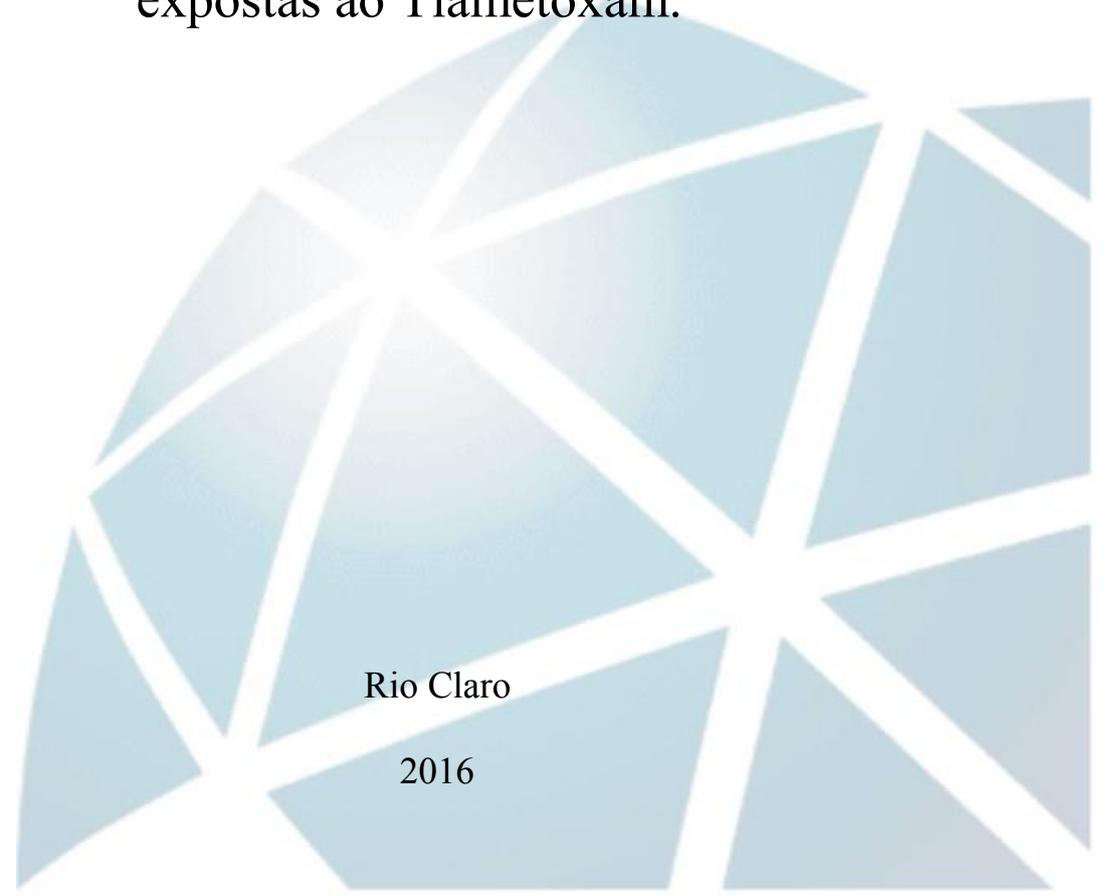

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Mayara Cristina Pereira

Análise morfológica do sistema neuroendócrino de formigas
Atta sexdens rubropilosa Forel (Hymenoptera: Formicidae)
expostas ao Tiametoxam.

Rio Claro

2016



Mayara Cristina Pereira

Análise morfológica do sistema neuroendócrino de formigas
Atta sexdens rubropilosa Forel (Hymenoptera: Formicidae)
expostas ao Tiametoxam.

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno

Co-orientador: Dra. Priscila Cintra Socolowski

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 e licenciada em Ciências
Biológicas.

Rio Claro

2016

595.796 Pereira, Mayara Cristina
P436a Análise morfológica do sistema neuroendócrino de formigas *Atta sexdens rubropilosa* forel (Hymenoptera: Formicidae) expostas ao Tiametoxam / Mayara Cristina Pereira. - Rio Claro, 2016
36 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Odair Correa Bueno

