
Ciências Biológicas

Pâmela Decio

Análise morfológica dos túbulos de Malpighi, do ventrículo e das glândulas pós-faríngeas de operárias adultas de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com hidrametilnona.

Pâmela Decio

Análise Morfológica dos túbulos de Malpighi, do ventrículo e das glândulas pós-faríngeas de operárias adultas de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com hidrametilnona.

Orientador: Odair Correa Bueno

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2010

595.796 Decio, Pâmela
D294a Análise morfológica dos túbulos de Malpighi, do
 ventrículo e das glândulas pós-faríngeas de operárias adultas
 de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com hidrametilnona /
 Pâmela Decio. - Rio Claro : [s.n.], 2010
 62 f. : il., figs., tabs.

 Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
 Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
 Biociências de Rio Claro
 Orientador: Odair Correa Bueno

 1. Formiga. 2. Saúva-limão. 3. Morfologia celular. 4.
 Histologia. 5. Iscas formicidas. I. Título.

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

*Dedico este trabalho e todas as
minhas conquistas aos meus pais, Luiz e
Mariza, os quais nunca deixaram
de me apoiar e incentivar.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, sem o qual nada teria sido possível em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Decio e Mara, por serem a minha referência de tantas maneiras e estarem sempre presentes na minha vida de uma forma indispensável, me apoiando, me ensinando a buscar e confiar nos meus sonhos, me acalentando em tantos momentos difíceis. E mesmo que muitas vezes a gente discorde sobre determinadas situações e pontos de vista, agradeço a eles por serem os formadores dos fundamentos do meu caráter e por serem o meu porto seguro. Agradeço pela compreensão, pelas repreensões, pela minha criação com tanto amor.

Não menos importantes, agradeço aos meus irmãos, Pá (minha parceira e quem despertou em mim a vontade de fazer UNESP e ainda me deu de presente nossa princesinha, a Belle Belle), Tá (a neguinha que a gente viu crescer e hoje já é muito mais mulher do que eu) e ao Ju (que era só uma criança quando eu entrei na Universidade e hoje me pentelha pra dividir o computador, e me faz rir com o seu jeito já adolescente). Enfim, o convívio com toda a minha família durante esses cinco anos de faculdade morando na casa dos meus pais, me fizeram dar muito mais valor a todos vocês.

Agradeço ao meu namorado, Sherman, que representa minha segurança em todos os aspectos, o meu companheiro incondicional. Obrigada por estar ao meu lado nestes cinco anos, por me aturar em tantas crises existenciais, em momentos de desilusão profissional, depois de tantas provas que eu achava que estavam perdidas. Você sempre esteve lá com o seu abraço espontâneo e tão necessário, com o seu ombro pra eu chorar, sempre dizendo que tudo ficaria bem no final. E ainda sempre de boa vontade disposto a me ajudar com minhas dificuldades e problemas computacionais (rs), me apoiando em todas as minhas decisões e ainda me dando liberdade total para estar em todos os eventos e festas da faculdade que eu quisesse ir, sempre compreensivo e adorável. Você aliviou minhas horas difíceis, me alimentando de certezas, força e alegria. Obrigada por me fazer sentir tão amada.

Sou grata aos meus primos-irmãos (Cô, Nê e Kell) que de alguma forma sempre contribuíram para a minha formação e se preocuparam comigo. Agradeço especialmente à Kell, prima - irmã mais velha - mãe - melhor amiga, quem me levou pra conhecer o mundo, me orientou e me deu conselhos que vou carregar comigo pra sempre. Agradeço ainda ao meu Tio Cid e à minha Tia Sema (*in memoriam*) por serem meus segundos pais e desempenharem

um papel imprescindível em minha infância, por todo o amor e carinho que trago até hoje, no momento em que termino minha graduação.

A todos os meus familiares (Caito, Lê, Kelly, Duda, Digo, Paula, entre tantos primos e primas, tios e tias), de perto e de longe, pelo amor e preocupação demonstrados através de ligações, visitas, orações e e-mails, obrigada!

Claro que preciso citar as amigas-irmãs que Deus me deu de presente: Mary Clair, Naná, Priscilinda e Danilinda. Simplesmente fundamentais para o meu bem-estar! Meninas, obrigada pela companhia constante e tão querida, sacrifício ilimitado em todos os sentidos, orações, palavras, abraços e aconchego. Por todos os bons momentos, pelas vitórias comemoradas, pelas bebedeiras, risadas, danças, baladas, encontros de Luluzinhas, pelas crises de choro, desabafos, consolos, confissões, e até pelas bronquinhas e puxões de orelhas recíprocos. Obrigada por vocês existirem e fazerem parte da minha vida. Por não deixarem eu me sentir louca sozinha (rs) e por serem a minha válvula de escape quando tantos problemas já não cabem mais dentro do meu peito. Vocês estarão comigo pra sempre.

Aos meninos da computação (Ca\$\$ino) por me acompanharem desde antes de eu virar uma bixete. Por vibrarem comigo quando eu passei no vestibular, ainda que de longe me acompanharem nessa jornada, e por continuarem sendo grandes amigos.

À tantas pessoas queridas que tive a oportunidade de conhecer na faculdade, como alguns professores (como a querida e admirada Dora) e muitos amigos. À toda a turma CBN 2006. À japonesinha que esteve comigo desde o primeiro dia do trote, Gisele, por quem tenho um carinho imenso e sei que é uma das pessoas que vou me esforçar ao máximo pra continuar revendo. Às grandes “companheiras pra tudo”, Manu e Ju, com as quais eu passei a maior parte de todos os momentos na universidade, entre aulas, CEIS, simpósio, CICs, tardes de estudo, tardes de fofoca. Meninas, gosto de vocês demais e passar tanto tempo rindo e conversando sobre milhões de assuntos com vocês sem dúvida tornou a faculdade muito mais divertida. Nós ainda faremos programas de casadas juntas! À Naty (ex-coração de pedra, no fundo ela tem um ótimo coração, apesar de ser argentina! rs), à Salms (a pessoa com o melhor humor do mundo!), à Carol (sempre fofa); à Babi. Às meninas de quem eu demorei mais pra me tornar próxima, mas que bom que ainda tive tempo de conhecê-las melhor, porque sem dúvida valeu à pena: Van e Monizzete, gente finas demais, por todos os corres com a nossa formatura; à Eli (sempre maldosamente engraçadíssima); Gi; Bruna Y. e Gláucia (a primeira da turma a se casar!). Aos meninos da sala, pelos quais tenho muito carinho por razões diferentes: Caze, nosso cozinheiro, contestador por natureza, e ótimo pra fofocar; Dom, por todas as risadas por motivos idiotas, pelo inesquecível Bateman, por só você entender meu

humor masculino, mas ainda assim saber conversar sobre coisas sérias também; Cogu, por ser um irmãozinho, sempre querido cuidando da gente e ao mesmo tempo pedindo nossos conselhos; Iéti, o cara sensível e vegetariano, um amigo muito especial, de um coração sem tamanho; Sean, por ser a paz em forma de gente; Tônico, que mesmo sendo bixo de novo, de alguma forma vai sempre fazer parte da nossa turma de 2006. É classe... apesar dos nossos desentendimentos, no final das contas nos acertamos. Mesmo que a vida nos leve pra caminhos diferentes e distantes para sempre levarei algo de vocês comigo. Vou sentir falta do nosso convívio na faculdade, das nossas viagens e do nosso TQAB. E finalmente, não poderia deixar de citar o Xaxim e o Momo, dois veteranos que precisam ser lembrados por se tornarem grandes amigos nos dois últimos anos da minha graduação. Fico muito feliz por ter tido a oportunidade de conhecê-los melhor e me aproximado mais.

Ao professor Odair, pela orientação na realização deste trabalho, pela confiança em mim, por todos os ensinamentos, pela paciência nos meus momentos de ansiedade, por despertar em mim a curiosidade pelo mundo das formigas, por me mostrar a importância de ser uma pesquisadora multidisciplinar, me mostrando vários caminhos dentro ciência.

À Elaine, pelo seu ótimo astral, por sempre acender uma luz no fim do túnel pra mim, pela preocupação e dedicação com o meu trabalho, muitas vezes me orientando à distância entre tantos afazeres em Sorocaba. Pelo exemplo não só de pesquisadora e de professora que ela é, mas de ser humano também. Elaine, você é incrível e ter você por perto durante a minha iniciação científica foi a chave pra eu não desistir da morfologia celular no meio do caminho. Obrigada de coração, por tudo.

Aos técnicos Gerson, Monica e especialmente ao Antonio, pelos serviços prestados, pela atenção e por toda a ajuda com as partes da histologia e da microscopia.

Aos meus colegas de trabalho do CEIS, pessoas maravilhosas que sempre se dispuseram a me ajudar e a agregar algo de valor à minha carreira acadêmica: à Aline (um exemplo, uma gauchinha fofa demais), à Cata (que chegou faz pouco tempo, mas que já admiro muito), à Cíntia Martins, ao Rodrigo, à Jock, à Fabiana, ao Andriago, ao Carlos, ao João, ao Rafa (Azul), ao Du, à Sandrinha, à Amandex (Carlos), às meninas da iniciação científica (Amandinha Picelli, Amanda Barbosa, Nathalia Lorenzon), à Sevê, à Erikinha, e é claro, novamente à Ju e à Manu! À Necis, sempre divertida, à Lu e a todos os demais funcionários. À todas as pessoas do laboratório de proteômica que são muito atenciosas comigo e me ajudaram muito neste último ano, especialmente a Naty com toda sua paciência em me orientar nos meus novos caminhos. E principalmente, à Má e à Ita, duas lindonas que moram no meu coração, amigas com quem tenho o prazer de trabalhar.

Agradeço ainda à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, instituição onde foi desenvolvido este trabalho e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, à todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que tiveram influência na minha formação, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi realizar bioensaios para avaliação da toxicidade da hidrametilnona, (solubilizada em acetona, com e sem óleo de soja) para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, bem como a análise morfológica dos órgãos dissecados dessa espécie de formiga, cujos indivíduos foram coletados em momentos específicos dos bioensaios de toxicidade. Por meio da análise morfológica, verificou-se o efeito toxicológico do composto químico nas glândulas pós-faríngeas, no ventrículo (intestino médio) e nos túbulos de Malpighi das formigas e, adicionalmente, foi possível correlacionar esses dados morfológicos com os dados da taxa de sobrevivência obtida nos bioensaios. O experimento com a hidrametilnona, solubilizada em uma mistura de acetona e óleo, indicaram uma via alternativa de ingestão do princípio ativo das iscas formicidas devido ao fato do óleo atuar como um coadjuvante, confirmando estudos prévios que sugerem a ação da glândula pós-faríngea na metabolização dos lipídios ingeridos. Dessa forma, o óleo presente na solução de hidrametilnona poderia estar envolvido no carregamento indireto da hidrametilnona para a glândula e, conseqüentemente, a diminuição da concentração desse princípio ativo no lúmen intestinal. Isto explicaria o menor grau de degeneração tecidual observada no intestino das formigas tratadas com hidrametilnona solubilizada em uma solução de acetona e óleo, em comparação com formigas tratadas com hidrametilnona solubilizada somente em acetona. Os controles com adição da acetona não apresentaram diferença significativa na porcentagem de sobrevivência em relação ao grupo testemunha e este solvente não interferiu na morfofisiologia das células. Os dados obtidos foram importantes para a melhor compreensão do efeito toxicológico da hidrametilnona nestes indivíduos.

Palavras-chave: Formigas, Saúva-limão, Morfologia celular, Histologia, Iscas formicidas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1. Sistema digestório.....	13
3.2. Sistema excretor	16
3.3. Glândulas pós-faríngeas	18
3.4. Morte celular.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Bioensaios	23
4.2. Microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão	24
4.2.1. Análise morfológica por microscopia de luz.....	24
4.2.2. Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. Bioensaios.....	26
5.2. Análise morfológica.....	27
5.2.1. Análise morfológica por microscopia de luz.....	27
5.2.1.1. Glândulas pós-faríngeas.....	27
5.2.1.2. Intestino médio (ventrículo).....	28
5.2.1.3. Túbulos de Malpighi	29
5.2.2. Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão.....	29
5.2.2.1. Glândulas pós-faríngeas.....	29
5.2.2.2. Intestino médio (ventrículo)	30
5.2.2.3. Túbulos de Malpighi	31
5.3. Figuras	32
6. DISCUSSÃO	44
5. CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS	51

1-INTRODUÇÃO

As formigas são os insetos com o maior número de indivíduos do planeta, ocupando quase todos os ambientes terrestres, com exceção dos pólos. Um dos fatos que explicam este sucesso é a adaptação das formas imaturas a nichos ecológicos diferentes das formas adultas, o que impede a competição por alimento (TERRA, 1991).

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* constituem o grupo das formigas cortadeiras por possuírem o hábito de cortar e transportar fragmentos vegetais diversos, flores e sementes para seus ninhos subterrâneos (DELLA LUCIA et al., 1993). De um modo geral estas formigas são consideradas benéficas quando em equilíbrio ecológico, pois podam a vegetação estimulando o crescimento de algumas plantas, auxiliam na decomposição de matéria vegetal, e ainda reviram, arejam e adubam o solo (HAINES, 1978). Formigas da tribo Attini, ao consumir a polpa das sementes caídas no chão das florestas, facilitam a germinação, que devido à ação antrópica, perderam seus dispersores naturais (GUIMARÃES et al., 2002).

Porém, quando ocorrem em ambientes alterados pela atividade humana seja pela expansão e desenvolvimento da agricultura ou mesmo pela urbanização, as formigas cortadeiras podem se tornar pragas causando elevados prejuízos econômicos (HERNÁNDEZ; JAFFE, 1995 apud MARINI, 2003). As atividades humanas provocaram a devastação de grandes áreas de matas e com isto diversas espécies de plantas que serviam de alimento ou abrigo para muitos animais, como os insetos, foram extintas. Com o empobrecimento do solo, os inimigos naturais foram reduzidos, o que causou uma proliferação intensa de pragas como as formigas cortadeiras (ANJOS; DELLA LUCIA; MAYHÉ-NUNES, 1998). O gênero *Atta* *sexdens*, é um dos poucos que conseguem se adaptar a áreas alteradas (SOUZA, 2005). Estas formigas são capazes de causar um intenso desfolhamento e destruir grandes áreas cultivadas, prejudicando a agricultura e a silvicultura. O fato das formigas cortadeiras cortarem parte dos vegetais representa prejuízos não só pela competição com o homem e seus animais domésticos (AMANTE, 1972), mas também pela preferência desses insetos por plantas cultivadas (CHERRETT, 1968), como citros, eucalipto, pastagens e cana-de-açúcar

(NAGAMOTO, 2003). Elas atacam florestas em todos os estágios, e quando não controladas impedem a sobrevivência de qualquer tipo de planta (ANJOS; DELLA LUCIA; MAYHÉ-NUNES, 1998). Além disso, esse efeito negativo pode ser causado, indiretamente, devido a grande quantidade de agrotóxicos utilizada para o controle desta praga.

Esse último fator revela a importância das pesquisas voltadas para o combate de tais pragas. Vários métodos culturais, biológicos e químicos têm sido estudados para o controle das formigas cortadeiras, no entanto os métodos químicos são mais frequentemente utilizados, sendo o produto químico tóxico aplicado diretamente nos ninhos, nas formulações pó, líquida ou líquidos nebulizáveis, ou apresentado na forma de iscas granuladas, aplicadas nas proximidades das colônias (BOARETTO; FORTI, 1997). O emprego de iscas granuladas é considerado vantajoso, pois oferecem maior segurança ao operador, dispensam mão-de-obra e equipamentos especializados e permitem o tratamento de formigueiros em locais de difícil acesso (LOECK; NAKANO, 1984).

O que dificulta o combate é a facilidade do estabelecimento da colônia e desta de se tornar estável (WEBER, 1982). Muitos estudos toxicológicos são realizados com inseticidas, os quais podem ser químicos ou de origem vegetal, com o intuito de buscar alternativas que causem o menor dano ambiental e interfira o menos possível no equilíbrio natural dos ecossistemas e/ou agroecossistemas (SILVEIRA, 2002).

