares, fato não observado quando fornecido via ingestão. Na dosagem de 0,0005 µg/abelha, também na aplicação tópica, causou redução na capacidade olfativa e nenhum efeito sobre a atividade locomotora. Entretanto, tem sido relatado por diversos pesquisadores, que alguns produtos, como fipronil, apresentam grande capacidade de ocasionar efeitos subletais em *A. mellifera*, ocasionando distúrbios principalmente no olfato e na percepção de açúcares.

O fipronil pode ser caracterizado como um inseticida de contato e ingestão, pois em algumas espécies, o efeito de ingestão é o mais importante, enquanto que em outras, a ação de contato é a mais pronunciada. Vários estudos têm demonstrado que o inseticida se liga ao canal de cloro e bloqueia sua ativação pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), uma substância que controla o fluxo de íons cloro através da membrana da célula nervosa. A ausência da inibição sináptica causa uma hiperexcitação do sistema nervoso central, o que leva o inseto à morte (BLOOMQUIST, 2009).

De acordo com as citações de Tingle et al. (2003), esse inseticida é largamente usado nas culturas de algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, cevada, feijão, milho, pastagens, soja e trigo, sob a fórmula comercial Regent®, além de ser encontrado em formulações utilizadas na veterinária, como, por exemplo, o Frontline®, produto amplamente utilizado em cachorros e gatos para controle de pulgas, carrapatos e piolhos mastigadores.

Pesquisas realizadas na Europa revelam que o inseticida fipronil, utilizado nos cultivos explorados pelas abelhas, provoca a morte de 10 a 65% dos indivíduos depois de 10 dias da aplicação deste composto químico (COLIN, 2004). Além disso, há evidências que este composto pode bioacumular-se nos tecidos dos organismos, além de afetar o sistema nervoso central (TINGLE et al., 2003).

Asorey (2004) aponta outros problemas do uso do fipronil nas lavouras: o apicultor afetado, na maior parte dos casos, abandona a atividade porque se sente impotente diante do problema. De acordo com a União Nacional de Apicultores Franceses, o inseticida fipronil foi responsável pela eliminação de milhares de colônias de abelhas na França.

O Brasil é o quarto maior mercado de agrotóxicos do mundo e o oitavo em uso por área cultivada. Dentre os produtos agrícolas permitidos para uso no país, está a molécula do inseticida fipronil utilizada no controle de várias espécies de insetos-praga. Sua aplicação na maioria dos casos é feita por pulverizações, sendo espalhado pelo vento para uma grande área. Nestas ocasiões, tem sido relatada grande mortalidade de abelhas em algumas regiões do Brasil, próximas a áreas agrícolas (MALASPINA et al., 2009). Este é um dos muitos exemplos de problemas, sendo estes agrotóxicos,

possivelmente, os responsáveis pela eliminação dos principais polinizadores agrícolas. Desta forma, estudos de impactos ambientais causados pelo uso deste inseticida nas lavouras brasileiras e seus efeitos sobre insetos polinizadores devem ser urgentemente realizados.

Neste contexto, as abelhas podem ser utilizadas como bioindicadores, uma vez que elas são sensíveis aos efeitos tóxicos do fipronil e de outras substâncias tóxicas. Pesquisas apontam a importância das abelhas *A. mellifera* como bioindicadores para a detecção de resíduos de agrotóxicos em plantas (MANSOUR, 1987) e também para a contaminação do ambiente por metais pesados (RAES et al., 1992; TOPORCAK et al., 1992; CONTI; BOTRE, 2001).

Diversos trabalhos foram realizados avaliando a atividade tóxica de compostos químicos sobre várias espécies de meliponíneos (BALESTIARI, 1989; BRITO et al., 2002) e sobre *A. mellifera* (CINTRA, 2001; CARVALHO et al., 2002 a,b), mas eles não focalizam as alterações morfológicas nos órgãos desses insetos. Cruz et al. (2009), Malaspina et al. (2009), observaram alterações morfológicas induzidas por inseticidas em diversos órgãos de abelhas, mas raros trabalhos mostram as alterações morfológicas no corpo gorduroso e túbulos de Malpighi de abelhas adultas, principalmente meliponíneos, tratadas com agentes químicos. Sabe-se que estes órgãos estão relacionados, com o armazenamento de substâncias e a excreção de compostos químicos e que a avaliação da morfologia dos mesmos pode revelar alterações ultra-estruturais induzidas por agentes tóxicos.

Estudos morfológicos de células do túbulo de Malpighi (SOROUR, 2001) de outros insetos estão sendo realizados com a finalidade de detectar alterações ultra-estruturais induzidas por contaminantes ambientais em doses subletais. Sorour (2001) avaliou as alterações ultra-estruturais nos túbulos de Malpighi do inseto *Lethocerus niloticum* (Hemiptera) causadas pela poluição do lago, onde o mesmo foi coletado. Os resultados desse trabalho permitiram a determinação do impacto dos poluentes nas células do túbulo de Malpighi de *L. niloticum*, sendo que este inseto pode ser utilizado como bioindicador em lagos poluídos (SOROUR, 2001).

O ácido bórico é um inseticida inorgânico eficaz, porém poucas são as informações a respeito de sua atuação na fisiologia dos insetos sabendo-se



que age no metabolismo, sendo abrasivo ao exoesqueleto quando usado em pó (RUST, 1986). Os efeitos tóxicos podem derivar da sua capacidade de criar complexos com grupos funcionais orgânicos (KLOTZ et al., 2002).

Várias hipóteses têm sido propostas para a ação do ácido bórico, incluindo o efeito abrasivo sobre a cutícula, provocando uma dessecação lenta ou a degeneração do epitélio do estômago, como observado em ninfa de baratas (COCHRAN, 1995). Recentemente, Habes et al. (2006) revelaram evidências bioquímicas de uma ação neurotóxica de ácido bórico sobre baratas, além de morte de células do intestino, levando a morte provavelmente por inanição, fato esse também descrito em intestino de formiga argentinas tratadas com ácido bórico (KLOTZ et al. 2002) e sugerido para *Atta sexdens rubropilosa* (SUMIDA et al., 2009).

O uso de insetos como bioindicadores em ecossistemas terrestres e aquáticos são considerados de grande interesse nos estudos ecotoxicológicos (BRAECKAMAN; RAES, 1999; BRAECKAMAN et al., 1999, MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006), uma vez que o processo de bioacumulação de compostos tóxicos ambientais é comum em uma grande variedade de insetos (INTRONA et al., 2001).

Trabalhos foram realizados avaliando a atividade tóxica de compostos químicos sobre várias espécies de meliponíneos (BALESTIARI, 1989) e sobre *A. mellifera* (CINTRA, 2001). Alguns trabalhos analisaram a capacidade de tolerância das abelhas a determinados inseticidas (YU et al, 1984; SMIRLE; WINSTON, 1988), verificando haver um mecanismo de desintoxicação eficiente, constituído, principalmente, de enzimas produzidas pelo intestino (YU et al, 1984). Johnson et al. (2006) concluíram que o metabolismo de desintoxicação, mediado pela enzima P450s, contribuiu para que abelhas campeiras tolerassem inseticidas do grupo dos piretróides. Contudo, não houve, nestes estudos, acompanhamento das possíveis alterações morfológicas nos órgãos dessas abelhas.

Neste panorama, estudos morfológicos de órgãos-alvos, tais como o intestino e os túbulos de Malpighi, associando-se aos testes de toxicidade, são de grande importância para a elucidação da ação desses compostos nos insetos polinizadores, além de fornecer subsídios para a avaliação de como

esses organismos estão respondendo a perturbações dos ecossistemas contaminados.

## 2. OBJETIVOS

---

Pelas propriedades tóxicas do inseticida fipronil e ácido bórico às abelhas, pelo seu amplo uso na agricultura e na veterinária, o presente trabalho teve como objetivo:

- Analisar a possível citotoxicidade de doses subletais dos inseticidas fipronil e ácido bórico, pela avaliação das alterações morfológicas e histoquímicas nos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso, em operárias adultas de *Scaptotrigona postica* e fornecer subsídios para futura utilização destas abelhas como bioindicadores em estudos ecotoxicológicos.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

Nos órgãos de animais submetidos a tratamentos com substâncias tóxicas, que conduzem a um alto nível de estresse nas células, pode ocorrer a indução do processo de morte celular. Essa indução pode ocorrer ativando as vias sinalizadoras intracelulares, por diversos agentes exógenos e/ou endógenos, culminando na ativação do programa de morte celular.

Pode-se classificar em três tipos de acordo com suas características morfológicas. Tipo 1, conhecida como apoptose, tipo 2, como a autofágica e tipo 3 a necrose (KERR, 1972). Nesse primeiro tipo de classificação, as mortes celulares do tipo 1 e do tipo 2 são consideradas 'Morte Celular Programada', enquanto que a necrose seria uma morte celular patológica e não programada geneticamente. Contudo, estudos recentes mostram que há uma regulação fisiológica em células necróticas e que a necrose não ocorre somente em situações patológicas, mas é também um componente de alguns processos fisiológicos, como renovação de tecidos, embriogênese e resposta imune (PROSKURYAKOV et al., 2002).

Vários estudos foram realizados em tecidos de insetos, focalizando o processo de morte celular programada a qual tem gerado muitas controvérsias quanto a sua classificação, já que as características típicas de apoptose, estabelecidas em vertebrados, não estão incondicionalmente presentes nas células de insetos (LOCKSHIN; BEAULATON, 1974; CRUZ-LANDIM; SILVA de

MORAES, 1977; LOCKSHIN, 1981, 1985; CRUZ-LANDIM; GIOMETTI, 1990; HARTFELDER; STEIMBRUCK, 1997; GREGORC; BOWEN, 1996, 1998, 1999; CAVALCANTE, 1998; DAÍ; GILBERT, 1997, 1999; SILVA de MORAES; BOWEN, 2000; REGINATO; CRUZ-LANDIM, 2002; GREGORC et al., 2004).

Considerado como sendo o principal tipo de Morte Celular Programada, a apoptose foi o principal foco dos extensivos estudos relacionados com o processo de morfogênese e diferenciação de muitos tecidos e/ou órgãos, bem como em resposta a algum defeito nas vias celulares de transdução de sinal (ALBERTS et al., 1994).

A morte celular autofágica (tipo 2) tem gerado grandes discussões devido a ambigüidade da função do processo de autofagia, podendo ser um mecanismo de proteção e viabilidade da célula, por exemplo em condições de limitações de nutrientes e energia, ou levar a célula à morte (DEBNATH, 2005).

Em tecidos de insetos, a classificação do tipo de morte celular gera controvérsias, pois exibe tanto características de apoptose como de autofagia. Silva-Zacarin (2007) demonstrou que a apoptose e a morte celular autofágica contribuem para a degeneração eficiente da porção secretora das glândulas salivares de *A. mellifera* no final do estágio larval.

Os tipos de morte celular são classificados com base nas características morfológicas distintas que as diferem uma das outras. Na apoptose, o núcleo e o citoplasma se condensam, a célula morre e fragmenta-se em corpos apoptóticos delimitados por membrana, os quais são fagocitados e digeridos por macrófagos ou células vizinhas, portanto não há vazamento do conteúdo celular. A autofagia tem como principal característica o acúmulo de vacúolos autofágicos no citoplasma. Já na necrose as células incham, a membrana plasmática é rompida e ocorre extravasamento do conteúdo citoplasmático, o que pode provocar uma resposta inflamatória (BOWEN et al, 1998).

A morte celular programada em insetos está relacionada com a reorganização tecidual que ocorre durante a metamorfose ou com a involução natural de algum órgão na fase adulta (GREGORC et al., 2004).

Alguns trabalhos ressaltam as alterações ultra-estruturais ocasionadas pela exposição de cultura de células ao mercúrio orgânico e inorgânico (BRAECKMAN; RAES, 1999) e, também, ao cádmio (BRAECKMAN et al., 1999). Os resultados dessas pesquisas revelam que doses subletais destes

compostos químicos causaram alterações ultra-estruturais nas células em cultura. Os autores acreditam que estas alterações ultra-estruturais não são características de necrose, mas da ativação da morte celular apoptótica. Além disso, eles acreditam que a manutenção da maquinaria de síntese protéica esteja relacionada com a síntese de proteínas de estresse (HSPs), em resposta aos agentes químicos testados nestas células. Silva-Zacarin et al. (2006) também detectaram a ativação das HSPs em glândulas salivares de larvas de abelhas tratadas com acaricidas em apiários comerciais.

Estudos em órgãos de inseto-alvo de compostos tóxicos ambientais são importantes para a avaliação do risco ecotoxicológico de determinada substância química. Neste contexto, a análise das alterações morfológicas nas células do corpo gorduroso e túbulos de Malpighi de insetos submetidos a tratamentos com compostos químicos contribuem para a avaliação deste risco ecotoxicológico, uma vez que estes órgãos estão relacionados, com o armazenamento de reservas e a excreção de compostos químicos.

### **3.1. Corpo Gorduroso**

O excesso de alimento ingerido pelos insetos durante a fase larval fica armazenado em um tecido denominado corpo gorduroso, o qual preenche grande parte da cavidade do corpo dos insetos. Desta forma mantendo reservas necessárias para a metamorfose, considerada fase de reorganização e reconstrução mediada por hormônios, quando então o inseto permanece sem se alimentar (CONTE, 1994; CRUZ-LANDIM, 2004).

O corpo gorduroso nos insetos tem origem embrionária de uma parte do mesoderma somático estendendo-se por todo o comprimento do inseto, presente principalmente durante todo o período larval e pupal.

Durante esse período as células separam-se e na maioria das vezes se histolizam, persistindo poucas até os primeiros dias da fase adulta; as características do corpo gorduroso do adulto surgem durante a metamorfose das células contidas nos discos imaginiais epidérmicos.

Estudos realizados por Buys (1924) no corpo gorduroso de oito ordens diferentes de insetos mostram que nas formas larvais, em especial nos insetos holometábolos, estes correspondem a um órgão distinto e algumas vezes preenchem toda a cavidade do corpo. Cruz-Landim (2004) em estudos com

*Melipona quadrifasciata* relata que no final da fase larval o corpo gorduroso corresponde cerca de 65% do peso total desse inseto (BISHOP, 1923; RUVOLO-TAKASUSUKI, 1988; GOITEN, 1989; CONTE; CRUZ-LANDIM, 1992; CONTE, 1994; OLIVEIRA, 2003).

A organização morfológica do corpo gorduroso apresenta variações, podendo-se observar uma disposição segmentar na forma de fibras soltas, lâminas ou lóbulos. O corpo gorduroso em Hemiptera apresenta-se como formações lamelares, em Diptera como lamelas fenestradas, em Lepidoptera na forma de fitas guarnecidas e em Orthoptera encontram-se cordões delgados ligados ao tegumento. Em *A. mellifera*, tanto na larva quanto no adulto, o corpo gorduroso está distribuído em uma camada parietal localizada logo abaixo do tegumento, entre os músculos intersegmentares e uma camada perivisceral associada ao redor do trato digestório (WIGGLESWORTH, 1974; CRUZ-LANDIM, 1983; KEELEY, 1985; CONTE; CRUZ-LANDIM, 1992; CHAPMAN, 1991; CONTE, 1994; CRUZ-LANDIM, 2004; OLIVEIRA, 2003).

Por se encontrar na hemocele, o corpo gorduroso permanece imerso na hemolinfa e esta circula através dos seus interstícios, permitindo que o mesmo responda rapidamente às trocas de metabólitos. As camadas são suportadas fisicamente por um entrelaçado de traquéias muito finas que parecem facilitar os processos oxidativos, pois penetram por todas as partes do referido órgão (CONTE, 1994; ROMA, 2007).

O corpo gorduroso dos insetos geralmente contém um único tipo de célula, o trofócito ou adipócito, funcionalmente diversificado e capaz de armazenar carboidratos, lipídeos e proteínas. Entretanto algumas ordens de insetos podem apresentar trofócitos modificados, formando outros tipos celulares especializados como as células de urato e micetócitos, ou associadas aos trofócitos (KILBY, 1963; BUTTERWORTH, et al., 1967; CRUZ-LANDIM; CONTE, 1992; LOCKE; COLLINS, 1966 e 1968; CHAPMAN, 1991; CONTE, 1994; OLIVEIRA, 2003; CRUZ-LANDIM, 2004; ROMA, 2007).

Os trofócitos do corpo gorduroso são a principal sede do metabolismo intermediário dos insetos. A maior parte das proteínas da hemolinfa são sintetizadas em suas células. Os produtos armazenados pelos trofócitos podem ter tanto origem endógena, como terem sido segregados da hemolinfa. Através da absorção de substâncias da hemolinfa e da liberação de outras tantas por

ele produzidas, os trofócitos regulam a composição do meio circundante do inseto, atendendo as suas necessidades metabólicas imediatas. Os trofócitos desempenham, ainda, um importante papel nos processos de desintoxicação e excreção do organismo, e na síntese do precursor da fração protéica do vitelo, a vitelogenina (CRUZ-LANDIM, 2004).

