



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO
CLARO



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

**EFEITOS DAS DOSES SUBLETAIS DO FIPRONIL PARA ABELHAS
AFRICANIZADAS (*Apis mellifera* L.), POR MEIO DE ANÁLISES
MORFOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS.**

TIAGO FAVARO DE SOUZA

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

Junho - 2009

TIAGO FAVARO DE SOUZA

**EFEITOS DAS DOSES SUBLETAIS DO FIPRONIL PARA ABELHAS
AFRICANIZADAS (*Apis mellifera* L.), POR MEIO DE ANÁLISES
MORFOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS.**

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

Orientador: Osmar Malaspina

Rio Claro
2009

595.799 Souza, Tiago Favaro de
S729e Efeito das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), por meio de análises morfológicas e comportamentais / Tiago Favaro de Souza. – Rio Claro : [s.n.], 2009
47 f. : il., figs., gráfs., tabs, fots.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Osmar Malaspina

1. Abelha. 2. Inseticida. 3. Toxicidade. I. Título.

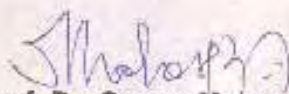
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO defendida em 07/08/2009

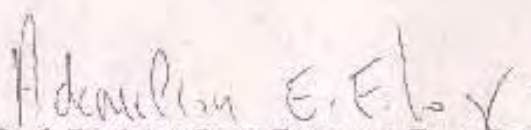
Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis
mellifera* L.), por meio de análises morfológicas e comportamentais

TIAGO FÁVARO DE SOUZA

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Osmar Malaspina



Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares



Prof. Dr. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Folha de Aprovação

TIAGO FAVARO DE SOUZA

**EFEITOS DAS DOSES SUBLETAS DO FIPRONIL PARA ABELHAS
AFRICANIZADAS (*Apis mellifera* L.), POR MEIO DE ANÁLISES
MORFOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS.**

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

Comissão Examinadora

Rio Claro, ____ de _____ de _____

Dedico ao meu pai, exemplo de caráter, dignidade, solidariedade, força, serenidade e amor pela vida. Ele sempre foi o elo de ligação em nossa família de personalidade tão forte e a pessoa em que todos podiam contar a qualquer hora e em qualquer circunstância.

“Não deixe que a saudade o sufoque, que a rotina o acomode, que o medo impeça-o de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

AGRADECIMENTO

Ao prof. Dr. Osmar Malaspina pela orientação e amizade durante todos esses anos de trabalho. Certamente, grande parte da minha formação profissional deve-se a ele.

Ao CEIS (Centro de Estudos de Insetos Sociais) e UNESP que me deram suporte e condições para a realização de minhas pesquisas e desenvolvimento profissional.

Aos técnicos do laboratório, Ita e Olivia, assim como a secretária ou mãe de todos, Necis, por todos os meus pedidos atendidos.

Ao Departamento de Biologia, principalmente ao laboratório de histologia e seu técnico Gerson, pelo auxílio no desenvolvimento das pesquisas.

Ao técnico do Biotério, profundo conhecedor sobre o comportamento das abelhas, pelas coletas e principalmente pela amizade.

A prof. Dra Roberta Nocelli e a Dra Thaisa Roat, que foram pessoas-chave no desenvolvimento do projeto, pela orientação e amizade.

A mestranda Caroline Rossi pelo auxílio em alguns testes realizados.

A minha companheira Nathalia, sempre presente em todos os momentos da minha vida, pelo apoio, dedicação, carinho, amor, paixão, amizade.

Aos meus pais, pelo apoio, carinho, dedicação e seus esforços desmedidos para minha educação e trajetória profissional e pessoal.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que deram mais sabor a esta etapa da história da minha vida.

A FAPESP pelo financiamento da pesquisa realizada.

Resumo

Muitos inseticidas atuam inibindo a ação de neurotransmissores específicos, causando a super atividade dos neurônios, como por exemplo, aqueles ligados ao aprendizado e a memória e, como consequência, podem alterar estruturas cerebrais. Atualmente, o inseticida fipronil é muito utilizado como defensivo agrícola, principalmente em culturas como cana-de-açúcar, soja e citrus, sendo que sua pulverização, que visa o controle de insetos-praga, vem causando sérios danos aos insetos não-alvo, como os polinizadores. Embora alguns estudos tenham sido realizados para os efeitos das doses subletais de inseticidas em abelhas *A. mellifera*, não existe nenhum trabalho documentado sobre esses efeitos para as abelhas africanizadas, híbrido predominante no país. Assim, esse projeto teve como objetivo estabelecer as doses subletais para o inseticida fipronil, administrado oralmente e por contato; os efeitos no comportamento de forrageamento das abelhas; e as possíveis alterações na morfologia do cérebro das abelhas (*A. mellifera*). Para isso, previamente foi calculado a DL_{50} oral e por contato, para que posteriormente estabelecesse os valores das doses subletais. Para as abelhas tratadas foram avaliados teste da atividade locomotora durante o forrageamento e de sensibilidade ao alimento, através da metodologia de Resposta e Extensão da Probóscide (REP), que é uma reprodução no que ocorre na interação abelha-planta. Por fim, foram realizados cortes histológicos no cérebro das abelhas tratadas a fim de detectar as possíveis alterações morfológicas destas estruturas e utilizar a técnica de imunohistoquímica para marcar e mapear as regiões cerebrais de atuação do inseticida. Os resultados mostraram-se promissores para as avaliações sobre o efeito de baixas doses do inseticida fipronil para as abelhas africanizadas, embora mais estudos deverão ser realizados e os testes melhores adaptados.

Abstract

Many pesticides act as an inhibitor of the action of specific neurotransmitters, causing a super activity of neurons, for example, those linked with learning and memory and, as consequence, they can alter cerebral structures. Nowadays, the pesticide fipronil is largely used as an agricultural defense, mainly in sugar cane, soy and citrus cultures. Its use that targets the control of plague insects has been causing serious effects on other insects, such as pollinators. Although some studies have been done on the effects of sublethal doses of pesticides on bees *Apis mellifera*, there are no documented work on those effects on Africanized bees, a hybrid very abundant in this country. Therefore, this project has the objective of establishing the sublethal doses of the pesticide fipronil, administered orally and by contact; the effects of the foraging behavior of work bees; possible alterations on the brain morphology of Africanized bees (*A. mellifera*). For that, the oral and by contact DL_{50} were calculated previously, so that the values of sublethal doses could be established later. For bees treated with sublethal doses of fipronil, tests of dislocation activity during foraging and sensitivity to food were evaluated through the PER methodology, which is a reproduction of what happens in the interaction bee/plant. At last, histological cuts were made in the brains of treated bees to detect possible morphological alterations on these structures and to use the immunohistochemistry technique to mark and map the cerebral regions affected by the pesticide. The results showed themselves very promising for the evaluations of small doses of fipronil pesticide on Africanized bees, although further studies should be made and tests more adapted.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1 Teste de Toxicidade.....	9
3.1.1 Coleta das abelhas.....	9
3.1.2 Teste de Ingestão.....	9
3.1.3 Teste de Aplicação Tópica.....	11
3.2 Efeito no comportamento de forrageamento.....	12
3.2.1 Atividade Locomotora.....	12
3.2.2 Sensibilidade ao alimento, aprendizado olfatório e memória.....	13
3.3 Análise Microscópica.....	14
3.3.1 Análise Morfológica.....	14
3.3.2 Análise Histoquímica.....	15
3.3.3 Análise Imunohistoquímica.....	16
4. RESULTADOS.....	18
4.1 Testes de Toxicidade.....	18
4.2 Efeito no comportamento de forrageamento.....	21
4.2.1 Atividade Locomotor.....	21
4.2.2 Sensibilidade ao alimento, aprendizado olfatório e memória.....	21
4.3 Análise Microscópicas.....	24
4.3.1 Análise Morfológica.....	24
4.3.2 Análise Histoquímica.....	26
4.3.3 Análise Imunohistoquímica.....	27
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÕES.....	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

1. Introdução e Revisão Bibliográfica.

Os agentes polinizadores e a reprodução vegetal proporcionada por sua ação são elementos cruciais no funcionamento de quase todos os ecossistemas terrestres, incluindo aqueles dominados pela agricultura (KEVAN, 1999). No entanto, o uso irracional de inseticidas nos agroecossistemas pode ocasionar o desequilíbrio da população de abelhas que visitam estes locais.

O desaparecimento de várias espécies de abelhas dos campos de cultivo vem, preocupando muitos pesquisadores no mundo todo, o que pode ser demonstrado pela publicação de artigos na Europa (OSBORNE et al. 1991; WILLIAMS, 1988; PORRINI et al., 2002; CELLI e MACCAGNANI, 2003), Estados Unidos (BATRA, 1995; MAYER, LUNDEM, 1999), América Central (ROUBIK, 1978) e na América do Sul (AIZEN, FEISINGER, 1994; MORAES et al., 2000, MALASPINA, SILVA-ZACARIN, 2006).

Delabie et al. (1985) avaliaram a toxicidade e efeito repelente da cipermetrina para a subespécie de abelhas *A. mellifera ligustica*. Esse estudo foi conduzido em condições de laboratório, com testes de ingestão, avaliando que a ação química desse inseticida nas abelhas é muito rápida, cerca de 2 dias. No entanto, em experimentos de campo, com pulverizações do inseticida em cultivo de algodão, não houve diminuição do número de visitas das abelhas. Análises residuais no pólen coletado nas culturas de algodão pelas abelhas mostraram a presença de cipermetrina, corroborando os riscos detectados pelo estudo.