Os inseticidas atuam nas formigas como inibidores, bloqueadores, moduladores ou indutores de “sítios” específicos de enzimas, receptores, canais protéicos ou membranas (HEBLING et al., 1999). Segundo Nagamoto (1998), a eficiência das iscas formicidas depende, em geral e fundamentalmente, do fato de possuírem um princípio ativo adequado e a técnica de aplicação usada ser a correta. Este princípio ativo deve conter várias características que possibilitem que a estrutura social e os mecanismos de defesa destes insetos sejam incapazes de impedir a intoxicação de toda ou, pelo menos, da maior parte da colônia. Dentre estas características pode-se citar: não apresentar efeito repelente, agir mesmo que em baixas concentrações, ter ação acumulativa por ingestão e apresentar baixa toxicidade em mamíferos (BUENO; CAMPOS-FARINHA, 1999). Mas o requisito mais importante que um ingrediente ativo deve atender é o fato de ter ação retardada, isto é, a substância tóxica tem de causar mortalidade menor de 15% das operárias nas primeiras 24 horas após a aplicação e maior que 90% no fim do teste (STRINGER et al., 1964).

A hidrametilnona é um destes compostos químicos que possuem ação retardada (NAGAMOTO, 1998). Ela atua inibindo o sistema de transporte de elétrons, o que bloqueia a produção de ATP e causa uma diminuição no consumo de oxigênio pela mitocôndria. A

interrupção do metabolismo e subsequente perda de ATP resultam em uma toxicidade lenta para os indivíduos tratados com este composto (BLOOMQUIST, 2008).

Para o controle de insetos-praga, óleos vegetais também têm sido empregados, principalmente em estoques de grãos armazenados infestados por besouros ou “brocas” (OBENG-OFORI, 1995). Óleos minerais ou vegetais tem sido utilizados em muitos testes como aditivos de pesticidas ou como sinergistas (HESLER; PLAPP, 1986). Segundo Chapman (1967) o uso do óleo no controle destes insetos oferece como vantagens o fato destes organismos serem menos resistentes aos óleos; não são nocivos à saúde humana e são economicamente mais viáveis e mais fáceis de serem obtidos do que os inseticidas comercializados. Schoonhoven (1978) verificou também que quando estes óleos são aplicados em grãos armazenados, não prejudicam a germinação da semente. Além do mais, a toxicidade do inseticida é acentuada quando o produto químico é aplicado com óleo, pois o óleo aumenta o contato do inseticida com a cutícula, dissolve a cera epicuticular e com isso facilita a passagem do inseticida, além de promover a desorganização da matriz protéica interna da cutícula (MATSUMURA, 1975).

Apesar de haver vários trabalhos realizados avaliando a atividade tóxica de compostos químicos e naturais sobre várias espécies de formigas, poucos estão voltados para o estudo das alterações morfológicas nos órgãos desses insetos (SUMIDA, 2007). Há somente um trabalho na literatura sobre alterações citoplasmáticas e nucleares nas células dos túbulos de Malpighi e do ventrículo de formigas submetidas à bioensaios de toxicidade (SUMIDA et al., 2010). O ventrículo e o túbulo de Malpighi são órgãos relacionados, respectivamente, com a absorção e a excreção de compostos químicos. A análise morfológica dessas estruturas pode revelar alterações ultra-estruturais induzidas por agentes tóxicos (BRAECKAMAN et al., 1999; SOROUR, 2001). Segundo Sumida (2007), o composto químico absorvido pelo intestino e não excretado adequadamente pelos túbulos de Malpighi pode permanecer na hemolinfa e, indiretamente, atuar em glândulas, que absorvem os precursores dos produtos glandulares a partir da hemolinfa. As glândulas pós-faríngeas, exclusivas dos Formicidae, realizam intensa síntese dos produtos glandulares, cujas funções são variadas, e podem também apresentar alterações morfológicas induzidas pela presença de agentes tóxicos na hemolinfa.

2-OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos avaliar a toxicidade da hidrametilnona para *Atta sexdens rubropilosa*, em bioensaios de ingestão, e através de análises morfológicas verificar o local de ação do inseticida. Para tal, foram analisados o ventrículo, os túbulos de Malpighi e as glândulas pós-faríngeas de operárias adultas desta espécie de formiga.

3-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O ingrediente ativo hidrametilnona ($C_{25}H_{24}F_6N_4$), ao ser incorporado em um tratamento para o estudo da análise de toxicidade, provoca a inibição do consumo de oxigênio nas mitocôndrias, atuando no transporte de elétrons nas cristas mitocondriais e conseqüentemente interferindo na produção de ATP do organismo. Com a perda da produção de quantidades adequadas de ATP, ocorre uma toxicidade lenta que vai debilitando o metabolismo celular e, gradativamente, os órgãos e sistemas do inseto, fazendo com que este composto químico apresente ação retardada (BLOOMQUIST, 2008).

Sintomas como dificuldade de locomoção, tremores nas pernas, descontrole motor (BUENO, 2005), pernas traseiras paralisadas (NAGAMOTO, 1998) e indivíduos vivos em decúbito lateral (TAKAHASHI-DEL-BIANCO, 2002) podem ser observados em formigas submetidas aos bioensaios cuja dieta teve a incorporação de hidrametilnona.

Segundo Hollingshaus, a hidrametilnona é um composto relativamente não tóxico ao contato cuticular. No entanto, devido aos constantes atos de limpeza coletiva das formigas, ocorre intoxicação, provavelmente, pela ingestão da hidrametilnona facilitada pela presença do óleo de soja utilizado como coadjuvante (BUENO, 2005). A hidrametilnona é solúvel em vários solventes orgânicos. Porém, sua solubilidade diminui em solventes como o metanol, o etanol e o isopropanol. Este composto também apresenta baixa solubilidade em água (JACOB, 2002). É importante ressaltar que este ingrediente ativo degrada-se rapidamente à luz solar, sendo este um fato que pode influenciar negativamente à sua atividade formicida (NAGAMOTO, 1998).

Existem poucos dados na literatura, até o momento, sobre a ação dos ingredientes ativos das iscas formicidas nos órgãos das formigas (SUMIDA, 2007). Presume-se que esses compostos químicos podem, inicialmente, desencadear um alto nível de estresse nas células dos órgãos afetados e, posteriormente, promover a indução do processo de morte celular que reflete em grande parte o seu grau de toxicidade. A morte das células, nos órgãos-alvos dos compostos químicos, pode ocorrer de duas maneiras: morte celular programada (apoptose

e/ou morte celular autofágica) ou por necrose (LOCKSHIN; ZAKERI, 2004). Estes tipos de morte celular podem ser controlados por processos fisiológicos (como no caso da autofagia e da apoptose) ou não (necrose).

Embora existam muitos estudos dos processos de morte celular, nem sempre é possível determinar o tipo exato que ocorre em um tecido ou órgão (CLARKE, 1990; ZAKERI et al., 1995). Isto porque muitas das características que definem o tipo de morte celular se sobrepõem nos tecidos de insetos e, adicionalmente, diferentes compostos químicos podem desencadear diferentes vias sinalizadoras intracelulares indutoras de morte celular, o que refletirá alterações morfológicas distintas.

Nos invertebrados, a caracterização e a classificação dos processos de morte celular são mais complexas que nos vertebrados (FURQUIM, 2007). Poucos trabalhos analisam os tipos de morte celular em insetos decorrentes de contaminação por agentes tóxicos. Sorour (2001) avaliou as alterações ultra-estruturais nos túbulos de Malpighi do inseto *Lethocerus niloticum* 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 desse inseto. Gregorc e Bowen (1998) mostraram que a quantidade de células em degeneração, no intestino médio de larvas de *Apis mellifera*, aumenta durante a infestação pelo *Bacillus larvae*, sugerindo que em situações patológicas o índice de morte celular aumenta. Esta porcentagem de morte celular também aumenta nas glândulas de seda de larvas tratadas com acaricidas comumente utilizados nos apiários comerciais (SILVA-ZACARIN; GREGORC; SILVA DE MORAES, 2006). Cintra (2001) descreveu características semelhantes no epitélio do intestino médio das abelhas adultas *A. mellifera*, tratadas com dieta contendo 0,5% de astilbina.

3.1-Sistema digestório

O Sistema digestório das formigas adultas é semelhante ao encontrado em outros insetos e está dividido em 3 regiões: intestino anterior (estomodeo), intestino médio (ventrículo) e intestino posterior (proctodeo). Os intestinos anterior e posterior têm origem ectodérmica e o intestino médio, endodérmica. Tais regiões podem apresentar-se anatômica ou fisiologicamente modificadas de acordo com a função específica e, particularmente quanto aos hábitos alimentares desenvolvidos por cada espécie de inseto (CAETANO, 1984; CAETANO; CRUZ-LANDIM, 1983; CHAPMAN, 1975; JANET, 1902; RICHARD;

DAVIES, 1977; ROSS, 1965; SNODGRASS, 1935; TOMOTAKE, 1996; WIGGLESWORTH, 1974). O trato digestório encontra-se entre músculos corporais e túbulos traqueais e é innervado por nervos motores do sistema nervoso central e do sistema nervoso estomogástrico que, juntos, controlam os movimentos do intestino e a passagem do alimento (CHAPMAN, 1975; DUPORTE, 1959; JANET, 1902; SNODGRASS, 1935; WIGGLESWORTH, 1974).

Neste trabalho, o enfoque voltou-se para o intestino médio, pois ele corresponde ao estômago propriamente dito (TOMOTAKE, 1996). Sendo assim, é a parte responsável pela absorção dos produtos da digestão, entre outras funções (CAVALCANTE, 1999 apud SUMIDA, 2007). Segundo Caetano (1977), esta região é a que apresenta maior variação histológica do trato digestivo. Seu epitélio inicia-se em continuação ao da válvula cardíaca onde, então, terminam as partes de origem endodérmica ou estomodeal e inicia-se a parte de origem endodérmica. Esta transição constitui uma zona especial, a que alguns autores atribuem a função de formar a membrana peritrófica, nos insetos que a possuem (CAETANO, 1981). Esta membrana contém quitina e protege as células epiteliais contra atritos do alimento (principalmente do tipo sólido), contra microrganismos presentes no trato digestivo, regula o fluxo de enzimas da célula para a luz do ventrículo e regula os produtos digestivos no caminho inverso (CHAPMAN, 1975, 1985; RICHARDS; RICHARDS, 1977; SMITH, 1968; WIGGLESWORTH, 1974). Ela também pode compartimentalizar o lúmen do intestino médio em duas regiões, a ectoperitrófica (onde ocorre a digestão intermediária que contém o alimento não digerido) e a endoperitrófica em contato com o epitélio (onde ocorre a fase da digestão inicial). A finalização da digestão ocorre nas células do intestino médio (TERRA, 1988).

Basicamente, o ventrículo possui dois tipos de células, as digestivas e as regenerativas. Estas últimas podem ser encontradas isoladas ou reunidas em pequenos grupos ou ninhos de células diminutas junto à membrana basal do ventrículo. As células regenerativas possuem o papel de repor as células do intestino médio, que têm uma vida limitada, substituindo células velhas ou com danos funcionais (MARTOJA; BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984). Por sua vez, as células digestivas são em grande número e muito longas constituindo o epitélio ventricular (CAETANO, 1977). Tais células formam uma única camada composta basicamente de células colunares funcionais que podem ser denominadas também de células principais ou enterócitos. Realizam múltiplas funções durante o ciclo de vida, tais como secreção de enzimas, de glicoproteínas, da membrana peritrófica, absorção e armazenamento de produtos orgânicos e inorgânicos (MARTOJA; BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984).

Três regiões na célula colunar podem ser reconhecidas morfológicamente do ápice até a base: a apical, a mediana e a basal. As organelas presentes nas células colunares são o retículo endoplasmático rugoso, os lisossomos, além de grânulos de secreção, vesículas de micropinocitose e microfilamentos procedidos de microvilosidades do citoesqueleto formando uma rede terminal de actina. (CRUZ-LANDIM, 1985). Algumas estruturas lisossomais aparecem em abundância, consistindo de corpos densos e vacúolos heterofágicos em quantidade variável (PRIESTER, 1971). Na região basal, as mitocôndrias estão freqüentemente ligadas a dobras da membrana plasmática, indicando possível envolvimento com transporte de água e íons (CAVALCANTE, 1999 apud SUMIDA, 2007). As dobras da membrana plasmática basal constituem um compartimento extracelular permitindo um acesso restrito à hemolinfa. Como há diferenças de concentração de solutos nas células deste compartimento, gera-se um gradiente osmótico entre este e o lúmen que acarretará na absorção de água (RIBEIRO; FERREIRA; TERRA, 1990).

As células colunares frequentemente apresentam grânulos com organização lamelar concêntrica, principalmente na parte posterior do intestino médio (CAVALCANTE, 1999 apud SUMIDA, 2007). Na maioria dos casos, os grânulos parecem ocorrer em todo o ventrículo e, estão presentes nos túbulos de Malpighi de *A. S. rubropilosa* (MARTINELLI, 1998). Os grânulos, também podem ser chamados de grânulos mineralizados (MARTINELLI, 1998), inclusões vesiculares (MARTOJA; BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984), esferocristais minerais (CAETANO; CRUZ-LANDIM, 1983), esferocristais (OLAVARRIETA, 2000), entre outros. Eles contêm um acúmulo de vários elementos, como cálcio, cobre e ferro (CHAPMAN, 1985). Estas estruturas podem estocar e absorver íons (BILLINGSLEY; DOWNE, 1989) para serem lançados dentro do conteúdo do intestino e, depois de um período de acúmulo, podem esvaziar ou podem aparentemente desaparecer como uma consequência dos conteúdos estarem sendo utilizados depois de um período temporário de estocagem (CHAPMAN, 1985).

Segundo um estudo de Jesus (2006) com formigas urbanas, os alimentos contendo substâncias hidrossolúveis percorrem a cavidade infrabucal, o papo e o ventrículo. Por outro lado, os alimentos contendo substâncias lipídicas, percorrem um sentido diferente: a cavidade infrabucal, as glândulas pós-faríngeas e o papo, mas não o ventrículo.

3.2-Sistema excretor

Os túbulos de Malpighi são os principais órgãos excretores dos insetos. Eles são responsáveis por manter, no animal, um meio interno ionicamente constante, com a finalidade de tornar mais eficiente as atividades celulares. Assim excretam amônia, ácido úrico e outros catabólitos, além de vários íons, como potássio, cálcio, entre outros (MARTINELLI, 1998). Além disso, são capazes de segregar substâncias presentes no sangue e reabsorver componentes úteis ao organismo (CAETANO, 1988; CHAPMAN, 1975; GILLOTT, 1980; MELLO, 1979; WIGGLESWORTH, 1974).

Em insetos, a osmorregulação e a excreção ocorrem em duas etapas: na primeira a urina é produzida pelos túbulos de Malpighi, quando estes removem os resíduos do metabolismo celular. Este fluído é lançado para o trato digestivo e acumula-se no reto. Então o produto da remoção dos túbulos de Malpighi e as fezes, passam por um processo de reabsorção da água e de alguns íons importantes, além de aminoácidos. A remoção destas substâncias é feita pelas papilas retais (CAETANO, 1981; GILLOTT, 1980; SMITH, 1968), que são estruturas semelhantes a pequenas almofadas presas na parede do reto (CAETANO, JAFFÉ; ZARA, 2002).

Estes túbulos estão associados entre a região de inserção do ventrículo e do intestino posterior e se apresentam como filamentos simples, delgados e longos, de fundo cego, com a extremidade distal livre na hemocèle (CAETANO, 1988), com exceção do gênero *Solenopsis* (lava-pés), onde a extremidade distal fica aderida à parede do reto (CAETANO, JAFFÉ; ZARA, 2002). O número de túbulos pode variar de uma espécie de inseto para outra: em *Orthoptera* chega a mais de 200 túbulos; em *Thysanoptera* apenas quatro túbulos e em coccídeos também ocorre em pequena quantidade (BRADLEY, 1985). Nos afídeos (Homoptera), *Collembola* e alguns *Thysanura*, os túbulos de Malpighi são ausentes. (BARNES, 1990; CHAPMAN, 1975; GILLOTT, 1980; GULLAN; CRANSTON, 2000; ROEDER, 1953).

O epitélio da parede dos túbulos lembra o do intestino médio (BARNES, 1990). Seu lúmen encontra-se revestido por uma única camada de células epiteliais. Transversalmente, se apresentam como anéis formados de três a oito células, dependendo da espécie (CAETANO, 1981; CAETANO; MACHADO 1982; CHAPMAN 1975; MARTINELLI; TABOGA, 1993). Em algumas espécies, como em formigas, são dotados de fibras musculares, dispostas helicoidalmente, que aumentam o contato da hemocèle com a hemolinfa e cuja função mais

provável é promover o fluxo do conteúdo do lúmen (CAETANO, JAFFÉ; ZARA, 2002). As células epiteliais que constituem estes túbulos estão unidas por junção do tipo *gap* (MARTOJA; BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984). No entanto, podem ocorrer outras estruturas de adesão como desmossomos (O'DONNELL et al., 1985 apud MARTINELLI, 1998). Além da função aderente das junções, elas também podem permitir a passagem das moléculas de peso molecular variável, desde a hemolinfa até o lúmen dos túbulos (BRADLEY, 1985).