Associado aos trofócitos pode ocorrer células denominadas enócitos, de origem ectodérmica, geralmente grandes e ovóides em relação aos trofócitos, células características dos insetos, facilmente identificáveis pelo seu citoplasma acidófilo, homogêneo com contornos nucleares bem nítidos; mostram ciclos de desenvolvimento que, em insetos imaturos estão relacionados com o ciclo de muda e provavelmente, se relacionam com a secreção das lipoproteínas, da epicutícula, como a síntese de cera. Em insetos adultos podem secretar hormônios, lipídeos e estar envolvidos nos processos de desintoxicação do inseto. Frequentemente, podem ser encontradas acompanhando as células epidérmicas, logo abaixo do tegumento, podendo ser encontradas em outros locais como, por exemplo, subjacente a epiderme, entre as fibras musculares, ao redor dos espiráculos e situadas mais profundamente, entre as células mesodérmicas do corpo gorduroso (SNODGRASS, 1935; WIGGLESWORTH, 1974; CRUZ-LANDIM, 1983; CONTE, 1994; OLIVEIRA, 2003; ROMA, 2007).

Apesar do que consta na literatura e dos aspectos descritos nas larvas de abelhas, os enócitos não aparentam estar envolvidos nos processos de síntese e armazenamento de hidrocarbonetos; por outro lado, alguns autores sugerem que esses absorvam ativamente substâncias da hemolinfa, conforme verificado para outros insetos por Evans (1967) e Locke (1968). Há participação dos enócitos presentes no compartimento parietal do corpo gorduroso na síntese dos componentes da epicutícula, mas aqueles presentes no compartimento perivisceral talvez tenham outra função, como a síntese de ecdisteróides (EVANS, 1967). O papel atribuído aos enócitos, de atuarem nos processos de desintoxicação, não encontra suporte morfológico nas células larvais (CRUZ-LANDIM, 2004).

### **3.2. Sistema excretor**

O sistema excretor é fundamental para eliminação de substâncias que não foram metabolizadas ou estão em excesso, e reabsorção de componentes



úteis ao organismo garantindo condições iônicas ideais para o correto funcionamento das células (BERRIDGE, 1969). Sabe-se que o túbulo de Malpighi é o órgão excretor e osmoregulador dos insetos (EICHELBERG; WESSING, 1975), análogo aos néfrons dos vertebrados em relação à sua função de remover os diferentes compostos químicos, tanto endógenos como exógenos, do fluido corpóreo.

Os túbulos de Malpighi dos insetos são originados pela evaginação da extremidade anterior do intestino posterior, mas a ligação dos túbulos de Malpighi ao intestino não altera a independência dos sistemas digestório e excretor. Segundo o trabalho de Cruz-Landim e Melo (1981), em abelhas *A. mellifera adansonii* foram encontrados quatro túbulos de Malpighi nas larvas e cerca de 64 nas operárias adultas.

A parede dos túbulos de Malpighi dos insetos é formada por uma única camada de células. A região apical das células dos túbulos é favorecida pelas microvilosidades, as quais incrementam a superfície de transporte de água e íons entre o citoplasma e o lúmen do túbulo (MARTOJA, 1985). Na região basal dessas células há numerosas invaginações perpendiculares à lâmina basal, cuja função é aumentar a superfície da membrana plasmática permitindo maior eficiência no transporte de água e íons, proveniente da hemolinfa, para o interior das células dos túbulos (BRADLEY, 1985).

Na maioria dos insetos os túbulos de Malpighi estão divididos em três regiões estruturalmente diferentes: proximal, intermediária e distal, as quais são compostas por células distintas (CRUZ-LANDIM, 1998), correspondendo a diferentes funções na filtração do fluido corpóreo (hemolinfa) e produção da urina primária. Estes eventos ocorrem por um processo de transporte de fluidos e por transporte ativo de íons para dentro do lúmen do túbulo de Malpighi (PANNABECKER, 1995). A produção de urina ocorre em várias etapas e em diferentes regiões ao longo desses túbulos, sendo que a sua região mais distal parece ser primariamente responsável pela filtração da hemolinfa e a sua região mais proximal estaria envolvida na reabsorção de água e íons (BERRIDGE; OSCHAMANN, 1972).

O produto de excreção nos túbulos de Malpighi dos insetos adultos apresenta-se, principalmente, como cristais de nitrogênio, podendo ser outras substâncias como fosfato, uréia, oxalato de cálcio e carbonato de cálcio, que

possivelmente interferem no desempenho do organismo caso não sejam excretados (HABIB, 2003). O material a ser excretado, primeiramente, acumula-se na porção basal das células, formam-se vesículas, sendo exocitado no ápice e desta forma eliminado para a luz do túbulo (SNODGRASS, 1956). A urina produzida pelo túbulo de Malpighi flui para o intestino e acumula-se no reto, onde ocorre absorção pelas papilas retais ou pelo próprio túbulo de Malpighi (WIGGLESWORTH, 1974).

Estudos morfológicos e histoquímicos nos túbulos de Malpighi de abelhas foram realizados em *M. quadrifasciata* (MELLO; BOZZO, 1969; SILVA de MORAES; CRUZ-LANDIM, 1976; CRUZ-LANDIM, 1998; CRUZ-LANDIM, 2000), em *Bombus atratus* (MELLO, 1979) e, também, em *Plebeia droryana* e *S. postica* (MELLO; KERR, 1984). No entanto, nenhum estudo foi feito em abelhas submetidas a bioensaios de toxicidade. Sabe-se que os túbulos de Malpighi de insetos possuem mecanismos de transporte ativo para a remoção de compostos tóxicos e de produtos metabólicos da hemolinfa como, por exemplo, os alcalóides provenientes de plantas (BRADLEY, 1985). Além disso, devido à sua forma tubular simples e principalmente, pela sua função excretora, os túbulos de Malpighi representam um dos órgãos-chave no estudo ecotoxicológico de insetos.

### 3.3 Inseticidas

Os agrotóxicos são biocidas por natureza, isto é, são venenos utilizados na agricultura para eliminar formas de vida, consideradas pragas agrícolas. Todos os agrotóxicos têm como propriedade comum, bloquear o metabolismo de organismos indesejáveis, para os quais são tóxicos (PEDRO, 2008). Estes químicos podem agir eliminando ou controlando algum processo vital, como, por exemplo, os processos reprodutivos (BAIRD, 2002).

Nesse grupo de compostos químicos diversificado encontram-se os fungicidas, os inseticidas e os herbicidas, que são produtos considerados, extremamente, agressivos ao meio ambiente e à saúde humana.

### 3.3.1. Fipronil

O inseticida fipronil comercialmente registrado como Regente®, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2005), tem nome químico 5 - amino - 1 - (2,6 - dicloro - a - a - a - trifluor - p - totil) 4 - trifluorometilsulfinil - pirazol - 3 carbonitrila (fórmula molecular:  $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ ) (ANVISA, 2007a) pertence à família dos fenilpirazóis e tem forte poder inseticida (COLIN, 2004).

O fipronil é moderadamente solúvel em água, estável à temperatura ambiente, mas instável na presença de íons metálicos (TINGLE et al., 2000). É razoavelmente persistente no ambiente e é degradado pela luz (fotodegradação), resultando, entre outros, num produto altamente estável e mais tóxico que o composto original, o fipronil-dissulfinil (NPTN, 2005).

Esse composto tem um amplo espectro de aplicação. Pode ser usado contra diferentes pragas na agricultura, como larvas de lepidóptero e ortóptero em horticulturas ou larvas de coleóptero no solo. Outro emprego do fipronil se dá no controle de pragas domésticas, como baratas e formigas. Forti et al. (1998) verificaram que a concentração de 0,0005% de fipronil foi suficiente para exterminar colônias de *Atta sexdens rubropilosa* em laboratório. Encontra-se fipronil também em produtos veterinários para tratamento de carrapato e pulgas em animais domésticos (TINGLE et al., 2000).

Estudos metabólicos mostraram que o fipronil é capaz de se bioacumular em tecido gorduroso de alguns organismos, como em peixes (TINGLE et al, 2000). A bioacumulação em insetos ainda não foi elucidada, portanto são necessários mais estudos para avaliar o processo de metabolização do fipronil nestes organismos.

O fipronil é extremamente ativo e afeta o sistema nervoso central (SNC) do inseto, inibindo o receptor do GABA, o qual previne o estímulo excessivo dos nervos. Dessa forma, o fipronil causa descontrole do SNC resultando em superexcitação neural e subsequente morte do inseto (PAN, 2006). Barbara (2005) utilizou-se de neurônios do lobo antenal de pupas de *A. mellifera* em meio de cultura e por meio de técnicas eletrofisiológicas confirmou a ação bloqueadora do fipronil em receptores de GABA e verificou, também, que ele influencia na corrente de cloro destes neurônios. Como esta região do cérebro está relacionada com o processamento das informações olfativas, esta

evidência indica que o fipronil também afeta a percepção olfativa das abelhas (JESUS, 2007).

A vantagem atribuída ao fipronil, pela sua toxicidade mais pronunciada, pode também decorrer em um maior comprometimento ambiental, pois, uma vez que doses muito baixas deste produto já são eficientes para o extermínio de pragas, elas também podem atuar, com a mesma efetividade, sobre organismos não alvos (PEDRO, 2008).

No Brasil, há uma grande aceitação da eficiência apresentada pela molécula do inseticida fipronil utilizada no controle de várias espécies de insetos-praga. Ele é utilizado principalmente no controle de cupins na cana de açúcar e nas pragas de soja. Sua aplicação na maioria dos casos é feita por pulverizações, sendo espalhado pelo vento para uma grande área. Nestas ocasiões, tem sido relatada grande mortalidade de abelhas em algumas regiões do Brasil, próximas a áreas agrícolas. Este é um dos muitos exemplos de problemas, sendo estes agrotóxicos, possivelmente, os responsáveis pela eliminação dos principais polinizadores agrícolas.

O produto ativo fipronil é também encontrado em formulações utilizadas na veterinária como, por exemplo, o produto comercial Frontline®. Esse produto é aplicado nos pêlos de animais e tem sua ação prolongada pelo seu efeito reservatório nas glândulas sebáceas. O fipronil não é sistêmico, não sendo então transportado pela corrente sanguínea, o que o caracteriza como pouco tóxico e indicado para uso em pequenos animais. O produto pode ser aplicado em filhotes de cães e gatos, portadores de Dermatite Alérgica a Picadas de Pulgas (DAPP) (PEDRO, 2008).

Vários estudos foram realizados para se determinar o nível de resíduos de fipronil em diferentes culturas, incluindo as de vegetais, frutas e fibras. Resultados indicaram que o nível residual em culturas destinadas a alimentação é geralmente abaixo do limite aceitável (BELAYNEH, 1998).

### **3.3.2 Ácido Bórico**

O ácido bórico (fórmula molecular:  $H_3BO_3$ ) (ANVISA, 2007b) é solúvel em água (1g em 18 ml) (KLOTZ& MOSS, 1996), sendo que os íons borato formam fortes complexos com álcoois de açúcar, como o inositol e outros grupos funcionais orgânicos (HU et al., 1997).

Este composto químico é relativamente volátil podendo contaminar o ambiente (DOWNING; STRONG, 1999). O ácido bórico apresenta ação retardada e acredita-se que ele provoque interrupção da regulação de água em insetos, como mostra o trabalho de Klotz; e Moss (1996) realizado com a formiga *Camponotus abdominalis floridanus*, o qual sugere que a ingestão do ácido bórico fez com que as formigas ingerissem cada vez mais isca na tentativa de contrabalancear a desidratação. Além disso, o boro pode estar envolvido na interrupção da adesão intercelular, uma vez que soluções saturadas de ácido bórico podem ser usadas para dissociar células (GOODRICH, 1942). Em mamíferos, foi encontrada deposição deste composto na forma de boro nos ossos de ratos que ingeriram ácido bórico (MOSEMAN, 1994).

Altas concentrações de ácido bórico compõem a fórmula ativa de muitos inseticidas utilizados principalmente para o controle de moscas domésticas, baratas, cupins e larvas de muitos insetos (EISLER, 1990). Características como solubilidade em água, ação retardada (KLOTZ; MOSS, 1996) e baixa toxicidade aos mamíferos (QUARLES, 1996 *apud* KLOTZ et al., 1997b) reforçam as qualidades tóxicas do ácido bórico como inseticida.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1. Material

Para o presente trabalho foram realizadas coletas de favos de cria de *S. postica* no meliponário do Departamento de Biologia, UNESP - Rio Claro, os quais foram mantidos incubados em estufa para BOD, à temperatura de 28°C e umidade relativa de 70% (Figura 1). Após o 4º dia de incubação, operárias virgens recém-emergidas foram coletadas e acondicionadas em potes plásticos transparentes (11 x 7cm) previamente forradas com papel-filtro.



Figura 1: favos de cria mantidos em estufa para BOD

Para cada ensaio foram utilizadas 300 abelhas, assim divididas:

- 75 para o grupo controle (C);
- 75 para o grupo experimental com dieta contaminada com fipronil (F);
- 75 para o grupo experimental com dieta contaminada com ácido bórico

(A) e;

- 75 para o grupo com dieta contaminada apenas por solvente (CS).

As 75 abelhas empregadas para cada grupo, essas foram divididas em três potes plásticos transparentes contendo 25 abelhas cada, ou seja, para cada grupo (C, F, A, CS) foram realizadas 3 repetições (  $3 \times 25 = 75$  ).

Os experimentos foram conduzidos em estufa para BOD, à temperatura de 28°C e umidade relativa de 70%.

Durante a realização dos bioensaios, as abelhas do grupo controle receberam como alimento apenas cândi, preparada com 50g de açúcar de confeitiro e 10 mL de mel.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Teste de fornecimento de pasta cândi contaminada

Para facilitar a homogeneização, os compostos químicos, fipronil e ácido bórico, foram diluídos em acetona e posteriormente adicionados ao mel, utilizado para o preparo da pasta cândi. Para determinar a dosagem de cada composto utilizado nesse experimento, primeiramente, foi determinada a densidade da pasta cândi. O volume foi determinado de forma direta, colocando-se, em uma proveta de 250 mL, o volume de 100 mL de água. Uma alíquota de 130,5 g de pasta cândi foi envolvida com filme de PVC, para impedir a absorção de água e colocada dentro da proveta. Posteriormente, determinou-se o volume final e, por diferença entre os volumes finais e iniciais, determinou-se o volume da massa de pasta cândi, que foi de 90 mL. Com esse volume, calculou-se a dosagem de cada produto.

### 4.2.2. Bioensaio - tratamento com fipronil

Para a realização do bioensaio, foi preparada uma solução de fipronil diluído em acetona a 0,001% (m/v). Dessa solução foi utilizado 0,1 mL para 9,9 mL de acetona, totalizando 10 mL da solução de trabalho, cuja concentração resultou em 0,1 µg de fipronil por mL de acetona. Desta solução, foi aplicado 1 mL em 100g de cândi, resultando em uma dieta contendo 0,1 µg de fipronil por kg de alimento. Considerando a ingestão diária por abelha de 10 µg de

cândi/dia, determinado em ensaios anteriores, resulta em uma ingestão diária de 0,1ng fipronil/abelha/dia.

Após o início do bioensaio, as abelhas foram observadas diariamente e a taxa de mortalidade diária foi anotada para posterior análise estatística. O experimento procedeu até atingir 100% da mortalidade do grupo experimental e/ou 50% +1 de mortalidade do grupo controle.

#### **4.2.3. Bioensaio – tratamento com ácido bórico**

O ácido bórico (pó) foi incorporado a dieta alimentar, cândi, na concentração de 0,75% (m/m) o que resultou em uma ingestão diária de 0,75µg ácido bórico/abelha/dia.

Após o início do bioensaio, as abelhas foram observadas diariamente e a taxa de mortalidade diária anotada para posterior análise estatística. O experimento procedeu até atingir 100% da mortalidade do grupo experimental e/ou 50% +1 de mortalidade do grupo controle.

#### **4.2.3. Bioensaio – tratamento com solvente**

Para a realização dos ensaios utilizando fipronil e ácido bórico foi utilizado como solvente a acetona, assim fez-se necessário a realização de um ensaio utilizando as mesmas concentrações de acetona utilizadas nos outros testes. A acetona foi incorporada a dieta alimentar, cândi, nas concentrações de 10µl/abelha/dia para simular os testes com fipronil e 0,75% (v/m) para o teste com ácido bórico.

Após o início do bioensaio, as abelhas foram observadas diariamente e a taxa de mortalidade diária anotada para posterior análise estatística. O experimento procedeu até atingir 100% da mortalidade do grupo experimental e/ou 50% +1 de mortalidade do grupo controle.

#### **4.2.4. Análise morfológica por microscopia de luz**

Igualmente aos ensaios para determinação da curva de sobrevivência (bioensaio), foram realizados ensaios utilizando 300 abelhas, divididas em quatro grupos de 75 abelhas cada (C, F, A, CS). Durante a realização dos



bioensaios foi determinado o pico máximo de intoxicação (TL50), pois a partir desse momento a taxa de mortalidade é próxima a 50%, além de mudanças no comportamento, como aumento do batimento de asas, maior fotosensibilidade e grau de estresse, comparados ao grupo controle, indicando alto grau de intoxicação.

Para as análises morfológicas 40 abelhas de cada grupo experimental e de cada grupo controle foram coletadas no 4º dia de exposição crônica aos compostos e dissecadas à temperatura ambiente e pré-fixadas, durante a dissecação, pelo gotejamento de fixador apropriado. Após a remoção, os órgãos de interesse, corpo gorduroso da porção parietal e túbulos de Malpighi medianos, obtidos dos indivíduos de cada grupo (C, F, A, CS) foram imersos em fixadores específicos para a melhor preservação de proteínas (paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M - pH 7,4), polissacarídeos (Bouin aquoso) e cromatina (etanol:ácido acético – 3:1 v/v).

