UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NATHALIA LORENZON

ANÁLISE MORFOLÓGICA DE OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* TRATADAS COM THIAMETHOXAM

Rio Claro
2014

NATHALIA LORENZON

ANÁLISE MORFOLÓGICA DE OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* TRATADAS COM THIAMETHOXAM

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2014

595.796 Lorenzon, Nathalia
L869a Análise morfológica de operárias de Atta sexdens rubropilosa tratadas com thiamethoxam / Nathalia Lorenzon. - Rio Claro, 2014
47 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

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

1. Formiga. 2. Formiga cortadeira. 3. Toxicidade. 4. Glândula pós-faríngea. 5. Túbulo de Malpighi. 6. Ventrículo. I. Título.

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

Dedico esse trabalho a minha família e a todos os meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Quatro anos se passaram, e, diga-se de passagem, muito rápido. Em 2010, quando entrei na faculdade, imaginava este momento muito distante e quando dei por mim, já era hora de começar a escrever o meu TCC. Devido aos dias muito atarefados, entre provas e trabalhos infinitos, bem como administrar o tempo entre as aulas e o estágio, digo que hoje, tudo valeu a pena. Algumas conquistas não são possíveis sem abrir mão de determinadas coisas. Foram noites e noites sem dormir, muito nervosismo, entretanto, também restaram os momentos bons.

Antes de mais nada, dedico este trabalho a minha família. Meu pai, Edson Tomaz Lorenzon, que sempre acreditou em mim e me incentivou para que eu fosse atrás dos meus sonhos. Minha mãe, Aparecida de Fátima Oliveira Lorenzon, que sempre me apoiou e estava presente em todos os momentos para me acalmar quando eu acreditava que nada iria dar certo, mas ao mesmo tempo estava sempre vibrando junto comigo a cada conquista. A minha irmã, Livia Lorenzon, que apesar de alguns momentos de desentendimentos, sei que torce muito pelas minhas conquistas. A minha avó, Terezinha Cardoso de Oliveira, que sempre se orgulhou ao dizer a todos que a neta dela estudava em uma das melhores universidades do país. A minha tia, Verônica Lorenzon, por sempre acreditar e vibrar comigo a cada conquista. Muito obrigada por todos os momentos. Amo muito vocês.

A minha amiga Paula Natasha Martins, por estar presente na minha vida e por acreditar em nossa amizade. Foram tantos momentos, e você estava lá para me apoiar em todos eles. Tantas tardes de domingo passadas no laboratório, e sempre que eu pedia a sua companhia, você nunca se negou.

Nesses quatro anos de faculdade conheci pessoas maravilhosas, que me ajudaram a trilhar esse caminho e me deram força para continuar. Meus amigos Renata, Perdigão, Isa, Sabrina, Vida, Tássio, Rafa, Ju, Gabi, Fer, Livia. Vocês fizeram toda a diferença na minha vida nesses anos. Uns permaneceram, outros são distanciaram, mas foram importantes de qualquer forma. Agradeço também aos meus amigos Amarildo, Danilo, Paulinho, Carmem Maia, Ícaro, Victor e Solange, por acreditarem no meu potencial e por sempre me estimularem a seguir em frente.

Ao Prof. Dr. Odair Correa Bueno, pela dedicação, por ter ensinado muitas das coisas que sei hoje, e por ter me orientado no decorrer desse trabalho.

Ao Dr. Alexsandro Santana Vieira, pela co-orientação, por toda paciência e dedicação em fazer sempre o melhor ao me ajudar no desenvolvimento do trabalho. Muito obrigada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de iniciação científica, ao Centro de Estudos de Insetos Sociais- CEIS e ao Departamento de Biologia, por fornecerem a infraestrutura necessária para a realização desse trabalho.

A todos do Centro de Estudos de Insetos Sociais: Ita Reis, Amandex, Manu, Sandroca, Marcella Bastos, Tais Marchesin, Vivi, Necis, Na Marin, Socorro, entre tantas outras pessoas que por ali passaram, agradeço a vocês pela amizade conquistada durante todo esse tempo de trabalho. Em especial gostaria de agradecer a Marcela Ceccato, por ser mais que apenas uma colega de trabalho, mas sim uma amiga, que sempre me ajudou nas horas difíceis, me dando força para continuar em frente. Também, a Pamelita, que me ajudou no desenvolvimento desse trabalho, perdendo horas e horas para me ensinar a dissecar corretamente as formigas, me explicando sobre as diversas técnicas. Sou muito grata a você. Tenho um carinho muito especial por todos vocês.

“Ninguém pode correr atrás de nossos sonhos mais que nós mesmos”
Nathalie Trutmann

RESUMO

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex* destacam-se como pragas agrícolas devido a sua capacidade de corte e transporte de vegetais frescos para utilização como substrato para o fungo simbionte. Assim, vários estudos toxicológicos são realizados na tentativa de controle dessas formigas. Nesse sentido, o presente estudo teve por objetivo avaliar a toxicidade de thiamethoxam solubilizado em acetona + óleo nas operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, bem como verificar possíveis alterações morfológicas nas glândulas pós-faríngeas, túbulos de Malpighi e no ventrículo destas formigas, em grupos com e sem o tratamento do ingrediente ativo Thiamethoxam. Foram realizados bioensaios preliminares para definição da concentração do ingrediente ativo (0,001%; 0,0001%; 0,00005% e 0,00001%) para realização das análises morfológicas nos tecidos propostos. Os resultados dos bioensaios de toxicidade mostraram que o Thiamethoxam apresenta atividade de ação retardada em todas as concentrações, apresentando-se como um ingrediente ativo eficiente para o controle de formigas cortadeiras. Mediante aos resultados, a concentração 0,00005% foi ideal para a realização das análises histológicas, uma vez que apresentou mediana satisfatória, com 5 dias de experimento. Então, foi realizado um novo ensaio com os grupos controle (dieta pura e acetona + óleo) e Thiamethoxam 0,00005% para coleta e dissecação das formigas para análise morfológica das glândulas pós-faríngeas, túbulos de Malpighi e do ventrículo. Os resultados mostraram que o Thiamethoxam 0,00005% provocou alterações mais significativas no ventrículo do que nos outros tecidos, onde foi possível observar formação de vacúolos citoplasmáticos e núcleos picnóticos que podem ser indicativos de morte celular. Nas glândulas pós-faríngeas foi notado desorganização no citoplasma, com alguns núcleos achatados. Os túbulos de Malpighi apresentaram modificações em relação a quantidade de grânulos mineralizados, sugerindo que esse tecido estaria aumentando a sua atividade metabólica para eliminar os resíduos metabólicos do ingrediente ativo. Esses resultados sugerem que a ação inicial desse ingrediente ativo testado ocorre no ventrículo e posteriormente em outros tecidos, como glândulas pós faríngeas e túbulos de Malpighi, devido a sua ação retardada, diferente de outros ingredientes ativos (hidrametilnona e sulfuramida) que provocaram alterações morfológicas drásticas em todos os tecidos já estudados (glândula pós-faríngea, túbulos de Malpighi e ventrículo).

Palavras–chave: Formiga cortadeira, toxicidade, glândula pós-faríngea, túbulo de Malpighi, ventrículo.

ABSTRACT

The leaf-cutting ants of the genus *Atta* and *Acromyrmex* stand out as agricultural pests due for its ability to cutting and transport of vegetables for use like substrate for the symbiotic fungus. In this way, many toxicological studies are conducted in attempt to control these ants. In this sense, the study was aimed to evaluate the toxicity of Thimethoxam, solubilized in acetone + oil on workers of *Atta sexdens rubropilosa*, as well identify morphological changes in Post-Faringeal Glands, Malpighian tubules and ventricles of these ants in groups with and without the treatment of active ingredient Thiamethoxam. Were done bioassay to define the concentration of Thiamethoxam (0.0001% 0.00005% 0.00001% and 0.001%) for performing morphological analyzes in tissues proposed. The results of toxicity tests showed that the Thiamethoxam activity has delayed action to all concentrations, suggesting to be an active ingredient effective to control leaf-cutting ants. By results, the concentration 0.00005% was ideal for carry out histological analyzes, because showed satisfactory median with 5 days of experiment. Was conduct a new test with control groups (pure diet and acetone + oil) and group Thiamethoxam 0.00005% for morphological analysis of Post-Pharyngeal Glands, Malpighian tubeles and ventricle. The results showed that the Thiamethoxam 0.00005% caused more significant changes in ventricle than in other tissues. Was possible to note formation of vacuoles cytoplasmic that may be indicative of cell death. In the Post-Pharingeal Glands was note clutter in the cytoplasm, however, the nucleus remained intact.The Malpighian tubules showed changes in the amout of mineralized granules, suggesting that this tissue would be increasing their activity metabolic to remove wast metabolic from the Thiamethoxam. These results suggest that initial action of this active ingredient happens in ventricle and later in other tissues as the post-pharyngeal glands and Malpighian tubules.

Keywords: Leaf-cutting ants, toxicity, Post-Pharyngeal Glands, Malpighian tubules, ventricle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do thiamethoxam. 15
Figura 2. Curvas de sobrevivência de operárias médias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de toxicidade em dieta artificial, durante 25 dias, com thiamethoxam, nas concentrações de 0,001%, 0,0001%, 0,00001% e 0,00005%. 26
Figura 3. Curva de sobrevivência de operárias médias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de toxicidade em dieta artificial com thiamethoxam, durante 25 dias, pelo método acetona+óleo, na concentração de 0,00005%. 28
Figura 4. Secções histológicas das glândulas pós-faríngeas de operárias de *A.sexdens rubropilosa* coradas com Hematoxilia-Eosina. 31
Figura 5. Secções histológicas dos túbulos de Malpighi de operárias de *A. sexdens rubropilosa* coradas com Hematoxilia-Eosina. 34
Figura 6. Histologia do intestino médio (ventrículo) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* coradas com Hematoxilia-Eosina. 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias médias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com thiamethoxam nas concentrações 0,001%, 0,0001%, 0,00005% e 0,00001%. 26

Tabela 2. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias médias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de toxicidade em dieta artificial com thiamethoxam, pelo método acetona+óleo, na concentração de 0,00005%. 28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13
2.1 Formigas cortadeiras: aspectos gerais 13
2.2 Thiamethoxam 14
2.3 Glândula pós-faríngea 16
2.4 Sistema excretor 18
2.5 Sistema digestório 18
3 OBJETIVOS 21
4 MATERIAIS E MÉTODOS 22
4.1 Teste de toxicidade (Bioensaios) 22
4.2 Análise morfológica por microscopia de luz 23
4.2.1. Técnica de Hematoxilina de Harris – Eosina aquosa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) 23
5 RESULTADOS 25
5.1 Teste de toxicidade (Bioensaios) 25
5.2 Análise morfológica por microscopia de luz 29
5.2.1 Glândula Pós-Faríngea 29
4.2.2 Túbulo de Malpighi 32
4.2.3 Ventrículo (intestino médio) 35
5 DISCUSSÃO 38
6 CONCLUSÕES 42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA 43

1 INTRODUÇÃO

As formigas do gênero *Atta* e *Acromyrmex*, pertencentes à tribo Attini, colonizam os mais diversos ambientes no Novo Mundo como desertos, savanas, pastagens abertas, áreas de cerrado, restinga e florestas (SOUSA-SOUTO, et al., 2008).