Na região basal das células dos túbulos estão presentes, numerosas invaginações da membrana plasmática que estão ligadas à lâmina basal por contatos focais (MARTINELLI, 1998). Elas aumentam a superfície de contato da membrana plasmática para o transporte de íons e água para o interior das células. Já na região apical existem microvilosidades alongadas que aumentam a superfície de transporte de água e íons entre o citoplasma e o lúmen. Ambas podem estar associadas às mitocôndrias, fato que indica alta demanda energética para o transporte de substâncias entre a hemolinfa e o lúmen dos túbulos (BRADLEY, 1985; MARTOJA; BALLAN - DUFRANÇAIS, 1984).

Em formigas, os túbulos de Malpighi mostram-se bastante uniformes. Apresentam uma única camada de células cúbicas ou piramidais, porém Smith (1968) constatou que existe diferença nos detalhes estruturais das células em espécies diferentes e também ao longo de um único túbulo. Martinelli (1998) observou, por meio de testes histoquímicos, que os túbulos de *A. s. rubropilosa* são divididos em três regiões: a proximal, a distal e a intermediária. A primeira apresenta aspectos ultra-estruturais relacionados à síntese protéica intensa, representada por inúmeras organelas, tais como complexos de Golgi e porções de retículo endoplasmático rugoso extremamente desenvolvidas, bem como grande quantidade de ribossomos livres. Esta região apresenta um grande acúmulo de cálcio e ausência de grânulos mineralizados. Já a distal, apresenta características típicas de células transportadoras de íons, com grande quantidade de mitocôndrias distribuídas na célula, além de grande quantidade de grânulos mineralizados. Por último, a região intermediária apresenta características intermediárias das duas primeiras regiões citadas. Sendo assim, a região proximal apresenta células com características secretoras (de proteínas ou substâncias lipídicas) (OLAVARRIETA, 2000) e a distal, excretoras. Existem evidências de que pode ocorrer reabsorção na região proximal dos túbulos (WIGGLESWORTH, 1974).

Quanto à origem embriológica dos túbulos de Malpighi, a opinião dos pesquisadores varia, sendo que para Mohamed (1986) eles são de origem ectodérmica, enquanto que para Chapman (1975) e Tsai (1993) a origem é endodérmica.

3.3-Glândulas pós-faríngeas

As formigas apresentam um par de glândulas pós-faríngeas que se localizam dorsalmente na transição entre a faringe e o esôfago (CAETANO, 1998; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990;). Elas são de origem ectodérmica e formam-se durante o desenvolvimento pós-embrionário a partir de duas evaginações dorsais do epitélio faríngeal (GAMA, 1985; JANET, 1905).

Em *A. s. rubropilosa*, as glândulas pós-faríngeas apresentam basicamente a mesma constituição anatômica e ultramorfológica tanto para as rainhas como para as operárias, sendo maiores nas primeiras (BUENO, 2005). Segundo Almeida-Toledo (1967), elas constam de dois cachos de lobos ramificados, os quais terminam em uma estrutura sacular que se estreita num canal levemente quitinizado que desemboca na parte inicial do intestino anterior. Esse mesmo autor descreveu que os lobos são achatados e se espalham na região frontal do cérebro, ficando entre este e a tampa quitinosa da cabeça. As paredes dos lobos são formadas por um epitélio simples de células, as quais podem se encontrar achatadas ou cilíndricas com reentrâncias entre elas, o que confere um aspecto ondulado (BUENO, 2005). O núcleo é distinto e grande, enquanto que o citoplasma, por sua vez, é rico em organelas, contém vesículas e possui granulações que se coram pela Hematoxilina de Heidenhain e Azan (ALMEIDA-TOLEDO, 1967). Segundo Bueno (2005) há uma cutícula que reveste o lúmen na face interna, a qual pode ser dividida em três partes: a) epicutícula fina e elétron-densa; b) exocutícula fibrilar e c) endocutícula elétron-lúcida e adjacente às células epiteliais, como descrita nas glândulas de *Dinoptera quadriceps* (BILLEN; SCHOETERS, 1996).

As funções dessas glândulas são passíveis de discussão. Para alguns autores (MARKIN, 1970 apud VANDER MEER; GLANCEY; LOFGREN, 1982) elas seriam responsáveis pela alimentação das larvas. Já para Caetano, Jaffé e Zara (2002), a glândula pós-faríngea funcionaria como um divertículo do trato digestório. No entanto, para Zylberberg, Jeantet e Delage-Darchen (1974), Peregrine, Mudd e Cherrett (1973), Delage-Darchen (1976), Vinson, Phillips e Willians (1980) e Vander Meer, Glancey e Lofgren (1982) as glândulas teriam função de cecos cefálicos ou gástricos.

Outras informações afirmam que o composto presente na glândula é espécie-específico e é sintetizado pela rainha (VANDER MEER apud VANDER MEER; GLANCEY; LOFGREN, 1982). Soroker e colaboradores (1994) estudaram essas glândulas em *Cataglyphis niger* e atribuíram a elas a função de mistura de hidrocarbonetos exógenos e

endógenos, obtidos durante a trofalaxia, criando um odor característico da colônia, o que seria importante para a identidade química dos membros da colônia. Delage-Darchen (1976), Thompson et al. (1981) e Attygale, Billen e Morgan (1985) chegaram a conclusões parecidas ao sugerir que o conteúdo glandular é importante na organização da colônia e na determinação de castas, devido também ao hábito de trofalaxia.

Para Ayre (1963) a presença de nematóides parasitas da Família Mermithidae (CAETANO et al., 1990; FALCO, 1992; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990) no lúmen da glândula seria indício da existência de um material alimentar completo, o qual seria regurgitado para os demais membros da colônia. Ele afirma que o conteúdo da glândula pode ser um tipo de reserva alimentar para operárias e larvas, mas não deve estar associado à digestão. Em testes enzimáticos com glândulas pós-faríngeas de *Acromyrmex octospinosus*, Febvay e Kermarrec (1986) detectaram somente a presença de α -glucosidase e esterase. Para estes autores a determinação da baixa atividade destas enzimas sugere que elas não serviriam para função digestiva nessas formigas também.

No entanto, outros autores (DELAGE, 1968; FORBES; MACFARLANE, 1961) creditam às glândulas pós-faríngeas a digestão de gorduras ingeridas, por apresentarem enzimas digestivas no lúmen, principalmente lipases. É comum encontrar no lúmen destas glândulas um líquido de aspecto oleoso amarelado. Sua origem estaria ligada diretamente à ingestão de lipídeos provenientes da alimentação (PEREGRINE; MUDD; CHERRET, 1973; VINSON; PHILLIPS; WILLIAMS, 1980). Caetano (1998) observou as células glandulares repletas de retículo liso e de gotas de lipídio e sugeriu que estas devem representar ou participar da composição do complemento nutricional absorvido pela glândula, fundamental para a sobrevivência do indivíduo.

Estudos toxicológicos com *A. s. rubropilosa* (SUMIDA, 2007) indicaram uma possível via alternativa de ingestão do princípio ativo de iscas formicidas contendo óleo de soja como veículo, confirmando estudos prévios (BUENO, 2005) que sugerem a ação da glândula pós-faríngea na metabolização dos lipídios. A presença dessas glândulas em *A. s. rubropilosa* seria a explicação para a capacidade destas formigas de separarem seletivamente compostos lipídicos dos não lipídicos na porção final da faringe. Assim, se a quantidade de lipídio ingerido for grande e o sistema não conseguir armazenar, o excesso se desloca para o papo, mas sem atingir o ventrículo. Quando há redução do estoque ocorre o retorno pelo esôfago que atinge o lúmen da glândula (BUENO, 2005).

3.4-Morte celular

Os processos de morte celular são importantes para o desenvolvimento e para a homeostase dos seres vivos. As células de um organismo podem morrer acidentalmente, por traumatismo ou doença, ou ainda por um processo fisiológico normal (SILVA DE MORAES, 1998). A morte acidental é chamada de necrose pelos patologistas e a que faz parte de um processo fisiológico normal de desenvolvimento de organismos multicelulares é denominada morte celular programada (LOCKSHIN; WILLIAMS, 1964).

Para que a necrose ocorra não é necessária a ativação de genes. Este processo ocorre devido à exposição a substâncias tóxicas, microrganismos, entre outras causas, que promovem uma resposta inflamatória nos tecidos vizinhos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000). As células em necrose perdem o controle de seu balanço iônico, ganham água, apresentando-se inchadas. A função das mitocôndrias fica comprometida, o que gera queda de ATP, e consequentemente queda na produção de proteínas. Nos núcleos ocorre aumento da acidose, levando a uma precipitação picnótica da cromatina, sem marginalização da mesma. As células necróticas se rompem e lançam seu conteúdo no meio extracelular, produzindo a inflamação. (BOWEN; BOWEN, 1990; BOWEN; BOWEN; JONES, 1998).

Ao contrário da necrose, na apoptose, um dos tipos de morte celular programada, a célula se mantém intacta, e os brotamentos destacados do citoplasma (corpos apoptóticos) também são delimitados pela membrana celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000). Os corpos apoptóticos são fagocitados e digeridos por mecanismos lisossomais. (BURSCH et al., 1985). Segundo Bowen e Bowen (1998), na apoptose as células se condensam por perda de água. A produção de energia é mantida e algumas vezes pode ocorrer síntese de novos RNAm e proteínas. O núcleo se dilata e a membrana nuclear forma *blebs* (“borbulhas”) com marginalização cromatínica. Com isto, há formação de fragmentos de cromatina sob a influência de endonucleases, que são enzimas que clivam o DNA em regiões internucleossômicas.

Conforme Bowen e Bowen (1990), a apoptose seria um processo dependente de ATP, por isso as bombas de íons da membrana plasmática continuariam funcionando. No entanto, na fase final da apoptose, após a formação dos corpos apoptóticos, seria observado a queda de ATP e da atividade da ATPase, com conseqüente perda da integridade da membrana plasmática.

Em insetos, a identificação de morte celular programada não é tão simples como em mamíferos. Geralmente, a apoptose está correlacionada com o aumento da atividade lisossomal (HALABY; ZAKERI; LOCKSHIN, 1994; SILVA-ZACARIN et al., 2007a), mas características nucleares típicas de apoptose também podem ser visualizadas em glândulas de seda de *Apis mellifera* (SILVA-ZACARIN; TABOGA; SILVA DE MORAES, 2007b). As mitocôndrias, o retículo endoplasmático e o aparelho golgiano, aparecem morfológicamente normais, pelo menos durante os estágios iniciais da apoptose. Entretanto, a dilatação do retículo endoplasmático tem sido notada, também, em estágios iniciais (HÄCKER, 2000). Características descritas inicialmente como necrose por Wyllie (1981), tais como os edemas citoplasmáticos, degradação das organelas, vacuolização do citoplasma e a ruptura da membrana plasmática, atualmente são caracterizadas como eventos comuns durante a morte celular programada em insetos (HÄCKER, 2000). Já a fragmentação do DNA que é considerada a principal característica da apoptose clássica, nem sempre está presente (HÄCKER, 2000). Um exemplo é o que ocorre com as glândulas de seda de *Apis mellifera*, onde há a fragmentação do DNA precedendo a histólise glandular (SILVA-ZACARIN, et al., 2007b). No entanto, pode ocorrer síntese de DNA na morte celular programada em insetos, ao invés de fragmentação (BOWEN; MORGAN; MULLARKEY, 1993).

Um outro tipo de morte celular programada é a autofágica. Esta é caracterizada principalmente pelo aumento do nível da atividade de hidrolases ácidas (fosfatase ácida) e também pelo surgimento de extensos e numerosos vacúolos autofágicos, o que causa, conseqüentemente, a destruição da célula (LOCKSHIN; ZAKERI, 1996; ZAKERI et al., 1995). Pode ocorrer também colapso nuclear tardio (BOWEN; MORGAN; MULLARKEY, 1993; LOCKSHIN; ZAKERI, 1996; ZAKERI et al., 1995). Além disso, pode-se observar uma dilatação de organelas, tais como as mitocôndrias e o retículo endoplasmático (CLARKE, 1990), mas não ocorre marginalização cromatínica. Este tipo de morte celular é bastante observado na metamorfose de insetos (JUHASZ, et al., 2003).

Ressalta-se ainda que, embora a ativação de caspases (enzimas catabólicas que digerem outras proteínas) seja comumente descrita para apoptose, a morte celular programada autofágica é controlada por uma via independente de caspase (HÄCKER, 2000; LOCKSHIN; ZAKERI, 2004). Embora a maioria das células apoptóticas sejam caspase-dependentes, há relatos divergentes onde a morfologia da célula sofrendo apoptose não reflete a atividade das caspases (LOCKSHIN; ZAKERI, 2004).

Vários estímulos, como citocinas, isquemia, irradiação, patógenos, calor intenso, podem causar tanto a necrose quanto apoptose (PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV;

GABAI, 2003). A apoptose pode iniciar-se com a autofagia, da mesma forma que a autofagia pode terminar em apoptose, e o bloqueio da atividade da caspase pode causar um defeito tanto na apoptose como na autofagia (LOCKSHIN; ZAKERI, 2004). Esses dois processos, apesar de terem aspectos morfológicos distintos, têm várias características em comum, indicando possíveis sobreposições em sua regulação (LOCKSHIN; ZAKERI, 2004). A morte celular autofágica é um processo fisiológico normal que diferentemente de outras situações, não termina antes do colapso celular e pode ser ativada tanto por homeostase quanto por atrofia (LOCKSHIN; ZAKERI, 2004).

4-MATERIAIS E MÉTODOS

4.1-Bioensaios

Para a realização dos bioensaios foram utilizadas operárias médias de *Atta sexdens rubropilosa* coletadas de um ninho artificial mantido no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro. As formigas foram distribuídas em grupos de 10 indivíduos em placas de Petri (10cm de diâmetro), as quais foram forradas com círculos de papel filtro, identificadas e mantidas em estufa para B.O.D. com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa acima de 70%. Cada tratamento foi composto de 5 destas placas (50 formigas).

Paralelamente, dois bioensaios foram montados: um para a avaliação da toxicidade e outro para a coleta de indivíduos para a análise morfológica.

Para a alimentação das formigas isoladas do formigueiro, foi fornecida uma dieta artificial sólida composta por 5% de glicose, 1% de peptona de caseína, 0,1% de extrato de levedura e 1,5% de ágar bacteriológico, dissolvidos em 100 mL de água destilada, sendo tudo autoclavado a 120°C e 1 atm por 15 minutos (BUENO et al., 1997). Ainda líquida essa dieta foi entornada em placas de Petri de vidro de 10 cm de diâmetro (previamente esterilizadas) e, após resfriamento e solidificação, as placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas em geladeira durante o período do experimento, para melhor conservação. Esta era a composição da dieta pura, utilizada no controle. Além deste, mais dois grupos controles foram estabelecidos:

- Controle I: com adição de 0,3 mL de acetona em 30 mL de dieta pura;
- Controle II: com a adição de uma solução de 0,3 mL de acetona + óleo de soja (9:1), em 30 mL de dieta pura.

Tomou-se o cuidado de aguardar alguns momentos com as placas das dietas dos controles I e II abertas, afim de que a maior parte da acetona pudesse evaporar.

Para os grupos que receberam a dieta com o ingrediente ativo, os procedimentos foram basicamente os mesmos já descritos, com o diferencial da adição de 0,3 mL de uma solução de hidrametilnona em uma dose sabidamente subletal (BUENO, 2005), concentração de 200 µg/mL, em 30 mL de dieta pura tendo como veículo a acetona e a mistura de acetona e óleo de soja.

A bateria relativa à análise de toxicidade foi examinada diariamente, para anotação da mortalidade dos indivíduos, durante um período de 25 dias. Os dados obtidos foram comparados através do teste “log-rank”, software Graph-Pad, aplicativo Prisma 3.0.

A manutenção dos bioensaios necessitou do uso de bandejas plásticas (de 55 cm x 45 cm x 10 cm), com paredes revestidas com Teflon 30 (resina de fluoretileno) ou talco neutro para evitar fugas. Todo o experimento foi realizado com o máximo de assepsia, sendo as formigas e dietas manuseadas com auxílio de pinças e outros materiais esterilizados com álcool 70%. As dietas foram fornecidas às formigas sobre pedaços de papel alumínio, para facilitar o descarte e diminuir riscos de contaminação das dietas de diferentes composições.