O material fixado foi posteriormente lavado em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4) e desidratado em uma série crescente de álcoois (70% a 100%) para embebição em resina, com ausência de catalisador, e inclusão em historesina contendo catalisador. As secções histológicas do corpo gorduroso e túbulos de Malpighi foram obtidas em micrótomo rotativo.

As secções seriadas histológicas de 5µm de espessura, obtidas por microtomia, foram estendidas sobre lâmina de vidro e secas em temperatura ambiente, com aproximadamente 10 secções por lâmina.

Posteriormente, algumas lâminas do material fixado em paraformaldeído foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H-E) para análise morfológica. As demais foram submetidas aos métodos histoquímicos específicos, tais como técnica do azul de bromofenol para detecção de proteínas totais (PEARSE, 1985), técnica do PAS/azul de Alcian para detecção de polissacarídeos ácidos e neutros (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983 e reação de Feulgen para análise do nível de compactação cromatínica (FEULGEN; ROSSENBECK, 1924). As lâminas dos diferentes indivíduos e dos grupos (experimentais e controle) foram submetidas juntas às colorações específicas.

Tanto para túbulos de Malpighi como para corpo gorduroso foram utilizadas secções histológicas de 120 abelhas adultas avaliadas para análise morfológica e 120 indivíduos foram avaliados histoquimicamente.

#### **4.2.5. Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão**

As abelhas foram dissecadas à temperatura ambiente e pré-fixadas, durante a dissecação, pelo gotejamento de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,4. Após a remoção, o corpo gorduroso e túbulos de Malpighi foram fixados na solução fixadora, por 2h, a temperatura ambiente, lavados no tampão do fixador e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, no mesmo tampão da solução fixadora, por 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi lavado em tampão cacodilato ou acetato de sódio (duas vezes de 5 minutos cada), contrastado em acetato de uranila 0,5% em solução aquosa (2 horas, à temperatura ambiente), desidratado em uma série de soluções de concentração crescente de acetona, embebido e incluído em resina Epon-Araldite.

O material incluído foi seccionado e os cortes semi-finos, com aproximadamente  $0,5\mu\text{m}$  de espessura, foram corados com mistura de azul de metileno 1% e azur II 1% em solução de borax 1%, para seleção dos melhores blocos. As secções ultrafinas desses blocos foram recolhidas em grades de cobre e contrastadas com solução saturada de acetato de uranila 2% em álcool e citrato de chumbo 0,4%. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão e documentadas em filme, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP de Rio Claro-SP.

## 5. RESULTADOS

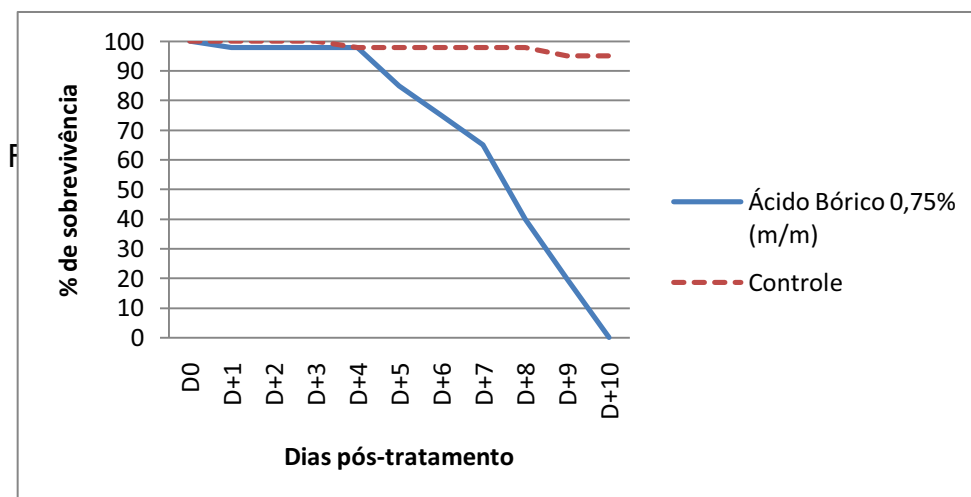
---

### 5.1. Bioensaios de Toxicidade

As análises estatísticas para o experimento de ingestão realizado com ácido bórico na concentração de 0,75% mostraram que os perfis de sobrevivência das abelhas que ingeriram a dieta contaminada foram significativamente diferentes ao perfil de sobrevivência apresentado pelo grupo controle ( $P < 0,0001$ ), conforme a Tabela 1. A Figura 2 mostra a curva de sobrevivência para o experimento de ingestão de ácido bórico. A mortalidade total do grupo experimental ocorreu no 10<sup>o</sup> dia após o início do bioensaio. Neste mesmo período ainda havia, aproximadamente, 95% de sobrevivência das abelhas do grupo controle.

**Tabela 1:** Resultado da análise estatística - Log Rank Test (COLLET, 1994).

<b>0,75% e Controle</b>	
Qui-quadrado (WL) =	293
Graus de liberdade =	1
(p) =	< 0.0001

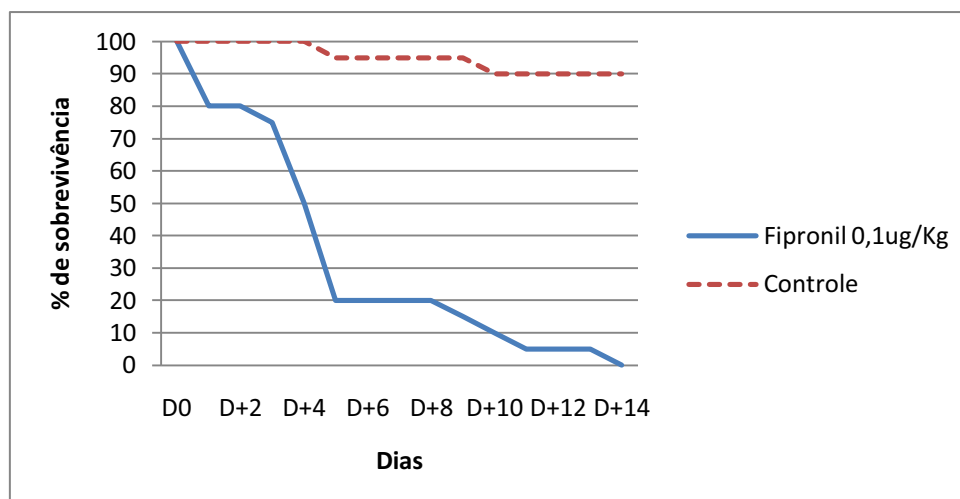


**Figura 2:** Gráfico mostrando a trajetória da sobrevivência das abelhas à ingestão de Ácido Bórico 0,75%.

Os resultados estatísticos obtidos a partir dos bioensaios para o experimento de ingestão de cândi contaminado na concentração de  $0,1\mu\text{g}/\text{Kg}$  de fipronil encontram-se na Tabela 2, onde o perfil de sobrevivência das abelhas que ingeriram cândi contaminado foram significativamente diferentes ao perfil de sobrevivência apresentado pelo grupo controle ( $p < 0,0001$ ). A mortalidade total do grupo experimental ocorreu no 14<sup>o</sup> dia após o início do bioensaio. Neste mesmo período ainda havia, aproximadamente, 90% de sobrevivência das abelhas do grupo controle, como mostrado na Figura 3.

**Tabela 2:** Resultado da análise estatística - Log Rank Test (COLLET, 1994).

0,1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ Cândia e Controle	
Qui-quadrado (WL) =	221
Graus de liberdade =	1
(p) =	< 0.0001



**Figura 3:** Gráfico mostrando a trajetória da sobrevivência das abelhas à ingestão de fipronil à 0,1µg/Kg.

Nos bioensaios utilizando a pasta cãndi com solvente, não foram observadas alterações significativas, tanto nos bioensaios de toxicidade como nas análises comportamentais, mostrando que a utilização de acetona como solvente dos inseticidas não causa alterações nos resultados.

## 5.2. Análise Morfológica por Microscopia de Luz

O procedimento metodológico para a análise dos resultados foi analisar o material de 30 indivíduos, para cada fixador de cada grupo experimental (inseticida) e 30 indivíduos, para cada fixador para os grupos controle e, a partir dessa análise qualitativa, estabeleceu-se um padrão morfológico e um padrão histoquímico para cada um desses grupos.

Para ambos os compostos químicos e concentrações, o tempo decorrido entre a aplicação do composto até o surgimento dos primeiros sinais visíveis de intoxicação foi de três dias de exposição crônica.

### 5.2.1. Túbulos de Malpighi

Morfologicamente, em relação ao grupo controle (tabela 3, figura 4 A), as alterações encontradas foram sutis, nos túbulos de Malpighi das abelhas tratadas com ácido bórico (figura 4 C) e fipronil (figura 4 E), exceto a aparente liberação de material celular para o lúmen, alguns núcleos picnóticos e bordo em escova mais evidente no grupo controle (figura 4 A).

As figuras 4C e E mostram túbulos de Malpighi típicos em cortes transversais e oblíquos. Comparado ao grupo controle, os indivíduos dos grupos experimentais tratados com ácido bórico apresentam túbulos de Malpighi com características morfológicas de degeneração. Na concentração de 0,75% de ácido bórico é possível visualizar áreas com alto grau de vacuolização no citoplasma celular e núcleos picnóticos (figura 4 C), vacuolização no citoplasma basal, além do acúmulo de material amorfo no lúmen deste órgão.

Comparado ao grupo controle e experimental com ácido bórico, o grupo experimental tratado com fipronil (figura 4 E), mostra o lúmen dos túbulos quase que, completamente, obstruído, o volume celular aumenta drasticamente. Nesse tratamento é possível visualizar áreas com alto grau de vacuolização no citoplasma celular, bem como acúmulo de material amorfo no lúmen, como observado no tratamento com ácido bórico.

### **5.2.2. Corpo Gorduroso**

A figura 4 (B, D e F) mostra os trofócitos, células com morfologia tipicamente de células de reserva, pois é possível observar vacúolos, em forma, tamanho e quantidades variáveis, predominante em toda a região citoplasmática. Os núcleos geralmente são esféricos e centrais em relação aos limites celulares, porém, algumas vezes os vacúolos chegam a comprimi-los contra a membrana plasmática deixando-os marginais. Esse fato deve-se ao acúmulo de substâncias no interior dos vacúolos dos trofócitos, gerando vacúolos coalescentes, ou seja, a fusão de um ou mais vacúolos, um vacúolo único, que acaba deslocando o núcleo para as porções mais periféricas das células, como observado nos grupos tratados com ácido bórico (figura 4 D) e fipronil (figura 4 F). Trofócitos modificados, tais como urócitos e trofócitos contendo depósitos de ferro, não foram encontrados no corpo gorduroso de *S. postica*.

Os enócitos apresentaram tamanho variável e estão dispersos entre os trofócitos, tanto na camada parietal como na visceral. As células apresentam limites celulares muito bem definidos, assim como, núcleo e citoplasma (figura

4 B). A região citoplasmática mostra-se acidófila e, diferentemente dos trofócitos não são evidenciadas vacuolizações, o que auxilia na comprovação de sua morfo-funcionalidade, na identificação desse tipo celular no órgão. No citoplasma dos enócitos não foram observadas nenhum tipo de concreções ou granulações, mostrando-se uma região morfológicamente homogênea, tanto no grupo controle, quanto nos grupos tratados. Os núcleos são centrais, heterocromáticos, muito evidentes e, em comparação ao citoplasma apresenta-se basófilo, com numerosos nucléolos.

### 5.3. Análise Histoquímica

Os resultados para as análises histoquímicas estão expressos nas tabelas 3 e 4.

Na reação de Feulgen, os túbulos de Malpighi de abelhas do grupo controle apresentaram células com núcleos levemente corados, evidenciando uma cromatina descondensada com uma fina granulação heterocromática uniformemente distribuída (figura 5 A). Já no grupo experimental (fipronil 0,1ng/abelha), os núcleos apareceram mais fortemente corados apresentando grandes grumos heterocromáticos, o que indica maior nível de compactação cromatínica em relação ao grupo controle, principalmente em núcleos picnóticos (figuras 5 C).

No corpo gorduroso a variação no grau de compactação cromatínica entre grupo controle (figuras 5 B) e os grupos experimentais tratados com fipronil (figura 5 D) e é muito sutil, pois há apenas poucos núcleos que apresentam cromatina mais condensada no grupo experimental.

Na detecção de proteínas pela técnica de azul de bromofenol, as células do túbulo de Malpighi do grupo experimental tratado com fipronil apresentaram uma distribuição quase que homogênea no citoplasma, com algumas regiões citoplasmáticas negativas (figura 6 C), diferindo do grupo controle (figura 6 A) e grupo experimental tratado com ácido bórico (figura 6 E), o qual apresenta essas regiões positivas à reação de azul de bromofenol, preferencialmente na região basal das células.

Neste mesmo teste histoquímico, o corpo gorduroso dos grupos experimentais (figuras 6 D e F) apresentou uma polarização quanto à

distribuição de proteínas, diferindo do grupo controle (figura 6B). Entretanto, há presença de áreas negativas ao Azul de Bromofenol, provavelmente são as áreas de vacúolos citoplasmáticos.

Nas células dos túbulos de Malpighi, tanto no grupo controle quanto no grupo experimental, nas quais foi empregada a técnica do PAS-Alcian Blue para detecção de glicoproteínas e polissacarídeos ácidos, pode ser evidenciada a presença de glicoproteínas nas regiões apicais das células, principalmente no bordo em escova (figura 7 A,C e E) e, adicionalmente, na membrana basal do túbulo. A região citoplasmática mostra-se com granulações mais evidentes no grupo experimental tratado com fipronil comparado ao grupo controle (figura 7 E). Em ambos os grupos, não foram evidenciados a presença de polissacarídeos ácidos.

No corpo gorduroso, o teste do PAS-Alcian, mostrou que apenas o citoplasma dos enócitos apresenta glicoproteínas, tanto para o grupo controle (figura 7 C) quanto para o grupo experimental tratado com ácido bórico (figura 7 D) e o grupo tratado com fipronil (figura 7 F).

#### **5.4. Análise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão**

As análises da microscopia eletrônica de transmissão tomaram como base os resultados obtidos pela microscopia de luz. Assim, apenas as características ultra-estruturais que adicionam informações relevantes aos resultados histológicos serão descritos.

##### **5.4.1. Fipronil - 0,1ng/abelha**

###### *5.4.1.1. Túbulos de Malpighi*

A ingestão crônica da dieta contendo fipronil causou alterações morfológicas no epitélio dos túbulos de Malpighi em relação ao grupo controle. A mudança mais evidente é intensa vacuolização do citoplasma, bem como, grânulos mineralizados exibindo concreções, com organização interna concêntrica e eletrondensidade distintas (figura 8 B), diferindo do grupo controle (figura 8 A), onde foram evidenciadas apenas as fases iniciais da formação de concreções desses grânulos.



Além disso, os núcleos (figura 8 D e E) apresentam-se com evaginações da membrana externa do envelope nuclear e o tamanho das regiões com cromatina eletrondensa aumenta, principalmente na periferia do envelope nuclear, ao contrário do observado em condições normais nos núcleos das células dos túbulos de Malpighi do grupo controle.

Destacam-se alterações nas microvilosidades (figura 8 G e H), que apresentam-se com a porção apical dilatada e intensa liberação de secreções para o lúmen do órgão. Quanto as organelas, comparadas ao grupo controle, as mitocôndrias (figura 8 M e N) mostram dilatação das membranas internas, bem como perda de ribossomos em cisternas dilatadas do retículo endoplasmático rugoso (figura 8 P e Q).

A membrana plasmática das células permaneceu íntegra, praticamente inalteradas, tanto nos grupos controle como experimentais, assim como a lâmina basal (figura 8 J e K).

#### *5.4.1.2. Corpo Gorduroso*

Ultraestruturalmente as células do corpo gorduroso do grupo experimental, tratado com fipronil (figura 9 B), apresentam alterações morfológicas em relação ao grupo controle (figura 9 A), tanto nos trofócitos como nos enócitos.

Quanto aos trofócitos a alteração morfológica mais evidente esta associada aos vacúolos, os quais se apresentam em quantidade e tamanho distintos, entre os grupos controle e tratado com fipronil. Apenas no grupo controle pode-se evidenciar a presença de reserva lipídica, no interior dos vacúolos, no grupo tratado com fipronil essa reserva não foi evidenciada (figura 9 D e E). Coalescência entre os vacúolos do grupo tratado com fipronil também foram observadas (figura 9 E).

Dentre as modificações encontradas nas organelas presentes nos trofócitos do corpo gorduroso, das abelhas tratadas com dieta contendo fipronil, destacam-se as mitocôndrias, que apresentam membranas internas dilatadas (figura 9 H). O retículo endoplasmático rugoso, assim como as cristas das mitocôndrias, apresenta cisternas dilatadas e intensa liberação de ribossomos (figura 9 K). Foram observados poliribossomos no citoplasma, concentrados próximos a membrana plasmática.