Coorientadora: Priscila Cintra Socolowski

1. Formiga. 2. *Corpora allata*. 3. Agrotóxicos. 4. Formigas-cortadeiras. 5. toxicologia. I. Título.

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

Dedico esse trabalho à minha família e àqueles que estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Todos os caminhos exigem coragem e eles só fazem sentido porque estamos a compartilhá-los o tempo todo, com pessoas que conhecemos por acaso, com pessoas que sempre fizeram parte de nossa vida, com pessoas que passam a fazer parte de nossa rotina e com pessoas que amamos. E é preciso reconhecer que o caminho, apesar de ser nosso, só se faz possível porque contamos com a ajuda e a torcida de muitos ao nosso redor. Por esse motivo, gostaria de agradecer àqueles que não deixaram de estar presentes nos bons e maus momentos desse ciclo. Sou grata primeiramente a Deus, que me permitiu chegar até aqui. Ao Prof. Dr. Odair Bueno pela oportunidade de orientação, confiança e apoio. À Dra. Priscila que há cinco anos me fez decidir pela Biologia e abriu portas para eu estar onde estou; com sua dedicação e carinho me ensinou muitas coisas, principalmente a confiar no meu trabalho. A todos os alunos, professores e funcionários do Centro de Estudo de Insetos Sociais que possibilitaram e, de alguma forma, participaram da realização desse trabalho, e àqueles que se tornaram amigos e dividiram momentos felizes comigo. À Cassy Anne, companheira inestimável, que colaborou e colabora grandemente para meu crescimento pessoal e profissional, me ensinou o significado de um trabalho feito com seriedade e amor e se tornou uma verdadeira amiga que quero para vida toda. Ao Tiago, pessoa maravilhosa, que não poupou energias para me ajudar, me ouvir e me aconselhar por esses caminhos, e tem me ensinado a olhar a vida com mais confiança e despertado o melhor de mim. Agradeço à minha mãe Delmina e ao meu pai Mario que são alicerce de tudo que sou e tudo que conquistei; o amor, o incentivo e os recursos cedidos é que me possibilitaram chegar até aqui e lhes dedicar essa conquista e outras que virão. À minha irmã Margot, em quem me espelho e busco motivação para continuar; ao meu irmão Mario, que divide comigo os devaneios do dia-a-dia e me faz acreditar que os sonhos valem a pena. À minha avó Maria (*in memoriam*) que me ensinou a ter orgulho de quem eu sou e a respeitar os que cruzam meu caminho. A todos os amigos do CBI 2012 que dividiram comigo momentos inesquecíveis; em especial à Fernanda, grande parceira, que acrescenta carinho e conhecimento à minha vida, que me recebe de braços abertos nos momentos de indecisão e construiu junto a mim uma amizade verdadeira. A todos os envolvidos nesse trabalho e na obtenção dos encantos da biologia e do que é ser professor. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Eu disse a uma amiga:

— A vida sempre superexigiu de mim.

Ela disse:

— Mas lembre-se de que você também superexige da vida.

Sim.

Clarice Lispector

RESUMO

As formigas-cortadeiras (gênero *Atta* e *Acromyrmex*) são herbívoros dominantes na Região Neotropical e por cultivarem seu fungo simbiote sobre fragmentos vegetais frescos são insetos muito comuns em ambientes agrícolas, onde estão comumente expostos à agrotóxicos. Nesses ambientes, as cortadeiras são consideradas pragas e pesquisas nessa área, normalmente, visam o controle dessas espécies. Poucos são os estudos que investigam os efeitos de inseticidas sobre os órgãos internos de insetos-alvo, os inseticidas agem sobre os seres vivos alterando processos fisiológicos e análises do sistema neuroendócrino de formigas após exposição à inseticidas podem elucidar sobre o modo de ação e efeitos citotóxicos desses compostos. Sendo assim, esse trabalho avaliou os efeitos de doses subletais de tiametoxam sobre a morfologia dos “corpora allata” das castas estéril e fértil de *Atta sexdens rubropilosa*. As doses utilizadas de tiametoxam, DL_{50/10}, DL_{50/100}, CL_{50/10} e CL_{50/100}, foram administradas topicamente e via ingestão e a análise morfológica dos “corpora allata” foi realizada sob microscopia de luz. Os resultados obtidos indicam que doses subletais de tiametoxam desencadeiam alterações morfológicas nas células dos “corpora allata” de operárias e rainhas de *A. sexdens rubropilosa*. As alterações verificadas, como o aumento do núcleo, presença de nucléolo e cromatina condensada, indicam aumento da atividade celular da glândula pela hiperexcitação do sistema neuroendócrino, provocada pelo inseticida. Essas alterações podem afetar a fisiologia das formigas, prejudicando os processos de desenvolvimento e reprodução. Considerando-se a grande quantidade de inseticidas usado no campo e a alta toxicidade do tiametoxam, estudos ecotoxicológicos tornam-se pertinentes para a avaliação do potencial risco deste inseticida também em organismos considerados pragas.

Palavras-chave: “corpora allata”, agrotóxicos, formigas-cortadeiras, toxicologia.

SUMÁRIO

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. Gênero <i>Atta</i>	9
2.2. Sistema endócrino e neurosecretor das formigas	11
2.2.1. “Corpora allata”	11
2.3. Tiametoxam	13
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Bioensaios	15
4.2. Contaminação de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	16
4.3. Contaminação de rainhas de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	16
4.4. Manipulação do material e Técnica de Hematoxilina de Harris – Eosina aquosa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)	17
5. RESULTADOS	19
5.1. Microscopia de luz	19
5.1.1. “Corpora allata” de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	19
5.1.2. “Corpora allata” de rainhas de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	24
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÕES	30

REFERÊNCIAS

1. Introdução

As formigas-cortadeiras (gêneros *Acromyrmex* e *Atta*) são consideradas herbívoros dominantes na Região Neotropical e desempenham um papel importante em termos de diversidade, ciclagem de nutrientes e fluxo de energia (HOLLOBLER e WILSON, 1990; PERFECT e VANDERMEER, 1993). A construção de ninhos e atividades de forrageamento modificam as propriedades do solo, melhorando a penetração de raízes, aeração, drenagem e aumentando a disponibilidade de matéria orgânica e mineralização de nutrientes (DELLA LUCIA, 2014).