4.2-Microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão

Do bioensaio montado com a finalidade de coletar indivíduos para análise morfológica dos órgãos foram coletadas operárias de *A. s. rubropilosa*, tanto dos grupos controles como dos grupos experimentais. As formigas alimentadas com as dietas contaminadas por hidrametilnona foram dissecadas no quinto dia de tratamento e, em seguida, foram dissecados os indivíduos dos grupos controles. A dissecação foi realizada rapidamente, à temperatura ambiente em solução salina 0,6%. As glândulas pós-faríngeas, os ventrículos e os túbulos de Malpighi foram fixados em paraformaldeído a 4%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,4) para análise em microscópio de luz, e em solução fixadora de glutaraldeído 1.5% e formaldeído 1.5% em tampão cacodilato de sódio 0.05M (pH 7.2), por 2 horas, a temperatura ambiente para análise em microscópio eletrônico de transmissão.

4.2.1-Análise morfológica por microscopia de luz:

Os órgãos dissecados para análise morfológica por microscopia de luz foram fixados em uma solução de paraformaldeído a 4% por 2h à temperatura ambiente e lavados em

tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4). Posteriormente, os órgãos foram desidratados em uma série crescente de álcoois (70% a 100%) e então, transferidos para a resina de embebição (*overnight*). Após essa etapa, os órgãos foram incluídos em historesina.

Nos blocos de historesina obtidos, foram feitas secções histológicas de 6µm de espessura, as quais foram estendidas sobre lâminas de vidro e secas à temperatura ambiente. As secções foram coradas com Hematoxilina–Eosina, todas ao mesmo tempo, e montadas com Bálsamo do Canadá, observadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio de luz (Zeiss).

4.2.2-Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão:

Para a análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão, os órgãos dissecados foram fixados em solução de glutaraldeído 1.5% e formaldeído 1.5% em tampão cacodilato de sódio 0.05 M (pH 7.2), por 2 horas, à temperatura ambiente. As estruturas foram lavadas no tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, no mesmo tampão da solução fixadora, por 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi lavado novamente no tampão (duas vezes de 5 minutos cada), banhado em álcool 10% (por 15 min) e contrastado em acetato de uranila 0,5% (2 horas, à temperatura ambiente). Por fim, os órgãos foram desidratados em uma série de soluções de concentração crescente de acetona, embebido (em acetona + mais resina) e incluído em resina Epon-Araldite.

Todo o material incluído foi seccionado e os cortes semi-finos, com aproximadamente 0,5µm de espessura foram corados com mistura de Azul de metileno 1% e Azur II 1% em solução de borax 1% para análise e seleção dos melhores blocos. As secções ultra-finas 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 um Microscópio Eletrônico de Transmissão Phillips CM 100 e documentadas em filme, no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro-SP.

5-RESULTADOS

5.1-Bioensaios

O bioensaio de incorporação da hidrametilnona em dieta artificial oferecida às formigas revelou que não houve diferença significativa entre as medianas referentes ao tempo de sobrevivência das formigas tratadas com os três controles. Porém, comparando-se os controles com as dietas contaminadas observou-se uma diferença significativa na porcentagem de sobrevivência destes tratamentos. As tabelas seguintes mostram a taxa de mortalidade acumulada e a sobrevivência mediana no bioensaio tratado com hidrametilnona solubilizada em acetona (tabela 1) e na solução de acetona e óleo (tabela 2).

Tabela 1: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com hidrametilnona (acetona), por 25 dias.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	1	5	6	1	4	1	1	0	0	0	12,0a
Controle I (acetona)	4	9	2	1	1	3	1	0	1	0	11,5a
Controle II (acetona+óleo)	2	6	4	1	3	1	2	0	0	3	13,5a
Hidrametilnona (acetona)	6	8	3	3	9	3	0	-	-	-	7,0b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” ($p < 0,05$).

Tabela 2: Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com hidrametilnona (acetona + óleo), por 25 dias.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	1	5	6	1	4	1	1	0	0	0	12,0a
Controle I (acetona)	4	9	2	1	1	3	1	0	1	0	11,5a
Controle II (acetona+óleo)	2	6	4	1	3	1	2	0	0	3	13,5a
Hidrametilnona (acetona+óleo)	9	13	1	3	1	-	-	-	-	-	4,0b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste “log rank” ($p < 0,05$).

5.2-Análise morfológica

Para garantir que o solvente utilizado não interferisse na taxa de mortalidade dos insetos tratados, testes preliminares foram realizados submetendo os órgãos dos três grupos controles a cortes histológicos e análises por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Mesmo naqueles em que a dieta artificial foi solubilizada em acetona e na solução de acetona e óleo de soja, não ocorreram alterações morfológicas, podendo se inferir que o solvente utilizado como veículo não causou nenhum efeito tóxico as estruturas analisadas.

5.2.1-Análise morfológica por microscopia de luz

5.2.1.1-Glândulas pós-faríngeas

As figuras 1A, 1B e 1C mostram as glândulas pós-faríngeas de formigas dos grupos controles. Observa-se o epitélio glandular lobulado e o lúmen (figura 1A). Os núcleos celulares estão intactos e é possível visualizar nucléolos típicos. É possível observar ainda a cutícula (figura 1B) e as características citoplasmáticas aparentam estar regulares (figura 1C).

No tratamento com hidrametilnona solubilizada em acetona, as células se apresentaram com morfologia típica, similar as do grupo controle (figura 1D). Os núcleos apresentam nucléolos evidentes e não há alterações citoplasmáticas significativas ao microscópio de luz (figuras 1E e 1F).

Com o a adição de acetona e óleo de soja no tratamento com hidrametilnona, observou-se um aumento considerável na espessura do epitélio glandular (comparação das figuras 1E e 1H). Em detalhe, pode-se visualizar, na figura 1I, grandes acúmulos de gotas lipídicas no citoplasma celular. Ocorrem núcleos picnóticos (figura 1G) e núcleos com cromatina marginalizada (figura 1H). Há ainda regiões citoplasmáticas contendo vacuolização (figura 1I).

5.2.1.2-Intestino Médio (ventrículo)

Na figura 2A observa-se o epitélio intestinal das formigas dos grupos controles evidenciando os ninhos de células regenerativas. É possível visualizar a grande quantidade de vesículas de secreção por todo o epitélio ventricular (figuras 2B e 2C) e em detalhe visualizam-se células digestivas do ventrículo com núcleos íntegros e evidência de nucléolos, além dos ninhos de células regenerativas que também se encontram com morfologia normal (figura 2D).

Uma região do epitélio do ventrículo tratado com hidrametilnona e acetona é mostrada na figura 2E. Verifica-se uma mudança considerável no epitélio ventricular em relação ao grupo controle, devido a diminuição do número de vesículas de secreção. Há uma grande quantidade de vacuolização citoplasmática das células digestivas, além da picnose nuclear observada em algumas das células e há presença de halos pericromatínicos ao redor da cromatina compactada centralmente em alguns núcleos.

Na figura 2G, observa-se uma porção do epitélio do ventrículo do grupo tratado com hidrametilnona solubilizada em acetona e óleo de soja. Comparando-se as figuras 2E e 2G com o grupo controle nota-se que no grupo experimental onde houve adição do óleo ao solvente, o epitélio ventricular apresenta uma grande quantidade de vesículas de secreção, assim como o controle. (figura 2G). Notam-se células digestivas com núcleos preservados e ninhos de células regenerativas íntegros.

5.2.1.3-Túbulos de Malpighi

Um túbulo de Malpighi dos grupos controles está apresentado na figura 3A. Em cortes realizados próximos a região de inserção do ventrículo é possível observar um túbulo de Malpighi com núcleos intactos e nucléolos bem aparentes. Visualiza-se uma grande quantidade de grânulos mineralizados, além do lúmen. Também apresenta-se características citoplasmáticas típicas de tecidos preservados.

Na figura 3B, é possível visualizar uma região do lúmen dos túbulos tratados com hidrametilnona solubilizada em acetona e óleo de soja. Estão presentes regiões com grande quantidade de grânulos mineralizados e núcleos semelhantes aos do grupo controle.

Os túbulos das formigas submetidas ao tratamento do ingrediente ativo solubilizado em acetona aparecem nas figuras 3C e 3D. Foram observados vacuolizações citoplasmáticas evidentes ao microscópio de luz e núcleos picnóticos. Os grânulos de esferocristais aparentam estar em menor quantidade.

5.2.2-Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão

Os resultados obtidos com microscopia eletrônica de transmissão reforçam os resultados obtidos com a microscopia de luz. Desta forma, serão descritos apenas as características ultraestruturais relevantes que adicionam informação aos resultados histológicos.

5.2.2.1-Glândulas Pós-faríngeas

Observam-se nas glândulas pós-faríngeas dos grupos controles, mitocôndrias com cristas mitocondriais definidas e polirribossomos livres (figura 4A). O núcleo apresentado aparenta integridade e seu nucléolo está evidente (figura 4B). Há ainda uma grande quantidade de vesículas de secreção, mostradas na figura 4C.

Quanto às alterações induzidas pela hidrametilnona nas glândulas pós-faríngeas, os dados ultraestruturais revelaram que esta substância é bastante tóxica às glândulas. No grupo tratado com o princípio ativo solubilizado em acetona, o citoplasma apresentou-se desorganizado em algumas regiões (figura 4D). Na figura 4E um vacúolo autofágico é

observado, o que pode representar indício de morte celular, mas estes vacúolos também ocorrem naturalmente em tecidos não tratados com substâncias tóxicas. A mitocôndria apresentada aparenta ainda possuir cristas definidas e cisternas do retículo endoplasmático rugoso com ribossomos aderidos também foram visualizados.

Drásticas alterações são observadas no grupo tratado com a hidrametilnona juntamente com a solução do solvente e óleo de soja. A característica mais marcante é a intensa vacuolização citoplasmática. (figuras 4F e 4H). As mitocôndrias dos insetos deste grupo experimental apresentam inchaço e não são mais visualizadas as suas cristas mitocondriais (figura 4F) e um núcleo começa a desenvolver invaginação do envoltório nuclear (figura 4H). Muitos núcleos depois de apresentarem as primeiras invaginações, adquirem forma totalmente irregular, o que precede a fragmentação dos mesmos.

Muitas gotas lipídicas são observadas na porção apical da glândula. (figura 4G) e uma vilosidade é mostrada englobando uma dessas gotas provenientes do óleo de soja fornecido nesta dieta experimental (figura 4I).

5.2.2.2-Intestino Médio (ventrículo)

A ingestão da dieta contaminada com hidrametilnona solubilizada somente em acetona causou alterações morfológicas consideráveis no epitélio do ventrículo das formigas (figuras 5C e 5D). Observou-se a presença de vacúolos autofágicos, de núcleos picnóticos de células digestivas com intensa compactação cromatínica, alteração nuclear indicativa de apoptose, além de núcleos com cromatina marginalizada (figura 5C). Também foi observada uma diminuição na quantidade de microvilosidades (figura 5D) e foi possível visualizar grandes regiões citoplasmáticas vacuolizadas no epitélio ventricular (figura 5D). Esta característica citoplasmática de necrose, na qual ele se apresenta elétron-lúcido e degradado, não se apresenta nas células digestivas dos grupos controles (figura 5B).

Na presença da acetona e do óleo de soja, a hidrametilnona também aparenta ter ocasionado uma diminuição na quantidade de microvilosidades. Porém, o fato de ser observado vesículas de secreção no citoplasma apical, indica que as células ainda não perderam sua atividade secretora (figura 5F). Na região basal do citoplasma, um núcleo similar aos apresentados pelos grupos controles (figura 5E) é apresentado.

5.2.2.3-Túbulos de Malpighi

No grupo experimental submetido ao tratamento com hidrametilnona e acetona observou-se uma perda dos anéis de concreção dos grânulos mineralizados (figura 6C) em relação aos túbulos dos grupos controles (figura 6A). Próximo a lâmina basal ocorrem regiões citoplasmáticas vacuolizadas (figura 6D). A figura 6E mostra o detalhe de um núcleo que apresenta invaginações do envoltório nuclear.

No que diz respeito às alterações causadas pelo tratamento do princípio ativo dissolvido em acetona e óleo, elas se restringiram a alterações nos grânulos mineralizados devido a uma perda dos anéis concêntricos (figura 6G). Na figura 6F é possível visualizar o retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias. As microvilosidades, assim como as apresentadas pelos túbulos de Malpighi dos grupos controles (figura 6B) estão íntegras.

5.3-Figuras

Figura 1- Fotomicrografia das glândulas pós-faríngeas:

- **A, B e C: Grupo Controle** – (1A): Glândula pós-faríngea de formigas do grupo controle, apresentando epitélio glandular (ep) normal, com núcleos intactos (N). As setas pretas apontam para os nucléolos. Barra = 25µm. (1B) e (1C): Em um aumento maior é possível visualizar núcleos (N), nucléolos (setas pretas), a cutícula (c) e o lúmen (Lu). Barra = 10µm em ambas.
- **D, E e F: Grupo tratado com Hidrametilnona 200 µg/mL (acetona)** – (D) Na presença de hidrametilnona com acetona, aparecem células com morfologia típica, similar as do grupo controle. Barra = 25µm.. Em 1E e 1F os núcleos (N) apresentam-se sem alterações significativas ao microscópio de luz e os nucléolos estão evidentes (setas pretas). Barra = 10µm em ambas.
- **G, H e I: Grupo tratado com Hidrametilnona 200 µg/mL (acetona+óleo)** – Comparando as figuras 1E e 1H, observamos que houve um aumento considerável da espessura do epitélio (ep) das glândulas tratadas com a hidrametilnona com a solução de acetona e óleo. Em 1G observam-se núcleos picnóticos (p). Barra = 25µm. (1H) Além de alguns núcleos íntegros nota-se a presença de marginalização cromatínica. Barra = 10µm. (1I): Visualizam-se ainda acúmulos de gotas lipídicas (setas brancas) no citoplasma, além de regiões citoplasmáticas contendo vacuolização (vr). Barra = 10µm.

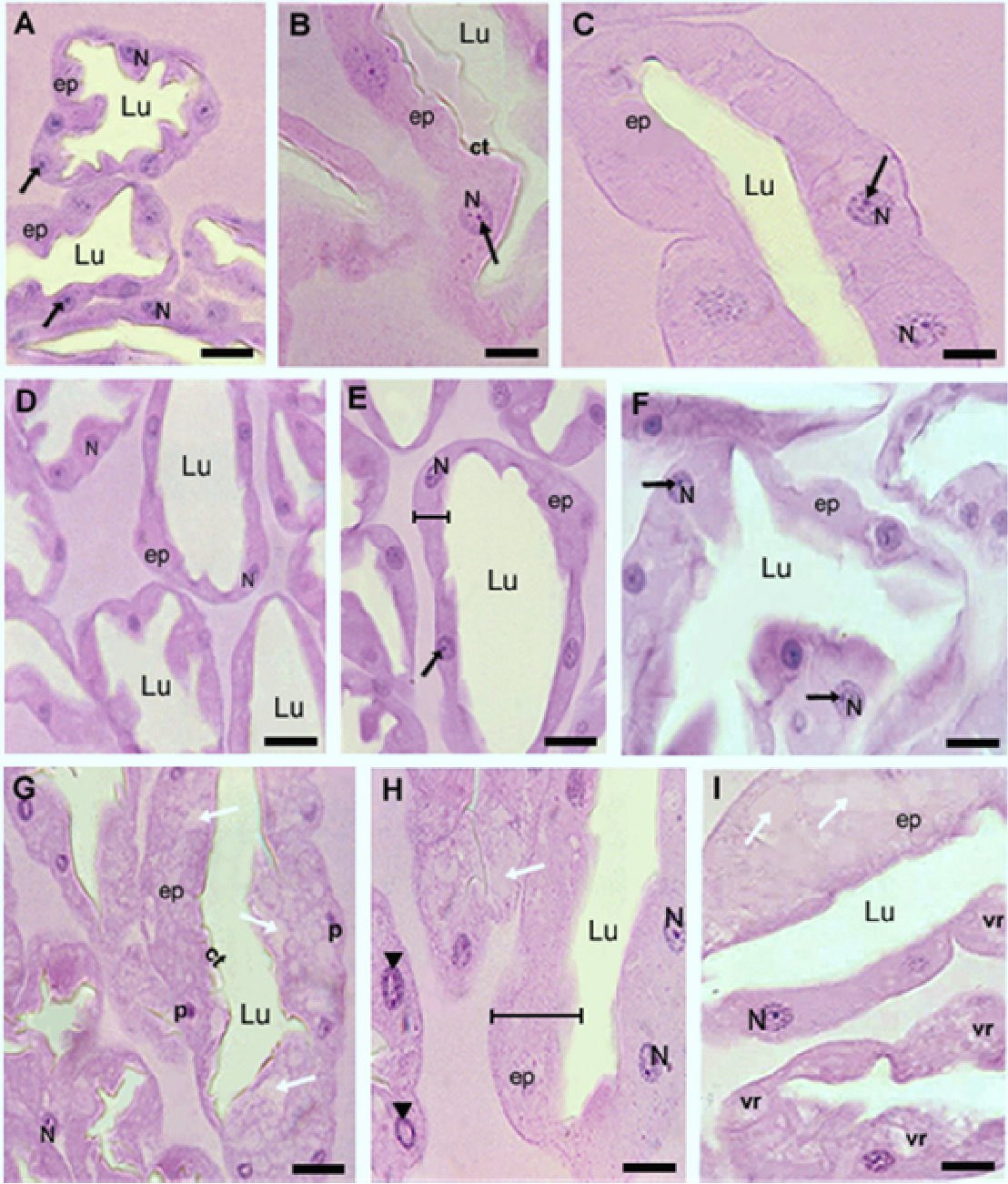


Figura 1

Figura 2- Fotomicrografia do intestino médio (ventrículo):

- **A, B, C e D: Grupo Controle** – (2A) Pode-se observar o epitélio (ep) do ventrículo e a presença de ninhos de células regenerativas (setas pretas). Barra = 25µm. (2B) Em um maior aumento observam-se vesículas de secreção (S) e núcleos íntegros (N) no citoplasma apical das células digestivas. Barra = 10µm. Em 2C uma visão geral do epitélio ventricular também evidencia a grande quantidade de vesículas de secreção (S) e ainda nota-se uma região de um túbulo de Malpighi (TM). Barra = 10µm. (2D) Em detalhe observa-se uma célula digestiva (dc) e núcleos intactos (N). A seta preta aponta para um ninho de células regenerativas. Barra = 10µm.