Os enócitos presente no grupo tratado com dieta contendo fipronil (figura 9 N) apresentam alterações morfológicas comparada ao grupo controle (figura 9 M), em relação à presença de vacúolos que estão presentes apenas nos enócitos do grupo tratado. Nesses vacúolos destaca-se a presença de material eletrondenso seu interior.

As organelas presentes nos enócitos do grupo experimental tratado com fipronil apresentam modificações quanto a quantidade de mitocôndrias encontradas, bem como retículo endoplasmático rugoso mostrando intensa dilatação de suas cisternas e a intensa quantidade de polirribossomos associados, indicando um aumento na atividade de síntese protéica no interior dessas células (figura 9 O e R).

Os núcleos dos enócitos apresentam-se com evaginações da membrana externa do envelope nuclear e regiões com cromatina eletrondensa são evidenciadas, principalmente na periferia do envelope nuclear, ao contrário do observado em condições normais nas células do corpo gorduroso do grupo controle (figura 9 P e Q).

#### **5.4.2. Ácido Bórico - 0,75%**

##### *5.4.2.1. Túbulos de Malpighi*

Ao contrário do observado em condições normais, grupo controle, as células dos túbulos de Malpighi do grupo experimental com ácido bórico (figura 8 C), apresentam alterações semelhantes ao observado para o grupo tratado com fipronil.

Quanto as alterações induzidas pelo ácido bórico nos túbulos de Malpighi, a alteração mais evidente é a intensa vacuolização do citoplasma, presença de grânulos exibindo concreções, com organização interna concêntrica, os núcleos com evaginações da membrana externa do envelope nuclear e regiões com cromatina eletrondensa aumentada.

As microvilosidades, como no tratamento com fipronil apresentam-se com a porção apical dilatada e intensa liberação de secreções para o lúmen do órgão (figura 8 I). As mitocôndrias também mostram dilatação, porém nas regiões das cristas (figura 8 O). Cisternas dilatadas do retículo endoplasmático

rugoso também são observadas, nas quais se observa perda de ribossomos (figura 8 R).

Semelhante ao grupo controle e nos grupos experimentais (fipronil e ácido bórico) a membrana plasmática permaneceu íntegra, bem como a lâmina basal e o envelope nuclear (figura 8 L).

#### 5.4.2.2. *Corpo Gorduroso*

Assim como túbulos de Malpighi, as células do corpo gorduroso do grupo experimental com ácido bórico apresentam alterações semelhantes ao observado para o grupo tratado com fipronil.

Quanto aos trofócitos, assim como no grupo tratado com fipronil, difere do grupo controle quanto a quantidade e tamanho dos vacúolos encontrados na região citoplasmática, assim como coalescência entre esses vacúolos e a presença de material no seu interior (figura 9 F)

Dentre as modificações encontradas nas organelas, destacam-se a presença de mitocôndrias com cristas dilatadas (figura 9 I), retículo endoplasmático rugoso com intensa liberação de ribossomos e cisternas dilatadas, bem como a presença de polirribossomos no citoplasma (figura 9 L)

Nos enócitos do corpo gorduroso do grupo tratado com ácido bórico destaca-se a presença de vacúolos autofágicos, retículo endoplasmático liso evidente, bem como mitocôndrias concentradas na porção apical das células.

O núcleo tanto nos enócitos quanto trofócitos apresenta intensa cromatina eletrondensa e nucléolo evidente, o envelope celular apresenta-se íntegro, porém, com evaginações.

Semelhante ao grupo controle e grupos experimentais (fipronil e ácido bórico) a membrana plasmática permaneceu íntegra, bem como a lâmina basal e o envelope nuclear.

**Tabela 3:** Testes histoquímicos aplicados nos túbulos de Malpighi de *S. postica* tratadas com dieta contaminada pelos compostos químicos Fipronil e Ácido Bórico.

		<b>Controle</b>	<b>Fipronil 0,1 ng/abelha</b>	<b>Ácido Bórico 0,75 µg/abelha</b>
<b>Azul de Bromofenol</b>	Núcleo	++	+++	+++
	Citoplasma	+	++	++
	Lúmem	-	-	-
<b>PAS/Alician Blue</b>	Núcleo	-	-	-
	Citoplasma	+	+	+
	Lúmem	-	-	-
<b>Feulgen</b>	Núcleo	+	+++	/
	Citoplasma	-	-	/
	Lúmem	-	-	/

( - ) Ausência; ( + ) Presença/intensidade; ( / ) Não identificado.

**Tabela 4:** Testes histoquímicos aplicados nos corpo gorduroso de *S. postica* tratadas com dieta contaminada pelos compostos químicos Fipronil e Ácido Bórico.

		Controle		Fipronil 0,1 ng/abelha		Ácido Bórico 0,75 µg/abelha	
		Trofócitos	Enócitos	Trofócitos	Enócitos	Trofócitos	Enócitos
Azul de Bromofenol	Núcleo	+++	+++	+++	++	+++	++
	Citoplasma	+	+	+	+	+	-
	Vacúolos	-	-	-	-	-	-
PAS/Alcian Blue	Núcleo	-	-	-	-	-	-
	Citoplasma	-	+	-	+	-	+
	Vacúolos	-	-	-	-	-	-
Feulgen	Núcleo	++	++	+++	+++	/	/
	Citoplasma	-	-	-	-	/	/
	Vacúolos	-	-	-	-	/	/

(-) Ausência; (+) Presença/intensidade; (/) Não identificado.

**Tabela 5:** Alterações ultraestruturais nos túbulos de Malpighi de *S.postica* tratadas com dieta contaminada pelos compostos químicos Fipronil e Ácido Bórico.

	<b>Controle</b>	<b>Fipronil 0,1 ng/abelha</b>	<b>Ácido Bórico 0,75 µg/abelha</b>
Vacuolização citoplasmática	+	+++	+++
Grânulos mineralizados/ concreções	+	++	++
Alteração no envoltório nuclear	-	+++	+++
Alteração na microvilosidades	-	++ (↑d)	++ (↑d)
Eliminação de secreções das micovilosidades para o lúmen	-	++	++
Alterações nas organelas (retículo endoplasmático)	-	+ (↑d)	+ (↑d)
Alterações nas organelas (Mitocôndrias)	-	++	++
Nível de compactação da cromatina	+	+++	+++
Alteração na membrana plasmática	-	-	-
Alteração na lâmina basal e invaginações basais	-	-	-

(-) Ausência; (+) Presença/intensidade; (d) dilatação; (↑) aumento em relação ao controle.

**Tabela 6:** Alterações ultraestruturais no corpo gorduroso de *S.postica* tratadas com dieta contaminada pelos compostos químicos Fipronil 0,1ng/abelha e Ácido Bórico 0,75 µg/abelha.

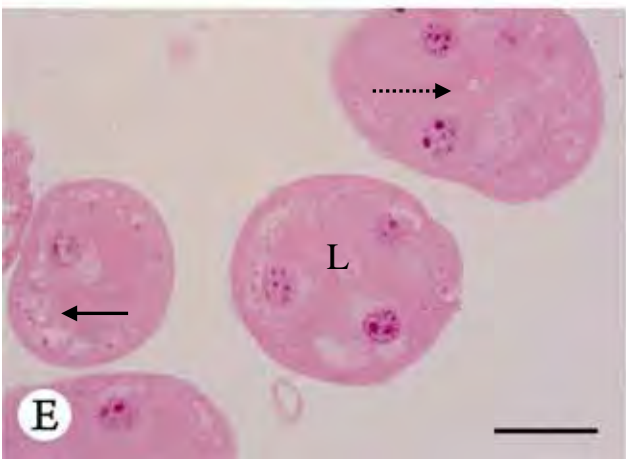
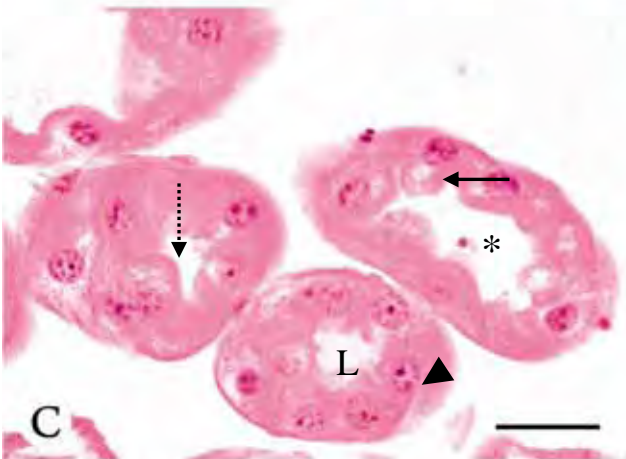
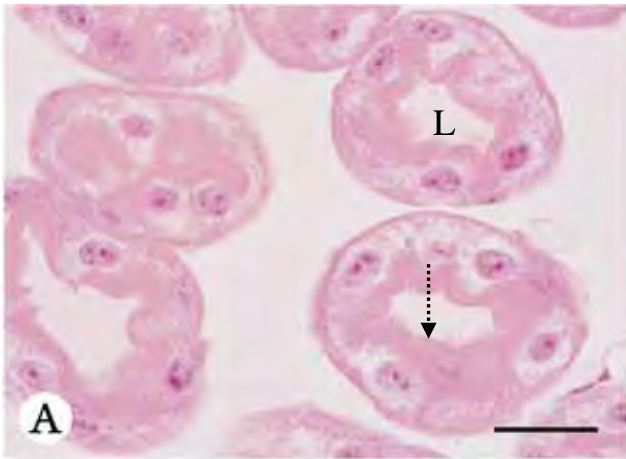
	Controle		Fipronil 0,1 ng/abelha		Ácido Bórico 0,75 µg/abelha	
	Trofócitos	Enócitos	Trofócitos	Enócitos	Trofócitos	Enócitos
Vacuolização no citoplasma	+	-	++	-	++	-
Reserva lipídica no interior dos vacúolos	+++	-	-	-	-	-
Coalescência vacuolar	-	-	+++	-	+++	-
Alteração no envoltório nuclear	-	-	++	++	++	++
Variação na eletrondensidade cromatínica	+	+	+++	+++	+++	+++
Polirribossomos	+	-	+++	-	+++	-
Alterações nas organelas (retículo endoplasmático)	-	-	++(↑d)	+(↑d)	++(↑d)	+(↑d)
Alterações nas organelas (mitocôndrias)	-	-	++(↑d)	++(↑d)	++(↑d)	++(↑d)
Variação na eletrondensidade das mitocôndrias	+	+	+++	+++	+++	+++

(-) Ausência; (+) Presença/intensidade; (d) dilatação; (↑) aumento em relação ao controle.

**Figura 4:** Secções histológicas coradas com H-E. Comparação morfológica entre túbulos de Malpighi medianos de abelhas do grupo controle (**A**), tratadas cronicamente com ácido bórico a 0,75% (**C**), tratadas com 0,1ng/abelha de fipronil (**E**). Observam-se bordo em escova (seta tracejada) indícios de eliminação de conteúdo celular (\*) para o lúmen (L), alguns núcleos picnóticos (cabeça de seta) e vacuolização citoplasmática (seta) nos túbulos de Malpighi de abelhas tratadas.

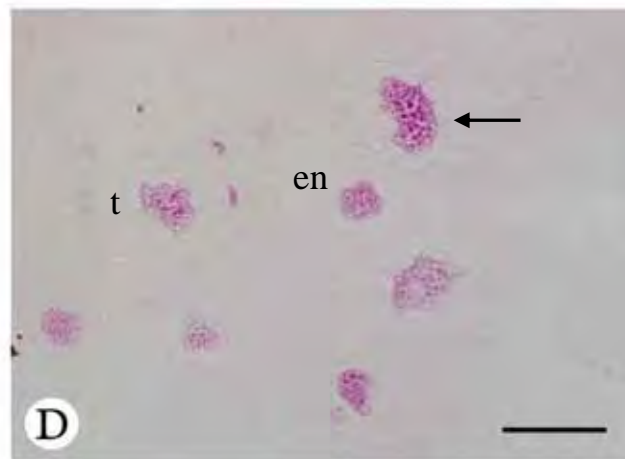
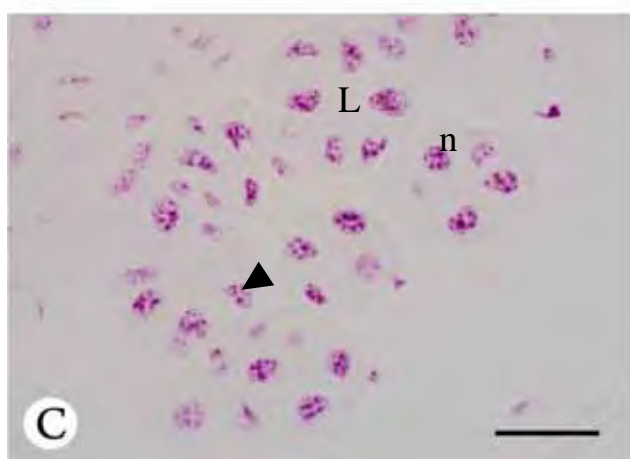
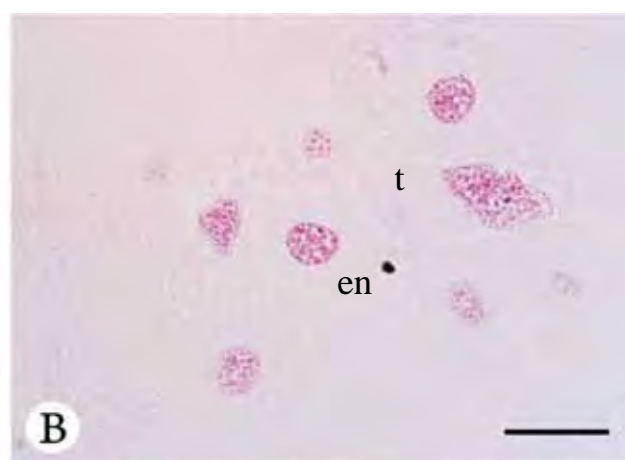
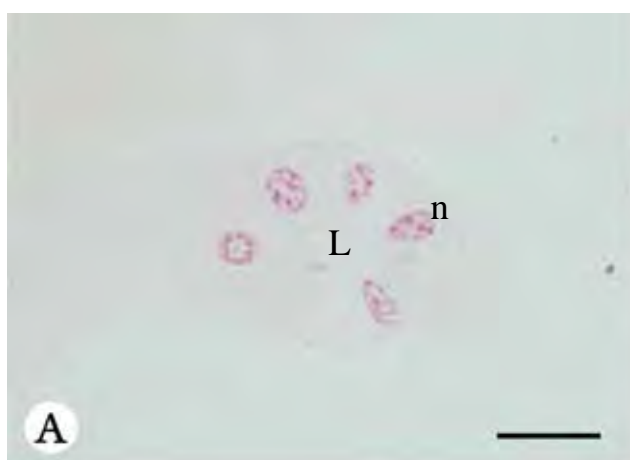
Comparação entre o corpo gorduroso de abelhas do grupo controle (**B**), tratadas com ácido bórico a 0,75% (**D**) e tratadas com 0,1ng/abelha de fipronil (**F**). Disposição de trofócitos (t) e enócitos (en). Note intensa coalescência vacuolar (\*), núcleo dos trofócitos com aparente ramificação (seta), núcleos picnóticos (cabeça de seta). Barras: 10 µm.