Essas formigas apresentam um papel importante nos ecossistemas terrestres, uma vez que mantem as condições químicas e físicas do solo, bem como homeostase do ambiente. Além disso, esses insetos podem ser polinizadores de plantas e dispersores de semente (BROWN Jr., 2000; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), contribuindo, dessa maneira, para o desenvolvimento de algumas espécies vegetais.

Por outro lado, as formigas cortadeiras também podem se destacar como pragas agrícolas, devido à intensa atividade de corte e transporte de fragmentos de espécies vegetais para as câmaras subterrâneas, onde o material vegetal serve como substrato para o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* (HEBLING-BERALDO et al., 1991), do qual se alimentam as crias e parcialmente os indivíduos adultos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Com as devastações das matas através das atividades antrópicas, empobrecimento do solo e, consequente redução de competidores e inimigos naturais, as formigas cortadeiras encontram condições ideais de proliferação e estabelecimento de novas colônias (ANJOS et al., 1998) e, quando não controladas, impedem a sobrevivência de alguns tipos de espécies vegetais. Assim, vários métodos de controle vêm sendo aplicados para tentar diminuir os danos causados pelas formigas cortadeiras, tais como tentativas de controle mecânicos, culturais, biológicos e químicos, sendo esse último o mais utilizado, podendo ser aplicado diretamente nos ninhos, nas formulações em pó, líquida ou líquidos nebulizáveis, ou apresentado na forma de iscas granuladas, aplicadas nas proximidades da colônia (BOARETTO; FORTI, 1997).

A eficiência das iscas formicidas, em geral, depende fundamentalmente de um ingrediente ativo adequado e da aplicação correta. De acordo com Nagamoto (1998), este composto deve apresentar características que façam com que a estrutura social e os mecanismos de defesa desses insetos sejam incapazes de impedir a intoxicação de toda ou pelo menos da maior parte da colônia. Dentre estas características, a ação retardada do ingrediente ativo é considerada a mais importante (STRINGER et al., 1964).

Dentre os vários grupos de inseticidas, destacam-se os neonicotinóides, que representam uma das classes de inseticidas mais utilizadas nas últimas três décadas nos campos de cultivo (TOMIZAWA; CASIDA, 2005). O thiamethoxam é um neonicotinóide de

segunda geração, com seu desenvolvimento através de produtos químicos sintetizados, que apresenta efeito agonista sobre os receptores nicotínicos de acetilcolina de insetos (NAUEN et al., 2003). Além disso, ele apresenta ação sistêmica, podendo ser utilizado em diversas culturas, como por exemplo, cana-de-açúcar e citros, difundindo-se ao longo dos tecidos vegetais e, uma vez em contato com esses vegetais, os insetos se contaminam. Entretanto, esse composto apresenta-se inativo em vertebrados, o que oferece menos efeitos secundários que outras classes de inseticidas.

Sabe-se que o ventrículo e o túbulo de Malpighi são órgãos relacionados com a absorção e excreção de compostos químicos, respectivamente. Quando o composto químico absorvido pelo intestino não é excretado adequadamente, ele pode atuar em glândulas através da hemolinfa (SUMIDA, 2007), dentre elas, a glândula pós-faríngea, exclusiva dos Formicidae na fase adulta (BUENO et al., 2008). Assim, torna-se importante a análise morfológica desses tecidos a fim de verificar possíveis alterações causadas pela presença de agentes tóxicos, uma vez que nenhum estudo trata da relação entre o thiamethoxam e seus efeitos toxicológicos na morfologia das glândulas pós-faríngeas, túbulos de Malpighi e ventrículos de *Atta sexdens rubropilosa*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Formigas cortadeiras: aspectos gerais

Pertencentes à tribo Attini (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae), as formigas cortadeiras estão localizadas estritamente no Novo Mundo e sua distribuição se estende desde os Estados Unidos até a Argentina, sendo inexistentes nas regiões transandinas da América do Sul (WEBER, 1970 apud BARBOSA, 2010) e em altitudes acima de 2500 metros (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Baseando-se em dados morfológicos, Weber (1972 apud RODRIGUES, 2004) considerou o grupo das formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* como o mais derivado dentro da tribo Attini, cujos ninhos podem ser muito grandes, comportando mais de milhões de operárias (RODRIGUES, 2004)

As formigas cortadeiras são consideradas insetos altamente sociais, pois apresentam as seguintes características: cuidado com a prole, castas reprodutivas, sobreposição de gerações e divisão de trabalho (WILSON, 1971). Essas características lhe proporcionam vantagens em relação a outros herbívoros, como alocação de recursos, reprodução, sobrevivência e consequentemente no seu sucesso (MARINHO; DELLA LUCIA; PICANÇO, 2006). Além disso, esses insetos são organismos dominantes na maioria dos ecossistemas terrestres, apresentando importantes papéis no fluxo de energia e nutrientes (CARLOS, 2008)

As formigas do gênero *Atta* possuem colônias caracterizadas por uma população que pode chegar a milhões de operárias, sendo estas altamente polimórficas. Assim, a organização social é caracterizada pelo polimorfismo e pela divisão de trabalho entre os indivíduos da colônia. A casta das jardineiras é responsável pela manutenção do jardim de fungo e pelo cuidado com as crias; a casta das operárias generalistas apresentam a tarefa de explorar novos recursos alimentares, escavar ninhos e realizar o corte e o transporte do material vegetal; a casta dos soldados desempenha a função de defender a colônia, podendo, ocasionalmente, cortar e transportar material vegetal (BARBOSA, 2010). Os machos alados (bitus), juntamente com as fêmeas aladas, as içás, pertencem à casta reprodutiva e desempenham papel fundamental no ciclo de vida da colônia, durante o evento conhecido como voo nupcial ou revoada, onde a casta alada deixa os ninhos e voa até uma determinada altitude, resultando no acasalamento e inseminação das fêmeas (AUTUORI, 1941; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), seguido pela morte dos bitus.

As formigas da tribo Attini apresentam uma relação de simbiose com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Möller), na qual as formigas fornecem ambiente e substrato ótimos para o desenvolvimento do fungo, sobre fragmentos frescos de origem vegetal, e este, em troca, serve como fonte de alimento para as larvas, além de ser parte da alimentação dos adultos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Devido ao fato de cortarem e transportarem folhas para os seus ninhos para manutenção do fungo simbionte, as formigas cortadeiras são um dos mais destrutivos herbívoros na região tropical (FERNANDES et al., 2008), ocasionando grandes problemas para a agricultura. Além disso, esses insetos ocorrem durante todo o ano todo podendo não apresentar redução na sua população, além de atacarem plantas de todas as idades (DELLA LUCIA; ARAÚJO, 2000). Essa característica, quando são coincididas com ambientes em desequilíbrio ecológico por ação antrópica, propicia condições ideais para o desenvolvimento destas formigas.

Apesar das saúvas cortarem folhas e flores de várias espécies vegetais, elas apresentam preferências por espécies de plantas cultivadas, tais como *Citrus*, *Eucalyptus*, pastagens e cana-de-açúcar, fazendo com que estas sejam mais susceptíveis ao ataque dessas formigas. Assim, as formigas cortadeiras têm sido alvo de diversas pesquisas para o desenvolvimento de metodologias de controle para o combate dessas pragas, onde o controle das formigas cortadeiras pode ser realizado através de métodos mecânicos, biológicos e químicos, sendo este último o mais utilizado.

2.2 Thiamethoxam

A primeira geração de inseticidas incluia compostos orgânicos, representados por extratos de plantas, além de compostos inorgânicos. Esses compostos deixaram de ser utilizados como métodos de controle de pragas devido a seguintes motivos: elevada toxicidade para o homem e animais; não combatem insetos de aparelho bucal mastigador; acumulam-se nos tecidos orgânicos; apresentam estabilidade e longa persistência no ambiente (MARICONI, 1977). Com isso, a segunda geração de inseticidas teve início com o desenvolvimento de produtos químicos sintetizados (KADIR; BARLOW, 2000), agindo de forma mais específica, na tentativa de diminuir esses fatores.

Dentre os inseticidas presentes na segunda geração, destacam-se os neonicotinóides, sintetizados a partir da nicotina natural (WARE, 2003). O termo nicotinóide foi proposto,

originalmente, para anabasina e nornicotina, moléculas naturais, semelhantes à nicotina. O Thiamethoxan é considerado um principio ativo desses inseticidas (FARIA, 2009).

O thiamethoxam (3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5- oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine) (Fig. 1) é um composto neonicotinóide que apresenta grande eficácia para os insetos praga, podendo ser utilizado tanto para o tratamento foliar quanto no tratamento de sementes (TOMIZAWA; CASIDA, 2005). Esse composto é comercializado no Brasil pela Syngenta nas formulações pó dispersível, granulado, granulado dispersivo.

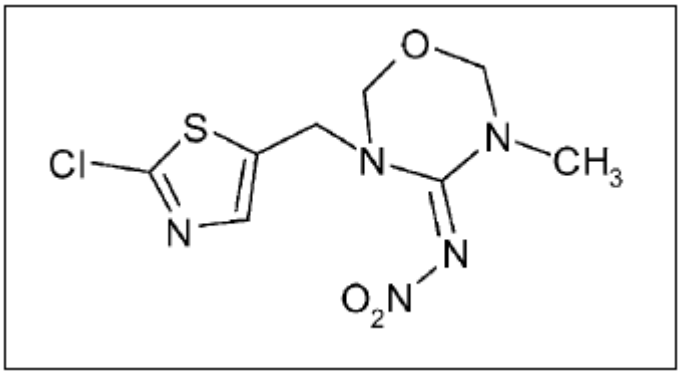


Figura 1. Estrutura química do thiamethoxam

Nas últimas três décadas, os neonicotinóides têm sido considerado uma das classes mais importantes de inseticidas e representam de 11% a 17% do faturamento anual do mercado desses produtos (NOMINATO, 2012). Esses compostos agem de forma agonística em receptores nicotínicos da acetilcolina dos insetos, pois se ligam com grande facilidade a esses receptores (NAUEM et al., 2003).