- **E e F: Grupo tratado com Hidrametilnona 200 µg/mL (acetona)** – (2E): No grupo tratado com hidrametilnona solubilizada em acetona verifica-se uma mudança considerável no epitélio ventricular devido a uma diminuição do número de vesículas de secreção (S). Além disso, núcleos picnóticos (p) também são observados. Barra = 25µm. (2F) Próximo a um túbulo de Malpighi (TM) observa-se a região citoplasmática apical do ventrículo com intensas vacuolizações (vr) no citoplasma das células digestivas. Núcleos picnóticos (p) estão evidentes e ocorre ainda a presença de halos pericromatínicos (setas brancas) ao redor da cromatina compactada centralmente em alguns núcleos. Barra = 10µm.

- **G e H: Grupo tratado com Hidrametilnona 200 µg/mL (acetona+óleo)** – Comparando-se as visões gerais dos epitélios tratados com a hidrametilnona (2E e 2G) com os grupos controles (2A e 2C)), nota-se que no grupo experimental onde houve adição do óleo ao solvente, o epitélio ventricular apresenta uma grande quantidade de vesículas de secreção (S) assim como os do grupos controles. (2G) Barra = 25µm. (2H) Observam-se células digestivas (dc) com núcleos íntegros e ninhos de células regenerativas são apontados pelas setas pretas. Barra = 10µm.

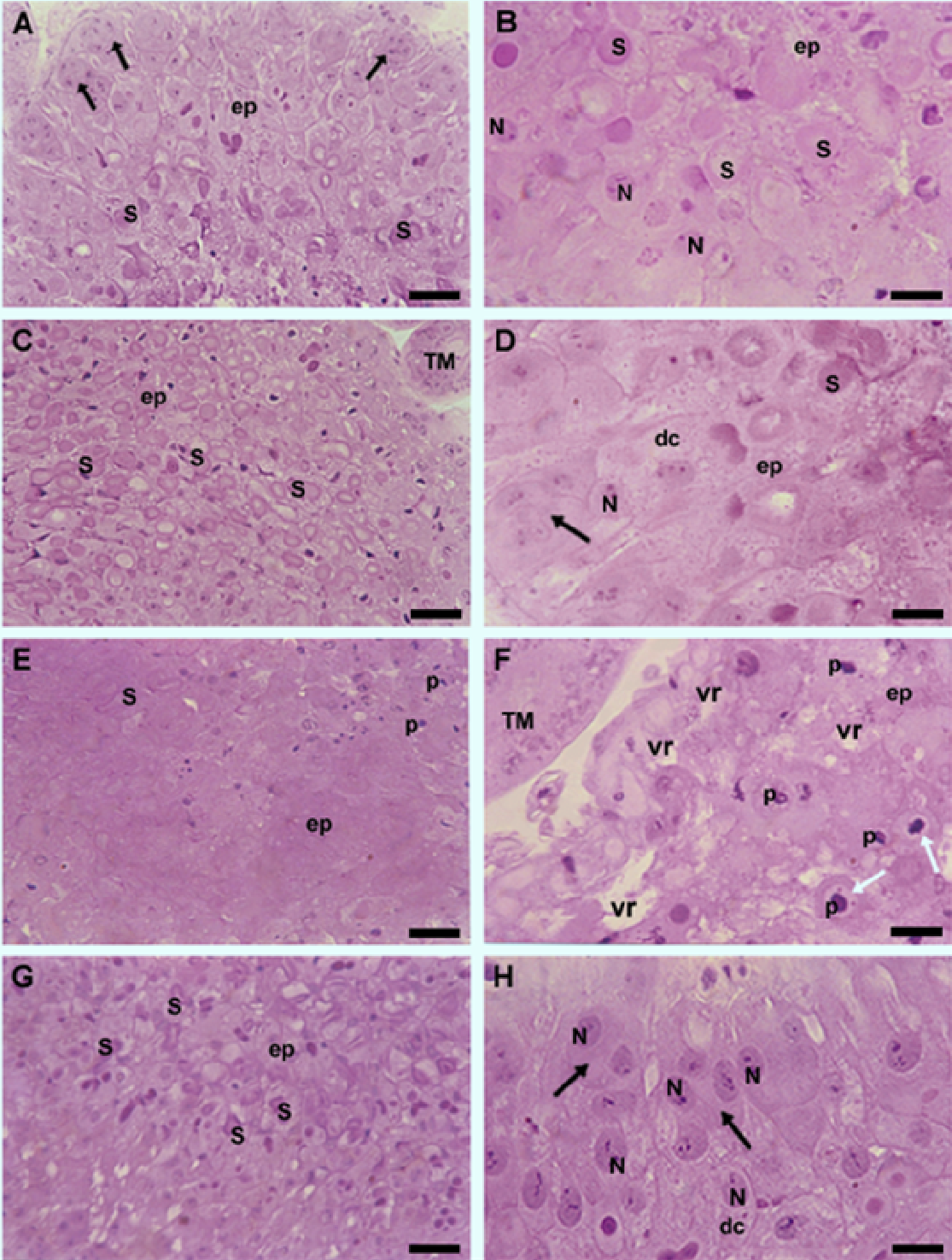


Figura 2

Figura 3- Fotomicrografia dos túbulos de Malpighi:

- **A: Grupos controles** – (A) Em cortes realizados próximos a região de inserção do ventrículo é possível observar um túbulo de Malpighi com núcleos (N) intactos e nucléolos aparentes (setas pretas). Visualiza-se uma grande quantidade de grânulos mineralizados (setas brancas), além do lúmen (Lu). Barra = 10µm.
- **B: Grupo tratado com Hidrametilnona 200 µg/mL (acetona+óleo)** – (B): Os túbulos das formigas submetidas ao tratamento do ingrediente ativo solubilizado na solução de acetona e óleo apresentam-se semelhantes aos do grupo controle, com núcleos (N) típicos com nucléolos evidentes (seta preta), além de regiões com grânulos mineralizados em grande quantidade. Barra = 10µm.
- **C e D: Grupo tratado com Hidrametilnona 200 µg/mL (acetona)** – (C): Neste tratamento notam-se núcleos com picnose nuclear (p) e regiões citoplasmáticas vacuolizadas (vr). Barra = 25µm. (D) Em detalhe, com um aumento maior, observam-se regiões citoplasmáticas vacuolizadas (vr). Núcleos (N) similares aos do controle também estão presentes e os grânulos mineralizados (setas brancas) parecem estar em menor quantidade. Barra = 10µm.

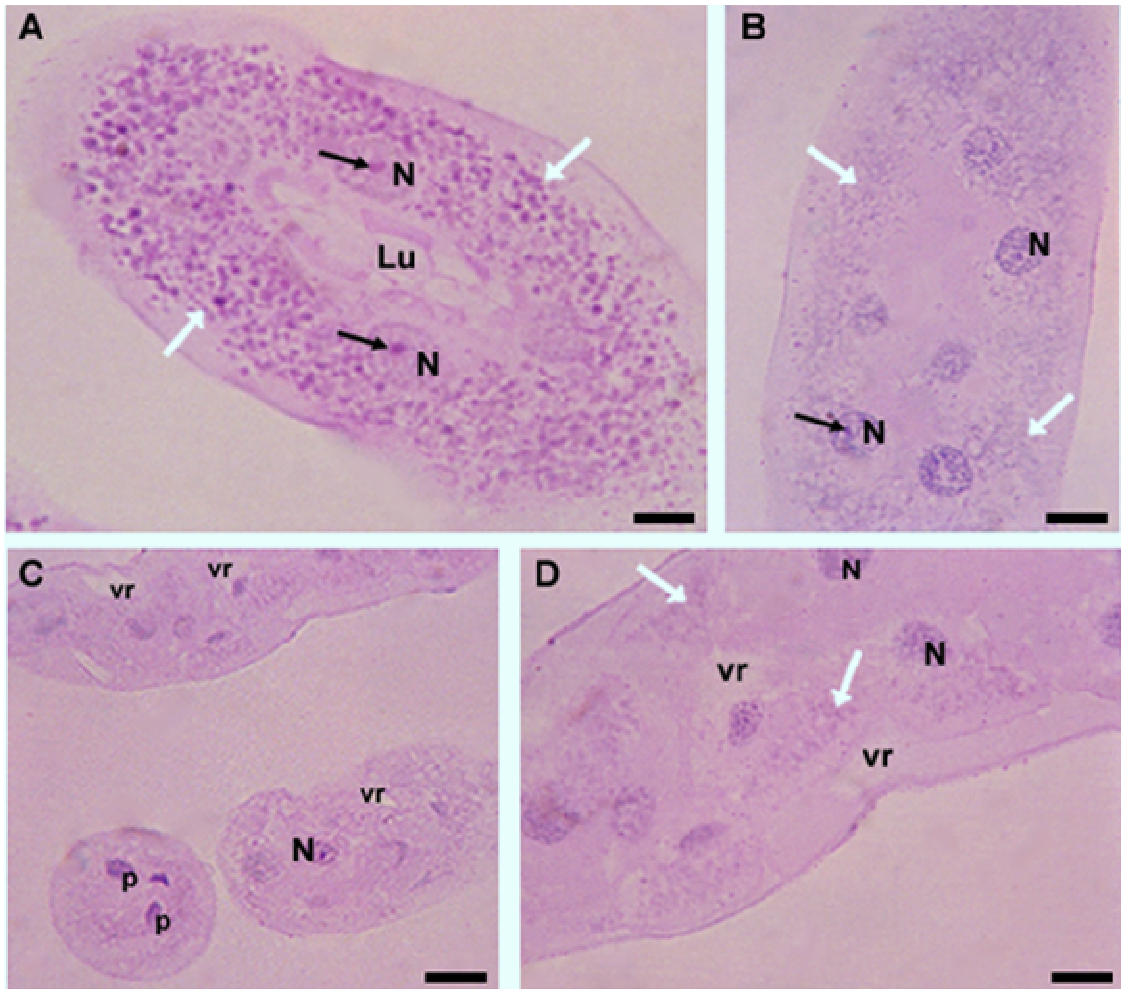


Figura 3

Figura 4- Eletromicrografia de Glândula pós-faríngea:

- **A, B e C: Grupos controles** – (4A): Observam-se mitocôndrias (Mi) com cristas definidas (setas pretas) de glândulas pós-faríngeas de formigas do grupo controle. Estão presentes vesículas (V) e poliribossomos (setas brancas) livres também. Barra = 0,6µm. (4B): Visão geral do epitélio secretor evidenciando uma célula revestida por cutícula (c) separada pelo espaço intercelular (seta branca). Está presente um núcleo (N) com nucléolo (n) e envoltório nuclear (ne) evidentes e regiões mais eletrondensas com heterocromatina (setas pretas). Barra = 5µm. (4C): Evidência da lâmina basal (BL) e uma região que apresenta uma grande quantidade de vesículas (V), além de mitocôndrias (Mi) e retículo endoplasmático rugoso (setas pretas). Barra = 2µm.

- **D e E: Grupo tratado com Hidrametilnona 200 µg/mL (acetona)** – (4D) Neste grupo experimental, o núcleo (N) apresentado possui regiões heterocromáticas muito eletrondensas e o nucléolo está evidente (n). O citoplasma apresenta-se desorganizado (d) em algumas regiões e ainda é possível observar a cutícula (c), o lúmen (Lu) e a lâmina basal (BL). Barra = 4µm. (4E): Nota-se a presença de um vacúolo autofágico (vc), que pode ser indício de morte celular, mas também ocorre naturalmente em tecidos não tratados com substâncias tóxicas. Estão presentes uma mitocôndria (Mi) com cristas definidas (seta preta) e cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER) com ribossomos aderidos (setas brancas). Barra = 1µm.

- **F, G, H e I: Grupo tratado com Hidrametilnona 200 µg/mL (acetona+óleo)** – (4F): No grupo tratado com ingrediente ativo solubilizado na solução de acetona e óleo de soja, observa-se o detalhe de duas mitocôndrias (Mi) inchadas com perda das cristas mitocondriais. Barra = 2,4µm. (4G): Visão geral mostrando um núcleo (N) e extensas regiões vacuolizadas (vr) no citoplasma. Nota-se grande quantidade de gotas lipídicas (setas brancas) presentes na porção apical da glândula. Barra = 28µm. (4H): Próximo à lâmina basal observam-se duas mitocôndrias (Mi) e um núcleo (N) que começa a apresentar invaginação (seta preta) do envoltório nuclear (ne). Observam-se ainda grandes regiões vacuolizadas (vr) no citoplasma. Barra = 5µm. (4I): Uma vilosidade (VL) da região apical é apresentada englobando gotas lipídicas (setas brancas) provenientes do óleo de soja adicionado neste tratamento. Barra = 1,7µm..