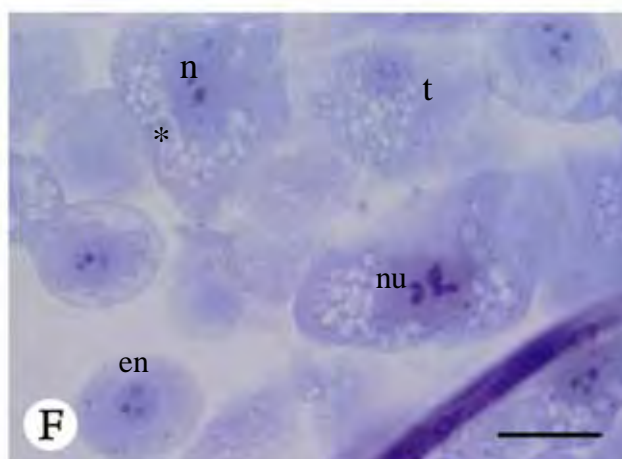
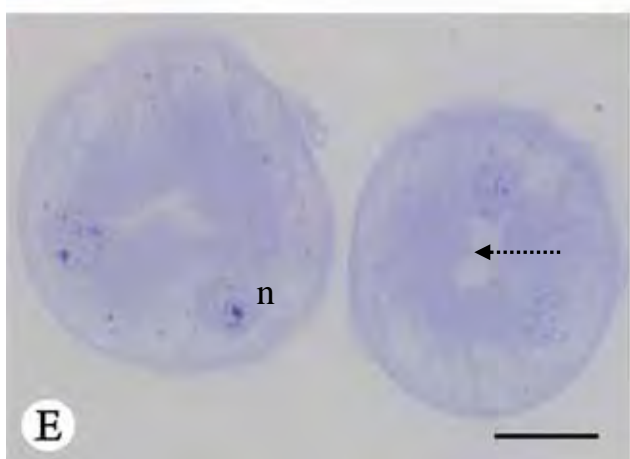
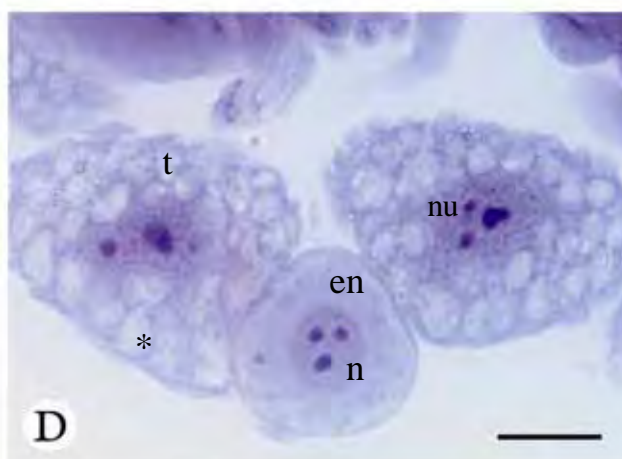
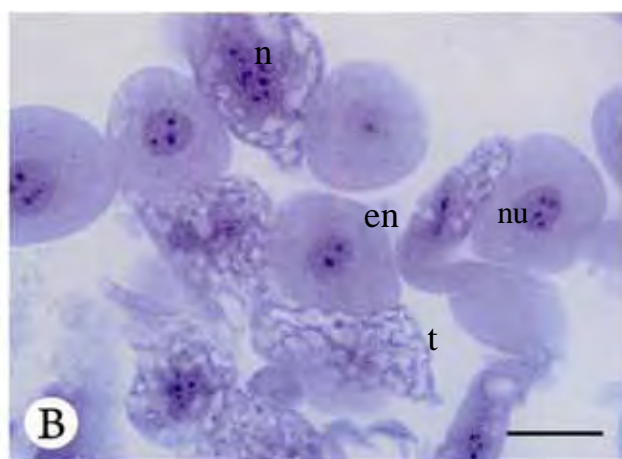
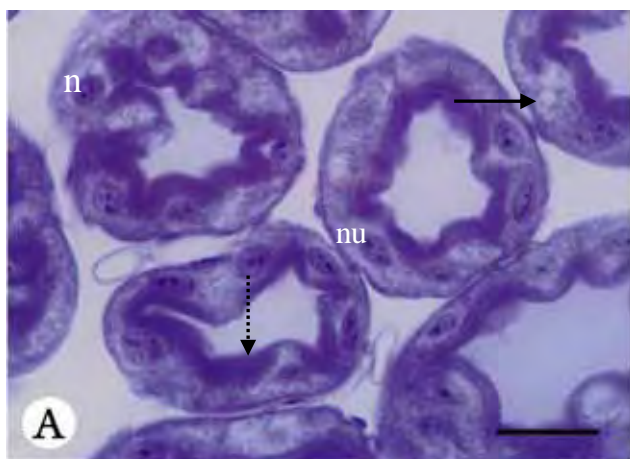
**Figura 5:** Teste histoquímico: Reação de Feulgen em túbulos de Malpighi de *S. postica*. **A** - Órgão de abelha do grupo controle mostrando núcleos (n) levemente corados. **C** - Túbulos de abelhas tratadas com fipronil (0,1ng/abelha). Observam-se núcleos picnóticos (cabeça de seta) e lúmen (L).

Testes histoquímicos pela reação de Feulgen no corpo gorduroso de *S. postica*. **B** - Órgão de abelhas do grupo controle. **D** órgão de abelhas tratadas cronicamente com fipronil (0,1ng/abelha). Observam-se trofócitos (t), enócitos (en) mostrando poucos núcleos com cromatina mais condensada (seta) em relação aos núcleos das células do grupo controle. Barra: 10  $\mu$ m.



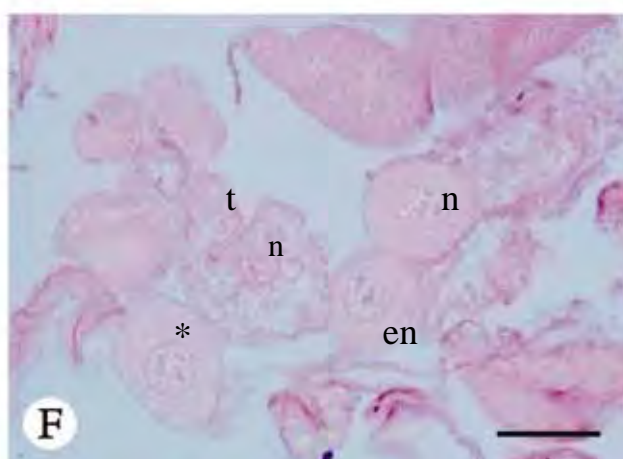
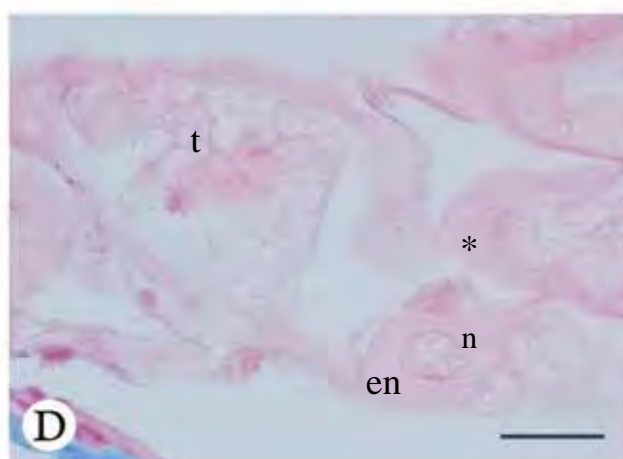
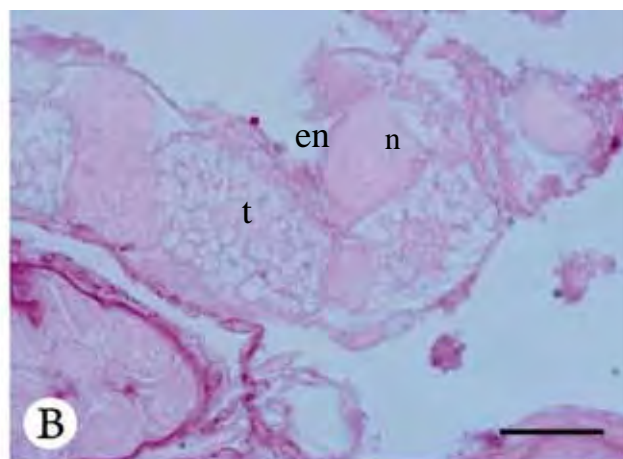
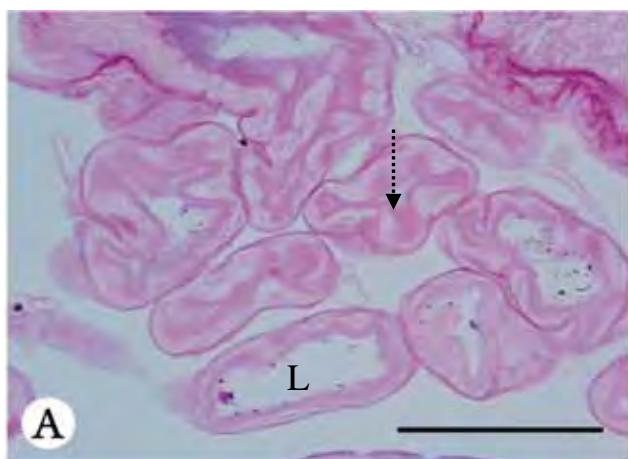
**Figura 6:** Secções histológicas coradas com Azul de Bromofenol. Comparação morfológica entre túbulos de Malpighi de abelhas do grupo controle (**A**), tratado cronicamente com ácido bórico a 0,75% (**C**) e tratadas com 0,1ng/abelha de fipronil (**E**). Pode-se observar bordo em escova (seta tracejada) indícios de vacuolização citoplasmática (seta) e núcleos (n) com vários nucléolos (nu).

Testes histoquímicos pela reação do Azul de Bromofenol no corpo gorduroso de *S. postica*. Órgão de abelhas do grupo controle (**A**), tratado com ácido bórico a 0,75% (**C**) e tratadas com 0,1ng/abelha de fipronil (**F**). Observam-se trofócitos (t), enócitos (en) mostrando núcleos com cromatina mais condensada (n) e nucléolos evidentes (nu) em relação aos núcleos das células do grupo controle e coalescência vacuolar (\*). Barra: 10 µm.



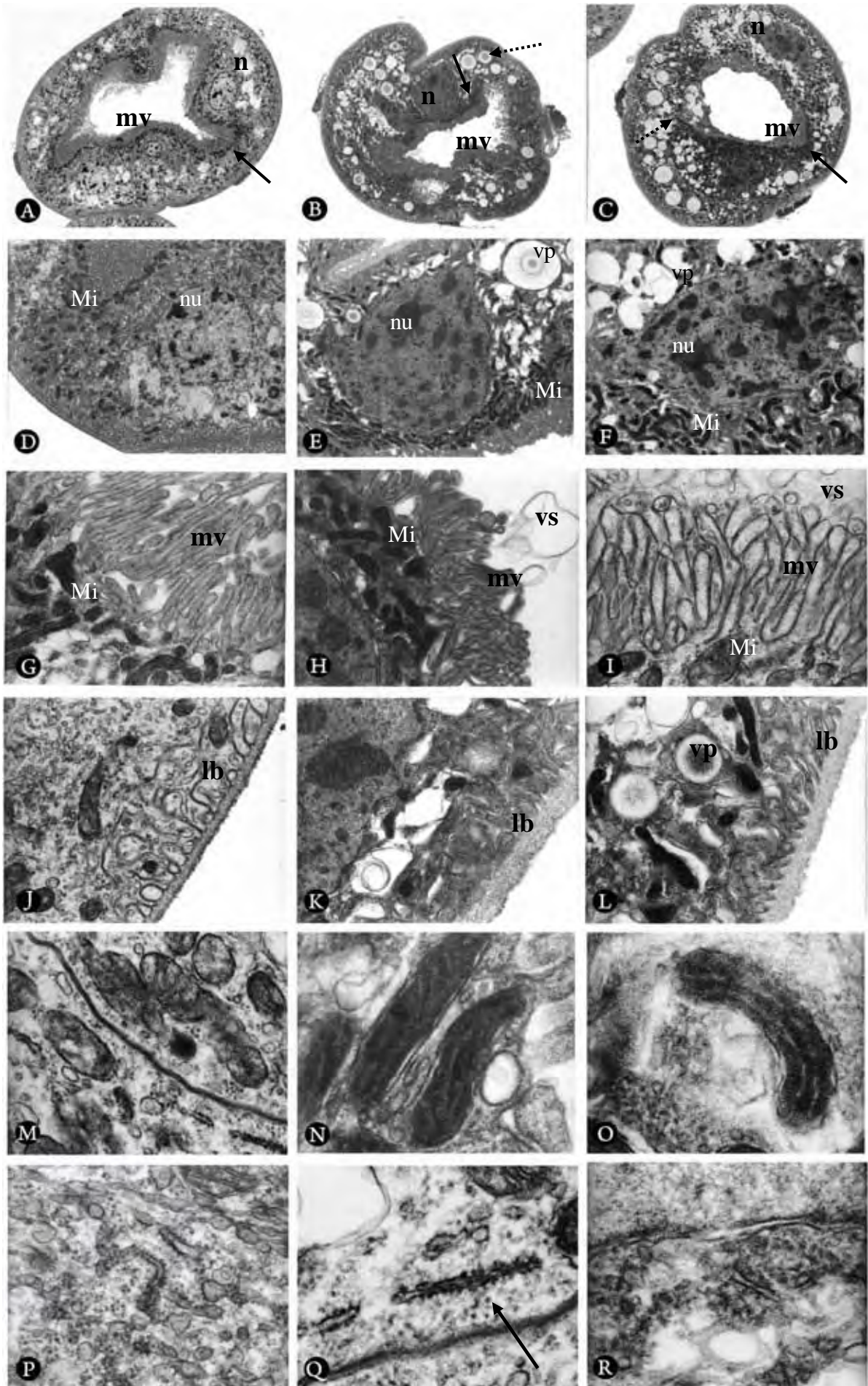
**Figura 7:** Teste histoquímico: PAS-Alcian Blue em túbulos de Malpighi de *S. postica* do grupo controle (**A**), tratado com ácido bórico a 0,75% (**C**) e tratadas com 0,1ng/abelha de fipronil (**E**). Nota-se núcleos (n) levemente corados, bordo em escova (seta tracejada), lúmen (L), granulações citoplasmática (\*). Barras: 10 µm.

Testes histoquímicos pela reação PAS-Alcian Blue no corpo gorduroso de *S. postica* do grupo controle (**B**), tratado com ácido bórico a 0,75% (**D**) e tratadas com 0,1ng/abelha de fipronil (**F**). Observam-se trofócitos (t), enócitos (en), ambos com núcleo (n) levemente corados, indícios de granulações citoplasmáticas (\*). Barra: 10 µm.

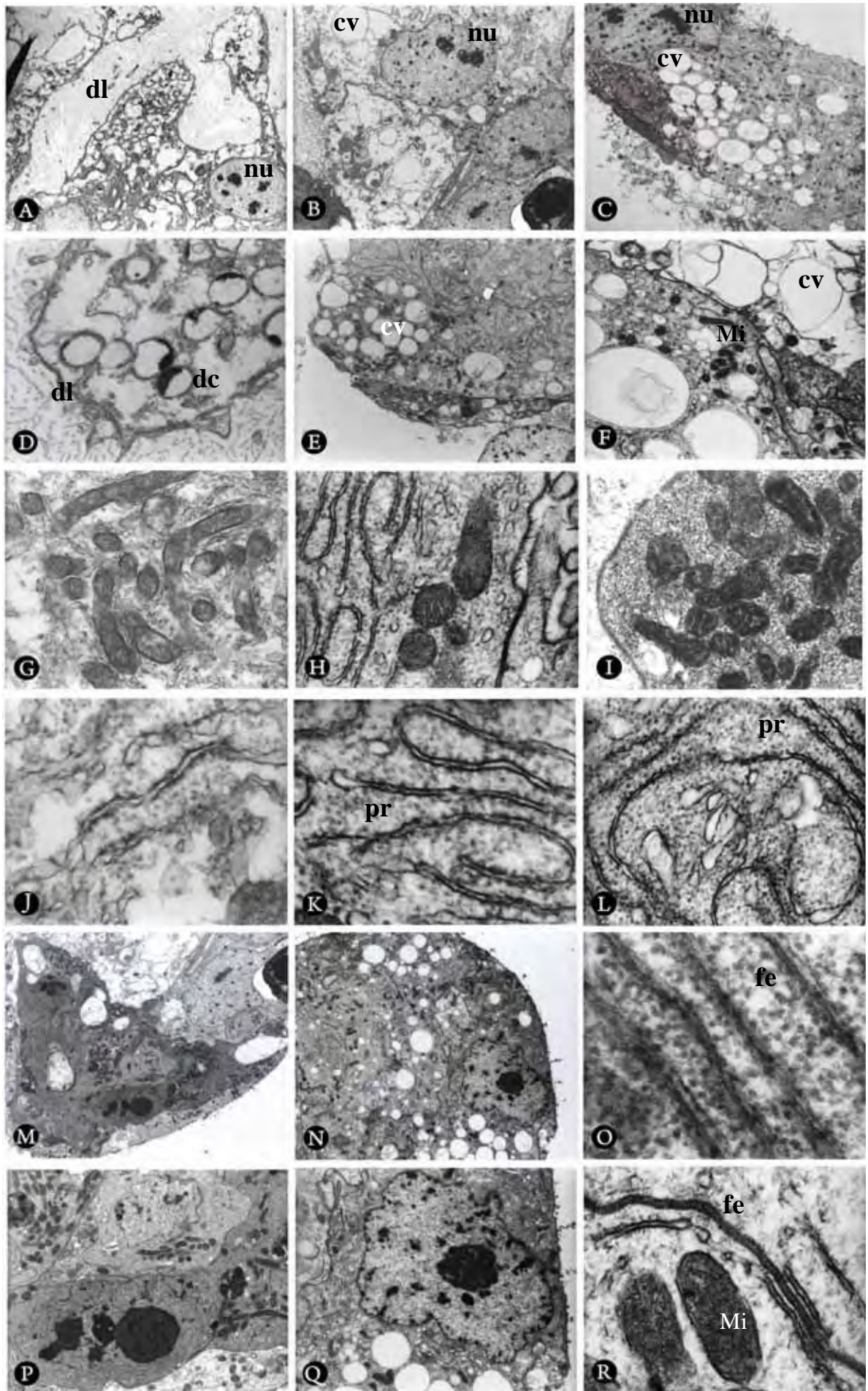


**Figura 8:** Eletromicrografia de transmissão dos túbulos de Malpighi de *S. postica*. **(A,D,G,J, M e P)** Grupo Controle, **(B,E,H,K, N e Q)** Grupo Experimental tratado cronicamente com Fipronil, **(C,F,I,L, O e R)** Grupo Experimental tratado com Ácido Bórico. **(A-C)** mostrando disposição das microvilosidades (mv), mitocôndrias em maior concentração na porção apical (seta) e com variação de eletrondensidade, núcleos íntegros (n). Note a presença de vacúolos concêntricos e áreas com citoplasma vacuolizado (seta tracejada). Aumento: 600x. **(D-F)** Detalhe dos núcleos localizados na porção central das células, nucléolos (nu), cromatina com eletrondensidade e compactação variada, envelope nuclear com expansões, vacúolos com aparente deposição protéica (vp) e mitocôndrias (Mi). Aumento: 2.500x **(G-I)** Porção apical dos túbulos de Malpighi mostrando mitocôndrias (Mi) associadas as microvilosidades (mv). Note porção apical das microvilosidades dilatadas, vesículas de secreção (vs). Aumento: 10.500x **(J-L)** Porção basal das células dos túbulos mostrando o labirinto basal (lb) e vacúolos com deposição protéica (vp). Aumento: 10.500x **(M-O)** Detalhe das mitocôndrias. Note dilatação das cristas. **(P-R)** Detalhe do Retículo Endoplasmático Rugoso, com aparente liberação de ribossomos (seta). Aumento: 21.500x.