O thiamethoxam é um inseticida que age por contato e ingestão e possui ação sistêmica. A sua molécula mimetiza a acetilcolina e compete pelos receptores nicotínicos de acetilcolina na membrana pós-sináptica (FERNANDES-BUZZERIO et al., 2005 apud MAEZUKA, 2008). Assim, ele interage com receptores específicos no sistema nervoso central do inseto, e uma vez em contato com as culturas contaminadas, o processo é irreversível.

Esse inseticida pode ser aplicado diretamente no solo em diversas culturas, como cana-de-açúcar, citros, uva; ou até mesmo aplicado em sementes de milho, soja e trigo; ou ainda através da aplicação foliar em culturas de eucalipto, citros, pastagens, entre outros. (ANVISA, 2008b).

2.3 Glândula pós-faríngea

Pesquisas recentes realizadas por Herzner e colaboradores (2007) mostraram que as glândulas pós-faríngeas, que até pouco tempo atrás se acreditava ser exclusiva das Formicidae, estão presentes também em vespas solitárias (Sphecidae) *Philanthus triangulum,* e em *Ampulex compressa* (HERZNER et al, 2011).

Em Formicidae, as glândulas pós-faríngeas localizam-se na região dorsal da cabeça, na transição entre a faringe e o esôfago (CAETANO, 1998; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Elas podem apresentar, externamente, dois tipos de morfologia, sendo a (1) auriculiforme, formada por dois lóbulos (esquerdo e direito), como descrito por Peregrine et al. (1973), Gama e Cruz Ladim (1982), Schoeters e Billen (1996), Jesus (2012), e (2) digitiforme, com expansões laterais digitiformes, segundo Gama & Cruz Ladim (1982) e Bueno et al. (2008). Em ambas as morfologias existem uma única camada de células arredondadas na parede externa (SCHOETERS; BILLEN, 1997), e há presença de uma cutícula quitinosa em contato direto com o lúmen (ALMEIDA-TOLEDO, 1967). Essas glândulas encontram-se na região frontal da cabeça e na frente do cérebro, ocupando posições acima do palato (BUENO, 2005).

Em *A. sexdens rubropilosa* as glândulas pós-faríngeas apresentam morfologia externa do tipo digitiforme. Nessa espécie, assim como em *A. laevigata*, as glândulas pós-faríngeas são compostas por dois conjuntos de projeções digitiformes, alongadas e de aspecto tubular, inseridas na porção latero-posterior da placa hipofaríngea, entre a musculatura da faringe e esôfago (JESUS, 2012).

As paredes dos lobos digitiformes são formadas por um epitélio simples de células, podendo estas ser achatadas ou cilíndricas com reentrâncias entre elas, o que confere um aspecto ondulado ao epitélio glândular (BUENO, 2005). Há uma cutícula revestindo o lúmen em sua face interna e o núcleo é distinto e grande, enquanto que o citoplasma, por sua vez, é rico em organelas, contém vesículas e possui granulações (ALMEIDA-TOLEDO, 1967).

As glândulas pós-faríngea tem origem ectodérmica, surgindo durante o desenvolvimento pós-embrionário a partir de duas evaginações dorsais do epitélio faringeal (JANET 1905; GAMA 1985 apud JESUS, 2012). Em *A. sexdens rubropilosa*, as glândulas apresentam basicamente a mesma constituição anatômica e ultramorfológica tanto para rainhas quanto para as operárias, sendo maiores nas primeiras (BUENO, 2005), variando apenas o número de digitações.

As funções da glândula são passíveis de discussão. De acordo com Ayre (1963), Caetano et al. (1990) e Hölldobler e Wilson (1990), a presença de nematóides parasitas

Mermithidae no lúmen da glândula pós-faríngea seria indício da existência de um material alimentar, o qual seria regurgitado para os demais membros da colônia ou, o conteúdo da glândula poderia ser um tipo de reserva alimentar para operárias e larvas. Porém, histologicamente a glândula pós-faríngea não apresenta tecido muscular para realizar regurgitação (BUENO, 2005). Além disso, a trofalaxia não foi constatada entre as operárias adultas de *A. sexdens rubropilosa* (BUENO et al., 2001; ANDRADE et al., 2002). A função digestiva da glândula pós-faríngea foi refutada por Febvay e Kermarrec (1986) ao verificar que as glândulas de *Acromyrmex octospinosus* apresentou baixa quantidade de glucosidase e esterase, sugerindo que essas glândulas não teriam função digestiva.

Os primeiros autores que descreveram conteúdo lipídico e anatomia dessas glândulas foram Peregrine et al., (1972, 1973), Peregrine e Mudd (1974), e Delage-Darchen (1976). Delage-Darchen (1976), Forbes e Macfarlane (1961) sugeriram que as glândulas pós-faríngeas seriam responsáveis pela digestão de gorduras ingeridas, por apresentarem enzimas digestivas no lúmen, por exemplo, lipases (PEREGRINE et al., 1973, VINSON et al., 1980).

A presença de lipídio no interior das glândulas pós-faríngeas tem sido observada em várias espécies de formigas, cuja origem é contraditória. Uma delas seria que o lipídio resultaria de secreções do próprio epitélio glandular e, para outros, do alimento ingerido. Delage-Darchen (1976) propôs três hipóteses sobre a presença do lipídio: 1) via transcelular, o material entraria nas células glandulares e seria metabolizado; 2) via extra oral, o material seria regurgitado diretamente das glândulas para os demais membros da colônia; 3) via digestiva, o material seguiria do interior das glândulas em direção ao papo e depois para o ventrículo. Phillips e Vinson (1980) verificaram, por meio de isótopos marcados, que moléculas de ácidos graxos e triaglicerídeos injetados na hemolinfa não atingem o interior das glândulas pós-faríngeas de *Solenopsis invicta* e, sugeriram que os lipídios seriam provavelmente oriundos da alimentação. De acordo com Bueno (2005) as operárias de *A. sexdens rubropilosa* seriam capazes de separar seletivamente compostos lipídicos dos não lipídicos do alimento ingerido na porção final da faringe. Numa dieta alimentar de lipídios, estes compostos atingiriam as glândulas pós-faríngeas e aqueles não lipídicos se deslocariam para o papo (BUENO et al. 2008).

Estudos toxicológicos realizados com hidrametilnona com *A. sexdens rubropilosa* conduzidos por Sumida (2007) e Décio (2010) com a presença de óleo de soja, designaram uma possível via alternativa de ingestão do ingrediente ativo, inferindo a ação da glândula pós-faríngea na metabolização dos compostos lipídicos, já confirmado anteriormente em estudos de Bueno (2005).

2.4 Sistema excretor

Os túbulos de Malpighi são os principais órgãos excretores dos insetos e são responsáveis pela manutenção da homeostase, tornando as atividades celulares mais eficientes. Os túbulos produzem um filtrado a partir da hemolinfa, apresentado inicialmente como um fluido iso-osmótico, que serve como carreador dos produtos de excreção (ROSSI, 2011). Assim, pode-se eliminar substâncias tóxicas como amônia, ácido úrico e outros catabólitos e ainda segregar substâncias presentes na hemolinfa e reabsorver componentes úteis ao organismo (WIGGLESWORTH, 1972; CHAPMAN, 1975; MELLO, 1979; GILLOTT, 1980; CAETANO, 1988).

Os túbulos estão presentes 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 hemocele (CAETANO, 1988). Em cortes transversais, essas estruturas apresentam-se como anéis. Os túbulos são constituídos por uma camada de células epiteliais que repousam sobre uma lâmina basal (ROSSI, 2011).

Além disso, há presença de grânulos, que podem ser chamados de grânulos mineralizados (MARTINELLI, 1998), esferocristais (OLAVARRIETA, 2000), esferocristais mineiras (CAETANO; CRUZ- LANDIM, 1983), entre outros. Essas estruturas podem estocar e absorver íons (BILLINGSLEY et al., 1989), além de conter elementos acumulados como cálcio, cobre e ferro (CHAPMAN, 1985). Essas estruturas também podem estar presentes no ventrículo. Os íons estocados e absorvidos podem ser lançados dentro dos conteúdos do intestino e, depois de um período de acúmulo, podem esvaziar ou desaparecer como uma consequência dos conteúdos estarem sendo utilizados depois de um período temporário de estocagem (CHAPMAN, 1985).

Nas formigas, os túbulos são dotados de fibras musculares, dispostas helicoidalmente, que aumentam o contato da hemocele com a hemolinfa, cuja função é provavelmente promover o fluxo do conteúdo do lúmen (CAETANO; JAFFÉ & ZARA, 2002).

2.5 Sistema digestório

A morfologia do sistema digestório das formigas, em geral, apresenta pouca variabilidade e é bastante semelhante a encontrada em outros insetos. Sua organização compreende três regiões básicas: intestino anterior (estomodeo), posterior (proctodeo), que

apresentam origem ectodérmica e o intestino médio (ventrículo), que apresenta origem endodérmica.

O sistema digestivo dos insetos está localizado entre músculos corporais e túbulos traqueais (DÉCIO, 2010), com esfíncteres (CAETANO, 1984, 1988), ao mesmo tempo em que é inervado por nervos motores e pelo sistema nervoso entomogástrico controlando o fluxo de alimento (CHAPMAN, 1975; SNODGRASS, 1935; WIGGLESWORTH, 1972 apud SUMIDA, 2007)

As regiões anterior e posterior são revestidas por uma cutícula, que é impermeável a partículas de alta massa molecular (CHAPMAN, 1998). No entanto, há uma diferença entre a cutícula do proctodeo em relação a do estomodeo, sendo que a proctodeo apresenta a cutícula menos espessa e, portanto mais permeável.

O intestino anterior (estomódeo) é composto pela cavidade bucal, faringe, esôfago, papo e proventrículo (FERNANDES, 2009). A abertura da boca está localizada na posição ântero superior, antes da cavidade pré-oral e da cavidade infrabucal, seguida por um prolongamento da faringe, e por fim o esôfago, que corresponde a um tubo longo que atravessa o restante da cabeça, todo o mesossoma e a cintura, alcançando o papo anterior do gáster e por fim, o proventrículo, limite entre os intestinos anterior e médio (CAETANO, 1990), que controla a passagem de nutrientes do papo para o intestino médio (CHAPMAN, 1998). Quando o proventrículo apresenta-se desenvolvido, é possivel observar uma projeção de sua parte posterior para o interior do intestino médio formando a válvula cardíaca (BILLINGSLEY & LEHANE, 1992 apud FERNANDES, 2009).