Mais recentemente, Fletcher e Barnett (2003) realizaram um levantamento sobre os freqüentes acidentes com envenenamento de abelhas por pesticidas, no Reino Unido. O trabalho foi feito em conjunto com apicultores e agricultores, para a obtenção de informações necessárias na investigação sobre onde estavam ocorrendo os acidentes por envenenamento, através de substâncias que eram utilizados no controle de pragas. Os principais componentes encontrados em amostras de abelhas mortas foram organofosforados (42%) e carbamatos (29%). Os acidentes causados deram-se através do uso incorreto dos inseticidas (32%) e principalmente pelo uso de inseticidas proibidos ou não-especificados (48%).

Em 2002, nos apiários franceses, foram realizados monitoramentos de pesticidas através de colônias de abelhas *A. mellifera*. Os estudos foram realizados em cinco apiários, distribuídos ao acaso. Para cada apiário, cinco colônias de abelhas receberam coletores de pólen, que foram visitados quatro vezes por ano. Nessas visitas, o pólen capturado foi enviado para análises residuais, onde foram encontrados 19 compostos de elevada toxicidade para as abelhas (CHAUZAT et al., 2006).

Uma metodologia clássica de para estimar os efeitos dos produtos químicos para os insetos benéficos é determinar a DL_{50} (dose média letal) e a CL_{50} (concentração média letal). De acordo com Johansen e Mayer (1990), pesticidas com $DL_{50} < 2.0\mu\text{g/abelha}$ são considerados altamente tóxicos. Mayer e Lunden (1999) realizaram avaliações com testes de ingestão e de aplicação tópica em pulverização de alfafa (*Medicago sativa*) e encontraram efeitos elevados de toxicidade do fipronil para as abelhas das espécies *Nomia melanderi* ($DL_{50} =$

1.130 μ g/abelha), *A. mellifera* ($DL_{50} = 0.013\mu$ g/abelha) e *Megachile rotundata* ($DL_{50} = 0.004\mu$ g/abelha).

Além dos efeitos de toxicidade aguda levando a morte das abelhas, os inseticidas podem também provocar alterações comportamentais nos indivíduos, que ao longo do tempo acarretará sérios prejuízos na manutenção da colônia. Segundo para Medrzycki et al. (2003), em algumas circunstâncias, o efeito de inseticidas nas abelhas não pode ser imediatamente notado, sendo necessárias avaliações em doses subletais de seus compostos químicos para que seja possível observar sua influência na sobrevivência e comportamento destas.

Apicultores italianos relataram elevada mortalidade em suas colônias de abelhas, que foram afetadas pela aplicação do inseticida imidaclopride a agricultura da região, na província de Bologna. Uma das hipóteses para este fato foi sugerida por Bortolotti et al. (2003), estudando os efeitos das doses subletais de imidaclopride sobre as abelhas, verificou que estes inseticidas atuam sobre o as atividades de comportamento de forrageamento, alterando-as e dificultando o seu retorno à colônia.

Decourtye et al. (2003) verificou redução da movimentação, da mobilidade e diminuição da capacidade de comunicação das abelhas, interferindo em suas atividades sociais e dificultando retorno à colônia logo após as coletas, quando submetidas a doses subletais do inseticida "Gaúcho", cujo princípio ativo é o imidaclopride. Decourtye et al. (2004a, 2005) também verificaram que as abelhas tratadas com doses subletais de inseticidas imidaclopride, fipronil e deltametrina, apresentam alterações no desempenho de aprendizado e memória durante o processo de forrageamento

Esses trabalhos mencionam uma metodologia denominada de REP (Reflexo e Extensão da Probóscide) para estudos de comportamento com abelhas forrageiras. A REP é uma reprodução do que ocorre na interação abelha-planta. Quando a abelha forrageira chega ao botão floral, ela instintivamente estende sua probóscide, como reflexo dos receptores gustativos na antena, tarso ou outras partes que são estimuladas pelo néctar. Esse reflexo induz a abelha a coletar o néctar e memorizar o odor floral ali presente. Uma vez memorizado, o odor toca numa parte proeminente do reconhecimento da flor pelas abelhas, durante as próximas viagens de coleta (DECOURTYE et al., 2005).

Ainda que alguns trabalhos sobre o comportamento desses animais tenham sido realizados com doses subletais de inseticidas (DECOURTYE et al., 2003, 2004a, 2005; HASSANI et al., 2005; GUEZ et al., 2005; SCHUMUCK et al., 2001, 2004), eles foram realizados exclusivamente com abelhas de origem européia e nenhum estudo desse tipo está documentado para as abelhas africanizadas.

As abelhas da espécie *A. mellifera*, família Apidae, subespécies européias, foram introduzidas no Brasil em 1839. A subespécie africana foi introduzida em 1956. Atualmente ela é conhecida como africanizada, e é um poli-híbrido resultante do cruzamento das subespécies *A. mellifera scutellata* (oriunda da África), *A. mellifera mellifera* (vinda do norte da Europa), *A. mellifera ligustica* (originária da Itália e norte da Iugoslávia) e *Apis mellifera iberica* (provinda da Europa Ocidental) (RUTTER, 1988).

O fipronil, conhecido comercialmente como Regent, é um inseticida fenilpirazólico introduzido no controle de pragas, mas que afeta outros insetos não-alvo, causando a sua mortalidade. Para os insetos, o fipronil em elevadas concentrações age bloqueando os receptores GABA (ácido gama-aminobutírico), um

importante neurotransmissor inibitório desses animais que abre os canais de cloro inibindo a despolarização da membrana da célula pós-sináptica, levando o inseto a morte (COLE et al., 1993; FAO, 1998). Em doses subletais, o fipronil pode afetar a percepção gustativa, o aprendizado olfatório e a atividade motora das abelhas que são funções essenciais no forrageamento destes insetos (HASSANI et al., 2005). O consumo anual de agrotóxicos no Brasil tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais. Expresso em quantidade de ingrediente-ativo (i.a.), são consumidas anualmente no país cerca de 130 mil toneladas; representando um aumento no consumo de agrotóxicos de 700% nos últimos quarenta anos, enquanto a área agrícola aumentou 78% nesse período (SPADOTTO et al., 2004).

Pesquisas atuais 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 o fipronil pode bioacumular nos tecidos dos organismos, além de afetar o sistema nervoso central (TINGLE et al., 2003). Na França, o inseticida Regent, que possui como princípio ativo o fipronil, foi igualmente proibido por apresentar-se altamente tóxico para muitos animais, especialmente as abelhas, causando baixas de até 40% nos apiários franceses (GODOY, 2005).

A molécula de fipronil devido à região morfológica de atuação nos insetos pode alterar estruturas cerebrais muito importantes associados ao comportamento de forragear e a polinização. Dessa forma, estudos morfológicos tornam-se imprescindíveis para detectar essas possíveis alterações estruturais, para as abelhas tratadas com doses subletais de inseticida. Por exemplo, o princípio do citocromo oxidase (CO) está baseado na atividade metabólica dos neurônios, como as mudanças na atividade neuronal que induzem um aumento na atividade

respiratória celular, devido ao estresse causado por algum composto químico. As mudanças na atividade da CO no sistema nervoso central (SNC) das abelhas são concomitantemente relacionadas à deficiência no aprendizado. Além disso, nos invertebrados a histoquímica da CO é uma ferramenta valiosa para identificar estruturas do cérebro (Lóbulos Antenais, Cálices Ópticos, Corpos Pedunculados), envolvendo os processos de memória (ARMENGOUD et al., 2000; DECOURTYE et al., 2004b). Outras técnicas também podem tornar-se igualmente importantes para a avaliação das alterações cerebrais das abelhas. O gene *fos* expresso em neurônios vem sendo considerado um importante marcador metabólico de estruturas do sistema nervoso, e tem sido usado para avaliar alterações causadas por diversas substâncias no SNC. Sua transcrição pode ser alterada por estímulos variados, como químicos, elétricos ou fisiológicos. Em abelhas, a expressão da proteína semelhante a *fos* foi usada para o estudo da ontogênese e plasticidade do sistema olfatório, através de técnicas de imunohistoquímica, imunocitoquímica e *immunoblotting* (FONTA et al., 1995). Assim, técnicas como a imunohistoquímica do cérebro das abelhas poderão marcar e mapear as regiões específicas, onde os compostos químicos estariam atuando, associados a uma possível deficiência apresentada nestas abelhas após o tratamento.

O sistema nervoso das abelhas inclui o cérebro e o cordão nervoso ventral. O cérebro apresenta três massas ganglionares: o protocérebro, que é a maior e mais complexa região, constituída por corpos pedunculados, ponte protocerebral, corpo central e lobos acessórios, além de receber os nervos dos lobos ópticos; o deutocérebro, que apresenta os lobos antenais e os axônios motores e sensoriais das antenas; e o tritocérebro que contém os centros tritocerebrais (DALY; DOYEN; PURCELL III; 1998).

Os corpos pedunculados do protocérebro são também conhecidos como corpos de cogumelo (“*mushroom bodies*”). Essas estruturas são as mais volumosas e apresentam mais células e sinapses neurais nos insetos. Elas estão intimamente relacionadas com o comportamento de forrageamento, pois é onde se forma um centro complexo de neurônios ligados ao aprendizado e a memória (DALY; DOYEN; PURCELL III; 1998). As estruturas constituídas de numerosos neurônios são denominadas de células Kenyon e formam os cálices com seus dendritos e o pedúnculo, e os lobos (α , β e γ) com seus axônios (FARRIS, 2005; FAHRBACH, 2006).

Diante dessas considerações, a associação de estudos morfológicos das estruturas cerebrais de operárias de abelhas africanizadas (*A. mellifera*) ligadas ao aprendizado e memória e à marcação de genes de expressão imediata que respondem a estímulos externos, como é o caso do gene fos, fornecem dados importantes para a melhor compreensão do efeito toxicológico de compostos químicos nestes órgãos e pode trazer possíveis subsídios para futura utilização destas abelhas como bioindicadores em estudos ecotoxicológicos.