**Figura 9:** Eletromicrografia de transmissão do Corpo Gorduroso de *S. Potica*. **(A,D,G e J)** Trofócitos Grupo Controle, **(B,E,H e K)** Trofócitos Grupo Experimental tratado cronicamente com Fipronil, **(C,F,I e L)** Trofócitos Grupo Experimental tratado com Ácido Bórico. **(A-C)** Trofócitos mostrando núcleos regulares com vários nucléolos (nu), cromatina pouco condensada. Note a coalescência vacuolar (cv), vacúolos com depósitos lipídicos (dl). Aumento: 550x. **(D-F)** Detalhe dos vacúolos dos trofócitos, mostrando coalescência vacuolar (cv), vacúolos com depósito de cálcio (dc) mitocôndrias (Mi) e vacúolos com depósitos lipídicos (dl). Aumento: 4.800x. **(G-I)** Alterações mitocondriais em nos trofócitos, G. mitocôndrias regulares, H e I. mitocôndrias apresentando cristas. Aumento: 13.500x **(J-L)** Detalhe do Retículo Endoplasmático Rugoso dos trofócitos. Note cisternas dilatadas e grande acúmulo de polirribossomos no citoplasma (pr). Aumento 31.000x. **(M, P e O)** Enócito Grupo Controle, **(N,Q e R)** Enócito Grupos Experimentais (Fipronil/Ácido Bórico). **(M e P)** Eletromicrografia mostrando enócitos com limite celular com expansões e associados a trofócitos, núcleo regular com vários nucléolos (nu). Aumento: 2.900x **(N e Q)** Enócito apresentando alguns vacúolos, núcleo (n) irregular, com envelope nuclear apresentando expansões. Aumento: 12.500x e 31.500x respectivamente. **(R)** Detalhe Retículo Endoplasmático Rugoso, mostrando liberação de ribossomos para o citoplasma. Detalhe Retículo Endoplasmático com depósito de ferro (fe) no seu interior. Note mitocôndria (Mi) com cristas alteradas. Aumento: 21.500x



## 6. DISCUSSÃO

---

Os resultados do presente estudo refletem a importância da utilização dos bioensaios de toxicidade combinada com a análise morfológica dos órgãos de abelhas expostos cronicamente a inseticidas. Os bioensaios in vitro revelaram que as doses utilizadas de ácido bórico e o fipronil, mostram-se subletais, uma vez que a taxa de sobrevivência foi maior que 50% em 48 horas, conduzindo, portanto, a efeitos crônicos.

A análise dos dados dos bioensaios com ácido bórico e fipronil revelou que o fipronil atingiu 50% de mortalidade, mais rápido do que o ácido bórico. A mortalidade atingiu 100% no 14º dia para os testes com fipronil e no 10º dia para os testes com ácido bórico. Hooper-Biu; Rust (2000) utilizaram-se destes mesmos dois compostos para testar sua toxicidade em colônias de formigas *Linepithema humile*, obtendo 100% de mortalidade das operárias e rainhas em 14 dias de exposição às iscas com fipronil ( $1 \times 10^{-5}\%$ ) ou ácido bórico (0,5%). Um trabalho semelhante foi realizado por Ulloa-Chacón (2003), em formigas da espécie *Tapinoma melanocephalum* com uma concentração mais alta de fipronil (0,05%), no qual dentro de uma semana o fipronil causou mortalidade total das operárias, rainhas e crias em colônias de formigas, enquanto que o ácido bórico (0,5%) levou três semanas para obter o mesmo efeito. Desse modo, verificamos que a toxicidade de ambos pesticidas é similar em formigas e em abelhas, já que os dois insetos apresentam uma sensibilidade muito

maior ao fipronil que ao ácido bórico, embora este também apresente uma toxicidade drástica, porém de efeito retardado, nestas espécies.

Segundo avaliações da NPTN (2006), o ácido bórico é classificado como não tóxico para as abelhas, porém para outros insetos mostrou-se tóxico, causando alteração principalmente no sistema digestório desses insetos (EISLER, 1990). A concentração do ácido bórico utilizada tomou como base em formulações de inseticidas já comercializados.

O tratamento de *S. postica* com dieta contendo ácido bórico a 0,75% m/m, evidenciou que nessa concentração o princípio ativo provoca alterações morfológicas no corpo gorduroso e túbulos de Malpighi. Klotz et al.(1997) relataram que as concentrações 0,25; 0,5; 0,75 e 1% de ácido bórico causam redução de 90% no tamanho das colônias de formigas tratadas. Este composto também pode ser encontrado naturalmente em ambientes aquáticos em concentrações relativamente baixas (até 5,5mg/litro), porém estas concentrações podem ser bem maiores nas proximidades de indústrias ou culturas irrigadas com este composto (EISLER, 1990).

A concentração utilizada de fipronil no bioensaio destinado à análise morfológica, correspondente a 0,1ng/abelha/dia, foi baseado em trabalhos prévios, destinados a analisar efeitos causados por exposição crônica à dose subletal desse inseticida em *A. mellifera*, bem como avaliar os testes comportamentais dos efeitos causados por esse inseticida (EL HASSANI et al., 2005; DECOURTYE, 2005; BARBARA, 2005, JESUS, 2008).

El Hassani et al (2005), mostrou que pequenas doses de fipronil (0,1; 0,5 e 1 ng/abelha) oferecidas às abelhas, embora não tenha afetado a atividade locomotora, afetou a sensibilidade à sacarose, a memória e o processo de aprendizagem em *A. mellifera*. Decourtye (2005) comparou a capacidade olfativa das abelhas *A. mellifera* que receberam alimento contaminado com doses subletais de alguns inseticidas e observou que a ingestão de fipronil, nas doses de 0,75 e 0,15ng por abelha e por dia, afetou a capacidade olfativa deste inseto. Barbara (2005) mostrou resultado semelhante, sugerindo que o efeito bloqueador de GABA seja decorrente de cloro na região do lobo antenal no cérebro da abelha, responsável pela percepção olfativa.

A concentração utilizada para o teste de toxicidade, correspondente 0,1µg do composto químico por quilo do alimento. Esse tratamento resultou na mortalidade total das abelhas em 14 dias, fato que se contrapõem ao trabalho de Colin (2004), em *A. mellifera* alimentadas durante 10 dias, com um xarope contaminado a 0,01µg de fipronil por quilo do alimento, sofreram uma mortalidade de 10 a 65% dos indivíduos, no mesmo período, refletindo uma dose-resposta diferente entre as espécies.

Os dados deste trabalho corroboram com a hipótese de que a intoxicação por inseticidas seja uma das várias causas da CCD (Colony Collapse Disorder), responsável por perdas de colônias que chegaram a 40% nos Estados Unidos.

Chauzat et al (2006) mostraram que o fipronil pode facilmente ser encontrado nos apiários, onde os autores analisaram, durante três anos consecutivos, amostras de pólen coletado por *A. mellifera*. Dentre as amostras analisadas cerca de 12,4% estavam contaminadas por fipronil e apenas 12,3% das amostras não havia contaminação por nenhum resíduo tóxico. Em um estudo semelhante, Colin (2004) também realizou análises de presença de inseticidas em amostras de pólen na França e detectou que cerca de 65% do pólen de girassol e milho possuem valores compreendidos entre 0,02 a 2µg de fipronil/kg.

Embora não haja estudos que relatem a ocorrência da bioacumulação de fipronil em insetos, acredita-se que esta seja uma das explicações mais coerentes para a interpretação do comportamento da curva de sobrevivência das abelhas expostas ao fipronil apresentada neste trabalho. Destaca-se a baixa taxa de mortalidade nos primeiros dois dias, período em que também não foram observados sinais de intoxicação.

Com base nos dados obtidos no presente trabalho, sugere-se que a contínua ingestão de alimento contaminado e a ineficiência na eliminação total do composto, seja por processos de desintoxicação ou por excreção, aumentaria a sua concentração no corpo do animal, o que potencializa seu efeito tóxico.

A exposição crônica pode ter permitido, inicialmente, às abelhas tentarem se adaptar fisiologicamente à ação do inseticida, fato suportado pelo

acúmulo de vesículas com arranjos protéicos no citoplasma dos túbulos de Malpighi, porém esta adaptação não foi suficiente para suportar o período de exposição ao composto químico e impedir o progresso dos efeitos tóxicos nas células. Análises imuno-histoquímica da expressão de proteínas de estresse celular, conhecidas também como proteínas de choque térmico (HSPs), estão sendo realizadas no ventrículo de *A. mellifera* e *S. postica* expostas cronicamente ao fipronil (Silva-Zacarin et al., dados não publicados) e poderão fornecer subsídios para reforçar ou refutar a hipótese.

Sabe-se que mesmo em doses muito baixas, alguns compostos tóxicos causam efeitos na fisiologia e comportamento das abelhas (CHAUZAT, 2006). Em seu trabalho, Chauzat (2006) discute sobre os valores de DL50 e menciona que estes não são suficientes para esclarecer os diversos efeitos subletais de um determinado pesticida. Desse modo, além dos testes de toxicidade, mais esforços devem ser dispensados nos estudos toxicológicos em abelhas, utilizando várias ferramentas, para complementar as lacunas existentes.

A análise morfológica dos órgãos é uma dessas ferramentas e pode ser inserida neste contexto, já que pouco se sabe sobre as vias de ativação de morte celular em tecidos e órgãos de insetos em resposta a agentes estressores ambientais (MALASPINA & SILVA-ZACARIN, 2006).

Os resultados das análises morfológicas revelam que o composto fipronil na concentração de 0,1 ng/abelha/dia e ácido bórico na concentração de 0,75 µg/abelha/dia, provocam alterações morfológicas drásticas se comparadas ao grupo controle, porém, se comparadas entre si, os compostos apresentam alterações similares. A essas alterações não podemos descartar a ação dos metabólitos, produzidos a partir da quebra das moléculas do princípio ativo dos compostos testados no processo de digestão e/ou metabolização no corpo da abelha.

O processo de desintoxicação e eliminação de compostos potencialmente tóxico aos insetos ligado aos túbulos de Malpighi, os quais agem ativamente nesse processo excreção (HABIB, 2003). A maneira do como ocorre a excreção de compostos potencialmente prejudiciais aos túbulos de Malpighi de abelhas ainda é uma questão a ser elucidada. Os dados obtidos neste trabalho não mostram claramente este processo, mas sugere que ela

ocorra através das microvilosidades, assim como relatado por Jesus (2008) em túbulos de Malpighi de *A. mellifera* e por Cruz-Landim (1998) em túbulos de Malpighi de *M. quadrifasciata*, que a autora interpreta como característica típica dessas células. Características semelhantes foram encontradas na secreção em glândulas salivares larvais de *P. villosa* por Zara e Caetano (2002), propondo ser esta via de liberação de secreção neste órgão.

Ultra-estruturalmente, nos grupos experimentais fipronil e ácido bórico podem ser observados vacúolos autofágicos, no citoplasma. Isto sugere que inicialmente a célula passou por uma fase autofágica, a qual não necessariamente pode culminar em morte celular (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004), já que é um processo fisiológico normal a fim de ter um turnover (reciclagem) de muitas proteínas e organelas celulares (YOSHIMORI, 2004). Em situação de estresse permanente, a célula pode ser totalmente degenerada por macroautofagia ou desencadear a apoptose (LOCKSHIN e ZAKERI, 2004).

Um aspecto a ser considerado na análise das células dos túbulos de Malpighi é a presença de esferocristais de eletron densidade variada, tanto nos tratamentos com fipronil como com ácido bórico. Segundo Olavarrieta (2000), essas vesículas representam esferocristais (ou grânulos mineralizados) em diferentes fases de formação e o acúmulo desses no interior do citoplasma indica alta atividade de excreção, uma vez que essas vesículas são constituídas de restos metabólicos filtrados a partir da hemolinfa (SUMIDA, 2010). Estes grânulos são características não só dos túbulos de Malpighi, mas também de algumas células do epitélio do intestino médio (CAETANO; CRUZ-LANDIM, 1983).

Nos túbulos de Malpighi em ambos os tratamentos (fipronil e ácido bórico) foram observadas esferocristais com ou sem concreções formando os anéis eletron densos, em diferentes estágios de organização. Ao longo da progressão dos estágios de modificações morfológicas dos grânulos mineralizados, nota-se a formação de figuras mielínicas, sendo que o acúmulo dessas estruturas na célula é observado nos estágios iniciais de morte celular no intestino e túbulos de Malpighi de *A. s. rubropilosa* (SUMIDA et al., 2010). Ao contrário que, nas formigas tratadas com ácido bórico, a quantidade



desses grânulos nos túbulos de Malpighi decresceu drasticamente, sugerindo comprometimento do processo de excreção (SUMIDA et al., 2010).

No presente trabalho, a quantidade de grânulos nos grupos experimentais foi muito maior do que aquela observada no grupo controle, onde eles estavam em fase inicial de formação, refletindo a tentativa das células dos túbulos de Malpighi em potencializar a inativação dos compostos químicos tóxicos filtrados a partir da hemolinfa. Este fato pode indicar estágios iniciais de morte celular, formando figuras mielínicas que poderiam ser uma progressão das alterações morfológicas das concreções, como observado no intestino e túbulos de Malpighi de *S. A. rubropilosa* por Sumida (2010).

Quanto as microvilosidades em todos os grupos experimentais, houve a intensificação da dilatação das microvilosidades, fato que indica haver uma tentativa das células deste órgão em intensificar o processo de excreção a fim de eliminar o agente químico da hemolinfa, como observado em *A. mellifera* por Jesus (2008).

Em nenhum grupo analisado foi constatada alterações evidentes na lâmina basal dos túbulos de Malpighi, bem como variações na quantidade e profundidade das invaginações da membrana basal em relação ao grupo controle, o que poderia ser esperado já que estas estruturas promovem maior contato com a hemolinfa e desse modo otimiza a captação de substâncias contidas na mesma (CRUZ-LANDIM, 1995).

Embora algumas características indicativas de início do processo de morte celular tenham sido observadas, as células permanecem metabolicamente ativas nos processos de excreção e inativação dos compostos químicos evidenciados, respectivamente, pela presença de dilatação apical das microvilosidades e grande aumento na quantidade e grau de organização dos grânulos mineralizados. Diante destas evidências, sugere-se que os indícios de início de morte celular das células do túbulo de Malpighi sejam relacionados à morte celular programada, induzida pelos compostos químicos testados, uma vez que não foram constatados eventos típicos de necrose, como ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citoplasmático (GOLSTEIN; KROEMER, 2006).

O corpo gorduroso de adultos de *S. postica*, tanto nos grupos controle e experimentais tratados com fipronil e ácido bórico, encontram-se distribuídos em dois compartimentos da cavidade corpórea, uma associada ao tegumento e outra associada ao trato digestório, parietal e visceral, respectivamente, como o descrito para os insetos em geral.

Morfologicamente são descritos dois grupos celulares de trofócitos compondo o corpo gorduroso em insetos, um grupo onde os limites celulares desaparecem completamente no final do desenvolvimento e o tecido mostra-se constituindo um sincício, e um segundo grupo onde os limites celulares são mantidos, ou são parcialmente perdidos após a maturidade ou após a pupação (NAIR; GEORGE, 1967). Os dados obtidos para os trofócitos de adultos de *S. postica* correspondem ao descrito para o segundo grupo, em que os limites celulares são evidentes, sem alterações entre os grupos experimentais, concordando com o descrito por BUYS (1924) para larvas e adultos de Orthoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Hemiptera e alguns Coleoptera.

As análises mostram que nos trofócitos de *S. postica* estão presentes grandes vacúolos com localização e quantidade variáveis com reservas lipídicas que se apresentam sob a forma de gotas muito grandes que ocupam quase todo o citoplasma, principalmente nos grupos tratados com fipronil e ácido bórico. Estes dados segundo Cruz-Landim (2009), embora discrepantes, estão de acordo com a morfologia destas células.

Cruz-Landim (2009), afirma que os produtos armazenados pelos trofócitos podem ter origem endógena ou serem secretados pela hemolinfa. Baseado nessa informação sugere-se que a liberação e/ou absorção de produtos sejam eles tóxicos ou essenciais, pelos trofócitos, regulam toda a composição da hemolinfa, de forma a atender as necessidades metabólicas dos insetos.

De acordo com os dados obtidos a partir das análises histoquímicas, pode-se sugerir que, além dos lipídios, constituídos por triglicerídeos neutros, os trofócitos das operárias recém-emergida de *S. postica*, contem glicogênio e proteínas, tanto nos grupos tratados com inseticidas como no grupo controle, concordando com o descrito por Paes de Oliveira e Cruz-Landim (2003), para operárias de *M. quadrifasciata*.