Essas formigas cultivam um fungo simbiote predominantemente sobre fragmentos vegetais frescos e, portanto, são insetos muito comuns em ambientes agrícolas, onde fundam suas colônias e se estabelecem utilizando as folhas da espécie cultivada no local para manter o jardim de fungo (BUENO, 2008). São consideradas pragas em áreas de intenso cultivo vegetal e devido à magnitude dos prejuízos causados pela atividade de forrageamento há necessidade de controle (MONTROYA-LERMA et al., 2012).

Pesquisas relacionando formigas e inseticidas são, normalmente, direcionadas ao controle, sem considerar os efeitos sobre as comunidades de formigas em geral. Esses efeitos devem ser verificados, uma vez que os inseticidas não são espécie-específicos e podem atingir espécies não alvo (CHONG, HOFFMAN e THOMSON, 2007). Atualmente, o principal método de controle das formigas-cortadeiras é o químico, amplamente utilizado na formulação de iscas tóxicas ou para a nebulização (DELLA LUCIA, 2014). A abordagem do uso deliberado de defensivos fitossanitários no meio agrícola deve-se à consideração de que, apesar de serem de suma importância no cultivo de diversas espécies vegetais, esses produtos representam ameaça ambiental (SILVA, 2006; NOGUEIRA-NETO, 1997).

As cortadeiras possuem uma organização social complexa com castas bem definidas, sendo que em *A. sexdens rubropilosa* apenas uma rainha está presente durante toda a vida da colônia, representando a casta fértil, única responsável pela fundação. As castas estéreis compreendem soldados e operárias, sendo que estas têm a função de realizar os cortes vegetais feitos nas áreas cultivadas. Embora não participe da atividade de corte de vegetais, a rainha está sujeita à contaminação por agrotóxicos no momento de fundação da colônia ou por ação indireta no contato com as formigas forrageiras (DELLA LUCIA, 1995).

Durante o corte dos fragmentos vegetais, as operárias podem ingerir a seiva nos atos de prensar e lambar a borda do fragmento. A raspagem da superfície da folha para remoção de cera, necessária para incorporação do vegetal ao jardim de fungo, também significa um contato direto com o substrato. Uma vez que a maioria dos inseticidas é aplicada por via aérea em toda a área agrícola, o contato mandibular da formiga com o substrato vegetal acaba por contaminá-la (BUENO, 2008).

Os inseticidas agem sobre os seres vivos alterando processos fisiológicos e/ou bioquímicos. Possuem alta eficácia, ocasionando neurotoxicidade no organismo, e podendo ativar os mecanismos de detoxificação celular, desencadear a inibição do crescimento do inseto ou até o bloqueio da respiração celular. (LOCKSHIN e ZAKERI 2004). O Tiametoxam faz parte de um grupo químico denominado de neonicotinóide, e em doses altas leva o inseto à morte pela hiperexcitação do metabolismo. Os inseticidas sintéticos dessa classe são considerados os mais importantes das últimas três décadas e são amplamente utilizados no Brasil (TOMIZAWA e CASIDA, 2003). Variadas culturas podem receber a aplicação de tiametoxam, desde colheitas hortícolas, colheitas industriais, como citrus e outros pomares frutíferos, plantas ornamentais e no tratamento de sementes. Esse inseticida leva a hiperexcitação do sistema nervoso central devido o envio descontrolado de impulsos nervosos (RENZO et al., 1997).

Análises de alterações morfológicas têm acrescentado importantes informações nos estudos toxicológicos de organismos alvo e não alvo, particularmente as formigas e abelhas que são constantemente expostas aos agrotóxicos. Sumida et al. (2010) avaliaram a toxicidade de diferentes concentrações de ácido bórico em operárias de *Atta sexdens*, cujas análises histológicas revelaram alterações nas glândulas pós-faríngeas como a vacuolização citoplasmática. Além disso, estudos realizados com a utilização de doses subletais de inseticidas contaminando abelhas tem demonstrado efeitos danosos como alterações cognitivas, redução da mobilidade, dificuldades de retorno à colônia e prejuízos no comportamento de forrageio e polinização (BORTOLLI et al., 2003; DECOURTYE et al., 2005).

Não há estudos que relacionem os efeitos de inseticidas ao sistema neuroendócrino de formigas. Esse sistema é composto por células neurosecretoras do cérebro, “corpora cardiaca”, “corpora allata” e as glândulas protorácicas. (BUENO, 1980). Os “corpora allata” dos insetos são glândulas endócrinas que produzem hormônios juvenil (RITCEY e DIXON,

1969). O hormônio juvenil regula a metamorfose em indivíduos jovens e a síntese e deposição do vitelo nos ovócitos de indivíduos adultos (BUENO, 1980). A análise dessa glândula permitirá associar o efeito do tiametoxam à deficiência na produção do hormônio juvenil.