Outro fato insere-se no contexto de que o fipronil é largamente utilizado como defensivo agrícola no país, principalmente de culturas como, por exemplo, cana-de-açúcar, milho, soja, eucalipto e citrus (Ministério da Agricultura, 2006). E, mesmo que, muitos trabalhos mencionem os efeitos da toxicidade aguda para esses animais, os efeitos de doses subletais dos inseticidas são pouco estudados, principalmente no Brasil. Esses estudos são importantes, pois os polinizadores possuem grande valor econômico na agricultura, principalmente para a conservação das espécies de vegetais, além de afetar negativamente a indústria apícola. Além disso, o uso indiscriminado de inseticidas pode estar relacionado com os últimos

acontecimentos sobre o desaparecimento das abelhas em campos de cultivo. Segundo Spivak (2008), nos Estados Unidos, foi perdida uma quantidade muito grande de colônias de abelhas domésticas nos invernos de 2006 e de 2007. Aproximadamente 90% das colméias foram perdidas. A desordem do colapso das colônias é diagnosticada como o não retorno das operárias campeiras, encarregadas de coletar o néctar e o pólen nas flores, não retorna às colméias. Trata-se de um conjunto de sintomas chamado “Colony Collapse Disorder” (CCD), cujas causas estão sendo investigadas intensivamente através dos órgãos oficiais ARS (Agriculture Research Service) e USDA (United States Department of Agriculture). O impacto tem sido tão preocupante que em abril de 2007, o ARS realizou um Workshop reunindo cerca de 80 pesquisadores da área, representantes da indústria e agentes de extensão, com a finalidade de discutir um plano de ação denominado “Colony Collapse Disorder Action Plan” para pesquisar as causas do fenômeno (USDA, 2008a; USDA, 2008b). A combinação de um conjunto de fatores tem sido responsabilizada pela CCD. Esta combinação inclui: novas doenças, parasitoses, genética, nutrição, pesticidas agrícolas e alterações no agroecossistema. No entanto, ainda não existe um consenso definitivo sobre as causas (De Jong e Message, 2008; Spivak, 2008). A CCD foi identificada também na Alemanha, Suíça e Península Ibérica. Contudo as causas desta alta mortalidade ainda não estão bem esclarecidas, sendo uma das hipóteses a intoxicação das abelhas por inseticidas, cada vez mais utilizados na agricultura.

2. Objetivos

O presente projeto teve por objetivo estabelecer as doses subletais de fipronil, através da DL₅₀ por ingestão e contato, para operárias de abelhas africanizadas (*A. mellifera*), em condições de laboratório; verificar a ocorrência de alterações no comportamento de forrageamento das abelhas na presença do inseticida; e detectar as alterações morfológicas que ocorrem no cérebro das abelhas tratadas.

3. Materiais e Métodos

3.1 Testes de toxicidade

3.1.1 *Coleta das abelhas.*

Abelhas adultas recém-emergidas da espécie *A. mellifera* foram coletadas diretamente dos favos, no apiário do Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, com base na coloração e no tamanho das mesmas para a identificação. Para a coleta das abelhas, foram verificadas às condições de saúde da colônia e o estado fisiológico. Os bioensaios para testes de mortalidade estiveram de acordo com o Protocolo Internacional para Testes Químicos (213: Abelhas, Teste de Toxicidade Oral Aguda; 214: Abelhas, Testes de Toxicidade por Contato Aguda) da Organização para Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OECD, 1998).

3.1.2 *Teste de ingestão.*

As abelhas foram acondicionadas em três caixas de madeira (10 abelhas por caixa), medindo 11cm de comprimento x 11cm de largura x 7cm de altura e forradas com papel-filtro. Os experimentos para as operárias foram conduzidos à estufa B.O.D., com temperatura a $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 70%. A dieta preparada, uma solução de sacarose (50/50 v/v), foi oferecida às abelhas em tampas plásticas

de 2,8cm de diâmetro, recoberta por uma tela de arame, a fim de que os insetos não se contaminassem por contato. Os grupos experimentais receberam os mesmos suprimentos de água dos controles, que consiste em algodão embebido em água e colocado em tampa plástica. O inseticida fipronil foi adicionado à dieta das abelhas em doses de 100 μ L diluídos em acetona, na concentração inicial de 1 μ g/abelha.

Após o consumo das abelhas (geralmente de 3 a 4 horas), os alimentadores do tratamento foram retirados das caixas e recolocados somente com cãndi (mel e açúcar confeiteiro, na proporção 1:5). Posteriormente, o experimento foi monitorado e as abelhas mortas foram anotadas em fichas controle, durante 48 horas. Quando a mortalidade aumentou (<10%), após as primeiras 24 horas, o teste foi estendido até 96 horas de duração. As abelhas do controle atingiram a taxa de 10% de mortalidade para a validação do teste (OECD, 1998).

Os resultados do teste de ingestão serviram para determinar a concentração mínima em uma dose capaz de causar a mortalidade de 50% das abelhas, quando administrada oralmente (DL₅₀), obedecendo ao limite de confiança de 95%. O valor foi dado por ng de pesticida por abelha.



Figura I: Estufa B.O.D, reguladora de temperatura e umidade, com as caixas de abelhas em experimento.

3.1.3 *Teste de aplicação tópica*

As abelhas recém-emergidas foram acondicionadas em caixas idênticas às descritas para os testes de ingestão, respeitando o número de 10 abelhas por caixa. Foram oferecidos alimento e água para as abelhas durante os testes de aplicação tópica.

Os pesticidas foram adicionados a 1mL do solvente acetona. Para isso, foram preparadas uma solução na concentração inicial de 1µg/abelha para fipronil e realizadas sucessivas diluições em acetona até a concentração a ser testada.

Para cada abelha foi adicionada 1µL da solução correspondente (1µg/µL) na região do pronoto com o auxílio de uma micropipeta automática de 1µL.

Após a aplicação, as abelhas permaneceram por 15 minutos em uma bandeja plástica para permitir a evaporação do solvente. Quando elas passaram a caminhar na bandeja foram retiradas e distribuídas nas caixas de madeira. Nestes experimentos foram utilizados dois controles: um controle sem solvente (SS) e outro, o controle solvente (S) com o objetivo de verificar se a acetona, como solvente, apresentou-se tóxica às abelhas. A mortalidade das abelhas foi anotada 4 horas após aplicação do pesticida e depois disso, durante intervalos de 24 horas, até o período máximo de 96 horas. A mortalidade do controle não pode exceder a taxa de 10%.

Os resultados do teste de aplicação tópica serviram para determinar a concentração mínima em uma dose capaz de causar a mortalidade de 50% das abelhas, quando administrada por contato (DL_{50}), obedecendo ao limite de confiança de 95%. O valor foi dado por ng de pesticida por abelha.

3.2 Efeito dos pesticidas no comportamento de forrageamento.

3.2.1 *Atividade locomotora.*

Foram utilizadas as abelhas operárias de colônias *A. mellifera*, provenientes do apiário do Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro.

Para os testes de locomoção foi utilizada uma caixa de madeira com 60 cm de comprimento, 40 cm de largura e 4 cm de altura. A caixa formava uma gaveta na qual a parte superior foi recoberta com uma placa de vidro, para a abertura e fechamento da mesma e facilitar a observação do experimento. Na parte posterior foi colocada uma lâmpada fluorescente a fim de atrair os insetos para seu contato. A caixa foi disposta com seis raias para observação das abelhas em locomoção.



Figura II: Caixa-gaveta com raias para os testes de locomoção.

As abelhas tratadas topicamente com fipronil foram colocadas na parte inferior da caixa e liberadas no ponto zero. Foi calculado o tempo percorrido pelas abelhas desde o momento da largada até a chegada em contato com a lâmpada

após a aplicação do inseticida. Houve três repetições para cada tratamento e para o grupo controle. Os testes foram realizados em câmara escura e a caixa esteve inclinada em ângulo de 45°.

3.2.2 *Sensibilidade ao alimento, aprendizado olfatório e memória.*

Para avaliar as respostas ao estímulo do alimento, foi utilizado o método Reflexo de Extensão da Probóscide (REP) (MENZEL, 1999; SCHEINER et al., 2004). Para os experimentos, foram utilizadas 20 abelhas por tratamento (replicado três vezes). As abelhas foram colocadas individualmente em tubos plásticos, de maneira que somente as antenas ficassem livres para o lado de fora. Obrigatoriamente, as abelhas permaneceram sem alimento por um período de 4 horas, anterior ao início dos testes.

Posteriormente, as abelhas foram selecionadas para mostrarem o reflexo de extensão da probóscide, após a estimulação dos receptores gustativos na antena com solução de xarope de açúcar (50% v/v). Então foi anotado o número de indivíduos que exibiram o reflexo em resposta a estimulação (resposta e não-resposta). O grupo controle recebeu apenas a solução de xarope de açúcar. Inicialmente, o grupo tratamento recebeu o xarope de açúcar por 1 hora e logo em seguida foi feita uma aplicação tópica no tórax do inseto com as concentrações pré-estabelecidas (01, 0,5 e 1ng de fipronil por abelha) nos testes de toxicidade.

Para os testes de desempenho de aprendizado e memória, foi colocado em contato com a antena da abelha um odor floral conhecido como citral, que foi embebido em papel filtro e colocado em contato com a antena das abelhas através de uma micropipeta automática, a fim que estimulasse a extensão da probóscide. Cada abelha recebeu xarope de açúcar, como recompensa, estimulando

condicionamento à medida que recebam o citral nos receptores gustativos das antenas. Após o aprendizado e memorização do odor floral, foi administrado fipronil nas mesmas concentrações citadas anteriormente, junto à solução estimulante de REP (citral), verificando o desempenho do aprendizado e contabilizando o número de abelhas que estenderam a probóscide (resposta positiva) e o número de abelhas que não estenderam (resposta negativa).



Foto: M.Giurfa

Figura III: Aplicação tópica de inseticida nos testes de Resposta e Extensão da Probóscide (REP) para as abelhas.