Embora Locke (1984) tenha descrito em *Calpodes ethlius* a presença de 11 tipos diferentes de vacúolos, neste trabalho, foram identificados apenas vacúolos com características para digestão (autofágicos e fagocitários). Esses vacúolos são frequentemente associados com armazenamento, originados em geral da membrana plasmática, característica comum entre os grupos experimentais tratados com inseticidas e o grupo controle.

A presença de vacúolos pequenos nos trofócitos de *S. postica*, do grupo controle, bem como alta incidência de coalescência nos grupos experimentais tratados com fipronil e ácido bórico, sugere que o seu conteúdo possa ser absorvido da hemolinfa, e que essa característica seja uma forma de adaptação para o acúmulo do material potencialmente tóxico, para posterior excreção. Provavelmente esse processo ocorre por endocitose, quando pequenas vesículas são incorporadas para o interior dos trofócitos e os vacúolos grandes se formam pela fusão dos pequenos, ou provacúolos, semelhante ao descrito por Conte (1994) para larvas de *D. saccharalis*.

Nos trofócitos que formam o corpo gorduroso do *S. postica*, além dos vacúolos, foi observada na região citoplasmática a presença de grânulos de tamanhos variados, os quais muitas vezes mostraram-se distintos e intensamente corados. Muitos destes grânulos estão localizados ao redor dos vacúolos e núcleos, semelhantemente ao observado no corpo gorduroso larval de *Oryctes rhinoceros* por Nair; George (1967) e em larvas de *D. saccharalis* por Conte (1994).

A aparência dos depósitos granulares varia com o estágio desenvolvimental e como o observado no presente trabalho, com o estágio de intoxicação do inseto. No interior de muitos grânulos podem ser encontradas regiões cristalizadas (DEAN et al., 1985). A cristalização pode ser uma particularidade significativa, talvez devido a composição protéica e o tipo de proteína presente no grânulo, condição esta não observada em operárias recém-emergidas de *S. postica*.

Os núcleos dos trofócitos não apresentam localização fixa, sendo vistos em regiões centrais e em algumas vezes, deslocados para regiões periféricas. Núcleos observados nas regiões centrais mostram forma esférica. Quando periféricos apresentam formas poligonais ou ramificados, semelhantemente ao

observado por CONTE (1994) em larvas de *D. saccharalis* e, podem indicar uma provável atividade de transcrição de genes de proteínas de desintoxicação.

Observações ultra-estruturais realizadas por CONTE (1994) mostraram que em larvas *D. saccharalis* não parasitadas, o interior do núcleo é preenchido por cromatina granular, a qual apresenta variações na condensação, aparentando uma alta taxa metabólica, assim como observado no presente trabalho, onde foi possível verificar a condensação da cromatina nos trofócitos, dos grupos experimentais.

Os estudos histológicos realizados para esta espécie de abelha não mostraram evidências de divisões celulares nos trofócitos e, portanto, o grande aumento na extensão do corpo gorduroso deve ocorrer por aumento do tamanho celular, semelhante ao descrito por Goiten (1989) para o corpo gorduroso de *A. mellifera*.

Nas abelhas, dois tipos de trofócitos modificados são encontrados nos adultos: urócitos e trofócitos contendo depósito de ferro. Os urócitos estão presentes apenas em adultos jovens. Estas células contêm depósitos de ácido úrico e, portanto funcionam como células excretoras. Os testes empregados não demonstram a presença destes tipos celulares em adultos de *S. postica*, o que possibilita a inferir que a excreção de toxinas e/ou metabólicos potencialmente tóxicos, seja feita exclusivamente pelos túbulos de Malpighi.

Nas abelhas, os enócitos mantêm uma relação estreita com os trofócitos entre os quais se acham distribuídos. Embora não tenham sido observados complexos juncionais, entre estes dois tipos celulares, conforme relatado por Dean et al. (1985), os trofócitos se amoldam à superfície dos enócitos, mesmo quando não há pressão física de outras células. Esta é mais uma razão para considerar o conjunto destas células como um órgão de enchimento da hemocela das abelhas (CRUZ-LANDIM, 2009).

O número de enócitos em relação ao de trofócitos é variável, segundo Chapman (1998), estas células podem se formar de maneira contínua em alguns insetos, fato observado no presente trabalho, principalmente entre os grupos experimentais e controle, onde a presença foi mais significativa nos

grupos onde houve tratamento com os inseticidas, porém, essa característica não pode ser tomada como alteração, provocada pelos princípios ativos.

No corpo gorduroso de *S. postica* os enócitos apresentam-se como células grandes, de contornos bem definidos e citoplasma com granulações acidófilas, tanto no grupo controle como nos tratamentos, diferentemente ao observado por Cruz-Landim (2004) em larvas de *A. mellifera* e *M. quadrifasciata* nas quais os enócitos mostram grânulos basófilos.

Ainda segundo Cruz-Landim (2004) esse tipo celular pode apresentar morfologia diferenciada, em que o tamanho celular e seus contornos eventualmente mostram-se irregulares e embora com pouca frequência, vacúolos podem aparecer em seu citoplasma pode ser observado, concordando com os dados obtidos no presente trabalho.

Os dados obtidos das observações dos enócitos de *S. postica*, mostram a presença de núcleos com até quatro nucléolos e a dispersão da cromatina, como observado no corpo gorduroso de larvas de *Apis* e *Melipona* por Cruz-Landim (2004).

A partir das análises do corpo gorduroso de *S. postica*, não é possível afirmar as alterações encontradas nesse órgão sejam, exclusivamente, pela exposição aos pesticidas empregados, uma vez que as células deste tecido estão em constante atividade para suprir as necessidades metabólicas do inseto.

Devido aos processos de reversibilidade do processo de morte celular, podemos sugerir que se o tempo de exposição fosse maior, os sinais de morte celular seriam mais intensos, assim como nos túbulos de Malpighi.

## 7. CONCLUSÃO

---

As análises realizadas no presente trabalho confirmam que os inseticidas fipronil e ácido bórico, apresentam citotoxicidade em doses subletais verificadas pela avaliação das alterações morfológicas nos túbulos de Malpighi, de operárias adultas de *S.postica*. Dentre as principais alterações é possível destacar:

- o aumento na porção apical do microvilosidades;
- as dilatações das cisternas dos retículos endoplasmáticos rugoso;
- a presença de vesículas e o acúmulo de polirribossomos no citoplasma;

As análises do corpo gorduroso mostram o aumento da quantidade, coalescência, depósitos lipídicos e protéicos nos vacúolos nos trofócitos do corpo gorduroso, porém a essas alterações foram sutis.

No aspecto ecológico, as conseqüências do uso indiscriminado desses inseticidas podem ser alarmantes, uma vez que o processo de polinização, o qual depende em grande parte das abelhas, pode ser comprometido e, desse modo, as espécies vegetais, que servem de alimento para muitos animais terão sua fecundidade diminuída, ocasionando um desequilíbrio ambiental.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Índice monográfico A16: ácido bórico. 2007b. Disponível em <[www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/a16.pdf](http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/a16.pdf)>. Acesso em 15 maio. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Índice monográfico f43: fipronil. 2007a. Disponível em <[www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/f43.pdf](http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/f43.pdf)>. Acesso em 15 maio. 2009.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland Publishing, 1994. 1294p.

ASOREY, X. Preocupante y sospechosa desaparición de abejas. **Vida Apícola**, n.128, 2004.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 1. ed. Porto Alegre: Boohman, 2002, 290p.

BALESTIARI, J.B.P. **Toxicidade de inseticidas e efeitos respiratórios em duas espécies de meliponíneos *Tetragonisca angustula angustula* (Latreille, 1807) e *Nanotrigona testaceicornis testaceicornis* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae)**. Rio Claro: UNESP, 1989. 116p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 1989.

BARBARA, G.S. et al. Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. **J. Comp. Physiol.** Berlim, v. 191, p. 823-836, 2005.

BEGO, L. R. On some aspects of bionomics in *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.27, p.211-224, 1983.

BEIG, D.& SAKAGAMI, S. F. Behavior studies of the stingless bees, with special reference to the ovoposition process II. *Melipona seminigra merrillae* Cockerell. **Annotationes Zoologicae Japonenses**.v.37(2), p.112-119, 1964.

BEIG, D. Desenvolvimento embrionário das Abelhas *Trigona (Scaptotrigona) postica* Latreille (Hymenoptera: Meliponinae). **Arquivos de Zoologia**, v.21, p.179-234, 1971.

BELAYNEH, Y.T. **Amendment III to the USAID/Madagascar supplement environmental assessment for locust control program: Options for including fipronil as an anti-locust insecticide**. Washington: USAID, 1998.

BENDAHO, N., FLECHE, C., BOUNIAS, M. Biological and biochemical effects of chronic exposure to very low levels of dietary cypermethrin (cymbush) on honeybees colonies (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44 (2), p. 147-153, 1999.

BERRIDGE, M.J.; OSCHMANN, J.L. A structural basis for fluid secretion by Malpighian tubules. **Tissue; Cell**, v.1 (2), p. 247-272, 1969.

BERRIDGE, M.J.; OSCHMANN, J.L. **Transporting epithelia**. 1ed. New York: Academic Press, 1972, p.190.

BETIOLI, J.V. **Estudo da longevidade de operárias de Apis mellifera (Hym.: Apidae) em condições de confinamento**. 1989, 74p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 1989.

BISHOP, G.H. Cell metabolism in the insect fat body. II. A functional interpretation of the changes in structure in the fat-body cells of the honey bee. **J. Morphol.**, v.37, p.533-553, 1923.

BLOOMQUIST, J. R.. Insecticides: chemistries and characteristics. Disponível em: <<http://www.ipm.umn.edu/chapters/bloomq.htm>>. Acesso em: 02/nov/2009.

BOWEN, I.D., et al. **Mitosis and apoptosis** – London: Chapman; Hall, p.174, 1998.

BRADLEY, T.J. The excretory system: structure and physiology. In: KERKUT, G.A., GILBERT, L.I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. London: Pergamon. 1985, v. 4, p. 421-465.



BRAECKMAN, B., BRYNS, K., RZEZNIK, U., RAES, H. Cadmium pathology in an insect cell line: ultrastructural and biochemical effects. **Tissue; Cell**, v. 31, n. 1, p. 45-53, 1999.

BRAECKMAN, B., RAES, H. The ultrastructural effect and subcellular localization of mercuric chloride and methylmercuric chloride in insect cells (*Aedes albopictus* C6/36). **Tissue Cell**, v. 31, n.2, p.223-232, 1999.

BRITO, A.S., BATISTA, A.R.P.L., CASTRO, M.S. Toxicidade de praguicidas usados no controle da mosca branca *Bemisia argentifolli* (Hemiptera, Aleyrodidae) para as abelhas sem ferrão do gênero *Scaptotrigona* (Hymenoptera: Apoidea). **Anais do XIV Congresso Brasileiro de Apicultura**, p. 36. 16 a 20 de julho, 2002. Campo Grande-MS.

BUTTERWORTH, F.M., BODENSTEIN, D., KING, R.C. Adipose tissue of *Drosophila melanogaster*. In: An experimental study of larval fat body. **J. Exp. Zool.**, v.158, p.141-154, 1967.

BUYS, K.S Adipose tissue in insects. **J. Morphol.**, v.38, p 485-527, 1924.

CAETANO , F. H., CRUZ-LANDIM, C. Ultra- estrutura das células colunares do ventrículo de *Camponotus arboreus* (Hymenoptera : Formicidae) e suas implicações funcionais. **Naturalia**, v.8, p. 91-100, 1983.

CARVALHO, E.M., CARVALHO, S.M., CARVALHO, C.F., CARVALHO, G.A., SOUZA, B. Impacto de inseticidas fornecidos a adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) por meio de pasta cãndi contaminada. **Anais do XIV Congresso Brasileiro de Apicultura**, p. 114. 16 a 20 de julho, 2002a. Campo Grande-MS.

CARVALHO, E.M., CARVALHO, S.M., CARVALHO, C.F., CARVALHO, G.A., SOUZA, B. Efeito da pulverização de alguns inseticidas usados em cucurbitáceas sobre adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Anais do XIV Congresso Brasileiro de Apicultura**, p. 112. 16 a 20 de julho, 2002b. Campo Grande-MS.

CARVALHO, S.M. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados na cultura de citros a operárias de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (HYMENOPTERA: APIDAE). Lavras: UFLA, 2006. 86p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Entomologia), Universidade Federal de Lavras, 2006.

CAVALCANTE, V.M. **Reorganização do intestino médio em *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) durante a metamorfose: estudos ultra-estruturais e citoquímicos.** 1998. 134p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 1998.

CHAPMAN, R.F. **The insects: Structure and function**. 4ed. London: English Universities Press, Ltd, 1998. 819 p.

CHAUZAT, M.P. et al. A survey of Pesticide Residues in Pollen Loads by Honeybees in France. **J. Econ. Entomol.** Lanham, v. 99, p. 253-262, 2006.

CINTRA, P. **Atividade tóxica de *Dimorphandra mollis* Benth. (Caesalpiniaceae) sobre operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. Rio Claro: UNESP, 2001. 75p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2001.

COCHRAN, D.G. Toxic effects of boric acid on the German cockroach. **Cell. Mol. Life Sci**, Basel, v.51, n. 6, p. 561-563, 1994.

COLIN, M.E. Un medio ambiente que mata las abejas. Estudios de imidacloprid y fipronil en Europa. **Vida Apícola**, n.128, 2004.

CONTE, H., CRUZ-LANDIM, C. Microscopia eletrônica de varredura do corpo gorduroso de Larvas de *Diatraea Saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). **Naturalia**, São Paulo, v. especial, n. 09, p. 223-223, 1992.

CONTE, H. **Morfologia do corpo gorduroso em larvas de *Diatrea saccharalis* (Lepidóptera: Pyralidae) não parasitadas e parasitadas pelo *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)** Rio Claro: Inst. de Biociências, UNESP, 1994. 77p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). 1994.

CONTI, ME, BOTRE F. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. **Environ Monit Assess**. v.69, n.3, p.267-82, 2001.

CRUZ, Aline da Silva , Silva-Zacarin, ECM , BUENO, O. C. , MALASPINA, O. . Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biology and Toxicology**, v. 1, p. 1-13, 2009.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA DE MORAES, R.L.M. Estruturas degenerativas nas glândulas hipofaríngeas de operárias de *Apis mellifera* (Apidae). **Rev. Brasil. Biol.**, v.37, n.3, p.681-92, 1977.

CRUZ-LANDIM, C.& MELO, R.A. **Desenvolvimento e Envelhecimento de larvas e adultos de *Scaptotrigona postica latreille* (Hymenoptera, Apidae): aspectos histológicos e histoquímicos**. São Paulo: ACIESP, n.31, p.118, 1981.

CRUZ-LANDIM, C. O corpo gorduroso da larva de *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEP (Apida, Meliponinae). **Naturalia**, São Paulo, V.8, p.7-23, 1983.

CRUZ-LANDIM, C.; GIOMETTI, S.E.E. Histólise dos músculos torácicos larvais durante a metamorfose e miogênese dos músculos do vôo, em *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Rev. Brasil. Biol.**, v.50, n.4, p.983-1002, 1990.

CRUZ-LANDIM, C. Specializations of the Malpighi Tubules cells in a stingless bee, *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae). **Acta Micros.** Caracas, v. 7, n. 2, p. 26-33, 1998.

CRUZ-LANDIM, C. . Localization of Calcium and Acid Phosphatase in the Malpighian tubules of Nurse Workers of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. ( Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Biosci J**, Uberlândia/MG, v. 16, n. 1, p. 87-99, 2000.

CRUZ-LANDIM, C. *Biologia do desenvolvimento em abelhas*. Depto. Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, 2004. Disponível em <<http://www.rc.unesp.br/ib/biologia/carminda.html.html>>. Acesso em: 20 de Dezembro de 2009.

CRUZ-LANDIM, C. . **Morfologia e Função dos Sistemas**. 1ed. São Paulo: UNESP, 2009, 407 p.

DAI, J.D., GILBERT, L.I. Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis. **Insect Biochem. Molec. Biol.** Oxford, v.27, n.1, p.69-78, 1997.

DAI, J.D., GILBERT, L.I. An *in vitro* analysis of ecdysteroid-elicited cell death in the prothoracic gland of *Manduca sexta*. **Cell and Tissue Res.**, v. 297, n.2, p.319-27, 1999.

DEAN, R. L., LOCKE, M., COLLINS, J. V. Structure of fat body. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Org.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985, v. 3, p. 155-210.

DEBNATH, J. et al. Does autophagy contribute to cell death? **Autophagy**. Michigan, v.1, p. 66-74, 2005.

DECOURTYE, A. et al. Comparative Sublethal Toxicity of Nine Pesticides on Olfactory Learning Performances of the Honeybee *Apis mellifera*. **Environ. Contam. Toxicol.** Washington, v. 48, p.242-250, 2005.

DENARDI, S. E., CAMARGO-MATHIAS, M. I., BECHARA, G. H. *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): salivary glands cells of partially engorged females ticks and the production of lipid by their mitochondria. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 113, p. 30-35, 2006.

DOWNING, R.G.& STRONG, P.L. Analytical challenges of low level boron analysis in biological matrices. **J. Trace Elem. Exp. Med.** v.12, p.205-212, 1999.