O intestino posterior (proctodeo) corresponde à porção final do canal alimentar e apresenta basicamente três regiões: o piloro, o íleo e o reto. No reto há a presença de papilas retais que tem a função de reabsorver água e íons importantes, tais como sódio e potássio, a fim de manter o equilíbrio fisiológico do organismo (WALL; OSCHMAN, 1975). O piloro é a região de transição entre o intestino médio (ventrículo) e o intestino posterior, e na maioria das vezes é o local onde surgem os túbulos de Malpighi (CHAPMAN, 1998).

O intestino médio (ventrículo) corresponde ao estômago propriamente dito (TOMOTAKE, 1996). Com sua origem endodérmica, ele está diretamente envolvido tanto na produção de enzimas digestivas quanto na absorção dos produtos de digestão (CHAPMAN, 1998).

O ventrículo possui basicamente dois tipos de células: as digestivas e as regenerativas. As células digestivas são longas e abundantes, constituindo o epitélio ventricular (CAETANO, 1977). Essas células formam uma única camada composta basicamente de

células colunares funcionais que podem também ser denominadas de células principais ou enterócitos, e realizam diferentes 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 et al., 1984). Dentre as células digestivas, podemos encontrar as *goblet cells* ou vesículas de secreção, que apresentam-se unidas por um ápice rico em microvilosidades, formando uma cavidade que se abre para o lúmen do ventrículo, além de possuírem função secretora (CAETANO et al., 1994). Alguns estudos também têm apresentado funções às *goblet cells* relacionadas ao equilíbrio osmótico dos insetos (LEHANE; BILLINGSLEY, 1996 apud BARON et al, 2011).

As células regenerativas podem ser encontradas isoladas ou reunidas em pequenos grupos ou ninhos de células diminutas junto a membrana basal do ventrículo, e a sua principal função é repor as células do intestino médio, cuja vida é limitada, substituindo células velhas ou com danos funcionais (MARTOJA et al., 1984), renovando assim o epitélio digestivo.

3 OBJETIVOS

- Verificar a potencialidade tóxica do ingrediente ativo Thiamethoxam nas para operárias médias de *A. sexdens rubropilosa* através de bioensaios toxicológicos por ingestão.
- Encontrar uma concentração adequada do ingrediente ativo para realização da análise morfológica das glândulas pós-faríngeas, túbulos de Malpighi e ventrículo.
- Verificar possíveis alterações morfológicas por meio da microscopia de luz, causadas pela ingestão do Thiamethoxam na concentração adequada, verificada nos bioensaios toxicológicos nas glândulas pós-faríngeas, túbulos de Malpighi e ventrículo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Teste de toxicidade (Bioensaios)

Para a realização dos experimentos, operárias médias de *A. sexdens rubropilosa* foram coletadas do formigueiro mantido no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), localizado na UNESP de Rio Claro/SP. As formigas coletadas foram armazenadas temporariamente em bandejas de plástico com as laterais revestidas com Teflon. Após a coleta, as formigas foram distribuídas em placas de Petri de plástico, forradas com papel filtro. Para cada tratamento foram utilizadas 50 operárias, sendo estas distribuídas em cinco placas de Petri, sendo o total de 10 formigas para cada placa, além dos grupos controle.

Para a manutenção das formigas isoladas do formigueiro, foram utilizadas dietas artificiais sólidas preparadas com 5 g de glicose, 1 g de peptona bacteriológica, 0.1 g de extrato de levedura e 1.5 g de ágar bacteriológico, dissolvidos em 100 mL de água destilada. Após a mistura dos componentes, a dieta foi levada ao forno de microondas para melhor solubilização dos ingredientes e, posteriormente autoclavada a 120ºC e 1 atm por 20 minutos (BUENO et al., 1997). A dieta artificial preparada sem adição de nenhum componente, a não ser os citados acima, é denominada dieta pura.

Inicialmente, para realização dos ensaios toxicológicos foi utilizado o ingrediente ativo thiamethoxam em diferentes concentrações (0,001%; 0,0001%; 0,00005% e 0,00001%). Cada uma delas foi solubilizada em solução 9:1 de acetona e óleo (9 mL de acetona para 1 mL de óleo).

A quantidade dissolvida (em miligramas) de thiamethoxam em solução acetona+óleo foi definida com base em cálculos. Com as soluções devidamente prontas, foi pipetado 0,3mL da solução (Thiamethoxam + solução Acetona e Óleo), e vertidos em placa de Petri previamente esterilizadas em autoclave, contendo 30mL de dieta pura liquida, ainda quente. Além dos tratamentos, também foram feitos dois grupos controle, sendo:

- Controle Dieta Pura: 30 mL de dieta sem nenhuma adição;
- Controle Acetona + Óleo: 30 mL de dieta pura com adição de 0,3mL de solução acetona + óleo.

Após o resfriamento e a solidificação, as dietas foram embrulhadas em filme de PVC e mantida em geladeira, sendo utilizada durante todo o período do experimento.

O experimento foi avaliado diariamente para troca das dietas e retirada de formigas mortas, além da observação de sintomas, durante um período de 25 dias. As placas contendo

as formigas foram mantidas em BOD com temperatura média de 24°C e umidade relativa acima de 70%. Os dados obtidos foram comparados através do teste "log-rank", software Graph-Pad, aplicativo Prism 3.0, com nível de significância à 0,05%.

Após a realização desse teste inicial, foi definida a melhor concentração para dar continuidade ao trabalho de análise morfológica, e a partir dos resultados obtidos, outro ensaio foi realizado, porém dessa vez, com uma única concentração, sendo thiamethoxam 0,00005%.

Foram feitas duplicatas do controle dieta pura, dieta pura + solução de acetona e óleo e a concentração de thiamethoxam 0,0005%, sendo uma bateria relativa à análise de toxicidade durante 25 dias e outra relativa à coleta das formigas para análise morfológica das glândulas pós-faríngeas, túbulos de Malpighi e ventrículos, em dia pré-determinado de acordo com os sintomas apresentados no experimento inicial.

4.2 Análise morfológica por microscopia de luz

Operárias médias de *A. sexdens rubropilosa* foram coletadas no quinto dia de experimento dos grupos controle e do grupo experimental (thiamethoxam 0,00005%) ainda vivas, entretanto, apresentando sintomas de intoxicação. Para dissecação, as formigas foram colocadas em freezer por aproximadamente 1 minuto e, em seguida foram rapidamente dissecadas em solução salina 0,06% para retirada dos órgãos, que posteriormente foram fixados em paraformoldeído a 4%, durante um período de 48 horas, em freezer.

Posteriormente, os órgãos dissecados e fixados foram lavados em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH=7,4), desidratados em uma série crescente de álcoois (70% a 90%), por aproximadamente 5 minutos cada, e, em seguida transferidos para a resina de embebição (*overnight*). Após a embebição, os órgãos foram incluídos em historesina.

Nos blocos de historesina obtidos foram feitas secções histológicas de 6 μm de espessura, estendidos sobre lâminas de vidro e secas em temperatura ambiente.

4.2.1. Técnica de Hematoxilina de Harris – Eosina aquosa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

As secções histológicas foram hidratadas por 1 minuto em água destilada e coradas com hematoxilina por 10 minutos e, posteriormente, mantidas em cubetas com água por 4

minutos e depois colocadas em água corrente para que a reação ocorresse. Em seguida, as lâminas foram coradas com eosina por 5 minutos e lavadas em água corrente. Depois de secas, as lâminas foram cobertas com Bálsamo do Canadá e lamínula, observadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio de luz localizado no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS).

5 RESULTADOS

5.1 Teste de toxicidade (Bioensaios)

Os resultados obtidos no tratamento com thiamethoxam nas concentrações de 0,001%; 0,0001%; 0,00005% e 0,00001% estão representados na Tabela 1, o qual representa a porcentagem de mortalidade acumulada diariamente (%), o valor da mediana (Md) e a interpretação do teste não-paramétrico "log-rank". Na Figura 2 estão representadas as curvas de sobrevivência.

No geral, as formigas passaram a apresentar sintomas de intoxicação (dificuldade de locomoção, tremores nas pernas, descontrole motor) entre o primeiro e o segundo dia, sendo que todos os tratamentos apresentaram diferença significativa em relação ao controle acetona e óleo, o qual foi comparado estatisticamente com todas as concentrações devido ao ingrediente ativo ter sido solubilizado nesta solução. A concentração que obteve maior destaque para dar continuidade a análise morfológica das formigas contaminadas com thiamethoxam foi a de 0,00005%, onde a mediana (50% das formigas mortas) foi alcançada com 5 dias e a mortalidade total das operárias ocorreu com 18 dias de experimento (Fig. 2).

Tabela 1. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias médias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com Thiamethoxam nas concentrações 0,001%, 0,0001%, 0,00005% e 0,00001%.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	**2**	**3**	**6**	**8**	**10**	**14**	**17**	**21**	**25**	
Controle Dieta Pura	0	0	0	2	2	2	16	32	50	68	21,5 *a*
Controle Acetona+Óleo	2	2	2	4	8	18	24	40	48	56	22,5 *a*
Thiamet. 0,001%	10	46	88	100	100	100	100	100	100	100	3 *b*
Thiamet. 0,0001%	2	30	70	100	100	100	100	100	100	100	3 *b*
Thiamet. 0,00001%	2	16	44	94	100	100	100	100	100	100	4 *b*
Thiamet. 0,00005%	2	12	32	64	80	82	88	98	100	100	5 *b*

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

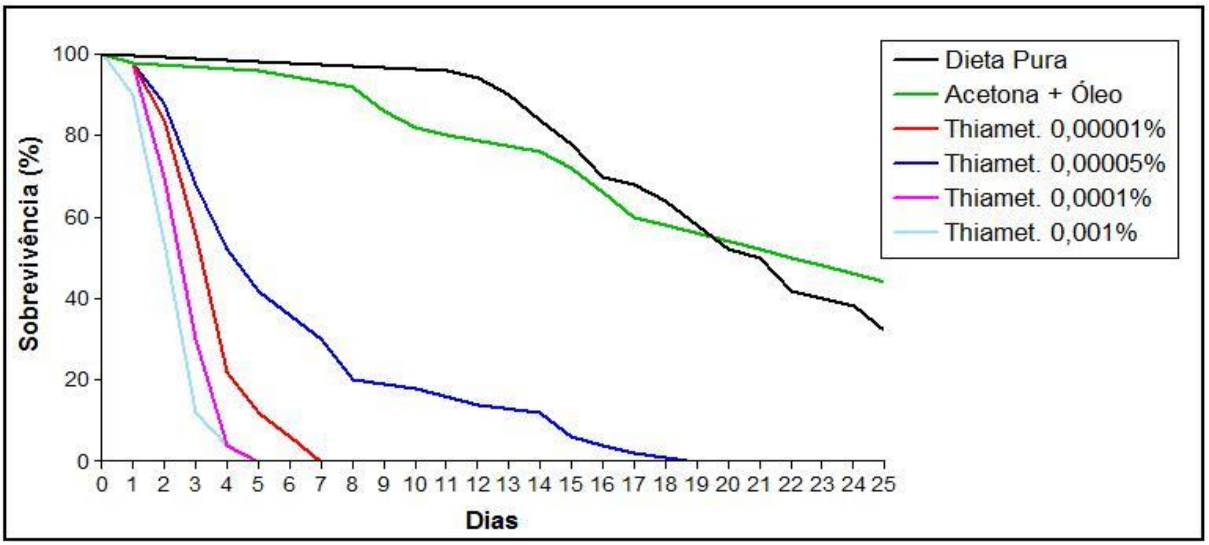


Figura 2. Curvas de sobrevivência de operárias médias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de toxicidade em dieta artificial, durante 25 dias, com Thiamethoxam, nas concentrações de 0,001%, 0,0001%, 0,00001% e 0,00005%.