3.3 Análises Microscópicas.

3.3.1 *Análise Morfológica.*

Inclusão em Resina e Coloração pela Hematoxilina de Harris – Eosina.

Para caracterização do cérebro de *A. mellifera* foram coletados pelo menos 5 indivíduos de cada grupo e os cérebros dissecados em solução salina para insetos tamponada (NaCl 7,5g/L, Na₂HPO₄ 2,38g/L e KH₂PO₄ 2,72g/L) e fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4. Em seguida foi feita uma lavagem com o mesmo tampão e o material foi desidratado em

concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 95%), cada banho durando 30 minutos.

Após o material ser desidratado, foi transferido para a resina de embebição, onde permaneceu durante mais 24 horas e, posteriormente, foi incluído em moldes plásticos contendo resina como polimerizador. A embebição e inclusão foram efetuadas com resina Leica. Os blocos foram mantidos em estufa a 37°C e depois de polimerizados, foram colocados em suportes de madeira para a secção (5µm de espessura) em micrótomo.

As secções foram recolhidas em lâminas de vidro, previamente limpas, e coradas com hematoxilina de Harris durante 5 minutos, depois lavadas em água corrente por aproximadamente 5 minutos para que o excesso de corante seja retirado e, em seguida, corado com eosina também por 5 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em água corrente para retirar o excesso de corante. Posteriormente foram secas e diafanizadas em xilol, montadas em Bálsamo do Canadá e cobertas com lamínulas para a observação do microscópio.

3.3.2 *Análise Histoquímica.*

Técnica de marcação fluorescente para células mortas usando Hoescht 33342 e Iodeto de Propídeo.

Os cérebros foram dissecados em solução salina para insetos tamponada (NaCl 7,5g/L, Na₂HPO₄ 2,38g/L e KH₂PO₄ 2,72g/L), e colocados em lâminas de vidro. Em seguida, o material foi incubado em Hoescht 10 mg/mL (Bisbenzimidazo 33342, Sigma), na ausência de luz, por 5 minutos. Depois foi colocada uma gota da solução de iodeto de propídeo (960 µL de citrato de sódio 3%, 10 µL de formalina 1:80, 20 µL de FDA 460 µg/mL, 10 µL de iodeto de propídeo 125 µg/mL), reagindo por mais 5

minutos. O material foi analisado em microscópio fluorescente Leica, usando filtro UV 365 nm e filtro barreira 400 nm, e foto documentado.

As células marcadas em azul pelo Hoescht representam as células vivas, enquanto as células mortas são marcadas em vermelho pelo iodeto de propídeo.

3.3.3 *Imunohistoquímica*

Após a coleta dos animais e o tratamento tópico de fipronil nas concentrações já mencionadas, os cérebros foram dissecados e fixados em formalina neutra tamponada por 2 horas. Em seguida, os cérebros passaram pelos procedimentos rotineiros para inclusão em parafina ultra-pura (Histosec Merck). Os cortes do cérebro foram realizados em micrótomo Leica com espessura aproximada de 10 µm, e colocados sobre lâminas histológicas. Após secagem, as lâminas foram desparafinizadas para a realização da imunohistoquímica.

Uma serie de cortes do cérebro de cada um dos animais utilizados nos experimentos foi submetida à marcação imunohistoquímica. Os cortes foram tratados com 0,3% de peróxido de hidrogênio em solução tampão de fosfato de potássio (KPBS) + 0,3% de Triton, por cerca de 10 minutos, sendo em seguida, incubados em soro normal de cabra para bloqueio. Decorrido o tempo necessário, os cortes foram incubados, por 24 horas, com o anticorpo primário anti-*fos* (Ab-5 Calbiochem) feito em coelho, na concentração 1:20.000 e 3% de soro normal de cabra em KPBS + 3% de Triton X-100, em refrigeração. Os cortes foram lavados em KPBS e incubados, por 1 hora, em anticorpo secundário biotilado, feito em cabra contra coelho (Jackson Labs 1:1000) e por mais 1 hora em complexo de avidina-biotina (Vector, 1:500). Após esses procedimentos os cortes foram revelados com

tetrahydroclorato de diaminobenzidina (DAB, Sigma) e 0,03% de peróxido de hidrogênio dissolvidos em KPBS.

Os cortes permaneceram reagindo por cerca de 5 minutos, e para cessar as reações foram realizadas lavagens sucessivas com KPBS.

As fotomicrografias foram adquiridas por meio de uma câmara digital Spot RT (Instrumentos Diagnósticos) adaptada a um microscópio Leica DMR e a um computador PC Apple Macintosh Power. Para a aquisição foi utilizado o software Adobe Photoshop 5.0. As imagens foram trabalhadas utilizando-se o programa Corel Draw 11 ou Adobe Photoshop apenas para ajustes finos, como brilho, contraste e balanço de cores.

4. Resultados

4.1 Teste de Toxicidade e cálculo da DL₅₀.

A tabela 1 mostra os números de mortalidade para os testes de ingestão com o inseticida fipronil para as abelhas *A. mellifera*.

Tabela 1 : Mortalidade das abelhas *A. mellifera*, após administração na dieta de doses do inseticida fipronil (ng/abelha).

Mortalidade					
Concentração (ng/abelha)	Exposição (horas)				total
	24	48	72	96	
1,0	0	0	0	9	9
3,0	0	0	7	8	15
5,0	0	2	16	23	41
8,0	0	14	19	16	49
11	0	37	23	-	60
controle	0	0	0	0	0

A tabela 2 mostra as análises estatísticas obtidas após os cálculos de regressão Probit, nos testes de ingestão com o inseticida fipronil para as abelhas *A. mellifera*.

Tabela 2 : Toxicidade oral do inseticida fipronil e determinação da dose letal média (DL₅₀) para operárias de abelhas *A. mellifera*.

Toxicidade oral de fipronil (ng/abelha)				
Espécie	n	G	χ^2	DL ₅₀
<i>A. mellifera</i>	300	3	22.809	3.27

Para os testes de toxicidade com aplicações tópica de fipronil em operárias de abelhas *A. mellifera*, as avaliações foram realizadas em até 48 horas, seguindo o protocolo da OECD (1998). A tabela 3 mostra os números de mortalidade para os testes de aplicação tópica com o inseticida fipronil para as abelhas *A. mellifera*.

Tabela 3 : Mortalidade das abelhas *A. mellifera*, após administração tópica do inseticida fipronil (ng/abelha).

Mortalidade			
Concentração (ng/abelha)	Exposição (horas)		
	24	48	total
0.1	0	0	0
0.125	9	10	19
0.15	15	19	34
0.2	21	20	41
0.25	26	26	54
0.3	43	17	60
0.5	51	9	60
1	60	-	60
controle	0	0	0

A tabela 4 mostra as análises estatísticas obtidas após os cálculos de regressão Probit, nos testes de aplicação tópica com o inseticida fipronil para as abelhas *A. mellifera*.

Tabela 4 : Toxicidade tópica do inseticida fipronil e determinação da dose letal média (DL₅₀) para operárias de abelhas *A. mellifera*.

Toxicidade tópica de fipronil (ng/abelha)				
Espécie	n	G	χ^2	DL ₅₀
<i>Apis mellifera</i>	300	6	15.885	0.157

Através dos resultados estabelecidos com os testes de toxicidade, pode-se afirmar que a DL₅₀ tópica do inseticida fipronil para abelhas adultas da espécie *A. mellifera* é 0,157ng/abelha, podendo variar entre 0,139 e 0,175 ng/abelha. Assim, foi estabelecido 0,1 ng/abelha como dose subletal, para posterior avaliação de seus efeitos sobre a morfologia e comportamento desses insetos.

Para as análises morfológicas foram utilizadas abelhas tratadas com a técnica de aplicação tópica, simulando as condições de campo.

4.2 Efeito no comportamento de forrageamento.

4.2.1 Atividade locomotora.

A avaliação motora das abelhas é apresentada na figura IV. Previamente, as abelhas foram tratadas topicamente com fipronil nas concentrações 0,1, 0,5 e 1,0 ng/abelha de fipronil. Esta última apresentou resultados significativos ($p=0,66$) para a deficiência atividade locomotora das operárias de *A. mellifera*.

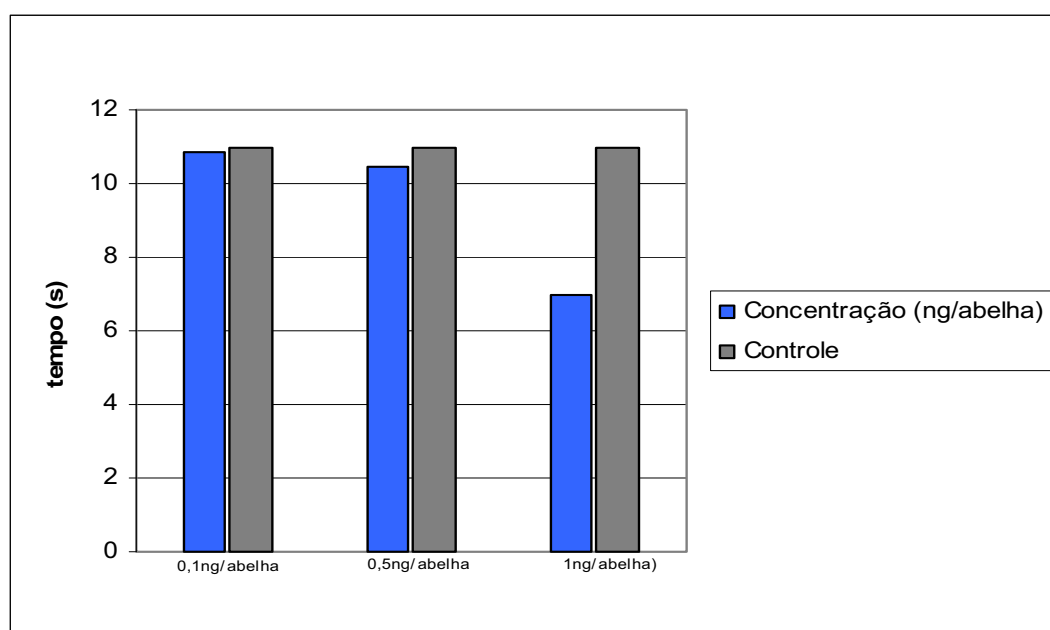


Figura IV: Atividade locomotora para operárias de *A. mellifera* nas concentrações 0,1, 0,5 e 1,0 ng/abelha de fipronil, comparadas ao grupo controle.