O conjunto dos “*corpora allata*” de gafanhoto e barata após serem submetidos a tratamento com compostos tóxicos apresentaram alterações no funcionamento da glândula. A substância 6,7-2,2-dimetilcromeno demonstrou atividade anti-gonadotrófica em diversas ordens de insetos, induzindo o hormônio juvenil e podendo levar à atrofia dos “*corpora allata*” (PENER, 1978). Outro composto (7-metoxi2, 2-dimetil-2H-1-benzopiran) testado em gafanhotos levou necrose seletiva de células na glândula (PRATT, 1977).

Estudos dos efeitos subletais dos inseticidas são relevantes para que se determine qual o modo de ação dessas substâncias exógenas sobre a biologia dos insetos, considerando também alterações sobre os processos reprodutivos, uma vez que os inseticidas ao atingirem o sistema neuroendócrino comprometem o status reprodutivo e fundação de novas colônias. Dessa forma, os resultados obtidos podem demonstrar necessidade de verificação nas dosagens mínimas utilizadas, e alterações biológicas sobre insetos não alvo

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Gênero *Atta*: divisão de castas e impacto econômico

As formigas-cortadeiras são consideradas insetos altamente sociais, quando comparadas a outras espécies de formigas, porque apresentam cuidado com a prole, castas reprodutivas, sobreposição de gerações e divisão de trabalho (WILSON, 1971). São organismos dominantes na maioria dos ecossistemas terrestres e, por viverem em sociedade, apresentam vantagens sobre outros herbívoros, como castas bem definidas e especializadas em uma função, alocação de recursos, defesa da colônia e reprodução (MARINHO, DELLA LUCIA e PICANÇO, 2006).

Dentre os insetos sociais, abelhas e formigas, possuem alta capacidade de aprender e memorizar e apresentam um rico repertório comportamental que se altera à medida que estas amadurecem, realizando diferentes tarefas dentro de um sistema cooperativo social (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). As formigas possuem o mais diferenciado sistema de castas entre os Hymenoptera sociais. A rainha é a única casta reprodutiva na colônia e na maioria das espécies a casta operária é estéril e responsável pela manutenção da colônia.

Vários fatores determinam a divisão de tarefas entre as castas como o polimorfismo, em que indivíduos de diferentes tamanhos executam tarefas específicas e o polietismo etário, em que formigas jovens trabalham no interior do ninho e quando maduras passam a executar tarefas fora dele (DUMPERT, 1978). Além disso, fatores genéticos, epigenéticos e a alimentação estão relacionados a essa divisão de tarefas.

O gênero *Atta* apresenta operárias polimórficas que vivem em colônias com uma população que pode chegar a milhões de indivíduos. A divisão de tarefas é bem definida e caracterizam a organização social desse grupo da seguinte maneira: a casta das jardineiras é responsável pela manutenção do jardim de fungo e pelo cuidado com as crias; a casta das operárias generalistas explora novos recursos alimentares, escava ninhos e realiza o corte e transporte do material vegetal; a casta dos soldados desempenha a função de defesa da colônia, podendo, ocasionalmente, cortar e transportar material vegetal (BARBOSA, 2012).

A casta reprodutiva compreende machos alados, popularmente denominados bitus, e fêmeas aladas, denominadas rainhas ou iças, ambos desempenham papel fundamental ao ciclo de vida da colônia. Machos e fêmeas abandonam os ninhos e acasalam durante o voo nupcial ou revoada. As iças podem acasalar com vários bitus (5 a 7) e armazenam o material espermático na espermateca, que garantirá a reposição de jovens durante a duração da colônia. Após a revoada, os machos morrem e as fêmeas perdem suas asas e escavam o solo para fundação de um novo formigueiro (AUTUORI, 1941; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

A espécie *Atta sexdens rubropilosa*, assim como outras pertencentes a tribo Attini, apresentam uma relação simbiótica com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Möller). Nessa relação, as formigas fornecem ambiente úmido e substrato vegetal para o desenvolvimento do fungo, que serve como fonte de alimento para as larvas, além de ser parte da alimentação dos adultos (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; MUELLER, 2002). Além disso, as formigas são beneficiadas pela quebra de enzimas que possibilitam a detoxificação de compostos secundários provenientes dos vegetais, que poderiam atuar como inseticidas (LITTLEDYKE e CHERRETT, 1978; NORTH et al., 1997, 1999) e o fungo se beneficia pelo ambiente livre de competidores, já que as formigas produzem compostos antibióticos (CURRIE e STUART, 2001).

As atividades antrópicas que levaram ao empobrecimento do solo, e consequente redução de competidores, criaram condições ideais para a proliferação e estabelecimento de novas colônias de formigas-cortadeiras em áreas cultivadas (ANJOS et al., 1998). A intensa

atividade de corte e transporte de fragmentos vegetais para manutenção do jardim de fungo as caracterizam como pragas agrícolas (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Quando não há controle, a atividade de forrageamento das formigas pode impedir a sobrevivência de algumas espécies vegetais. Estimativas globais das perdas econômicas causadas pelas formigas-cortadeiras podem alcançar bilhões de dólares (MONTROYA-LERMA et al., 2012).