Os resultados obtidos no experimento com thiamethoxam na concentração de 0,00005% estão representados na Tabela 2, o qual representa a porcentagem de mortalidade acumulada diariamente (%), o valor da mediana (Md) e a interpretação do teste não-paramétrico "log-rank". Na Figura 3 estão representadas as curvas de sobrevivência das operárias médias na concentração de 0,00005%.

O tratamento apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, apresentando mediana com 5 dias de experimento, alcançando a mortalidade total no 11º dia de experimento. Paralelo a esse experimento, uma bateria idêntica foi montada para realização da análise morfológica das estruturas. Para isso, as formigas foram dissecadas no 5º dia de experimento.

Tabela 2. Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias médias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de toxicidade em dieta artificial com thiamethoxam, pelo método acetona+óleo, na concentração de 0,00005%.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	0	0	0	2	6	16	24	46	52	25 ***a***
Controle Acetona+Óleo	0	0	0	4	10	10	18	26	26	48	>25 ***a***
Thiamethoxam 0,00005%	0	0	2	56	80	88	96	100	100	100	6,0 ***b***

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

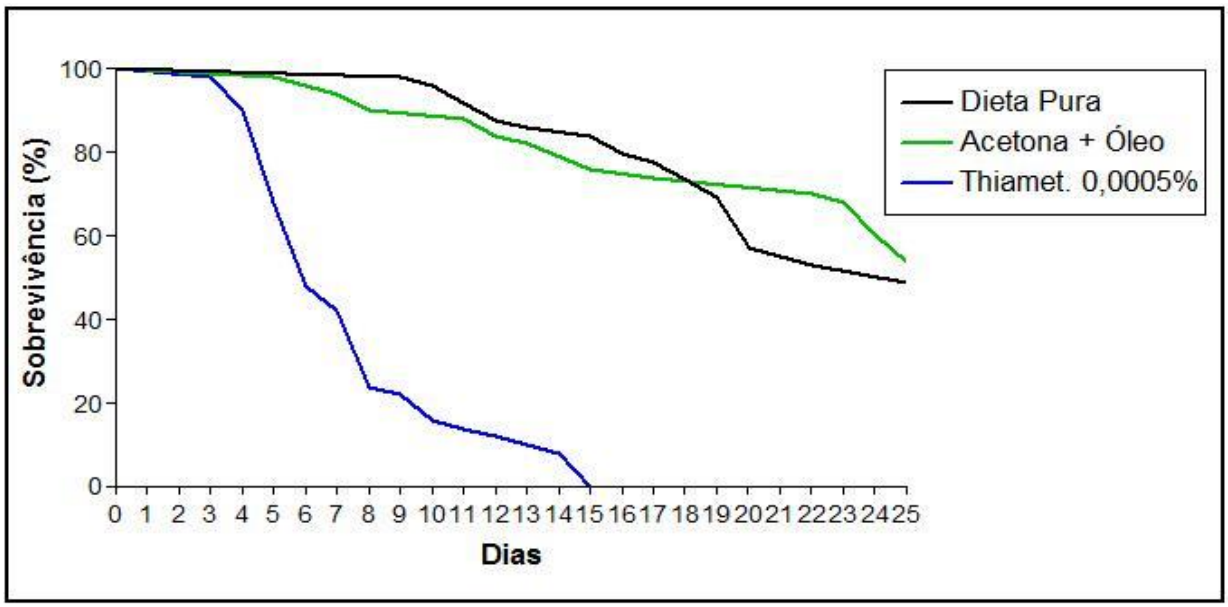


Figura 3. Curva de sobrevivência de operárias médias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de toxicidade em dieta artificial com thiamethoxam, durante 25 dias, pelo método acetona+óleo, na concentração de 0,00005%.

5.2 Análise morfológica por microscopia de luz

Os resultados obtidos na análise morfológica por microscopia de luz está apresentado e discutido de acordo com as estruturas das glândulas pós-faríngea, túbulo de Malpighi e ventrículo.

5.2.1 Glândula Pós-Faríngea

A glândula pós-faríngea encontra-se acima do palato, constituída por numerosas digitações com aspectos tubulares, sendo estas compostas por epitélio simples com células cilíndricas, além da presença de cutícula revestindo o lúmen. (Fig. 4A)

Nas Figuras 4A-B podemos visualizar a glândula pós-faríngea de *Atta sexdens rubropilosa* do grupo controle (dieta pura). É possível observar o epitélio simples, com suas células cilíndricas, bem como o lúmen e a cutícula que o reveste. Percebe-se ainda que as características celulares apresentam-se intactas. Os núcleos mantiveram-se íntegros, com aspecto ovalado, e é possível verificar alguns nucléolos típicos (Fig, 4A-B).

No grupo controle (acetona + óleo) é possível verificar a presença de núcleos aparentemente íntegros, o lúmen e a cutícula, como no grupo controle (dieta pura) (Fig. 4C-D).

No grupo tratado com thiamethoxam, as glândulas pós-faríngeas apresentaram as células do epitélio desorganizadas quando comparadas aos grupos controle (dieta pura e acetona + óleo), além da presença de algumas vacuolizações citoplasmáticas. Também é possível observar, aparentemente, alguns núcleos achatados (Fig, 4E-F).

Figura 4. Secções histológicas das glândulas pós-faríngeas de operárias médias de *A. sexdens rubropilosa* coradas com Hematoxilia-Eosina. **A-B - Grupo controle** (d**ieta pura):** é possível observar o epitélio simples (**ep**) sem alterações, com núcleos (**n**) e nucléolos (**seta branca**) intactos (**n**). Nota-se ainda o citoplasma, a cutícula (**seta escura**) e o lúmen (**l**) sem alterações morfológicas. Escalas= 20 μm; **C-D - Grupo controle (acetona + óleo):** Presença de núcleos (**n**) intactos. Observa-se ainda o lúmen (**l**) e a cutícula (**seta escura**). Escala= 20 μm e 40 μm, respectivamente; **E-F- Grupo tratado com thiamethoxam 0,00005%:** é possível notar a desorganização do epitélio (**ep**). No entanto, é possível verificar núcleos achatados (**n**). É possível observar vacuolização citoplasmática (**v**) e o lúmen (**l**) do lobo digitiforme. Escalas = 20 μm e 40 μm, respectivamente.

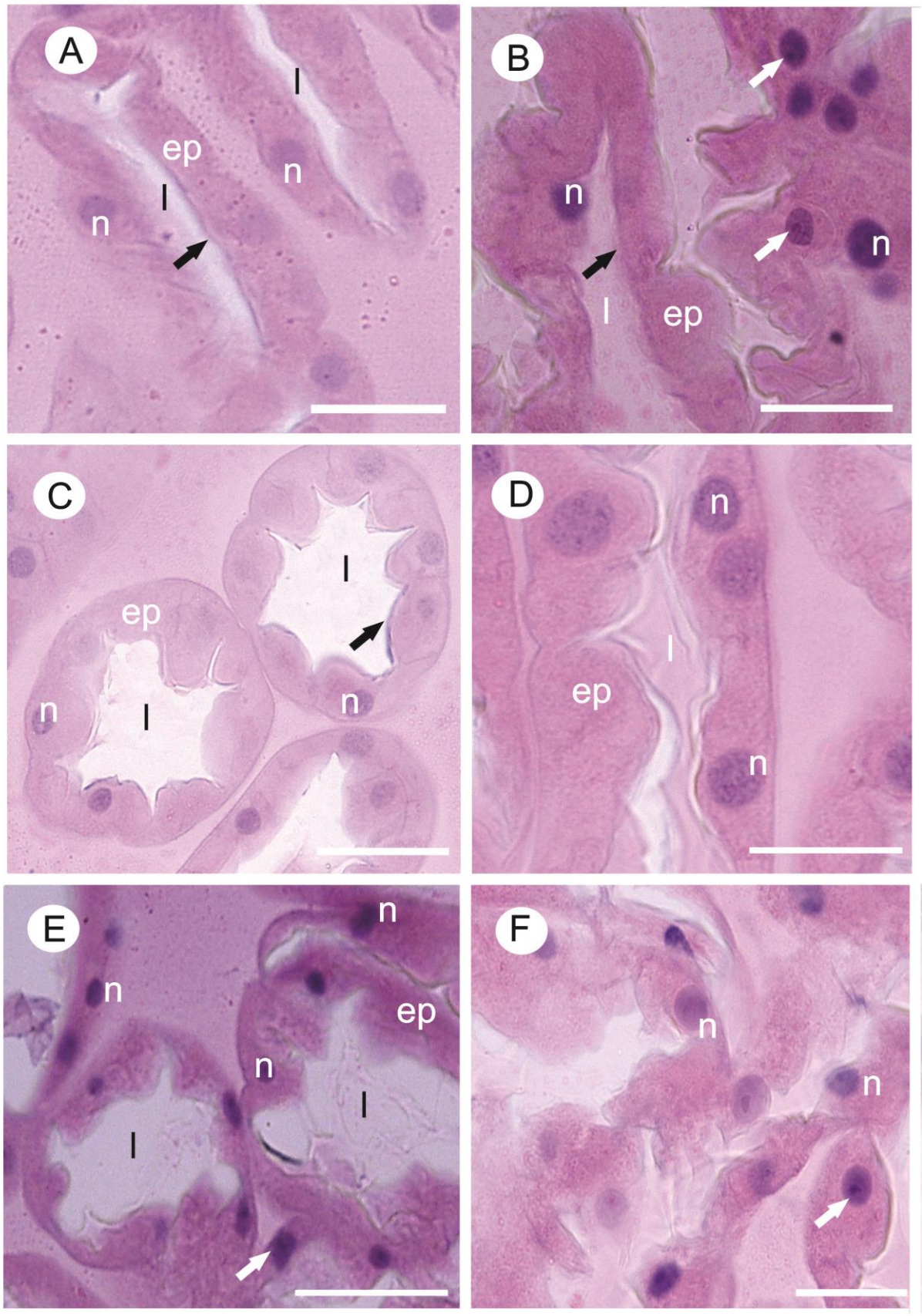


Figura 4

4.2.2 Túbulo de Malpighi

Os túbulos de Malpighi apresentam um lúmen revestido por cutícula e uma camada de células epiteliais (Fig. 5A).