4.2.2 Sensibilidade ao alimento, aprendizado olfatório e memória.

A figura V apresenta o condicionamento realizado nos testes de memória e aprendizado, através de Reflexo e Extensão da Probóscide (REP) para abelhas forrageiras de *A. mellifera*. Posteriormente ao condicionamento foram realizados testes administrando fipronil nas doses 0,1, 0,5 e 1,0ng/abelha de fipronil.

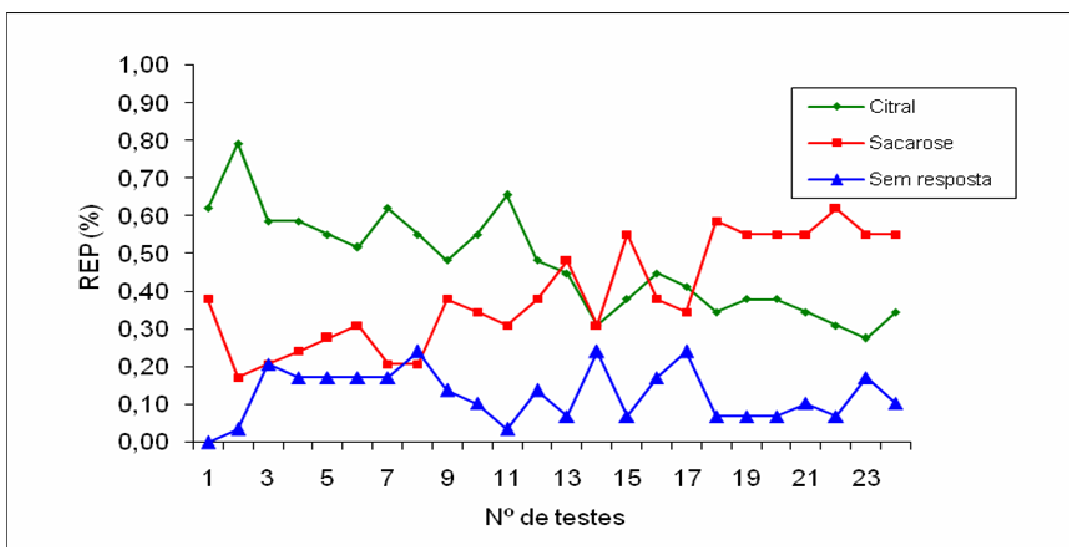


Figura V: Condicionamento realizado em forrageiras *A. mellifera* através dos testes de Resposta e Extensão da Probóscide (REP) ($\chi^2=24,327$; $P<0,5$).

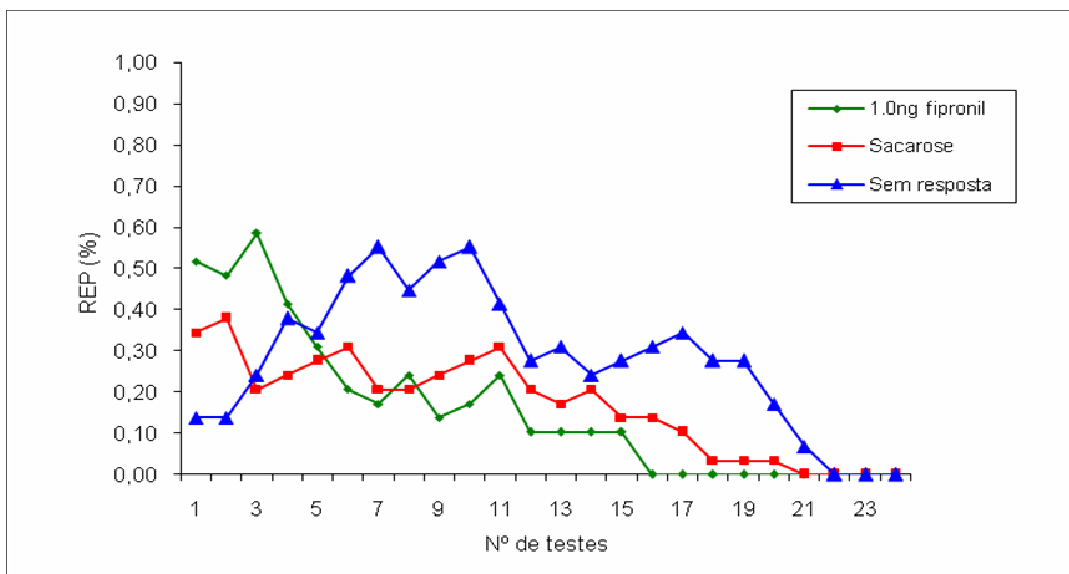


Figura VI: Condicionamento realizado em forrageiras *A. mellifera* através dos testes de REP, após tratamento com 1,0ng de fipronil/abelha ($\chi^2=1,977$; $P=0,854$).

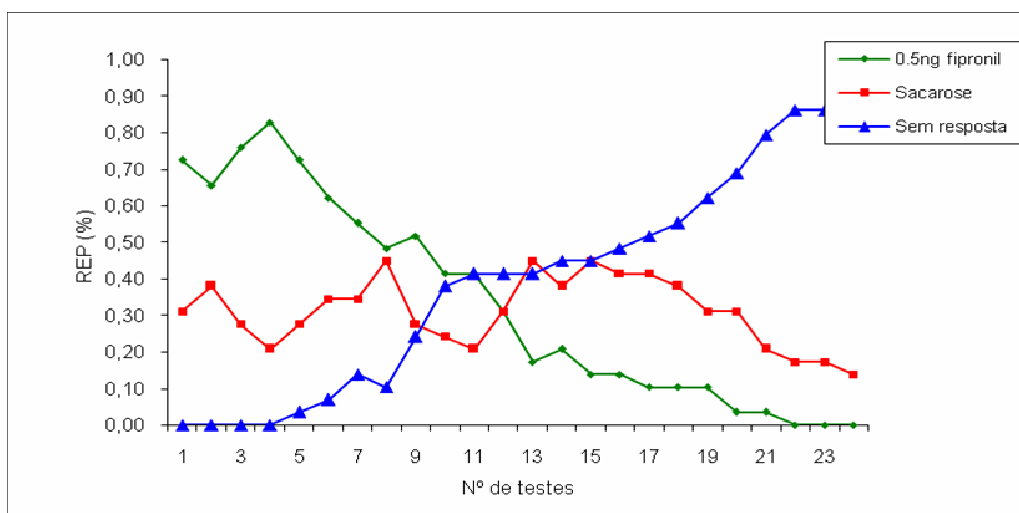


Figura VII: Condicionamento realizado em forrageiras *A. mellifera* através dos testes de REP, após tratamento com 0,5ng de fipronil/abelha ($\chi^2=10,680$; $P=0,689$).

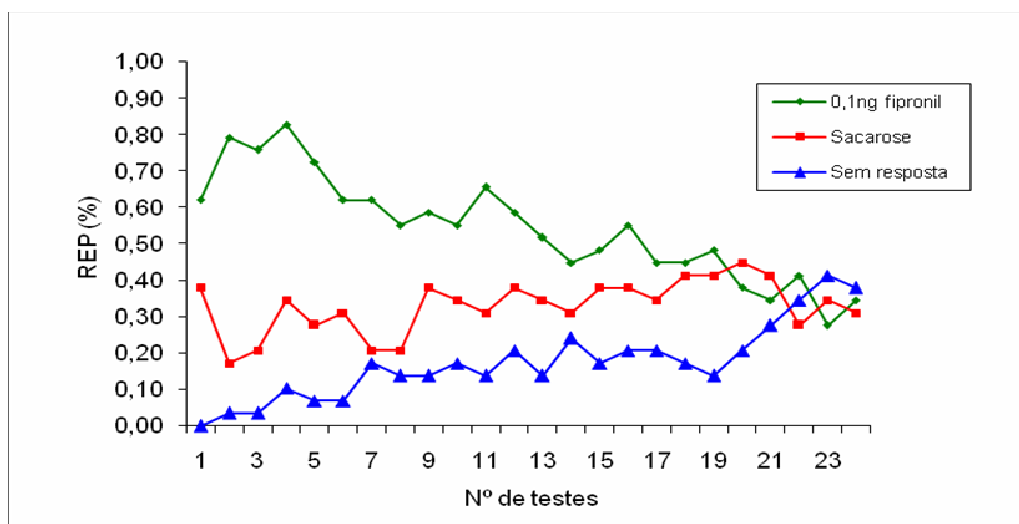


Figura VIII: Condicionamento realizado em forrageiras *A. mellifera* através dos testes de REP, após tratamento com 0,1ng de fipronil/abelha ($\chi^2=24,357$; $P<0,5$).

A figura IX mostra as curvas comparativas para o experimento de REP realizado com a com inseticida fipronil para operárias de *A. mellifera*, nas concentrações 0,1, 0,5 e 1,0ng/abelha.