Assim, diversos estudos buscam métodos de controle capazes de minimizar os prejuízos causados pelas formigas-cortadeiras, entre eles estão o controle mecânico, controle biológico e controle químico, sendo esse último o mais utilizado, podendo ser aplicado diretamente nos ninhos, nas formulações em pó, líquidos nebulizáveis, ou apresentado na forma de iscas granuladas, aplicadas nas proximidades da colônia (BOARETTO e FORTI, 1997; DELLA-LUCIA, 2014).

2.2. Sistema endócrino e neurosecretor das formigas

O sistema endócrino é responsável pela secreção de hormônios, que são substâncias químicas que atuam como sinalizadores celulares e, em geral, são transportados aos tecidos e influenciam uma série de processos fisiológicos, tais como reprodução, digestão e síntese de lipídios (GARCIA et al., 2012). Os insetos apresentam estruturas glandulares ligadas às peças bucais, chamado de sistema glandular salivar que nas formigas é constituído pela glândula labial, mandibular, pós-faríngea e hipofaríngea. As secreções produzidas por essas glândulas estão relacionadas à ingestão e digestão de alimentos (GAMA, 1982).

Nos insetos, os centros neuronais ou neuro-glandulares são responsáveis pela síntese e secreção de outros hormônios responsáveis por funções relacionadas ao comportamento e reprodução, nessas regiões estão presentes células neurosecretoras como os “corpora cardiaca”, os “corpora allata” e as glândulas protorácicas (HARTENSTEIN, 2006).

As células neurosecretoras estão localizadas no cérebro e ao longo do sistema nervoso do inseto. Os “corpora allata” produzem o hormônio juvenil, as glândulas protorácicas produzem os ecdisteróides nas larvas de insetos e o sistema nervoso central é responsável pela secreção dos demais hormônios conhecidos. A glândula protorácica é geralmente inervada pelos nervos do gânglio subesofágico e sofre morte celular programada durante a metamorfose (GARCIA et al., 2012).

2.2.1. “Corpora allata”

Os “corpora allata” são estruturas de forma elíptica ou arredondada envoltas por membrana acelular que estão pareadas dorso lateralmente ao esôfago no complexo retro cerebral e estão ligadas ao cérebro por dois ou três pares de nervos (CAMARGO-MATHIAS e CAETANO, 1991). Esse conjunto é responsável pela produção e secreção do hormônio juvenil, de forma que a taxa de liberação desse hormônio é determinada pela taxa de sua síntese e não há armazenamento nos “corpora allata” (HARTFELDER, 2000).

As secreções são liberadas em áreas neurohemais ou órgão neurohemal, como os “corpora cardiaca” que estão localizados logo abaixo dos “corpora allata” e recebem a mesma inervação cerebral. Neurônios neurosecretores e neurônios convencionais estão presentes na inervação dos “corpora allata”, que têm seus corpos celulares no cérebro e, normalmente, nos “corpora cardiaca” também. Esses neurônios estão envolvidos no controle da atividade secretora dos “corpora allata” (NIJHOUT, 1994).

Essas glândulas são consideradas essenciais para alguns processos relacionados com a ontogenia dos insetos, essa importância foi documentada na mudança da cor dos insetos, desenvolvimento do corpo gorduroso e influenciando a atividade da musculatura do voo (FORSTER e CAMARGO-MATHIAS, 2002). Em formigas, a estrutura dos “corpora allata” é similar entre operárias e rainhas, mas rainhas com total desenvolvimento do ovário podem apresentar menor volume dessa glândula, quando comparada a operárias adultas (CAMARGO-MATHIAS e CAETANO, 1991).

O hormônio juvenil, produzido pelos “corpora allata”, atua na regulação da metamorfose e deposição de vitelo nos oócitos de insetos adultos (CHAPMAN, 1975). Esse hormônio também pode estar relacionado à organização social das formigas e em abelhas do gênero *Apis* os “corpora allata” apresentam diferença de tamanho nas diferentes castas (PIMENTEL, 1985). A função do hormônio juvenil está relacionada a diversos aspectos reprodutivos dos insetos e regula a “síndrome de reprodução da fêmea”, como os processos de ovogênese, comportamento pós-copulatório e comportamento de oviposição (HARTFELDER, 2000).

Variações no volume dos “corpora allata” podem indicar um aumento ou diminuição da atividade dessas glândulas (PIMENTEL, 1985). Alguns estudos indicam que a atividade dos “corpora allata” só pode ser detectada pela observação de mudanças citológicas e

histológicas (NOVAK, 1966). Testes realizados com o uso do corante Azul de Toluidina em operárias e rainhas de *Pachycondila striata* F. Smith mostraram diferentes níveis de atividade dos “corpora allata” de acordo com o volume do núcleo e morfologia da cromatina (FORSTER e CAMARGO-MATHIAS, 2002).