No grupo controle (dieta pura) observa-se nos túbulos de Malpighi os grânulos mineralizados no interior das células epiteliais, em corte transversal aparecem como anéis (Fig, 5A-B), bem como os núcleos, os quais apresentam-se intactos. Não foi possível observar os nucléolos.

O grupo controle (acetona + óleo) também apresentou poucas alterações morfológicas, podendo ser observado quantidades semelhantes de grânulos mineralizados (Figura 5C-D) quando comparados ao controle dieta pura (Fig. 5A), bem como os núcleos intactos. É possível observar vacuolizações citoplasmáticas (Fig. 5C)

No grupo tratado com thiamethoxam 0,00005% os túbulos de Malpighi apresentaram pouco aumento na presença de grânulos mineralizados (Fig. 5F) quando comparado aos controles de dieta pura (Fig. 5A-B) e de acetona + óleo (Fig. 5C-D). Além disso, é possível observar vacuolizações citoplasmáticas (Fig. 5E-F).

Figura 5. Secções histológicas dos túbulos de Malpighi de operárias médias de *Atta sexdens rubropilosa* coradas com Hematoxilia-Eosina. **A-B – Grupo controle (dieta pura):** nota-se os túbulos de Malpighi com núcleos (**n**) intactos, além de grânulos mineralizados (**seta branca**) no interior das células epiteliais. Em corte transversal aparecem como anéis. Escalas = 20 μm; **C-D – Grupo controle (acetona + óleo):** é possível observar os núcleos (**n**) intactos, bem como quantidades semelhantes de grânulos mineralizados (**seta branca**) comparadas ao controle dieta pura. É possível observar vacuolizações citoplasmáticas (**v**). Escalas = 40 μm; **E-F – Grupo tratado com thiamethoxam 0,00005%:** é possível vizualizar um pequeno aumento na quantidade de grânulos mineralizados (**seta branca**), além de vacuolizações citoplasmáticas (**v**). Não foi possível observar núcleos e nem nucléolos na figura devido ao tamanho e quantidade de grânulos mineralizados. Escalas = 40 μm.

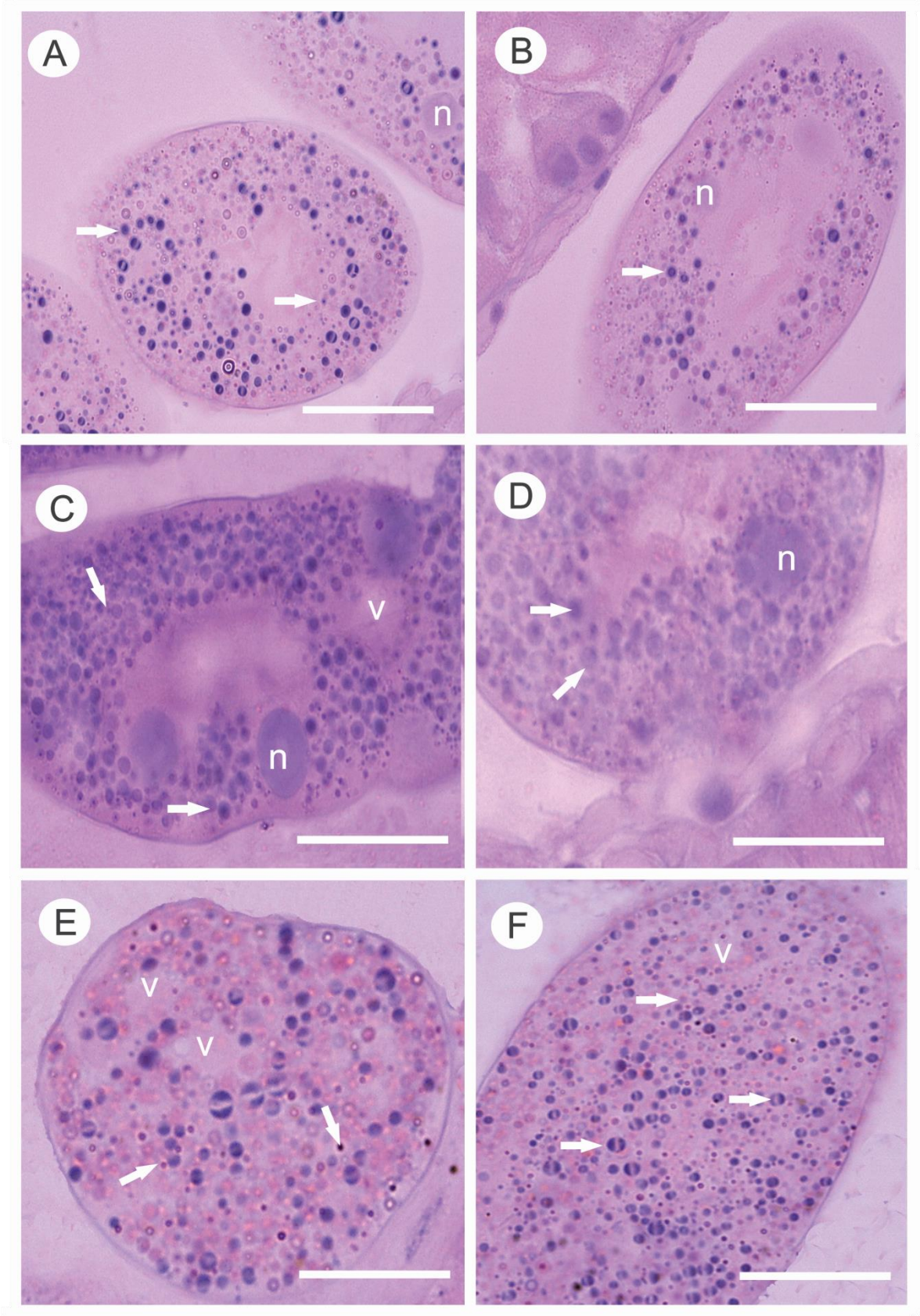


Figura 5

4.2.3 Ventrículo (intestino médio)

Basicamente, o ventrículo apresenta dois tipos de células: as células digestivas (Fig. 6A) e as células regenerativas (Fig. 6A-B). As células digestivas são formadas por células colunares, ou células principais, formando o epitélio ventricular. Dentre as células digestivas, existem as *goblet cells* (Fig. 6B). As células regenerativas podem ser encontradas isoladas ou agrupadas em pequenos ninhos de células junto à membrana basal do epitélio ventricular (Fig. 6A-B).

No grupo controle (dieta pura) foi possível observar os ninhos de células regenerativas no epitélio ventricular, além das *goblet cells* (Fig. 6B). Neste grupo, o epitélio ventricular não apresentou alterações morfológicas. O mesmo foi observado para o outro grupo controle (acetona + óleo), o qual também não foi observado nenhuma alteração morfológica (Fig. 6C-D).

No grupo tratado com thiamethoxam 0,00005% observa-se alterações no epitélio ventricular (Fig. 6E-F), quando comparado aos grupos controles (Figura 6A-C) tais como a vacuolização citoplasmática, bem como a ausência de ninhos de células regenerativas e vesículas de secreção (Fig. 6E-F). Além disso, também há presença de alguns núcleos picnóticos (Fig. 6F).

Figura 6. Secções histológicas do intestino médio (ventrículo) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* coradas com Hematoxilia-Eosina. **A-B- Grupo controle (dieta pura):** é possível observar o epitélio ventricular (**ep**) com ninhos de células regenerativas (**seta escura**), células digestivas (**dc**), e núcleos intactos (**n**). Nota-se também a presença das *goblet cells* (**gc**). O epitélio ventricular está sobre a membrana basal (**seta branca**) e está recoberto por musculatura longitudinal (**seta branca**). Escalas = 20 μm.; **C-D- Grupo controle (acetona + óleo)**: assim como o controle dieta pura, é possível observar os ninhos de células regenerativas (**seta escura**), bem como o epitélio ventricular (**ep**), as *goblet cells* (**gc**). Os núcleos aparentemente apresentaram-se normais. Escalas = 20 μm; **E-F- Grupo tratado com Thiamethoxam 0,00005%:** é possível observar uma desorganização no epitélio ventricular (**ep**). Visualiza-se poucas *goblet cells* (**gc**) e inúmeras vacuolizações citoplasmáticas (**v**) .Nota-se ainda alguns núcleos picnóticos (np), bem como alguns núcleos (**n**) aparentemente intactos. Escalas = 20 μm e 40 μm, respectivamente.