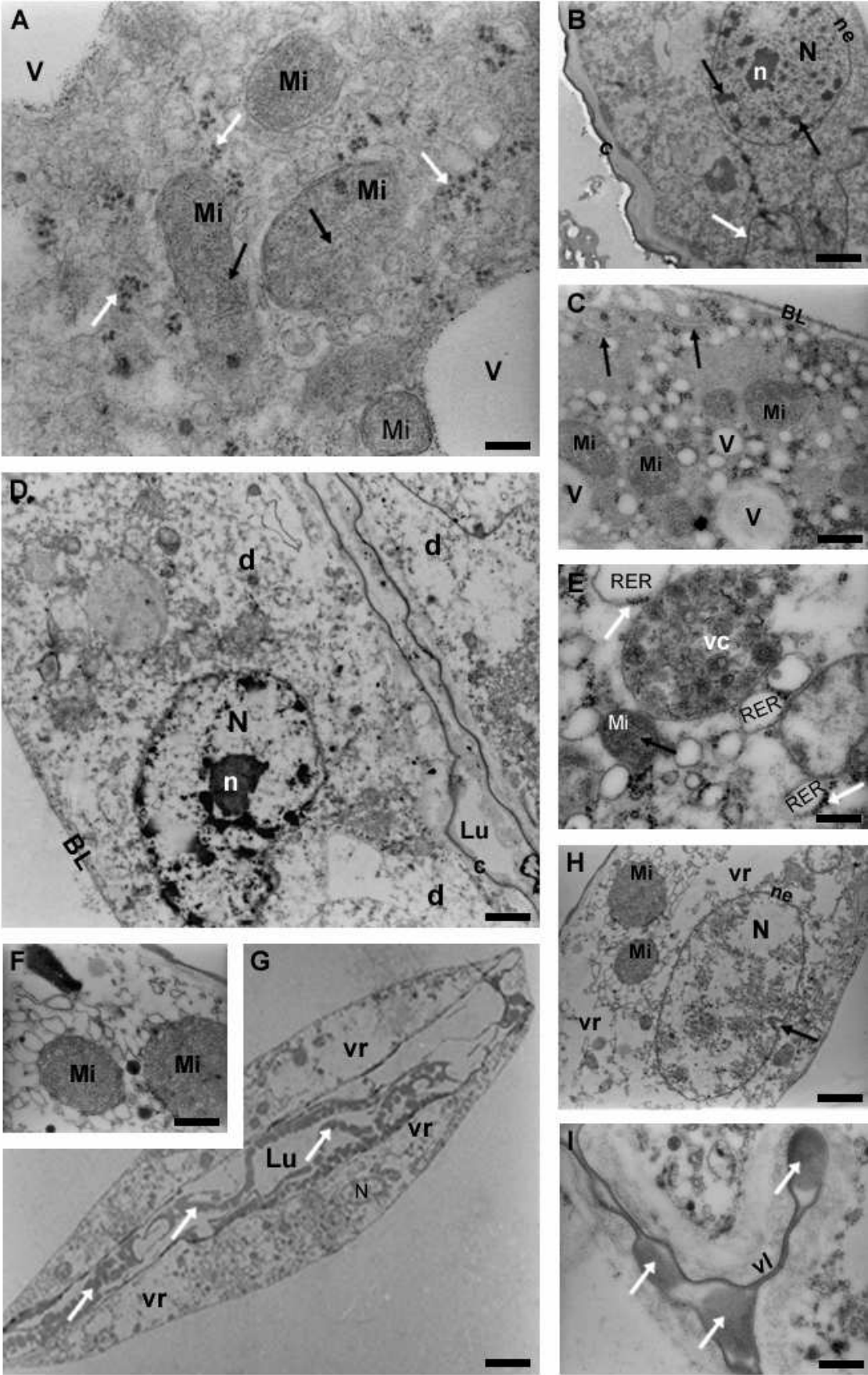


Figura 4

Figura 5- Eletromicrografia de Intestino Médio (ventrículo):

- **A e B: Grupos controles** – (5A): No grupo controle visualiza-se o detalhe de um núcleo (N) com morfologia típica, próximo à lâmina basal (BL). Observa-se uma grande quantidade de poliribossomos livres (setas brancas) além de cisternas do retículo endoplasmático (RE). Barra = 4,8µm. (5B): Visão geral evidenciando um núcleo (N) com nucléolo evidente (n), vesículas (V) e uma grande quantidade de miclovilosidades (Mv). Barra = 10µm.

- **C e D: Grupo tratado com Hidrametilnona 200 µg/mL (acetona)** – (5C): Observa-se um vacúolo autofágico (vc), um núcleo típico (N) com nucléolo (n) bem desenvolvido e um outro núcleo picnótico (P) mais elétron-denso. Barra = 4,8µm. (5D) Visão geral mostrando grandes áreas vacuolizadas (vr) no epitélio do ventrículo. As setas pretas indicam regiões onde houve diminuição de microvilosidades e a seta branca aponta para um núcleo com marginalização cromatínica. “P” indica um núcleo picnótico. Barra = 2,7µm.

- **E e F: Grupo tratado com Hidrametilnona 200 µg/mL (acetona+óleo)** – (5E): Núcleo íntegro (N) e envoltório nuclear evidente (ne). Barra = 4,8µm. (5F): Porção apical, com detalhes das microvilosidades (Mi) que parecem ter diminuído de quantidade em algumas regiões. Estão presentes mais vesículas de secreção no grupo experimental com adição do óleo ao veículo. Barra = 12µm.

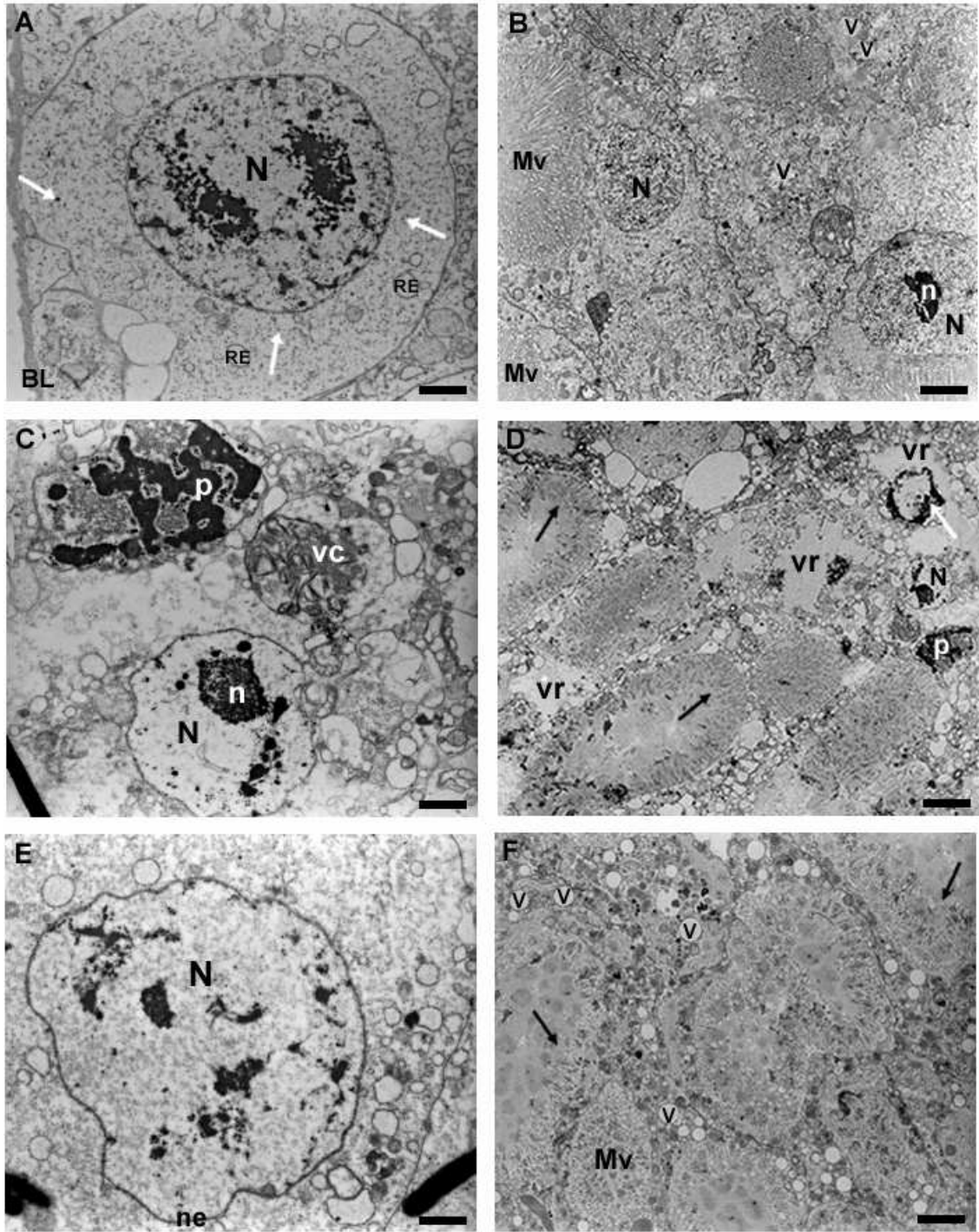


Figura 5

Figura 6- Eletromicrografia dos túbulos de Malpighi:

- **A e B: Grupos controles** – (6A): Grânulos mineralizados (cabeças de setas pretas) são mostrados em diversas fases de desenvolvimento com indicação de seus anéis concêntricos (seta preta). Um núcleo (N) e seu envelope nuclear (ne) também são evidenciados. Barra = 3,4µm. (6B): Notam-se muitas microvilosidades (Mv) e mitocôndrias (Mi). O lúmen (L) e um núcleo aparentemente íntegro (N) também são apontados. Barra = 6,8µm.

- **C, D e E: Grupo tratado com Hidrametilnona 200 µg/mL (acetona)** – (6C): Detalhes de grânulos (cabeças de setas pretas) com perda de anéis concêntricos, os quais são visualizados em apenas um dos grânulos, apontados por uma seta preta. Barra = 2,3µm. (6D): Visão geral mostrando a lâmina basal (BL), grânulos de esferocristais (cabeças de setas pretas) sem anéis concêntricos e áreas citoplasmáticas vacuolizadas. Barra = 12,3µm. (6E): Detalhe de um núcleo (N) e seu nucléolo (n) e do envoltório nuclear que começa a sofrer invaginação (seta preta). Barra = 2,9µm.

- **F e G: Grupo tratado com Hidrametilnona 200 µg/mL (acetona+óleo)** – (6F): Ocorrem microvilosidades (Mv) aparentemente normais na figura, além de uma mitocôndria (Mi). Uma porção do retículo endoplasmático rugoso (setas brancas) também é visualizada. Barra = 2,7µm. (6G): Visão geral de um túbulo indicando um núcleo (N) com regiões heterocromáticas e nucléolo evidente (n). Presença de grânulos mineralizados (cabeças de setas pretas), mas poucos anéis concêntricos são visualizados. Barra = 3,7µm.

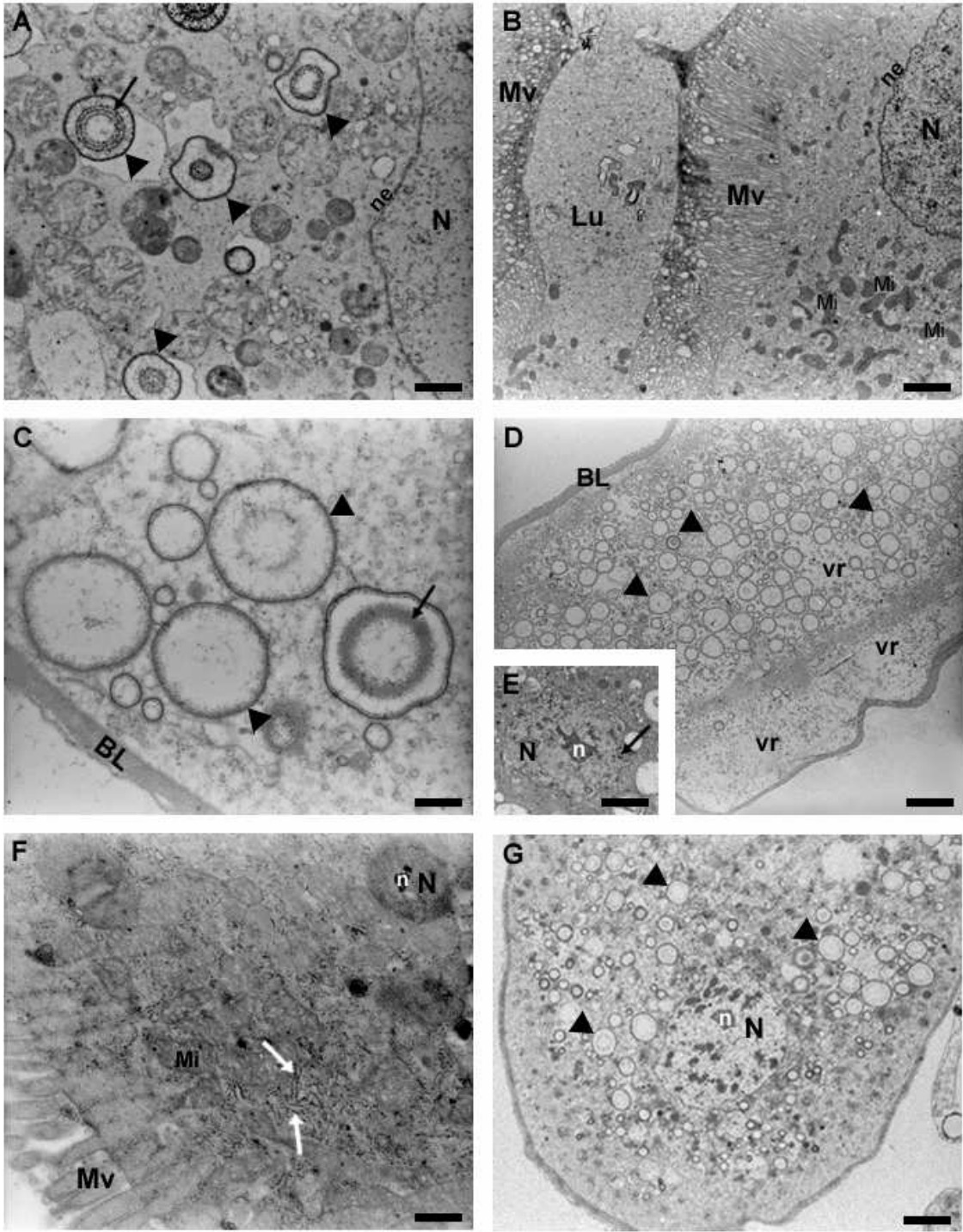


Figura 6

6-DISCUSSÃO

O resultado do bioensaio para a avaliação da toxicidade da hidrametilnona revelou que não houve diferença significativa entre as medianas dos controles (tabelas 1 e 2). Mesmo com a adição da acetona e da solução de acetona e óleo de soja na dieta pura, não houve um índice de mortalidade significativo em comparação com o grupo da dieta pura, revelando que tais solventes são adequados para a análise da ação do composto químico testado.

As medianas dos tratamentos com hidrametilnona com acetona e com acetona e óleo mostraram ser significativamente diferentes das medianas dos três controles considerados (tabelas 1 e 2). Os resultados obtidos confirmam o trabalho de avaliação de toxicidade de Bueno (2005) que observou a diferença considerável das medianas do grupo testemunha e de tratamentos com diferentes concentrações de hidrametilnona. Assim, conclui-se que a hidrametilnona realmente possui o efeito retardado necessário para a eficiência de um ingrediente ativo de inseticida (STRINGER et al., 1964). Nota-se ainda que a adição do óleo ao solvente e à hidrametilnona tornou o ingrediente ativo mais eficaz, o que corrobora os estudos de Bueno (2005).

Na análise histológica por meio da microscopia de luz, nos grupos tratados com o ingrediente ativo e acetona, as glândulas não apresentaram alterações morfológicas evidentes. No entanto, com a solubilização em acetona juntamente com o óleo, houve uma diferença notável na espessura do epitélio devido ao acúmulo de gotas lipídicas provavelmente provenientes do óleo adicionado à dieta, além de características indicativas de morte celular evidenciada pela presença de picnose nuclear (BOWEN; BOWEN, 1990; BOWEN; BOWEN; JONES, 1998), núcleos com marginalização cromatínica indicativos de apoptose (BOWEN; BOWEN; JONES, 1998), além de terem sido observadas regiões citoplasmáticas vacuolizadas.

Os dados apresentados pela microscopia eletrônica de transmissão confirmam que houve um maior grau de degeneração das glândulas pós-faríngeas quando a hidrametilnona estava solubilizada em acetona e óleo de soja. As alterações mais evidentes são a intensa vacuolização citoplasmática e o inchaço de mitocôndrias que apresentaram ainda perda de

suas cristas. No entanto, o contrário foi observado em relação ao ventrículo, pois este órgão parece ser mais afetado quando o composto químico está solubilizado apenas em acetona. O fato da hidrametilnona com óleo não ter promovido drásticas alterações morfológicas no intestino e nos túbulos de Malpighi, pode ser devido ao fato da presença do óleo ter influenciado no transporte e no acúmulo destas substâncias na glândula pós-faríngea.

Essa hipótese baseia-se no fato de que a glândula pós-faríngea está envolvida no metabolismo de lipídeos (BUENO, 2005) e é considerada por certos autores como um divertículo intestinal (CAETANO; JAFFÉ; ZARA, 2002). Dessa forma pode-se sugerir que a presença de óleo na dieta contaminada tenha promovido o transporte da maior parte do alimento para a glândula. Tal fato levaria à diminuição da quantidade de hidrametilnona a ser absorvida pelo intestino e posteriormente pelos túbulos de Malpighi, e conseqüentemente, diminuiria a concentração da mesma na hemolinfa reduzindo as possíveis alterações histológicas drásticas em determinados órgãos. No entanto, a quantidade de hidrametilnona presente na hemolinfa foi suficiente para aumentar a taxa de mortalidade das formigas, provavelmente por agir em órgãos vitais, tais como aqueles do sistema respiratório, circulatório e nervoso, os quais não foram avaliados histologicamente no presente estudo. Desta forma, a via de ingestão da hidrametilnona adicionada de óleo envolve a glândula pós-faríngea.