2.3. Tiametoxam

Há quatro gerações de inseticidas, a primeira geração inclui produtos orgânicos, como extratos de plantas e compostos inorgânicos; a segunda geração engloba os organoclorados, os organofosforados, os carbamatos e os piretróides; na terceira geração estão os reguladores de crescimento e os fagos-inibidores; e na quarta, a biotecnologia e os produtos neonicotinóides (FARIA, 2009). Os neonicotinóides constituem uma nova classe de inseticidas, sintetizados a partir da nicotina natural (WARE, 2003). Além do tiametoxam, outras moléculas como imidacloprido, nitenpiram, acetamiprido, tiacloprido, são considerados princípios ativos deste grupo inseticida (TOMIZAWA e CASIDA, 2003).

O grupo dos neonicotinóides, dentre os vários grupos de inseticidas, foi o mais utilizado nas últimas três décadas nos campos de cultivo, devido a sua excelente atividade sistêmica (TOMIZAWA e CASIDA, 2003). O tiametoxam (3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine) é um composto neonicotinóide de produtos químicos sintetizados, que apresentam efeito agonista sobre os receptores nicotínicos de acetilcolina de insetos (NAUEN et al., 2003). Sua molécula mimetiza a acetilcolina e compete pelos receptores nicotínicos de acetilcolina na membrana pós-sináptica, de modo que ele interage com receptores específicos no sistema nervoso do inseto, e as alterações causadas são irreversíveis (BRUNET et al., 2005).

Esse inseticida age por contato e ingestão e apresenta ação sistêmica. É inativo em vertebrados e, portanto, minimiza os efeitos secundários presentes em outras classes de inseticidas. O tiametoxam é comercializado no Brasil nas formulações pó dispersível, granulado, granulado dispersivo, e pode ser aplicado diretamente no solo em diversas culturas, como cana-de-açúcar, citros, uva; em sementes de milho, soja e trigo; ou por aplicação foliar em culturas de eucalipto, citros e pastagens (ANVISA, 2008b).

3. Objetivo

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos citotóxicos de doses subletais de tiametoxam sobre a morfologia dos “corpora allata” das castas estéril e fértil de *Atta sexdens rubropilosa*, e relacionar a possíveis alterações dos processos reprodutivos e de desenvolvimento dentro da colônia.

4. Material e Métodos

4.1. Bioensaios

O bioensaio padrão constou de operárias e rainhas de *A. sexdens rubropilosa*. As operárias foram coletadas de colônias mantidas em laboratório no Campus da UNESP (Universidade Estadual Paulista) em Rio Claro, estado de São Paulo, Brasil. Para cada grupo estabelecido, cinquenta operárias foram distribuídas em cinco placas de Petri (dez/placa). Já as rainhas foram coletadas em campo na Floresta Estadual “Edmundo Navarro de Andrade” (FEENA) em Rio Claro, estado de São Paulo, Brasil entre outubro e dezembro, período reprodutivo dessa espécie.

As doses subletais de tiametoxam utilizadas foram DL_{50/10} e DL_{50/100} para o teste tópico e CL_{50/10} e CL_{50/100} para teste de ingestão. O termo dose letal (DL) ou concentração letal (CL) refere-se à dose que leva o inseto a morte, ao referir-se a DL ou CL₅₀ trata-se de uma dose que leva 50% da população exposta à morte. As doses subletais foram obtidas a partir da diluição da DL (9,31 ng/formiga) e CL₅₀ (51,5 ng/ml) em 10 e 100 vezes, com acetona para operárias e para contaminação tópica de rainhas e com óleo vegetal e acetona para contaminação via ingestão de rainhas. O óleo de soja foi utilizado em rainhas para facilitar a incorporação pelo trato digestório, uma vez que a solução com inseticida não foi oferecida em dieta como realizado para operárias.

Diariamente foi fornecida às operárias uma dieta artificial contendo glicose (50 g litro⁻¹), peptona (10 g litro⁻¹), extrato de levedura (1,0 g litro⁻¹) e ágar (15 g litro⁻¹) em água destilada (100 mL) (BUENO et al., 1997). Para os testes via ingestão (CL) a dieta foi preparada com adição do inseticida e com adição de acetona e óleo de soja no caso dos controles estabelecidos para o grupo. As rainhas não foram alimentadas durante a realização do bioensaio, já que carregam o fungo simbiote em sua cavidade oral.

Foram estabelecidos os seguintes grupos para os testes realizados em operárias (O) e rainhas (R):

Tabela 1: Grupos estabelecidos para operárias e rainhas para os períodos de 24h e 48h. Estão destacados em negrito os grupos que receberam tratamento com inseticida

	DL 24h	CL 24h	DL 48h	CL 48h
Operárias	Controle (O1) e Controle acetona (O2)	Controle (O5) e Controle acetona (O6)	Controle (O1) e Controle acetona (O2)	Controle (O5) e Controle acetona (O6)
	DL_{50/10} (O3) e DL_{50/100} (O4)	CL_{50/10} (O7) e CL_{50/100} (O8)	DL_{50/10} (O3) e DL_{50/100} (O4)	CL_{50/10} (O7) e CL_{50/100} (O8)
Rainhas	Controle (R1) e Controle acetona (R2)	Controle (R5), Controle acetona e óleo (R6)	Controle (R1) e Controle acetona (R2)	Controle (R5), Controle acetona e óleo (R6)
	DL_{50/10} (R3) e DL_{50/100} (R4)	CL_{50/10} (R8) e CL_{50/100} (R9)	DL_{50/10} (R3) e DL_{50/100} (R4)	CL_{50/10} (R8) e CL_{50/100} (R9)