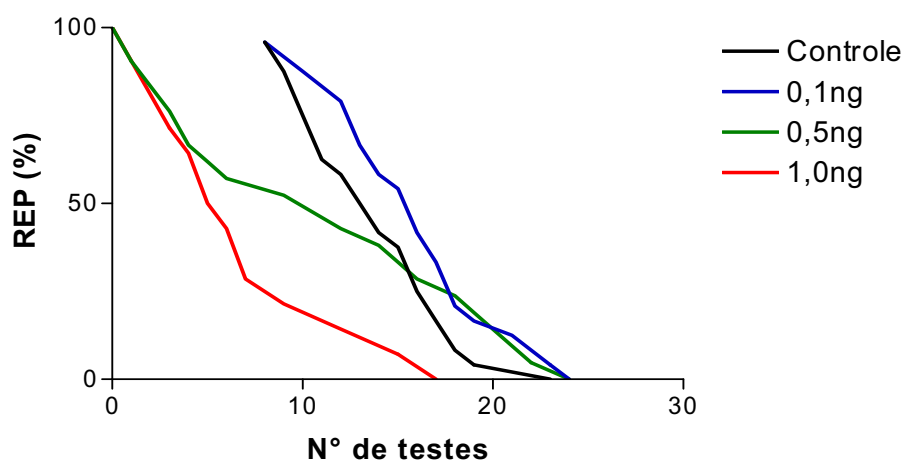
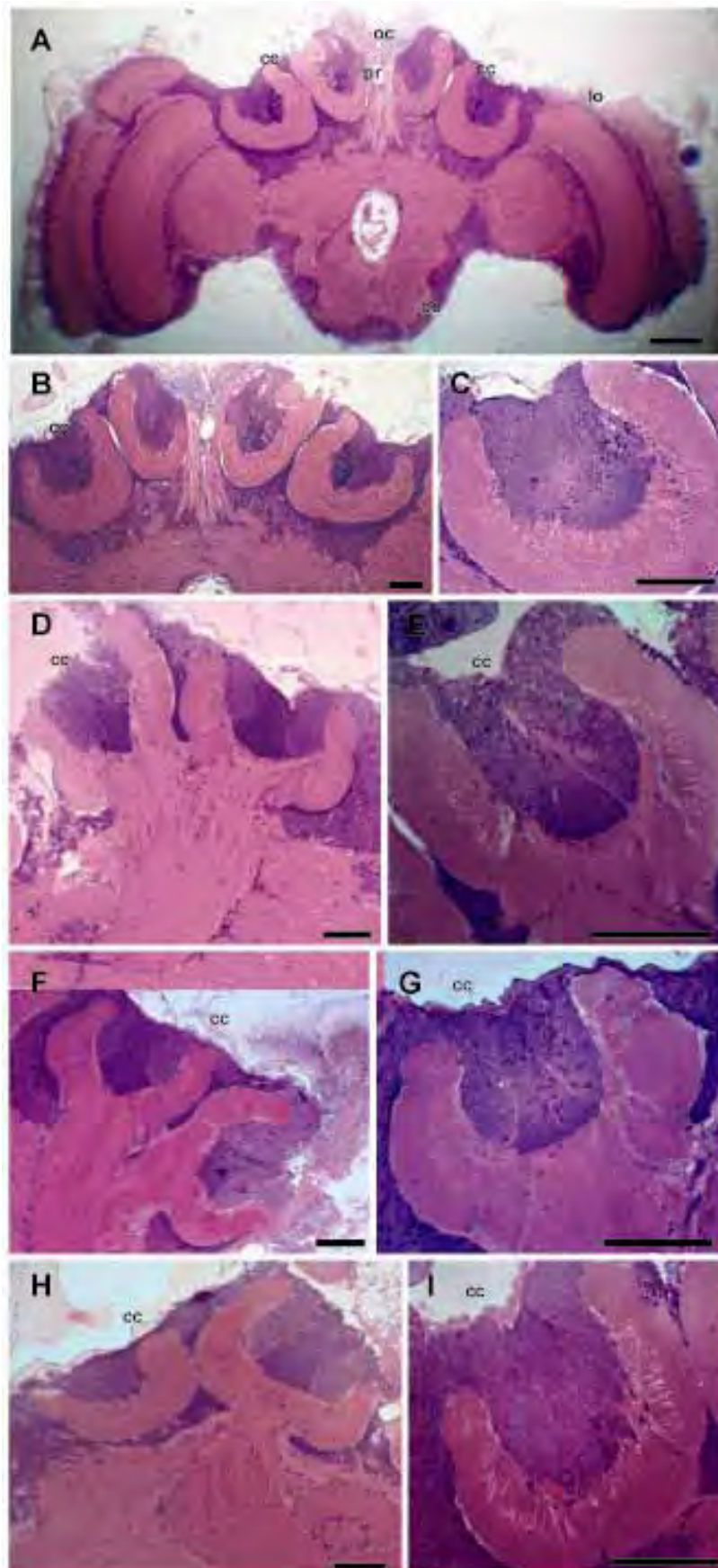


Figura IX: Curvas comparativas para o tratamento de fipronil em abelhas forrageiras *A. mellifera* através dos testes de REP, nas concentrações 0,1, 0,5 e 1,0ng de fipronil/abelha ($\chi^2=4,819$; $P<0,05$).

4.3 Análises Microscópicas

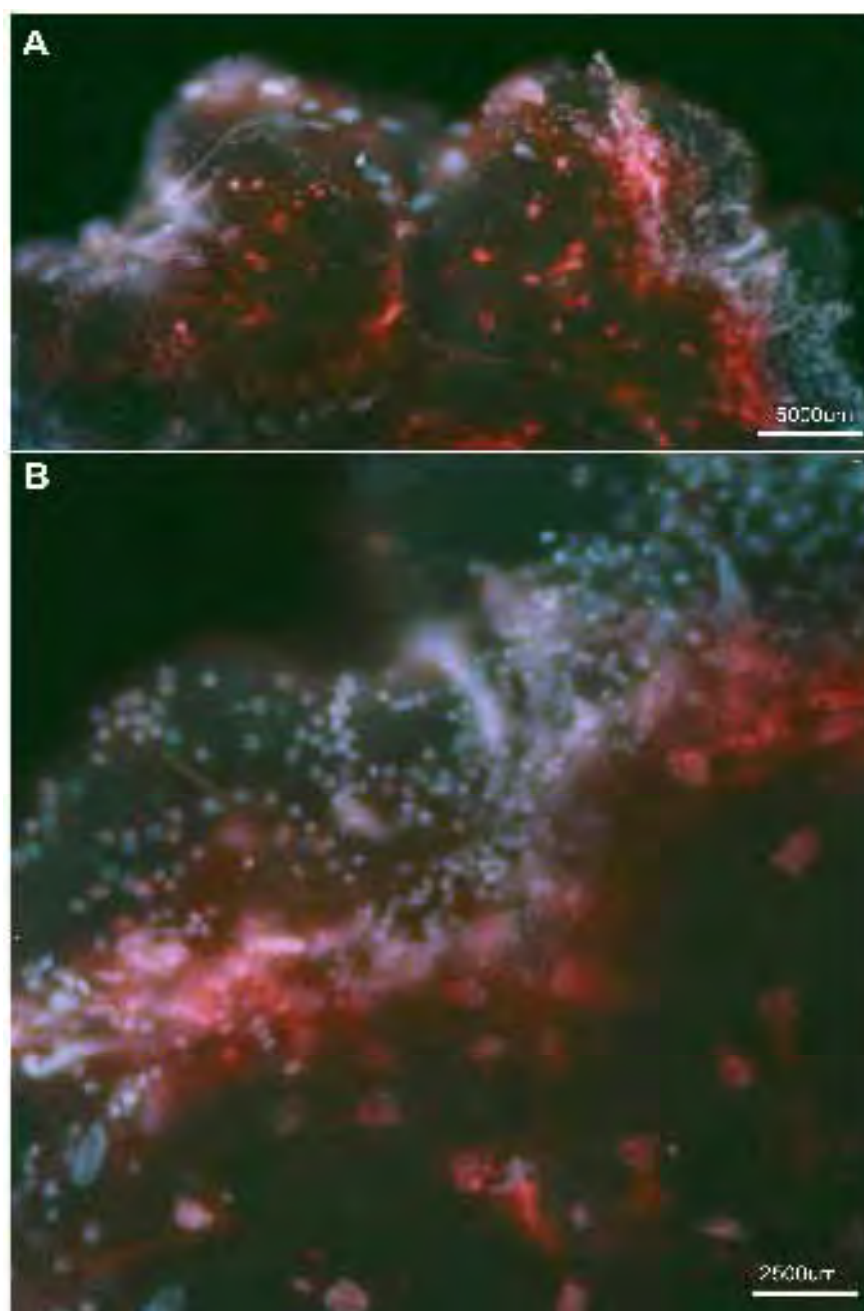
4.3.1 Análises Morfológicas

Na figura X encontram-se as fotomicrografias dos cortes histológicos no cérebro de abelhas *A. mellifera*. As estruturas evidenciadas são denominadas corpos cogumelares e são sítios relacionados a memória e aprendizado. Os cortes não apresentaram alterações morfológicas após o tratamento com doses letais (1,0ng/abelha e 0,5ng/abelha) e subletais do inseticida fipronil.