O papel desempenhado por essas glândulas de formigas é passível de discussão. Para Billen (1991), o retículo endoplasmático rugoso (RER) bem desenvolvido auxilia na produção de enzimas digestivas, o que pode ser um indicativo da função das glândulas pós-faríngeas em *Atta sexdens rubropilosa*, uma vez que são observados muitos RER dilatados. A presença dessas glândulas seria a explicação para a capacidade destas formigas de separarem seletivamente compostos lipídicos dos não lipídicos na porção final da faringe. Isto significa que se a quantidade de lipídio ingerido for grande e o sistema não conseguir armazenar, o excesso se desloca para o papo, mas sem atingir o ventrículo. Quando há redução do estoque ocorre o retorno pelo esôfago que atinge o lúmen da glândula (BUENO, 2005). Assim, essas glândulas em *A. s. rubropilosa* exercem a mesma função que a glândula de *Solenopsis invicta*, sendo supostamente capazes de absorver lipídios do alimento ingerido, não da hemolinfa, e digerir estes, intracelularmente, agindo como cecos cefálicos nestes organismos (VINSON; PHILLIPS; WILLIAMS, 1980).

No entanto, não se encontram grandes quantidades de lipídios disponíveis nas fontes alimentares de saúvas. Por isso, quando entram em contato com grande quantidade destas

biomoléculas, não possuem um limite de ingestão e como não têm mecanismos para eliminar o excesso, conseqüentemente acabam morrendo (BUENO, 2005).

Quanto às alterações apresentadas pelo ventrículo, como já foi dito anteriormente, o intestino médio aparentemente foi mais afetado pela hidrametilnona tendo somente a acetona como veículo, do que com a adição do solvente junto com o óleo. É observada a picnose nuclear de células pela microscopia de luz, além da drástica diminuição da quantidade de vesículas de secreção no epitélio ventricular e a grande quantidade de vacuolização do citoplasma das células digestivas. Tais vacúolos podem ser reflexo de morte celular programada do tipo autofágica, o qual está bem descrito na literatura no processo degenerativo das glândulas de seda de pré- pupas de *Apis* (SILVA-ZACARIN; GREGORC; SILVA DE MORAES, 2006), *Galleria mellonella* (SENHAL; JANDA; NEMEC, 1983), *Bombyx mori* (AKAI, 1984) e no processo de degeneração de glândulas salivares de *Diatraea saccharalis* (VICTORIANO, 2002), *Calliphora erythrocephala* (LEVY; BAUSTZ, 1985), *Calliphora vomitoria* (BOWEN; MORGAN; MULLARKEY, 1993) e *Manduca sexta* (LOCKSHIN; ZAKERI, 1994).

Estes vacúolos comumente aparecem em tecidos de insetos sofrendo metamorfose (BEAULATON; LOCKSHIN, 1982) e no intestino de abelhas mais velhas (MELLO; VIDAL; VALDRIGHT, 1971). Também foram identificadas estruturas similares durante a fase degenerativa de glândulas de seda de larvas na fase pré-pupa (SILVA- ZACARIN et al., 2007a), e nas glândulas salivares de outros insetos (JURAND; PAVAN, 1975; KLOETZEL; LAUFER, 1969; LOCKSHIN; ZACKERI, 1994; SILVA DE MORAES; CRUZ-LANDIM, 1979).

Em compensação, os núcleos do epitélio ventricular do tratamento experimental com adição de óleo não apresentaram picnose nuclear e nem marginalização cromatínica visíveis à microscopia de luz e a quantidade de vesículas de secreção é semelhante aos dos epitélios dos grupos controles. Ainda neste tratamento, foi observado ninhos de células regenerativas íntegros e pela análise da microscopia eletrônica houve uma aparente diminuição da quantidade de microvilosidades. Estudos descrevem a perda de microvilosidades na apoptose, como ocorreu nas glândulas de seda de *Melipona quadrifasciata* (SILVA DE MORAES; CRUZ-LANDIM, 1979). Embora a perda das microvilosidades descritas em células apoptóticas (HÄCKER, 2000) tenha sido observada na porção apical do intestino das formigas, o fato de serem observadas vesículas de secreção nesta região indica que a célula ainda não perdeu sua atividade secretora. A perda de microvilosidades poderia, também, estar

associada a um mecanismo de compensação celular em resposta ao estresse, como forma de diminuir a superfície de absorção do conteúdo alimentar contaminado.

Sobre os resultados obtidos para os túbulos de Malpighi, assim como no ventrículo, o grupo de formigas tratado com o ingrediente ativo e o solvente, sem adição do óleo sofreu mais alterações morfológicas. Nos dados obtidos pela microscopia de luz, verificou-se novamente regiões citoplasmáticas vacuolizadas, além de núcleos picnóticos e uma aparente diminuição na quantidade de grânulos mineralizados em relação aos grupos controles e ao grupo submetido à ingestão da hidrametilnona, acetona e óleo, embora seja difícil quantificar estes grânulos.

Com o acréscimo de óleo de soja não foram observadas vacúolos citoplasmáticos e nucleares, evidentes ao microscópio óptico, nas células dos túbulos de Malpighi. Os nucléolos e grânulos presentes se assemelham aqueles encontrados nos grupos controles. Isto seria explicado, pelo fato que o tratamento adicionado de óleo, seria carreado pela via alternativa da glândula pós-faríngea no trato digestório, o que diminuiria a concentração da hidrametilnona veiculada pela acetona juntamente com o óleo de soja no intestino e, conseqüentemente, nos túbulos.

Por esta análise visual inicial, os grânulos mineralizados das células dos túbulos de Malpighi apresentaram o mesmo padrão de distribuição entre os grupos tratados e os grupos controles. Porém, os resultados de microscopia eletrônica de transmissão nos dois grupos de formigas tratadas com hidrametilnona evidenciaram perda de anéis concêntricos dos grânulos mineralizados dos túbulos de Malpighi. Como a grande quantidade e o grau de desenvolvimento dos grânulos mineralizados indicam que as células estão em alta atividade metabólica (OLAVARRIETA, 2000), os dados do presente trabalho sugerem então que, se as células do ventrículo e dos túbulos de Malpighi perderem a atividade, haverá uma tendência da concentração desses resíduos metabólicos serem reduzidas nos grânulos, o que pode representar um caminho para a degeneração completa ou um indicativo de início de morte celular.

Segundo Caetano e Cruz-Landim (1983) os grânulos são constituídos de resíduos metabólicos de filtrados da hemolinfa e constituam materiais característicos não só dos túbulos de Malpighi, mas também de algumas células do epitélio do ventrículo. De acordo com esta hipótese, Cruz-Landim e Serrão (1997), em estudos químicos e morfológicos de concreções minerais no ventrículo de abelhas, sugeriram que a eliminação por extrusão apócrina do acúmulo das concreções minerais no ápice das células representa uma função excretora do intestino médio.

Estudos de Gouranton (1968) indicam que os grânulos mineralizados são produzidos em elementos do retículo endoplasmático rugoso (RER), começando com a condensação do material elétron-denso. As cisternas do retículo aumentam e perdem os ribossomos enquanto a fusão de pequenas inclusões aumenta o tamanho da concreção. O núcleo central do material torna-se envolto por camadas alternadas de material elétron-denso e translúcido. Frequentemente o núcleo subsequente torna-se menos denso, talvez indicando que algum material estocado é re-utilizado. As concreções podem tornar-se associadas com figuras mielínicas em estágios mais avançados e só uma tênue esfera de material elétron-denso pode permanecer. Em glândulas de seda de *A. mellifera* (SILVA-ZACARIN, 2007b) isto pode explicar o surgimento das lamelas concêntricas, consideradas como material degenerativo (CRUZ- LANDIM; SILVA DE MORAES, 1977). Tashiro, Morimoto e Matsumura (1968) também observaram as estruturas lamelares concêntricas em glândula de seda de *Bombyx mori*, enquanto Billen (1990) as encontrou nas glândulas de veneno de *Myrmecia gulosa*. Em *Petrobius maritimus* e em lagartas, as esferas podem derivar de corpos golgianos e, pelo menos no final, eles não tem associação com figuras mielínicas (FAIN-MAUREL; CASSIER; ALIBERT, 1973).

De acordo com a análise dos resultados do presente trabalho, não há influência do solvente (acetona) nos resultados da análise morfológica. Outro fator a ser considerado seria a influência do óleo vegetal utilizado, pois poderia causar respostas variadas das formigas, desde alta atratividade até repelência (BOARETTO, 2000). Segundo Nagamoto (1998), os inseticidas para *Solenopsis* sp são formulados com óleo de soja, que neste caso serve como solvente e atrativo, enquanto que para *Atta sexdens*, este mesmo óleo quando impregnado em chumaços de algodão, determinou uma forte redução na atratividade, agindo inclusive, como repelente. Este mesmo autor explica que essa repelência se deve às forças de coesão que tendem a fazer o óleo envolver a superfície corporal da formigas, matando-as por asfixia. Ou seja, as repostas dependem da forma pela qual as formigas entram em contato com o óleo. Desta forma, formigas que tem acesso ao óleo por meio de chumaços de algodão ficam impregnadas desencadeando um processo de limpeza de antenas e tarsos, respondendo assim negativamente.

No entanto, no trabalho de Boaretto (2000), fragmentos de celulose com óleos vegetais foram oferecidos às formigas após a retirada do excesso de óleo, diminuindo o problema de impregnação no corpo destes insetos. Para Bueno (2005), a presença do óleo de soja aumenta a eficiência do inseticida, sendo considerado essencial na preparação de iscas. De acordo com Matsumura (1975), isto ocorre devido ao fato do óleo permitir um maior contato do inseticida

com a cutícula, além de dissolver a cera epicuticular, e assim, facilitar a passagem do inseticida e promover a desorganização da proteína interna da cutícula.

7-CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos com os bioensaios confirmaram a atividade retardada da hidrametilnona.
- A associação dos dados morfológicos da microscopia de luz e da microscopia eletrônica de transmissão com os dados dos bioensaios de toxicidade sugere que a hidrametilnona atua diferentemente nos órgãos analisados, bem como na taxa de mortalidade das formigas, dependendo se esse princípio ativo está associado ou não ao óleo adicionado à dieta artificial.
- O mecanismo pelo qual o óleo adicionado ao ingrediente ativo aumenta a sua eficiência permanece obscuro, assim como a relação das glândulas pós-faríngeas nesse processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAI, H. The ultrastructure and functions of the silk gland cells of *Bombyx mori*; In: KING, R. C.; AKAI, H. (Eds.). **Insect ultrastructure**. New York: Plenum Press, 1984. n. 2, p. 323-364, 1984.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Histo-anatomia de glândulas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera). **Arq. Inst. Biol.** v. 34, n. 4, p. 321- 329, 1967.

AMANTE, E. 1972. **Influência de alguns fatores microclimáticos sobre a formiga saúva *Atta laevigata* (F. Smith, 1858), *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, *Atta bisphaerica* Forel, 1908 e *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera, Formicidae), em formigueiros localizados no estado de São Paulo**. 1972. 175f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.

ANJOS, N., DELLA LUCIA, T. M. C., MAYHÉ-NUNES, A. J. **Guia prático sobre formigas cortadeiras em reflorestamentos**. Ponte Nova, MG.: Graffcor, 1998. 97p.

ATTYGALLE, A. B., BILLEN, J. P. J., MORGAN, E. D. The post- pharyngeal gland of workers of *Solenopsis geminata* (Hymenoptera: Formicidae). **Actes Coll. Insects Soc.** [s.l.] v. 2, p. 75- 86, 1985.

AYRE, G. L. Feeding behaviour and digestion in *Camponotus herculeanus* (L.) (Hymenoptera: Formicidae). **Ent. Exp. & Appl.** v. 6, p. 165- 170, 1963.

BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. São Paulo: Roca, 1990. 1179p.

BEAULATON, J.; LOCKSHIN, R. A. The Relation of Programmed Cell Death to Development and Reproduction: Comparative Studies and an Attempt at Classification. **MI Rev. Cytol.**, v. 19 , p. 215-235, 1982.

BILLEN, J. Morphology and ultrastructure of the Dufour's and venom gland in the ant *Myrmecia gulosa* (Fabr.) (Hymenoptera : Formicidae). **Australian Journal of Zoology**. v. 38, p. 305-315, 1990.

BILLEN, J. Ultrastructural organization of the exocrine glands in ants. **Ethology, Ecology and Evolution**, v. 1, p. 67-73, 1991.

BILLEN, J.; SCHOETERS, E. The post-pharyngeal gland in *Dinoponera* ants (Hymenoptera: Formicidae): Unusual morphology and changes during the secretory process. **Int. J. Insect Morphol. & Embryol**, v. 25, n. 4, p. 443-447, 1996.

BILLINGSLEY, P. F., DOWNE, T. R. The effects of artificial diets on the anterior intestinal cell ultrastructure of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera : Reduviidae). **Int. J. Parasitol.**, v. 1, n. 3, p. 291-299, 1989.

BLOOMQUIST, J. R. Insecticides: chemistries and characteristics. Disponível em <www.ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>. Acesso em: 15 fev. 2008.

BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.

BOARETTO, M. A. C. **Seleção de substratos com potencial para uso em iscas formicidas para as saúvas *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 e *Atta bisphaerica* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) e isolamento do fungo simbiote**, 2000. 161f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio nde Mesquita Filho”, Botucatu, 2000.

BOWEN, I. D., BOWEN, S. M. **Programmed cell death in tumours and tissues**. London: Chapman and Hall, 268p. 1990.

BOWEN, I. D., BOWEN, S. M., JONES, A. H. **Mitosis and Apoptosis: matters of life and death**. London: Chapman and Hall, 1998.

BOWEN, I. D.; MORGAN, S. M.; MULLARKEY, K. Cell death in the salivary glands of metamorphosing *Calliphora vomitoria*. **Cell Biol. Int.** (s.l), v. 1, p. 13-33, 1993.

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

BRAECKMAN, B. et al. Cadmium pathology in an insect cell line: ultrastructural and biochemical effects. **Tissue & Cell**, v. 31, n. 1, p. 45-53, 1999.

BUENO, F. C.; **Seleção de ingredientes ativos para uso em iscas no controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae)**, 2005. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2005.

BUENO, O. C. et al. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera : Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. **An. Soc. Entomol.** v. 26, p. 107-112, 1997.

BUENO, O. C. **Filtro infrabucal e glândulas pós-faríngeas da saúva-limão *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae).** 107f. Tese (Livre-Docência) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho”, Rio Claro, 2005.

BUENO, O. C.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C. As formigas domésticas. In: MARICONI, F. A. M. (Ed.). **Insetos e outros invasores de residência.** Piracicaba: FEALQ. 1999, p.135-180.

BURSCHE, W., et al. Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death (apoptosis) during regression of rat liver hyperplasia. **Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.**, v. 50, p. 153-166, 1985.

CAETANO, F. H. **Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da sub-família Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae),** 1977. 142f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1977.

CAETANO, F. H. **Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera: Formicidae),** 1981. 171f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1981.

CAETANO, F. H. Presence of cuticular spines in proctodeo of ants *Paraponera clavata* and *Dinoponera australis* (Hymenoptera: Ponerinae). In: **INTERNATIONAL CONGRESS OF CELL BIOLOGY**, 4, 1988, Montreal, Canadá. Résumes...

CAETANO, F. H. et al. Presence of nematodes in the post- pharyngeal gland of ants *Camponotus rufipes* (Hymenoptera : Formicidae). In: **Jornada Paulista de Parasitologia**, n.8, 1990, Campinas. **Anais...** Campinas: IEL - Centro Acadêmico Unicamp, 1990.

CAETANO, F. H. **Aspectos ultramorfológicos, ultra-estruturais e enzimológicos da glândula pós-faríngea de *Dinoponera australis* (Formicidae: Ponerinae).** 137 f. Tese (Livre – Docência) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho”, Rio Claro, 1998.

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.

CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F. J. **Formigas: Biologia e Anatomia**. Rio Claro: Editora Topázio, 2002. 131p.

CAETANO, F. H.; MACHADO, V. L. L. Morfologia e histologia do trato digestivo de *Protopolybia exigua exigua* (Hymenoptera: Vespidae) e suas estruturas excretoras anexas. **Pap. Avulsos Zool.**, v.34, n. 25, p.283-96. 1982.

CAETANO, F. H.; OVERAL, W. L. Estudos do trato digestivo de vespas (Hymenoptera : Vespidae) e estruturas excretoras associadas. I. Morfologia. **Rev. brasil. Ent.**, v.28, n.4, p. 403 - 408, 1984.

CHAPMAN, P. J. Petroleum oils for the control of orchard pests. **New York State Agricultural Experiment Station Bulletin** n.814, 1967.

CHAPMAN, R. F. **The Insects: structure and function**. New York: American Elsevier. 1975. 819p.