4.2. Contaminação de operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Para contaminação tópica, as operárias foram submetidas a aplicação, na região do mesossomo, de 1 μ L das soluções contendo diferentes concentrações subletais do inseticida. Para os testes via ingestão, foi oferecida dieta artificial contendo inseticida em porções pré-definidas nas placas de Petri em que foram mantidas as operárias (Figura 2A e 2B). Os grupos controles foram alimentados com dieta pura no caso do grupo controle (O1 e O5) e com dieta preparada com adição de acetona, no caso do controle acetona (O2 e O6).

Após a contaminação, todos os grupos foram mantidos em estufa bacteriológica (B.O.D.) à temperatura de 25 (\pm 1) °C e uma umidade relativa variando entre 70-80% até a dissecação que ocorreu nas primeiras 24 e 48 horas do experimento.

4.3. Contaminação de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*

As fêmeas acasaladas foram mantidas isoladas em recipientes plásticos com o fundo revestido em gesso endurecido (Figura 2G), utilizado para controle da umidade do recipiente. As rainhas não foram alimentadas com dieta, uma vez que carregam seu fungo simbiote na cavidade oral. A contaminação tópica foi realizada com a aplicação de 50 μ L das

concentrações de interesse na região entre os tergitos do gáster da rainha. Essa região de aplicação foi escolhida para garantir a absorção do produto, uma vez que o corpo da rainha é altamente revestido de quitina, impossibilitando a aplicação na região do mesossoma como feito para operárias.

O volume a ser aplicado em rainhas foi calculado a partir de regra de três simples considerando o volume que normalmente se utiliza em testes com operárias e a variação de peso entre as castas. As rainhas apresentaram peso 50 vezes maior que o das operárias em uma amostragem que considerou a média do peso de três indivíduos distintos mantidos nas mesmas condições. Sendo assim, o volume de aplicação para DL 50 em rainhas foi 50 vezes maior que o aplicado em operárias.

A contaminação via ingestão foi realizada a partir da aplicação, entre as peças mandibulares, de 2 μ L da solução de inseticida dissolvido em óleo e acetona. Os grupos controles não receberam aplicação na região mandibular e o grupo R6 recebeu aplicação de acetona e óleo entre as mandíbulas, para verificar a toxicidade do solvente e do óleo de soja para o inseto. O uso de óleo vegetal para preparação da solução pretendeu garantir melhor incorporação do conteúdo pelo inseto, já que operárias de *A. sexdens rubropilosa* são capazes de separar seletivamente composto lipídicos, os quais são deslocados para glândula pós-faríngea (BUENO, 2005).

4.4. Manipulação do material e Técnica de Hematoxilina de Harris – Eosina aquosa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

A dissecação ocorreu em solução salina 0,06% sob lupa Leica EZ4 com o uso de pinças e alfinetes entomológicos para retirada do conjunto contendo as glândulas do sistema neuroendócrino a serem analisadas (Figuras 2C, 2D e 2F). Esse conjunto inclui o cérebro, glândulas neurosecretoras, gânglio subesofágico e parte do esôfago (Figura 1). O material foi fixado em paraformaldeído 4% por 5 dias.

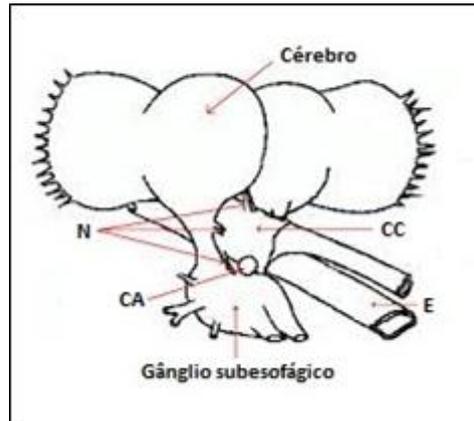


Figura 1: Esquema do conjunto neurosecretor retirado durante dissecação, contendo cérebro, nervos corporis cardiaca (N), “corpora cardiaca” (CC), esôfago (E), “corpora allata” (CA) e gânglio subesofágico.

A desidratação foi realizada com banhos em uma série crescente de álcoois (15% a 95%) que foram substituídos em um intervalo de duas horas, o álcool 70% foi mantido *overnight*. No início da desidratação, após a retirada do fixador e adição do álcool 15%, foram introduzidas gotas do corante Azul de Metileno para facilitar a visualização e manuseio da peça.

Ao fim do processo de desidratação, uma fase de resina intermediária foi realizada da seguinte forma: retirou-se metade do volume de álcool de cada recipiente e acrescentaram-se progressivamente gotas de historesina Leica até completar o volume inicial, a adição de gotas de resina ocorreu nos períodos da manhã, tarde e noite. Tal procedimento foi repetido por três dias. Ao 4º dia o volume foi completamente substituído por historesina, na qual as peças foram mantidas por cinco dias.