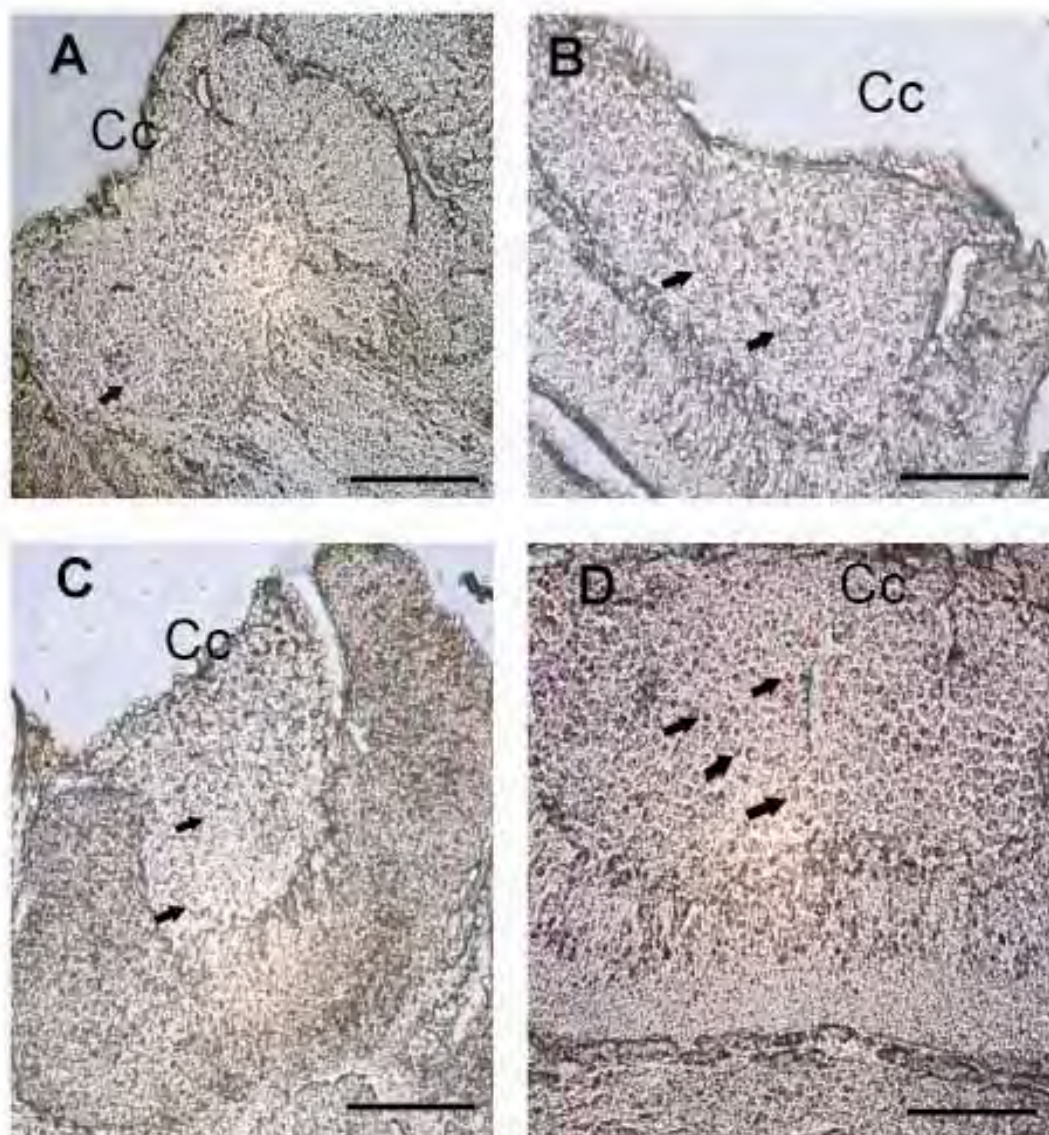
4.3.2 Análises Histoquímicas

Na figura XI é apresentado fotomicrografias do cérebro de operárias de *A. mellifera* em montagem total, preparadas com Hoescht e Iodeto de Propídeo, tratadas com doses subletais do inseticida fipronil. Não foi observado morte celular nas partes ligadas a memória e aprendizado.



4.3.3 Análises Imunohistoquímica.

Na figura XII encontram-se as fotomicrografias dos cortes histológicos no cérebro das abelhas. As setas em detalhe evidenciam a marcação da proteína-fos, nos corpos cogumelares. Os cortes apresentaram um aumento na expressão da proteína-fos após o tratamento, principalmente para as doses 1,0 e 0,5 η g/abelha). Embora o grupo controle e a dose (0,1 η g/abelha) também tenham apresentado expressão da proteína-fos, a quantidade encontrada foi inferior as mais elevadas.



5. Discussão

Os resultados obtidos na determinação da toxicidade oral do inseticida fipronil corroboraram com os resultados de Mayer e Lunden (1999) que realizaram avaliações com testes de ingestão e de aplicação tópica em pulverização de alfafa (*Medicago sativa*) e encontraram efeitos elevados de toxicidade do fipronil para as abelhas das espécies *Nomia melanderi* ($DL_{50} = 1.130\mu\text{g}/\text{abelha}$), *A. mellifera* ($DL_{50} = 0.013\mu\text{g}/\text{abelha}$) e *Megachile rotundata* ($DL_{50} = 0.004\mu\text{g}/\text{abelha}$). Dessa forma, após as análises de cálculo de regressão Probit (ROLF, 1958), foi determinado que a DL_{50} oral do inseticida fipronil para abelhas africanizadas *A. mellifera* é 3,27 $\eta\text{g}/\text{abelha}$ e para aplicação tópica de 0,157 $\eta\text{g}/\text{abelha}$. Segundo Johansen e Mayer (1990) esse inseticida pode ser considerado altamente tóxico, pois seus valores estão abaixo de 2 $\mu\text{g}/\text{abelha}$.

Por considerar os valores dos testes de mortalidade do inseticida fipronil para abelhas *A. mellifera* muito abaixo da média de toxicidade com relação a maioria dos inseticidas, torna-se importante análises acima da DL_{50} . As análises morfológicas e comportamentais foram realizadas com doses letais (1,0 e 0,5 $\eta\text{g}/\text{abelha}$ de fipronil) e com doses subletais (0,1 $\eta\text{g}/\text{abelha}$ de fipronil), aplicadas topicamente. O fipronil é fotoconvertido em outros subprodutos muitas vezes mais tóxicos, o que pode levar a diferença de resultados das análises com aplicação tópica e oral (TINGLE et al., 2003).

Resultados semelhantes foram obtidos dos testes REP, que simulam a interação abelha-planta em condições de laboratório. As abelhas forrageiras mostraram uma grande deficiência no aprendizado e memorização após o tratamento com a dose de 1,0 $\eta\text{g}/\text{abelha}$ de fipronil, apesar de apresentarem

dificuldade para suportar todos os testes. Para as doses 0,5 e 0,1ng/abelha, as abelhas forrageiras suportaram os testes e houve também uma diminuição, menos acentuada, do aprendizado e memorização. Para a atividade locomotora destes insetos, apenas a concentração 1,0ng/abelha de fipronil apresentou diferença significativa entre as abelhas tratadas e do grupo controle. O acúmulo do neurotransmissor excitador 1-glutamado nas membranas pós-sinápticas pode ter aumentado a intensidade de seus movimentos.

Estes dados não corroboram com Hassani et. al.(2005), que mostraram em seus estudos, que os efeitos do fipronil nas abelhas não são lineares com relação as concentrações. Esses autores sugerem que o desempenho de aprendizado e memorização pode ser menor em abelhas tratadas com 0,5ng de inseticida com relação as tratadas com 0,1 e 1,0ng de inseticida. Resultado já observado em abelhas para o inseticida imidaclopride (LAMBIM et al., 2001). O inseticida fipronil é um bloqueador do neurotransmissor GABA, mas poderia afetar outros receptores e ter diferentes afinidades com cada um deles. Em adição, o mecanismo desintoxicação forma compostos como as sulfonas e o fotoproducto disulfil-fipronil, que geralmente são muito mais tóxicos e potentes que o produto químico inicial (HAINZL et al., 1998).

Os resultados das análises morfológicas apresentaram distinções, com relação as técnicas empregadas. Embora os cortes histológicos não tenham apresentado alterações estruturais visíveis após o tratamento com o inseticida (FIG.1), a marcação da proteína-fos foi facilmente identificada em todos os cortes dos cérebros das abelhas (FIG.3). A diferença entre o tempo de aplicação tópica do inseticida e a dissecação dos cérebros das abelhas foi apenas de 4 horas, devido a elevada taxa de mortalidade para a dose de 1,0ng/abelha de fipronil, mostrando que

para estas análises são necessárias observações dos cortes histológicos também para animais tratados com dosagem crônica de inseticidas. Diferente destes resultados das análises morfológicas, Cruz et. al. (2009), encontrou alterações no intestino médio das larvas tratadas com fipronil, nas concentrações de 0,1 e 1µg/g.

A expressão do gene fos aumenta dos estágios larvais para as operárias, a medida que os estímulos são elevados na vida adulta do inseto (FONTA et.al., 1995). O estresse causado pela ação tóxica do inseticida nas abelhas foi observado com o aumento da marcação da proteína-fos, principalmente para as concentrações 0,5 e 1,0ng/abelha de fipronil. O efeito também notado para a dose subletal 0,1ng/abelha, embora em menores proporções.

A técnica de marcação fluorescente com Hoescht e Iodeto de Propídeo não se mostraram eficiente nas abelhas para detecção de células em apoptose. Os reagentes não penetraram nos cérebros preparados, evidenciando que tal fato pode ter ocorrido devido a presença da neuroglia, barreira que envolve todo o cérebro e que tem a função de seletividade, a fim de manter a integridade iônica do fluido neuronal (CARLSON et al., 2000; FREEMAN; DOHERTY, 2006). No estudo realizado por Vitt e Hartfelder (1998), o cérebro foi incubado em brometo de etídeo (BrdU) para provocar lesões na neuroglia. Dessa forma, é possível que uma alteração de reagentes na preparação da técnica, indique as células em morte celular, haja vista elevado grau de toxicidade do inseticida fipronil para as abelhas.

O inseticida fipronil mostrou-se com elevada toxicidade para as abelhas melíferas. Embora em baixas concentrações, apresentou grande mortalidade dos insetos dificultando sua avaliação no comportamento e nas alterações morfológicas. Esses resultados também confirmam a sugestão de muitos pesquisadores, de que, os inseticidas estariam contribuindo pelo desaparecimento das abelhas dos campos

de cultivo e de muitos ecossistemas, atualmente apresentado com desordem e colapso das colônias (DE JONG e MESSAGE, 2008; SPIVAK, 2008).