CHAPMAN, R. F. Structure of the digestive systems. In: KERKUT, G. A. and GILBERT, L. I. (Eds.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, Oxford, United Kingdom: Pergamon Press, 1985. v. 4. p. 165-211.

CHERRETT, J. M. The foraging behaviour of *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae). Foraging pattern and plant species attacked in tropical rain forest. **J. Anim. Ecol.**, Oxford, v. 37, p. 387-402, 1968.

CINTRA, P. **Atividade tóxica de *Dimorphandra mollis* Benth. (Caesalpinaceae) sobre operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**, 2001. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2001.

CLARKE, P. G. H. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anat and Embriol (Berl)**, Berlin, v. 181, p.195-213, 1990.

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, p. 681-692, 1977.

CRUZ-LANDIM, C. Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. IN: Biologia Celular. Aciesp. **Anais Acad. Ciências Est. São Paulo**. São Paulo, v. 44, p. 28-49, 1985.

CRUZ-LANDIM, C.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure and histochemistry of the mineral concretions in the midgut of bees (Hymenoptera: Apidae). **Neth. J of Zool.** [s.l], v. 47, n. 1, p. 21-29, 1997.

DELAGE, B. Recherches sur les fourmis moissonneuses du Bassin Aquitain: éthologie. Physiologie de l' alimentation. **Ann. Sc. Nat. Zool.**, v.10, p. 197-266. 1968.

DELAGE-DARCHEN, B. Les glandes post-pharyngiennes des fourmis connaissances actuelles sur leur structure, leur fonctionnement, leur rôle. **Ann. Biol.** [s.l] v. 15, n. 1-2, p. 63-76, 1976 .

DELLA LUCIA, T. M. C. et al. **As formigas cortadeiras: Folha de Viçosa.** Viçosa, MG. 1993. 262p.

DUPORTE, E. M. **Manual of insect morphology.** New York: Reinhold, 1959, p. 150-168.

FAIN-MAUREL, M. A.; CASSIER, P.; ALIBERT, J. 1973. Étude infrastructure et cytochimique de l'intestin moyen de *Petrobius maritimus*. Leach en rapport avec ses fonctions excrétrices et digestives. **Tissue Cell.**, v. 5, p. 603-631, 1973.

FALCO, J. R. **Comparação ultraestrutural entre glândulas pós-faríngeas de *Camponotus rufipes* (Hymenoptera: Formicidae) parasitadas e não por nematóides**, 1992, 70f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1992.

FORBES, J.; MCFARLANE, A. M. The comparative anatomy of digestive glands in the female castes and the male of *Camponotus pennsylvanicus* Degeer (Formicidae, Hymenoptera). **New York Entomological Society.** v. 69, p. 92-103, 1961.

FURQUIM, K. C. S. **Estudo das glândulas salivares de fêmeas e machos de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae): Caracterização do ciclo secretor com ênfase no processo de degeneração**, 2007. 237f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2007.

GAMA, V. O sistema salivar de *Camponotus (Myrmothrix) rufipes* (Fabricius, 1775), (Hymenoptera : Formicidae). **Rev. Brasil. Biol.**, v. 45, n. 3, p. 317-359, 1985.

GILLOTT, C. **Entomology.** New York: Plenum, 1980, 729 p.

GOURANTON, J. Composition, structure et mode de formation des concrétions minérales dans l'intestin moyen des homoptères cercopides. **J. Cell Biol.**, v. 37, p. 316 -328, 1968.

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.

GUIMARÃES, P. R. Parceria surpreendente. **Ciência Hoje**, v. 32, p. 68-70, 2002.

GULLAN P. J.; CRANSTON, P. S. The insects: an outline of entomology. 2. ed. Oxford: **Blackwell Science**, 2000. 470p.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 301, p. 5-17, 2000.

HAINES, B. L. Element and energy flows through colonies of leaf- cutting ant, *Atta colombica*, in Panama. **Biotropica**, v. 10, n. 4, p. 270-277, 1978.

HALABY, R.; ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R. A. Metabolic events during programmed cell death in insect labial glands. **Biochem. Cell Biol.**, v. 72, p. 597-601, 1994.

HEBLING, M. J. A. et al. A utilização de produtos naturais para o controle de formigas cortadeiras e/ou fungo simbiote. **Naturalia**, São Paulo, v. 24, p.311-317, 1999.

HESLER L. S.; PLAPP, F. W. Jr. Uses of oils in insect control. **Southwest. Entomol. Suppl**, v.11, p.1-8, 1986.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. London: Springer, 1990. 732p.

HOLLINGSHAUS, J. G. Inhibition of mitochondrial electron transport by hydramethylnon: a new amidinohydrazone insecticide. **Pest Biochem Physiol**, v.27, p.61-70, 1987.

JACOB, L. **Seleção de Ingredientes ativos para o controle de formigas urbanas**, 2002. 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2002.

JANET, C. **Anatomie du gaster de la *Myrmica rubra***. Paris: Georges Carré et C. Naud. Editeurs. 1902. 68p.

JANET, C. **Anatomie de la tête du *Lasius niger***. Paris: Limoges Impremeire-libraire. Ducourtieux et Gout. 1905. 40p.

JESUS, C. M. **Utilização de alimentos contendo substâncias lipídicas e açucaradas por formigas urbanas**. 2006. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2006.

JUHASZ, G. et al. The *Drosophila* homolog of Aut1 is essencial for autophagy and development. **FEBS Lett.**, v. 543, p. 154-158, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 11, p.231.

JURAND, A.; PAVAN, C. Ultrastructural aspects of histolytic process in the salivary gland cells during metamorphic stages in *Rhynchosciara hollaenderi* (Diptera, Sciaridae); **Cell Differ.** [s.l], v.4, p. 219-236, 1975.

KLOETZEL, J. A.; LAUFER, H. A fine-structure analysis of larval salivary gland function in *Chironomus thummi* (Diptera). **J. Ultrastruct. Res.**, v. 29, p. 15-36, 1969.

LEVY, M.; BAUTZ, A. M. Degeneration of larval salivary glands during metamorphosis of the blow-fly *Calliphora erythrocephala*. Meigen (Diptera: Calliphoridae). **J. Insect Morphol. Embriol.** [s.l], v. 14, p. 281-290, 1985.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programed cell death. II. Endocrine potentiation of breakdown of the intersegmental muscles of silkmouths. **J. Insect Physiol.**, v. 10, p. 643-649, 1964.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. F. Programmed cell death: early changes in metamorphosing cells; **Biochem. Cell Biol.**, v.72, p.589-596, 1994.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. The Biology of Cell Death and Its Relationship to Aging. In: HOLBROOK, N.; MARTIN, G. R., LOCKSHIN, R. A. (Eds.). **Cellular Aging and Cell Death**. New York: Willey- Liss, 1996. p.167-180.

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

LOECK, A. E.; NAKANO, O. Efeito de novas substâncias visando o controle de saúveiros novos de *Atta laevigata* (Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). **Solo**, v.1, p.25-30, 1984.

FEBVAY, G.; KERMARREC, A. Digestive Fysiology of leaf-cutting ants. IN: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Eds.) **Fire ants and leaf-cutting ants: Biology and management**. Boulder: Westview Press, 1986. p.274-285.

MARINI, T. **Toxicidade de alguns óleos vegetais para operárias de *Atta sexdens rubropilosa***. 2003. 31f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2003.

MARTINELLI, A. **Histoquímica e ultraestrutura dos túbulos de Malpighi de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptea: Formicidae)**, 1998. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto e Biociências da Univervidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1998.

MARTINELLI, A; TABOGA, S. R. Estrutura e ultra-estrutura dos túbulos de Malpighi em *Periplaneta americana* (Blattaria). In: XIV COLÓQUIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA, 1., 1993, Caxambu. **Anais...** Caxambu, 1993. p.250-251.

MARTOJA, R.; BALLAN-DUFRANÇAIS, C. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. In: KING, R.C., AKAI, H. **Insect ultaestruuture**. New York: Plenum Press, 1984. v. 2, p. 119-261.

MATSUMURA, F. **Toxicology of insecticides**. New York: Plenum Press, 1975, 503p.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C.; VALDRIGHT, L. The larval peritrophic membrane of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apoidea). **Protoplasma.**, v. 73, p. 349-365, 1971.

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

MOHAMED, U. V. K. Histomorphological evidence for ectodermal origin of Malpighian tubules in insects. **Pak. J. Zol.**, v.18, n. 2, p. 171-177, 1986.

NAGAMOTO, N. S. **Metodologia para Seleção de Inseticidas visando Confecção de Iscas Tóxicas para Formigas Cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae)**, 1998. 94p. Dissertação

(Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1998.

NAGAMOTO, N. S. **Estudos toxicológicos de princípios ativos inseticidas em formigas cortadeiras (Hymenoptera, Formicidae)**, 2003. 234f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.

OBENG-OFORI, D. Plants oils as grain protectants against infestations of *Cryptolestes pusilus* and *Phyzopertha dominica* in stored grain. **Entomol Exp Appl.**, v. 77, p.133-139, 1995.

OLAVARRIETA, A. J. A. **Estudo ultramorfológico e ultra - estrutural dos túbulos de Malpighi de operárias de *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera : Formicidae)**, 2000. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2000.

PEREGRINE, D. J.; MUDD, A.; CHERRETT, J. M. Anatomy and preliminary chemical analysis of post-pharyngeal glands of leaf- cutting ant, *Acromyrmex octospinosus* (Reich.) (Hym., Formicidae). **Ins. Soc.**, v. 20, n. 4, p. 355- 363, 1973.

PRIESTER, W. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Calliphora eritrocephala*. **J. Ultrastruct. Res.**, v.36, p.783-805, 1971.

PROSKURYAKOV, S. Y.; KONOPLYANNIKOV, A. G.; GABAI, V. L. Necrosis :a specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research**, v. 283, p. 1-16, 2003.

RIBEIRO, A. F., FERREIRA, C., TERRA, W. R. Morphological basis of insect digestion. In: MELLINGER, J. (Ed.) **Animal Nutrition and Transport Processes**. I. Nutrition in Wild and Domestic Animals, 1990. v. 5, p. 96-105.

RICHARDS, A. G., RICHARDS, P. A. The peritrofc membrane of insects. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 22, p. 219-240, 1977.

RICHARDS, O. W.; DAVIES, R. G. **IMM’ S General Textbook of Entomology**. London: Chapman and Hall, 1977. 135p.

ROEDER , K. D. **Insect physiology**. New York: John Wiley & Sons, 1953. p1100

ROSS, H. H. A textbook of entomology. 30 ed. New york: John Wiler, 1965. p. 90-163

SCHOONHOVEN, A. V. Use of vegetable oils to protect stored beans from bruchid attack. **Entomological Society of America**, v.71, n. 2, p.254-56, 1978.

SENHAL, F.; JANDA , J. R. V.; NEMEC, V. Compositio syntetic and cytolitic activities of *Galleria mellonella* silk glands during the last-larval instar under the action of juvenile hormone. **J. Insect Physiol.** [s.l], v. 29, p.237-248, 1983.

SILVA DE MORAES, R. L. M.; CRUZ-LANDIM, C. Estudos ultraestruturais da glândula salivar larval de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. durante o desenvolvimento larval; **Rev. Brasil. Biol.**, v 39, p.103-116, 1979.

SILVA DE MORAES, R. L. M. **Morte celular nas glândulas hipofaríngeas de *Apis mellífera* (Hymenoptera: Apidae)**, 1998, 97f.. Tese (Livre-Docência) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1993.

SILVA-ZACARIN, E. C. M.; GREGORC, A.; SILVA DE MORAES, R. L. M. In situ localization of heat-shock proteins and cell death labeling in the salivary gland of acaricide-treated honeybee larvae. **Apidologie**, v. 37, p. 507-516, 2006.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. et al. Programmed cell death in the larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Biosciences**, v. 32, p. 309-328, 2007 (a).

SILVA-ZACARIN, E. C. M. ; TABOGA, S. R. ; SILVA DE MORAES, R. L. M. . Nuclear alterations associated to programmed cell death in larval salivary glands. **Micron (Oxford)**, v. 38, p. 1-7, 2007 (b).

SILVEIRA, C. **Toxicidade de produtos de origem vegetal para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908**, 2002. 60f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2002.

SMITH, D. S. **Insect cells: their structure and function**. Edinburgh: Oliver and Boyd, 1968. 372p.

SNODGRASS, R. E. Principles of insect morphology. New york: Mc Mac Graw- Hilll Book, 1935. 667p.

SOROKER, V. et al. The post-pharyngeal gland as a “gestalt” organ for nestmate recognition in ant *Cataglyphis niger*. **Naturwissenschaften**, v. 81, p. 510- 513, 1994.

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

SOUZA, D. J. Cortadeiras sob ameaça. **Ciência Hoje**. Rio de Janeiro, RJ. v. 37, p. 62-63, 2005.

STRINGER, C. E.; LOFGREN, C. S.; BARTELETT, F. J. Imported fire ant toxic bait studies: evaluation of toxicants. **J. Econ. Entomol.**, v.57, n.6, p.941-945, 1964.

SUMIDA, S. S. **Análise Morfológica dos túbulos de Malpighi, do ventrículo e das glândulas pós-faríngeas das operárias adultas de *Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908, tratadas com compostos químicos**, 2007. 53f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2007.

SUMIDA, S. S. Morphological changes in organs of *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae: Hymenoptera) treated with boric acid in toxicological bioassays. **J. Econ. Entomol.**, v. 103, n. 3, p. 676-690, jun 2010.

TAKAHASHI-DEL-BIANCO, M. **Toxicidade de extratos orgânicos foliares de *Canavalia ensiformis* (L.) D. C. e de alguns princípios ativos de inseticidas comerciais para operárias de *Atta sexdens*, Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae)**, 2002. 173f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2002.

TASHIRO, Y.; MORIMOTO, T.; MATSUMURA, S. Studies on the posterior gland of the silkworm, *Bombix mori*. I. Growth of posterior silk gland cells and biosynthesis of fibroin during the fifth larval instar. **J. Cell Biol.**, v. 38, p. 574-588, 1968.

TERRA, W. R. Physiology and biochemistry of insect digestion. An evolutionary perspective. **Bras. J. Med. Biol. Res.**, v. 21, p. 675- 734, 1988.

TERRA, W. R. A digestão dos insetos. **Ciência Hoje.**, v. 12 , n.70, p. 28- 38, 1991.

THOMPSON, M. J. .et al. Major hydrocarbons of the post- pharyngeal glands of mated queens of the red imported fire ant *Solenopsis invicta*. **Lipids.**, v. 16, n. 7, p. 485- 495, 1981.

TOMOTAKE, M. E. M. **Ultra-estrutura do proventrículo de operárias da subfamília Ponerinae (Hymenoptera : Formicidae)**, 1996. 129f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1996.

TSAI, J. H.; PERRIER, J. L. Morphology of digestive and reproductive systems of *Peregrinus maidis* (Homoptera: Delphacidae). **Fla. Entomol.**, v. 76, n. 3, p. 429-436, 1993.

VANDER MEER, R. K.; GLANCEY, B. M.; LOFGREN, C. S. Biochemical changes in the crop, oesophagus and post-pharyngeal gland of colony- founding red imported fire ant queens (*Solenopsis invicta*). **Insect Biochem.**, v. 12, n.1, p. 123- 127, 1982.

VINSON, S. B., PHILLIPS, S. A., WILLIAMS, H. J. The function of the post- pharyngeal glands of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, Buren. **J. Insect Physiol.**, v. 20, p. 645- 650, 1980.

VICTORIANO, E. **Citoquímica e ultra-estrutura da glândula de seda de *Diatrea sacharalis* (Lepidóptera: Pyralidae) em fase de síntese e na degeneração**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2002.

WEBER, N. A. (1982): Fungus ants. In: HERMANN, H.R. (Ed.) **Social insects**, New York: Academic Press. v. 4. p. 255-363.

WIGGLESWORTH, V. B. **The principles of insects physiology**. 7ed. London: Chapman and Hall, 1974. 827p.

WYLLIE, A. H. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: BOWEN I. D., LOCKSHIN R. A. (Eds.) **Cell death in biology and pathology**. New York: Chapman and Hall; 1981. p. 9-34.

ZAKERI et al., Cell Death programmed, apoptosis, necrosis, or other? **Cell Death Differ.**, v. 2, p. 87-96, 1995.

ZYLBERBERG, L.; JEANTET, A-Y ; DELAGE- DARCHEN, B. Particularités structurales de l' intima cuticulaire des glandes post- pharyngiennes des fourmis. **J. Microscopie**, v. 21, p. 331- 342, 1974.