EICHELBERG, D., WESSING, A. Morphology of the Malpighian tubules of insects. **Fortschr. Zool.**, v.23, p 124-47. 1975.

EISLER, R. Boron hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U. S. Fish Wildl. Serv., **Biol. Rev. Cambridge**, v. 85, 1990.

EL HASSANI, A.K. et al. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacol. biochem. behav.** Fayetteville, v. 82, p.30-39, 2005.

EVANS, J.J.T. Development and ultrastructure of fat body cells and oenocytes of the Queensland fruit fly, *Dacus tryoni* (Frogg). **Z. mikr. Ant.**, v.81, p.49-61, 1967.

FAO. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture – the international response. In: FREITAS, B. M., PEREIRA, J. O. P. (Ed.). **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Fortaleza, Brasil: Imprensa Universitária. p. 19-22. 2004.

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. **Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.**, v.135, p.203-48, 1924.

GOITEN, M.R.C. **Estudos morfológicos e morfométricos do corpo gorduroso e enócitos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) durante o desenvolvimento larval**. Rio Claro: Inst. de Biociências, UNESP, 1989. 77p. Dissertação (Mestrado em Zoologia), 1989.

GOLSTEIN, P.& KROEMER G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochem Sci.** Amsterdam, v. 32, p. 37-43, 2006.

GOODRICH, E. S. A new method of dissociating cells. **Q. J. Microsc. Sci.**, v. 83, p. 245-258, 1942.

GREGORC, S.; BOWEN, I.D. Histopatological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. **Cell Biol. Int.**, v.22, n.2, p.137-44, 1998.

GREGORC, A.; BOWEN, I.D. In situ localization of heat-shock and histone proteins in honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae infected with *Paenibacillus larvae*. **Cell Biol. Int.**, v.23, n.3, p.211-18, 1999.

GREGORC, A., POGACNIK, A., BOWEN, I.D. Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. **Apidologie**, v.35, p.453-60, 2004.

GREGORC, S.; BOWEN, I.D. Programmed cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae midgut. **Cell Biol. Internat.**, v.21, p.151-159,1996.

HABES D. et al. Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: Alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 84, p.17–24, 2006.

HABIB, M. **Fisiologia dos insetos**. Campinas: Apostila Unicamp, 2003. 169 p.

HARTFELDER, K.; STEIMBRUCK, G. Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. **Invertebr. Reprod. Devl.**, v.31, n.1-3, p.237-50, 1997.

HOOPER-BUI L.M.& RUST M.K. Oral Toxicity of Abamectin, Boric Acid, Fipronil, and Hydramethylnon to Laboratory Colonies of Argentine Ants (Hymenoptera: Formicidae) **J. Econ. Entomol.** Lanham, v. 93, p. 858-864, 2000.

HU, H. et al. Isolation and characterization of soluble boron complexes in higher plants. **Plant Physiol. Minneapolis**, v.113, p. 649-655, 1997.

INTRONA, F., CAMPOBASSO, C.P., GOFF, M.L. Entomotoxicology. **Forensic Science International**, v. 120, p. 42-47, 2001.

JESUS, D. **Análise morfológica dos túbulos de Malpighi e dos ventrículos das larvas e das operárias adultas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apinae) tratadas com fipronil e ácido bórico**. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP, 2007.

JOHNSON, M.B., BUTTERWORTH, F.M. Maturation and aging of adult fat body and oenocytes in *Drosophila* as revealed by light microscopic morphometry. **J. Morphol.**, v.184, p.51-59, 1985.

JOHNSON, F.M.; et al. Mediation of Pyrethroid Insecticide Toxicity to Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) by Cytochrome P450 Monooxygenases. **J. Econ. Entomol.** Lanham, v. 99, n.4, p. 1046-1050. 2006.

JUNQUEIRA, L. C. U.& JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983. 123p.

KEELEY, L.L. Structure of fat body. In: KERKUT, G.A., GILBERT, L.I. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Great Britain: Pergamon Press, 1985, v.3, p.211-248.

KENMORE, P., KRELL, R. Global perspectives on pollination in agriculture and agroecosystem management. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON CONSERVATION AND SUSTAINABLE USE OF POLLINATORS IN AGRICULTURE: with Emphasis on Bees. São Paulo, Brasil. 1998.

KERR, J.F.R., WILLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.**, v.24, p.239-57, 1972.

KEVAN, P. G., PHILLIPS, T. P. The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences. **Conservation Ecology**, v. 5, n. 1, p. 8, 2001. Disponível em: <<http://www.consecol.org/vol5/iss1/art8>>. Acesso em: setembro. 2009.

KILBY, B.A. Intermediary metabolism of the insect fat body. **Arch. Insect Physiol.**, v.1, p.111-174, 1963.

KLOTZ, J. H., MOSS J. Oral toxicity of a boric acid sucrose water bait to Florida carpenter ants (Hymenoptera:Formicidae). **J. Entomol. Sci.**, v. 31, p. 9-12, 1996.

KLOTZ, J. H., VAIL K. M., WILLIAMS D. F. Liquid boric acid bait for control of structural infestations of pharaoh ants (Hymenoptera: Formicidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 90, p.523-526, 1997

KLOTZ, J. H., AMRHEIN, C., MCDANIEL, S., RUST, M. K., REIERSON, D. A. Assimilation and Toxicity of Boron in the Argentine Ant (Hymenoptera: Formicidae). **J. Entomol. Sci.**, v. 37, p.193-199, 2002.

KOEDAM, D., CONTRERA, F. A. L., FIDALGO, A. O. , IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. How queens and workers share in male production in the stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini). **Insect Societia**, v.52(2):114-121,2005.

LOCKE, M. COLLINS, J.V. Sequestration of protein by the fat body of an insect. **Nature**, v.210, n.5035, p.552-553, 1966.

LOCKE, M. COLLINS, J.V. Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. **J. Cell Biol.**, v.36, p.453-483, 1968.

LOCKE, M. The ultrastructural of the oenocytes in the molt/intermolt cycle of an insect. **Tissue Cell**, v.1, p.103-154, 1969.

LOCKE, M. The structure and development of the vacuolar system in the fat body of insects. In: KING, R.C., AKAI, H. **Insect Ultrastructure**. New York: Plenum Press, p.151-197, 1984..

LOCKSHIN, R.A., BEAULATON, J. Programmed cell death. Cytochemical evidence for lysosomes during the normal breakdown of the intersegmental muscles. **J. Ultrastruct. Res.**, v.46, p.43-62, 1974a.

LOCKSHIN, R.A., BEAULATON, J. Cytochemical appearance of lysosomes when the death of the intersegmental muscles is prevented. **J. Ultrastruct. Res.**, v.46, p.63-78, 1974b.

LOCKSHIN, R.A. Cell death in metamorphosis. In: BOWEN, I.D.& LOCKSHIN, R.A. (eds.). **Cell Death in Biology and Pathology**. London: Chapman; Hall, p.79-121, 1981..

LOCKSHIN, R.A., ZAKERI, Z. Apoptosis, autophagy, and more. **J. of Biochem.; Cell Bio.**, v. 36, p. 2405-2419, 2004.

MACIEIRA, O.J.D., PRONI, E.A. Capacidade de resistência a altas e baixas temperaturas em operárias de *Scaptotrigona postica* (Latreille)(Hymenoptera, Apidae) durante os períodos de verão e inverno. **Rev. Bras. de Zoo.**, v.21, n.4, p.893-896, 2004.

MALASPINA, O., SILVA-ZACARIN, E.C.M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organ of bees. **Braz. J. morphol. Sci.** v.23, n. 3-4, p. 303-309, 2006.

MALASPINA, O., JESUS, D., Roat, TC , NOCELLI, R.C.F., ZACARIN, E.C.M.S. . Histopathological and ultrastructural analysis of the midgut and malpighi tubules of honeybee worker submitted to fipronil exposition. In: Congresso internacional de Apicultura - Apimondia, 2009, Montpellier - França. 41 Congress Apimondia. Roma Italia : **Apimondia**, 2009.

MANSOUR, S.A. Is it possible to use the honey bee adult as a bioindicator for the detection of pesticide residues in plants? **Acta Biol Hung.** v.38, n.1, p. 69-76, 1987.

MARTOJA, R., BALLAN-DUFRANÇAIS, C. The ultrastructure of the digestive and excretory Organs. In: KING, R.C., AKAI, H. **Insect Ultrastructure**. New York: Plenum Press, p. 199-268, 1985.

MELLO, M.L.; BOZZO, L. Histochemistry, refractometry and fine structure of secretory globules in larval Malpighian tubes of *Melipona quadrifasciata* (Hym, Apoidea). **Protoplasma**, v.68, p.241-251, 1969.

MELLO, M.L. A mucous secretion in the Malpighian tubes of a neotropical bumblebee, *Bombus atratus* Franklin. **Protoplasma**, v.99, p.147-158, 1979.

MELLO, M.L.; KERR, W.E. Histochemistry of salivary gland and Malpighian tubule secretions contributing to the cocoon in *Plebeia droryana* and *Scaptotrigona postica* (Hym., Apoidea). **Zool. Anz. Jena**, v.213, p.177-189, 1984.

MOSEMAN, R.F. Chemical Disposition of Boron in Animal and Humans. **Environ. Health Perspect.** Research Triangle Park, v.102, p.113-117, 1994.

NAIR, K.S.S., KARNAVAR, G.K., GEORGE, J.C. Studies on the larval fat body of *Oryctes* with particular reference to the cytochemistry of the proteinaceous globules. *J. Anim. Morphol. Physiol.*, v.14, p.28-54, 1967.

NPTN, National Pesticide Telecommunications Network, 2005. Disponível em: <[www.npic.orst.edu/factsheets/fipronil.pdf](http://www.npic.orst.edu/factsheets/fipronil.pdf)> Acesso em 22 jun. 2009.

NPTN, National Pesticide Telecommunications Network, 2006. Disponível em: <[www.npic.orst.edu/factsheets/boricacid.pdf](http://www.npic.orst.edu/factsheets/boricacid.pdf)> Acesso em 22 jun. 2009.

OLAVARRIETA, A.J.A. Estudo ultra-morfológico e ultra-estrutural dos túbulos de Malpighi de operárias de *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera:Formicidae). **Naturalia**. São Paulo, v. 24, n. especial, p. 151-153, 2000.

OLIVEIRA, P. R., BECHARA, G. H., DENARDI, S. E., NUNES, E. T., CAMARGOMATHIAS, M. I., Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis in the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 110, p. 146 - 156, 2005.

OLIVEIRA, V.T.P.; CRUZ-LANDIM, C. Morphology and function of insect fat body cells: a review. **Biociências**., v.11, n.2, p. 195-205, 2003.

OSBORNE, J.L., WILLIAMS, I.H., CORBET, S.A. Bees, pollination and habitat change in the European Community. **Bee World**., v.72, p.99-116. 1991.

PAN, **Pesticide Action Network**, disponível em:< [www.pan-international.org](http://www.pan-international.org).> Acesso em 25 mai. 2006.

PANNABECKER, T. Physiology of the Malpighian tubule. **Annu. Rev. Entomol.**, v.40, p.493-510, 1995.

PAWERT, M., TRIEBSKORN, R., GRAFF, S., BERKUS, M., SCHUTZ, J., KOHLER, H.R. Cellular alterations in collembolan midgut cells as a marker of heavy metal exposure: ultrastructure and intracellular metal distribution. **Sci. Total Environ.**, v. 181, p. 187-200, 1996.



PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London: Churchill, 1985. 530p.

PEDRO, J. **Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, do inseticida fipronil no organismo teste *Allium cepa***. Rio Claro: UNESP, 2008. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2008.

PHAM-DELEGUE, M., DECOURTYE, A., KAISER, L. DEVILLERS, J. Behavioural methods to assess the effects os pesticides on honey bees. **Apidologie**, Les Ulis, v. 33, n. 5, p. 425-432, Sept./Oct. 2002.

PROSKURYAKOV, S.Y. et al. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Exp. Cell Res**. New York, v. 283, p.1-16, 2002.

RAES, H. et al. Organization end ultraestrutura of the regenerative crypts in the midgut of the adult worker honeybee (*Apis mellifera* L.). **Tissue Cell.**, v.26, p. 231-238, 1992.

REGINATO, R.D.; CRUZ-LANDIM, C. Morphological characterization of cell death during the ovary differentiation in worker honeybee. **Cell Biol. Int.**, v.26, n.3, p. 243-51, 2002.

ROMA, G.C. **Análise morfológica comparativa da estrutura do corpo gorduroso nos Attini em diferentes níveis filogenéticos** Rio Claro: UNESP, 2007. 142p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2007.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C., TOMOTAKE, M. E. M., CRUZ-LANDIM, C. Dados preliminares da morfometria do corpo gorduroso e enócitos em operárias de *Pachycondila striata* (Hymenoptera: Ponerinae) In: IX Encontro de Mirmecologia, 1988.

SARMENTO, R. de A., OLIVEIRA, H.G. de, HOLTZ, A.M., SILVA, S.M. da, SERRÃO, J.E., PALLINI, A. Fat body morphology of *Eriopsis connexa* (Coleóptera, Coccinellidae) in function of two alimentary sources. **Braz. Archives of Biol. and Techon.**, v.47, n.3, p.407-411, 2004.

SILVA DE MORAES, R.L.M.; CRUZ-LANDIM, C. Estudos comparativos dos tubos de Malpighi de larva, pré-pupa e adulto de operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Apidae, Meliponinae). **Papéis Avulsos Zool.**, v.29, n.25, p.249-257, 1976.

SILVA DE MORAES, R.L.M.; BOWEN, I.D. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Cell Biol. Int.**, v.24, n.10, p.737-43, 2000.

SILVA-ZACARIN, E.C.M., GREGORC, A., SILVA DE MORAES, R.L.M. *In situ* localization of heat-shock proteins and cell death labelling in the salivary gland of acaricide-treated honeybee larvae. **Apidologie**, v.37, p. 507-515, 2006.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. Autophagy and Apoptosis coordinate physiological cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Autophagy**, v. 3, p. 516-518, 2007.

SMIRLE, M.J., WINSTON, M.L. Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: An adaptation for foraging in contaminated ecosystems. **Can. J. Zool.** Ottawa, v. 66, n. 9, p. 1938-1942. 1988.

SNODGRASS, R.E. **Principles of insect morphology**. New York:Mc Graw-Hill Book, 1935. 667p.

SOROUR, J. Ultrastructural variations in *Lethocerus niloticum* (Insecta: Hemiptera) caused by pollution in Lake Mariut, Alexandria, Egypt. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, p. 268-274, 2001.

SUMIDA, S.; ZACARIN, E. C. M. S.; DECIO, P. , MALASPINA, O. , BUENO, F.C. , BUENO, O. C. . Toxicological bioassays and morphological analysis of *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae: Hymenoptera) workers treated with boric acid. **Journal of Economic Entomology**, v. 3, p. 8-30, 2009.

THOMSEN, E., THOMSEN, M. Fine structure of the fat body of the female *Calliphora erythrocephala* during the first egg-maturation cycle. **Cell Tissue Res.**, v.152, p.193-217, 1974.

TINGLE C.C.D. Health and environmental effects of fipronil. Briefing paper AI 1, 2000. Disponível em:<[www.pan-uk.org/briefing/fipronil.pdf](http://www.pan-uk.org/briefing/fipronil.pdf)>. Acesso em 23/07/2009.

TINGLE, C.C. et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Rev. Environ. Toxicol.**, v.176, p.1-66, 2003.

TOBE, S.S., DAVEY, K.G., HUEBNER, E. Nutrient transfer during the reproductive cycle in *Glossina austeni newst*: Histology and histochemistry of the milk gland, fat body and oenocytes. **Tissue; Cell**, v.5, n.4, p.633-650, 1970.

TOPORCAK J, LEGATH J, KULKOVA J. Levels of mercury in samples of bees and honey from areas with and without industrial contamination. **Vet Med (Praha)**. v.37, n.7, p.405-412, 1992.

ULLOA-CHACÓN P.& JARAMILLO G.I. Effects of Boric Acid, Fipronil, Hydramethylnon, and Diflubenzuron Baits on Colonies of Ghost Ants (Hymenoptera: Formicidae). **J. Econ. Entomol.** Lanham, v. 96, p. 856-862, 2003.

VELTHUIS, H. H. W., KOEDAM, D. , IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The males of *melipona* and other stingless bees, and their mothers. **Apidologie** **36**:169-185, 2005.

WIGGLESWORTH, V.B. **The principles of insect physiology**. New York: John Wiley Sons, 1974. 827 p.

WILLIAMS, C.S. Conserving Europe's bees: why all the buzz? **Trends in Ecology and Evolution**, v.10, n.8, p. 309-310. 1995.

YOSHIMORI, T. Autophagy: A regulated bulk degradation process inside cells. **Biochem. Biop. Res. Commun.** Orlando, v. 313, p. 453-458, 2004.

YU, S.J., ROBINSON, F.A., NATION, J.L. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. **Pestic. Biochem. Physiol.** San Diego, v. 22, n. 3, p. 360-368. 1984.

ZARA F.& CAETANO, F.H. Ultraestrutura of salivary gland of *Pachycondyla villosa* (Formicidae: Porinae): functional changes during the last larval instar. **Cytologia**. Tóquio, v. 67, p. 267-280, 2002.