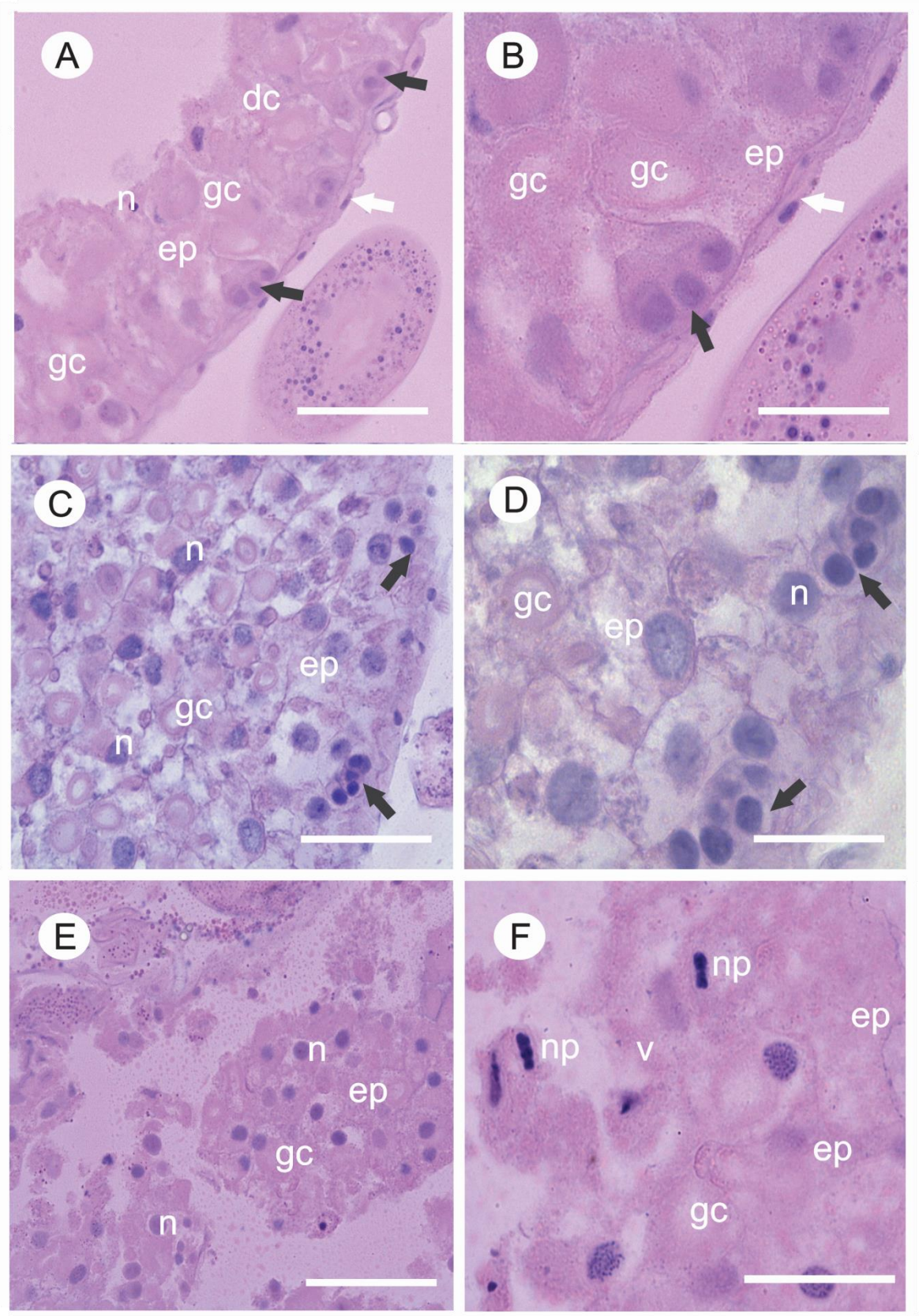


Figura 6

5 DISCUSSÃO

A eficácia das iscas depende, em geral, do fato de possuírem um ingrediente ativo adequado, o qual deve apresentar características que possibilitem que a estrutura social e o mecanismo de defesa desses insetos sejam incapazes de impedir a intoxicação de toda ou pelo menos parte da colônia (NAKAMOTO, 1998). Para que sejam ideais, esses compostos devem agir em baixas concentrações e apresentar ação acumulativa por ingestão (BUENO; CAMPOS-FARINHA, 1999), e principalmente, deve apresentar ação retardada.

Diferentes ingredientes ativos são utilizados na tentativa de controle de formigas cortadeiras, dentre eles sulfluramida, ácido bórico, hidrametilnona, thiamethoxam entre outros. A sulfluramida atua como inibidor da respiração celular e na síntese de ATP em insetos (SUMIDA, 2007). O ácido bórico pode causar a interrupção da regulação da água e da adesão celular (KLOTS et al, 2000 apud SUMIDA, 2007). A hidrametilnona, assim como a Sulfluramida inibe a respiração celular, atuando no transporte de elétrons no interior das mitocôndrias (JACOB, 2002 apud SUMIDA, 2007). O thiamethoxam é um composto que apresenta efeito agonista sobre os receptores nicotínicos de acetilcolina de insetos, impedindo a propagação do impulso nervoso.

Testes de toxicidade realizados em operárias de *A. sexdens rubropilosa* utilizando hidrametilnona obtiveram resultados satisfatórios para esse ingrediente ativo (BUENO, 2005; DÉCIO, 2010) , mostrando que ele apresentava um efeito de ação retardado, necessário para a composição de um inseticida para que este seja eficiente. Nos mesmos trabalhos, esses autores também testaram a eficácia ao adicionar o óleo de soja ao solvente para solubilização do ingrediente ativo, potencializando o efeito do mesmo. De acordo com Bueno (2005), operárias que recebem junto a sua dieta óleo de soja, mostram modificações em termos de aumento de volume das digitações da glândula pós-faríngea, fazendo com que estas se apresentem túrgidas.

No presente estudo, os resultados mostraram que o thiamethoxam também apresentou efeito de ação retardada na concentração utilizada, assim como a hidrametilnona, relatado por Décio (2010), uma vez que as concentrações 0,001%; 0,0001%; 0,00001% e 0,00005% apresentaram mediana (metade das formigas mortas) no 3º, 3º, 4º e 5º dia de experimento, respectivamente. Esses dados corroboram os estudos de Stringer e colaboradores (1964) que diz que um dos requisitos importantes para um ingrediente ativo ser eficiente é a substância tóxica causar mortalidade menor que 15% das operárias nas primeiras 24 horas de experimento, evidenciando dessa maneira o efeito de ação retardada do composto. No

presente estudo, todas as concentrações mostraram-se muito eficientes, no entanto, a escolha da concentração thiamethoxam 0,00005% para a análise morfológica se deu devido a sua mediana, no 5º dia de experimento, sendo possível a coleta das formigas apresentando sintomas de intoxicação, como dificuldade de locomoção, tremores nas pernas, descontrole motor, entre outros, como relatado por Bueno (2005). Assim, foram realizadas análises histológicas nas glândulas pós-faríngeas, túbulos de Malpighi e ventrículo intoxicadas com Thiamethoxam 0,00005%.

Os resultados histológicos mostraram que as glândulas pós-faríngeas de *A. sexdens rubropilosa* tratadas com Thiamethoxam 0,00005% não apresentaram alterações morfológicas significativas. Estudos realizados por Décio (2010) mostraram que para o ingrediente ativo hidrametilnona as glândulas pós-faríngeas da mesma espécie de formiga apresentou alterações morfológicas e ultraestruturais significativas. Segundo sua justificativa, esses resultados foram obtidos possivelmente pela presença do óleo de soja ter influenciado no transporte e no acúmulo da substância hidrametilnona na glândula.

A glândula pós-faríngea está envolvida no metabolismo de lipídios. Assim, a presença de óleo na dieta contaminada deveria ter promovido o transporte de maior parte do alimento para a glândula, corroborando com estudos anteriores. No entanto, a partir dos resultados obtidos em nosso estudo não foi possível verificar alterações relevantes na estrutura da glândula pós-faríngea do grupo contaminado, com exceção de uma pequena desorganização do epitélio glandular, sendo possível visualizar os núcleos e nucléolos intactos. Estes resultados podem tentar ser justificados com base em duas hipóteses. A primeira delas com base de que não foi possível observa alterações relevantes a nível histológico, no entanto é possível que essas alterações estejam a níveis ultraestruturais. A segunda delas é de que a concentração do ingrediente ativo foi relativamente baixa. Estudos realizados por Nominato (2012) mostraram que a taxa de mortalidade, e consequentemente, a contaminação pelo composto, é crescente quando aumenta-se a concentração do inseticida e esse fato pode estar relacionado com a presença e a ação de vários metabólitos.

No grupo controle (dieta pura) não foi observado alterações na glândula. Entretanto, é possível notar que no grupo controle acetona + óleo houve um aumento na espessura do epitélio, diferentemente do grupo controle (dieta pura), evidenciando os estudos de Bueno (2005), que mostraram que as formigas que receberam óleo em sua dieta apresentaram uma turgidez na glândula quando comparada ao grupo controle (sem óleo). Neste estudo podemos inferir também que o óleo não tenha afetado significativamente na ação do thiamethoxam nas glândulas pós-faríngeas, possivelmente o tempo de exposição (5 dias) não tenha sido

suficiente para provocar alterações morfológicas significativas, mostrando apenas que o ingrediente ativo, semelhante em outros estudos, causou apenas aumento na espessura do epitélio glandular.

Em relação aos túbulos de Malpighi, os resultados obtidos mostraram que essa estrutura apresentou alterações apenas para o grupo tratado com thiamethoxam 0,00005%, sendo estas relacionadas à maior quantidade de grânulos mineralizados. Segundo Caetano e colaboradores (1983), os grânulos são constituídos de resíduos metabólicos de filtrados da hemolinfa. A quantidade e o grau de desenvolvimento dos grânulos mineralizados podem indicar a atividade metabólica das células (OLAVARRIETA, 2000), sendo que, quanto maior a quantidade de grânulos, maior a atividade. Sendo assim, o aumento na quantidade de grânulos nessas estruturas de operárias tratadas com thiamethoxam pode sugerir que as células dos túbulos de Malpighi possivelmente estariam aumentando a atividade metabólica para excretar e eliminar resíduos metabólicos prováveis do ingrediente ativo, vindos da hemolinfa. Contudo, as vacuolizações citoplasmáticas podem representar um indicativo de degeneração celular.

Nesta pesquisa, foi possível perceber através dos resultados morfológicos do presente estudo que a estrutura mais afetada pelo ingrediente ativo foi o ventrículo. Estudos de Décio (2010) mostraram que para o ingrediente ativo hidrametilnona, tanto as glândulas pós-faríngeas, quanto os túbulos de Malpighi e ventrículos apresentaram alterações morfológicas drásticas pela ação do ingrediente ativo. Esses resultados confirmam estudos anteriores de Sumida (2007), para hidrametilnona, também testou ácido Bórico e sulfluramida.

Ainda em relação ao ventrículo, os controles (dieta pura e acetona + óleo) não apresentaram alterações morfológicas no epitélio ventricular. Assim, podemos inferir que a presença de somente acetona + óleo na dieta não influenciou na degradação do epitélio do ventrículo. No entanto, quando solubilizamos o ingrediente ativo Thiamethoxam em solução de acetona + óleo pudemos verificar que o composto causou alterações morfológicas, apresentando vacuolização citoplasmática, além da picnose nuclear e diminuição sigficante da quantidade de vesículas de secreção no epitélio ventricular. Assim, os vacúolos e núcleos picnóticos presentes podem ser indicativos de morte celular programada (SUMIDA, 2007).

As vesículas de secreção ou *goblet cells*, presentes no ventrículo, estão unidas por seu ápice rico em microvilosidades (CAETANO et al., 1994). Estudos de Décio (2010) mostraram que quando analisadas a nível celular, as vesículas de secreção apresentam uma diminuição da quantidade de microvilosidades, podendo indicar morte celular. Alguns estudos evidenciaram essa característica em glândulas de seda de *Melipona quadrifasciata* devido a

perda de microvilosidades na apoptose (SILVA DE MORAES; CRUZ-LADIM, 1979). No entanto, em formigas foi observado que apesar da perda das microvilosidades, o fato de apresentar vesículas de secreção, mesmo que poucas, seria um indicativo de que a célula não perdeu sua atividade secretora, podendo inferir que essa redução da quantidade de microvilosidades poderia também estar associada a um mecanismo de compensação celular em resposta ao estresse causado para a célula, como uma alternativa em diminuir a capacidade de absorção do alimento ingerido o qual apresentava-se contaminado.