6. Conclusão

Os resultados permitem sugerir a possibilidade do inseticida fipronil, afetar o aprendizado e a memorização das abelhas adultas da espécie *A. mellifera*. Através da marcação da proteína-fos e dos testes de REP pode-se observar que a aplicação do fipronil interfere no comportamento desses insetos. Embora, neste trabalho não tenha sido evidenciado a ocorrência de morte celular nas estruturas relacionadas com o aprendizado e memorização, a elevada mortalidade causada pelo inseticida nas abelhas pode ter dificultado uma análise mais apurada.

7. Referências Bibliográficas

AIZEN, M.A.; FEINSINGER, P. Forest fragmentation, polination, and plant reproduction in a Chaco dry Forest, Argentina. **Ecology**. Durham. n.75, p.330-351, 1994.

ARMENGAUD, M.; CAUSSE, N.; AIT-OUBAH, J.; GINOLHAC, A.; GAUTHIER, M. Functional cytochrome oxidase histochemistry in the honeybee brain. **Brain Research**. Amsterdam v. 853, p. 390-393, 2000.

BATRA, S.W.T. Bees and polination in our changing environment. **Apidologie**. Avignon. n. 26, p. 361- 370, 1995.

BORTOLOTTI, L.; MONTANARI, R.; MARCELINO, J.; MEDRZYCHI, P.; MAINI, S.; PORRINI, C. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. **Bulletin of Insectology**. Bologna. v. 56, n. 1, p. 63-67, 2003.

CARLSON, S. D.; JUANG, J. L.; HILGERS, S. L.; GARMENT, M. B. Blood Barriers of the insect. **Annual Review of entomology**, Stanford, v. 45, n. 1, p. 151-174, 2000.

CELLI, G.; MACCAGNANI, B. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. **Bulletin of Insectology**. Bologna. v. 56, n. 1, p. 137-139, 2003.

CHAUZAT, M.; FAUCON, J.; MARTEL, A.; LACHAIZE, J.; COUGOULE, N.; AUBERT, M. A survey of pesticides residues in pollen loads collected by honey bees in France. **Journal of Economic Entomology**. Lanham. v. 99, n. 2, p. 253-262, 2006.

COLE, L. M.; NICHOLSON, R. A. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channels. **Pesticide of Biochemistry Physiology**. California. v. 46, p. 47-54, 1993.

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

CRUZ, A. S.; SILVA-ZACARIN, E. L.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae : Morphological alterations in the midgut of *A. mellifera*. **Cell Biology and Toxicology**. Londres. *no prelo.*, 2009.

DALY, H. V.; DOYEN, J. T.; PURCELL III, A. H. **Introduction to insect biology and diversity**. 2nd ed. New York, Oxford University Press, 1998.

DECOURTYE, A.; LACASSIE, E.; PHAM-DELEGUE, M. H. Learning performances of honey bees are differentially affected by imidacloprid according to the season. **Pest Management Science**. Brighton. v. 59, p. 269-278, 2003.

DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; CLUSEAU, S.; CHARRETON, M.; PHAM-DELEGUE, M. H. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. New York. v. 57, p. 410-419, 2004a.

DECOURTYE, A.; ARMENGAUD, M.; RENOU, M.; DEVILLERS, J.; CLUSEAU, S.; GAUTHIER, M.; PHAM-DELEGUE, M. H. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Pesticide of Biochemistry Physiology**. San Diego. v. 78, p. 83-92, 2004b.

DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; GENECQUE, E.; LE MENACH, K.; BUDZINSKI, H.; CLUSEAU, S.; PHAM-DELEGUE, M. H. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybees *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. New York. v. 48, p. 242-250, 2005.

DE JONG, D.; MESSAGE, D.. New and exotic disease threats for Brazilian bees. In: **ENCONTRO SOBRE ABELHAS**, 8, Ribeirão Preto, SP, Anais...2008. CD-ROM. 2008.

DELABIE, J.; BOS, C.; FONTA, C.; MASSON, C. Toxic and repellent effects of Cypermethrin on the honeybee: laboratory, glasshouse and field experiments. **Pesticide Science**. Brighton. v. 16, n. 4, p. 409-415, 1985.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. **Annual Review of Entomology**. Stanford. n. 82, p. 81-106, 2006.

FAHRBACH, S. Structure of the mushroom bodies of the insect brain **Annual Review Entomology**, Stanford, v. 51, p. 209-232, 2006.

FAO (Organizações das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação). **Pesticides Residues in food**. Report of the joint meeting of the FAO Painel of Experts on Pesticides Residues in Foods and the Environment and the WHO Core Assessment Group. Lyon, 215p, 1998.

FARRIS, S. M. Evolution of insect mushroom bodies: old clues, new insights **Arthropod Structure & Development**, Oxford, v. 34, p. 211-234, 2005.

FLETCHER, M; BARNETT, L. Bee poisoning incidents in the United Kingdom. **Bulletin of Insectology**. Bologna. v. 56, n. 1, p. 141-145, 2003.

FONTA, C.; GASCUEL, J.; MASSON, C. Brain FOS-like expression in developing and adults honeybees. **NeuroReport**, v. 6, p. 745-749, 1995.

FREEMAN, M. R.; DOHERTY, J. Glial cell biology in Drosophila and vertebrates. **Trends in neurosciences**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 82-90, 2006.

GODOY, J. **Alarme contra inseticidas assassinos de abelhas**. Lunes, México. online. <http://tierramerica.net/2004/0313/pacentos.shtml> . Acesso em 15 out. 2005.

GUEZ, D.; ZHANG, S.; SRINIVASAN, M. Methyl Paration modifies foraging behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). **Ecotoxicology**. Oak Ridge. v. 14, p. 431-437, 2005.

HASSANI, A. K.; DACHER, M.; GAUTHIER, M. ARMENGAUD, C. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. Fayetteville . v. 82, p. 30-39, 2005.

HAINZL, D.; COLE, I. M.; CASIDA, J. E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolites and desulfinil product. **Chemical Research Toxicological**. v. 11, p. 1529-1535, 1998.

JOHANSEN, C. A.; MAYER, D. F.; EVES, J. D.; KIOUS, C. W. Pesticides and bees. **Environmental Entomology**. Lanham. v. 12, p. 1513-1518, 1983.

KEVAN, P. G. Pollinators as bioindicators of yhe state of the environment:: species, activity and diversity **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, p. 373-393, 1999.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell makers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Scienses**. São Paulo. v. 23, n. 3/4, p. 303-309, 2006.

MAYER, D. F.; LUNDEN, J. D. Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female of *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. **Journal of Apicultural Research**. Cardiff. v. 38, v. 3-4, p. 191-197, 1999.

MEDRZYCKI, P.; MONTANARI, R.; BORTOLOTTI, L.; SABATINI, A. G.; MAINI, S.; PORRINI, C. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour: Laboratory tests. **Bulletin of Insectology**. Bologna. v. 56, n. 1, p. 59-62, 2003.

MENZEL, R. Memory dynamics in the honeybees. **Journal of Comparative Physiology A**. Viena. v. 185, p. 323-340, 1999.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxico Fitossanitários (Agrofit)**. Brasília, Brasil. online. <http://www.agricultura.gov.br/> . Acesso em 26 outubro de 2006.

MORAES, S. S.; BAUTISTA, A. R. L.; VIANA, B. F. Avaliação da toxicidade aguda (DL₅₀ e CL₅₀) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): via de contato. **Anais Sociedade Entomológica Brasil**. Jaboticabal. v. 29, n.1, p. 31-37, 2000.

OEDC. Guidelines for the testing of chemicals. Honeybees, Acute Oral and Contact Toxicity test, n.214, n.213, 1998.

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

PORRINI C., GHINI S., GIROTTI S., SABATINI A.G., GATTAVECCHIA E., CELLI G. Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. In, **Honey bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals** (Devillers J. e Pham – Delègue M.H. Eds). Taylor & Francis, London and New York, p. 186-247, 2002.

ROUBIK, D.W. Competitive interactions between Neotropical pollinators and Africanized honeybees. **Science**. Estados Unidos. n.201, p.1030-1032.1978.

RUTTNER, F. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. **Springer-Verlag**. New York. p. 165-175, 1988.

SCHEINER, R.; PAGE, R. E.; ERBER, J. Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). **Apidologie**. Avignon. v. 35, p. 133-142, 2004.

SCHMUCK, R. Effects of a dietary exposure of the honeybees *Apis mellifera* to Imidaclopride. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. New York. v. 47, p. 471-478, 2004.

SCHMUCK, R; SCHONING, R.; STORK, A.; SCHRAMEL, O. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera*) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. **Pest Managment Science**. Brighton. v. 57, p. 225-238, 2001.

SOKAL, R. R. Probit análisis on a digital computer. **Journal of Economic Entomology**. Lanham. v. 51, n. 5, p. 738-739, 1958.

SOKAL, R. R.; ROLF, F. J. **Biometry**. 3rd ed. Freeman San Francisco. C. A., USA, 1985.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDREA, M. M. de. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42).

SPIVAK, M. Impactos do desaparecimento das abelhas no cenário internacional. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 17 E DE MELIPONICULTURA, 3**, Belo Horizonte, MG, Anais... CD-ROM. 2008.

TINGLE, C.C. et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Review Environmental of Toxicology**. Estados Unidos. v.176, p.1-66, 2003.

USDA (a). Questions and Answers: Colony Collapse Disorder. Disponível em <<http://www.ars.usda.gov/News/docs.htm?docid=15572> >. Acesso em: Janeiro de 2009.

USDA (b). Colony Collapse Disorder Action Plan. Disponível em <http://www.ars.usda.gov/is/br/ccd/ccd_actionplan >. Acesso em: janeiro de 2009.

VITT, H. H.; HARTFELDER, K. Neurogenesis detected by BrdU incorporation in brains of larval honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 351-354, 1998.

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