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, o thiamethoxam causou maiores danos ao intestino médio (ventrículo), diferentemente de outros resultados obtidos anteriormente em trabalhos realizados com outros compostos, sendo estes também solubilizados em acetona + óleo. Este fato pode ser explicado em relação às diferentes variações da atividade enzimática responsáveis pela desintoxicação nesses insetos. Enzimas presentes no intestino médio como epoxidase e hidrolase são conhecidas por desempenhar um importante papel na desintoxicação de inseticidas (NOMINATO, 2012). No entanto, a capacidade de desintoxicação pode diminuir de acordo com a perda de proteínas do intestino médio. Esse fato ocorreu em abelhas forrageiras de *A. melífera* contaminadas com thiamethoxam, onde foi notada uma diminuição na quantidade de proteínas, impedindo o sua função de desintoxicação. Contudo, a ação do ingrediente ativo foi mais específica, causando alterações morfológicas no ventrículo, ao contrário do estudo de Décio (2010) e Sumida (2007), as quais verificaram alterações significativas em todos os tecidos observados (glândula pós-faríngea, túbulos de Malpighi e ventrículo).

6 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos nos testes toxicológicos com thiamethoxam mostraram que o ingrediente ativo apresenta atividade significante para operárias médias de *Atta sexdens rubropilosa* em todas as concentrações testadas no presente estudo.

- Por apresentar atividade retardada em diferentes concentrações utilizadas no presente estudo (0,001%, 0,0001%, 0,00005% e 0,00001%), o thiamethoxam mostra-se como um eficiente ingrediente ativo para o controle de formigas cortadeiras.

- Os dados morfológicos obtidos através da análise histológica da glândula pós-faríngea, túbulo de Malpighi e ventrículo mostraram que o thiamethoxam atua eficientemente no ventrículo, mas não de maneira significativa nas glândulas pós-faríngeas e nos túbulos de Malpighi, diferentemente de outros ingredientes ativos, com sulfluramida, hidrametilnona e ácido bórico.

- Os resultados apresentados nas análises morfológicas do ventrículo mostraram que esse é o órgão mais afetado, podendo ser observados a formação de vacúolos citoplasmáticos e núcleos picnóticos que podem ser indicativos de morte celular. Portanto, podemos inferir que para a concentração de thiamethoxam 0,00005%, sua ação inicial é no ventrículo e posteriormente em outros tecidos, como glândulas pós-faríngeas e túbulos de Malpighi.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

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.

ANJOS, N.; DELLA LUCIA, T.M.C.; MAYHÉ-NUNES, A.J. **Guia prático sobre formigas cortadeiras em reflorestamento.** Ponte Nova, MG: Graff Cor, 1998. 100p.

AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.- Hymenoptera-Formicidae). I – Evolução do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 12, p. 197-226, nov. 1941.

BARBOSA, O.A. **Toxicidade de produtos naturais para operárias de Atta sexdens rubropilosa Forel (Hymenoptera: Formicidae).** 2012. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2012.

BARON, N.C, BUTION,M.L, CAETANO,F.H. **Histologia e histoquímica das células regenerativas e *goblet cells* do ventrículo de *Pachycondyla (= Neoponera) villosa* (FORMICIDAE: PONERINAE).** 2000

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.

BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF.** São Paulo, v.11, n.30, p.1-47, 1997.

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

BUENO, O. C. et al. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.107-113, 1997.

BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; DINIZ, E. A.; SCHNEIDER, M. O. Utilização de alimentos pelas formigas-cortadeiras.In: VILELA, E. F.; SANTOS, I. A.; SCHOEREDER, J. H.; SERRÃO, J. E.; CAMPOS, L. A. O.; LINO-NETO, J. **Insetos Sociais**: a biologia à aplicação. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2008. p. 96 -114.

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.

BROWN JR., W. L. Diversity of ants. In: AGOSTI, D. et al. (Ed). **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity,** Princeton: Smithsonian Institution. p. 45-79, 2000.

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, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 1981.

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

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, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 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.** p31., Rio Claro, 2002.

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, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 1977.

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

CARLOS, A.A. **Influência da polpa citrica, do óleo e de fungos filamentosos na atratividade de iscas tóxicas à *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae).** 2008, 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- UNESP, Botucatu, São Paulo, 2008.

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.

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

DÉCIO, P. **Análise morfológica dos túbulos de Malphigi, do ventrículo e das glândulas pós-faríngeas de operárias adultas de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com Hidrametilona. 2010. 62 p.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências – UNESP – Rio Claro, 2010.

FARIA, A. B. C. A política de educação ambiental para o ensino em engenharia florestal. **Ambiência**, v. 3, n. 3, p. 385-393, Dez. 2007.

FERNANDES, F.F; DALESSANDRO, W.B.; FREITAS, E.P.S. Toxicity of extract of *Magonia pubescens*(Sapindales: Sapindaceae) St. Hil. to Control the Brown Dogtick, *Rhipicephalus sanguineus*(Latreille) (Acari: Ixodidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.37, 2008.

GAMA, V. O sistema salivar de *Camponotus rufipes* (Fabricius, 1775), (Hymenoptera:Formicidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 45 (3): 317-359, 1985.

GAMA, V. & CRUZ-LADIM,C. Estudo comparativo das glândulas do sistema salivar de formigas (Hymenoptera:Formicidae). **Naturalia**, 7:145-165, 1982.

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

HEBLING-BERALDO, M. J. A.; BUENO, O. C.; ALMEIDA, R. E.; SILVA, O. A. Influência do tratamento com folhas de *Sesamum indicum* sobre o metabolismo respiratório de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). Separata de: **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil,** Rio Claro, v.20, n.1, p.27-33, 1991.

HERZNER, G., GOETTLER, W., KROISS,J., WEEB, A.G., JAKOB, P.M., RÖSSLER,W., STROHM,E. Males of a solitary was possess a post pharyngeal fland. **Arth. Struct. & Dev**. 36, 123-133, 2007.

HERZNER,G., RUTHER,J., GOLLER,S., SCHULTZ,S., GOETTLER,W., STROHM, E. Structure, chemical composition and putative function of the postpharyngeal gland of the emerald cockroach wasp, *Ampulex compressa* (Hymenoptera, Ampulicidae). **Zoology**, 114,p. 36-45, 2011.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Berlin: Springer – Verla, 1990.

JANET, C. 1895. Etudes sur les fourmis. 8/ note. Sur l‟organe de nettoyage tibiotarsien de *Myrmica rubra* L., race levinodis Nyl. **Ann. Soc. Ent. Fr.** v. 63, p. 691-704.

JESUS, C.M. **Análise comparativa das glândulas pós-faríngea e sua participação na utilização de lipídeos pelas formigas (Hymenoptera: Formicidae).** 2012. 136 f. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2012.

JUNQUEIRA, L.C.U., JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983, p.48-81.

KADIR, A. A.S.A.; BARLOW, H.S. Botanical Insecticides from higher plants: first to fourth generation insecticides. **In: Pest Management and the Environment in 2000.** Chapter 10, 2000. 132 p.

MAEZUKA, V. D. **Eficácia de Thiamethoxam na forma de spike no controle de *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) em mini-crisântemos (*Dendranthema* sp. - Asteraceae) e *Myzaphis rosarum* (Hemiptera: Aphididae) em mini-rosas (Rosa chinensis - Rosaceae)**. 2008. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2008.

MARICONI, F.A.M. **Inseticidas e seu emprego no combate as pragas: com uma introdução sobre o estudo dos insetos.** 3. Ed. São Paulo: Nobel, v.1, 1977.

MARINHO, C.G.C..; DELLA LUCIA, T.C.M.; PICANÇO,M.C. Fatores que dificultam o controle das formigas cortadeiras. **Bahia Agrícola**, v.7, n.2., p.18-21, 2006.

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.

NAGAMOTO, N.S. **Metodologia para seleção de inseticidas visando confecção de iscas tóxicas para formigas cortadeiras (Hymenoptera, Formicidae).**1998. 94f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu, São Paulo, 1998.

NAGAMOTO, N.S. **Estudos toxicológicos de principios ativos utilizando como modelo *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera:Formicidae).** 2003. 241 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu, São Paulo, 2003.

NAUEN, R.; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; SALGADO,L.V.; KAUSSMANN,M. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor coverted to clothianidin in insects and plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology.** v 76, p.55-69, 2003.

NOMINATO, C.F. **Estudo da ação do inseticida Tiametoxam na sobrevivência e no comportamento de operárias de *Apis melífera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) em diferentes idades.** 2012, 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2012.

OLAVARRIETA, A. J. A. **Estudo ultramorfológico e ultra - estrutural dos túbulos de Malpighi de operárias de *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera : Formicidae)**. 200, 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2000.

PEREGRINE, D.J.; MUDD, A.; CHERRET, J.M. 1973. **Anatomy and preliminar chemical analysis of the post-pharyngeal glands of the leaf-cutting ant, Acromyrmex octospinosus (Reich.) (Hymenoptera, Formicidae).** Insectes Sociaux, 20(4): 355-363.

PEREIRA, A. M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e comportamento de abelhas**. 2010. 124f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2010.

RODRIGUES, A. **Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas.** 2004, 90 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2004.

SOUSA-SOUTO, L.; SCHOEREDER, J.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; SILVA,W.L. Ant nests and soil nutrient availability: the negative impact of fire. **Journal of Tropical Ecology**. 24(6), p. 639-646. 2008.

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, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2007.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Anual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 45, p. 247-268, 2005.

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.

WARE, G. W. **An introduction to insecticides**. Department of Entomology, University of Arizona, Tucson, Arizona. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm.>. Acesso em: 03 abril 2014.

WEBER, N.A. **Gardening ants: The Attines**. Philadelphia: American Philosophical Society, v. 92, 1972, 146-p.

WEBER, N. A. Northern extent of Attine ants (Hymenoptera: Formicidae).**Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v.72, p. 414-415, 1970.

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

WILSON, E. O. Caste and division of labor in Leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). **Behavior Ecology and Sociobiology**, New York, v.7, p.143-156, 1980.

WILSON, E. O. **The Insect Societies.** Belknap Press of University Press, Cambridge. 548p, 1971.

Rio Claro, 3 de julho de 2014

_____

Prof. Dr. Odair Correa Bueno

_____

Aluna: Nathalia Lorenzon

Rio Claro
2014