Posteriormente, as peças foram incluídas em moldes plásticos contendo resina e polimerizador. Os blocos foram seccionados em micrótomo LEICA RM 2255, com secções de 3-6 μm de espessura, que foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As lâminas contendo as secções foram coradas pela hematoxilina de Harris durante 10 minutos. Depois de lavadas por cinco minutos em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa, por mais cinco minutos, e novamente lavadas em água corrente. Após secagem ao ar livre em suportes de madeira, as lâminas foram mergulhadas em xilol e, em seguida, cobertas com bálsamo do Canadá e lamínula (Figura 2H). As lâminas permanentes foram examinadas e fotodocumentadas em microscópio de luz de campo claro LEICA DM750.

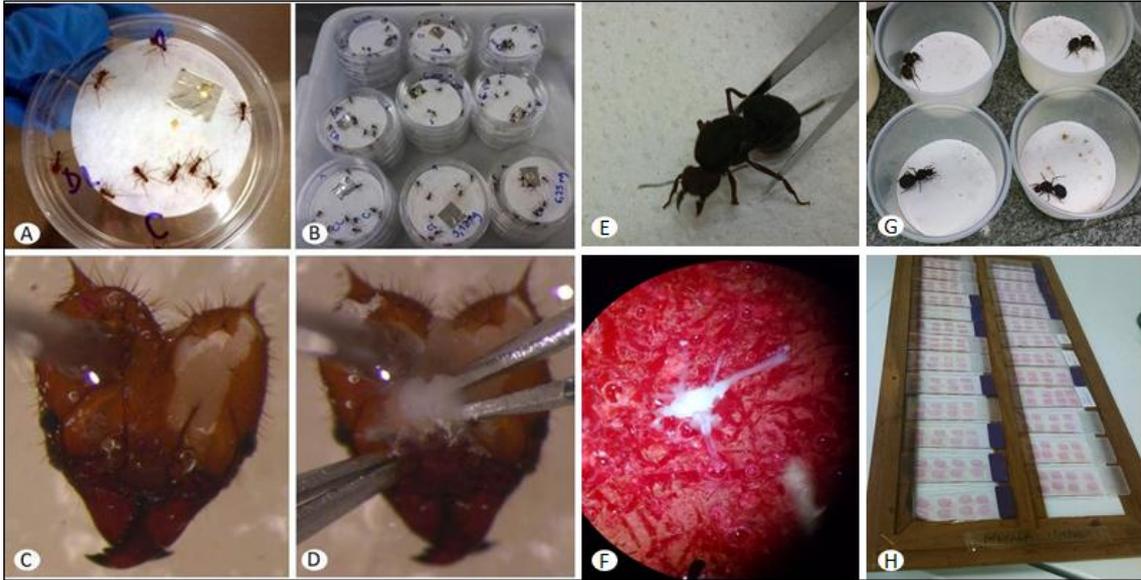


Figura 2: A e B: Operárias mantidas em placas de Petri durante o experimento; C e D: Dissecção do conjunto neurosecretor de operária; E e G: Rainhas mantidas em recipiente plástico com gesso durante experimento; F: Conjunto neurosecretor de operária visto sob lupa 200x; H: Lâminas contendo as secções a serem analisadas.

5. Resultados

5.1. Microscopia de luz

As lâminas permanentes foram analisadas em microscópio de luz (LEICA DM750) e a partir das fotomicrografias obtidas verificamos alterações morfológicas nos “corpora allata” de operárias e rainhas decorrentes do uso do inseticida. Os grupos que receberam tratamento com tiametoxam apresentaram células com núcleos alterados nos “corpora allata” de rainhas, apresentando núcleos maiores com presença de heterocromatina e nucléolos mais evidentes em operárias (Figuras 3, 4, 5 e 6).

5.1.1. “Corpora allata” de operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

As Figuras 3 e 4 ilustram os resultados obtidos para os cortes histológicos dos “corpora allata” de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* nos ensaios com DL 50 e CL 50, respectivamente. Podemos observar na Figura 3 que os grupos controles (O1 e O2) apresentaram células intactas e núcleos em tamanho variado com pouco ou nenhum acúmulo de heterocromatina. Não foi possível observar nucléolos nessas células (Figuras 3A, 3B, 3C e 3D).

Por outro lado, os grupos tratados apresentam alterações, como a presença de nucléolos (nu) evidentes, que puderam ser observados em núcleos maiores e aparecem

corados em roxo (Figuras 3E, 3G). A presença de nucléolos pôde ser verificada nos grupos DL_{50/10} 24h (O3) e DL_{50/100} 24h (O4), mas não foi observada no período de 48h dos grupos tratados. A seta vermelha indica na figura a presença de heterocromatina nos núcleos das células dos grupos DL_{50/10} 48h (O3) e DL_{50/100} 48h (O4), a heterocromatina também foi encontrada no núcleo do grupo controle, mas em menor quantidade (Figuras 3A, 3F e 3H). A presença de nucléolos e o acúmulo de heterocromatina nos núcleos dos grupos expostos sugerem o aumento da atividade celular dos “copora allata” analisados.

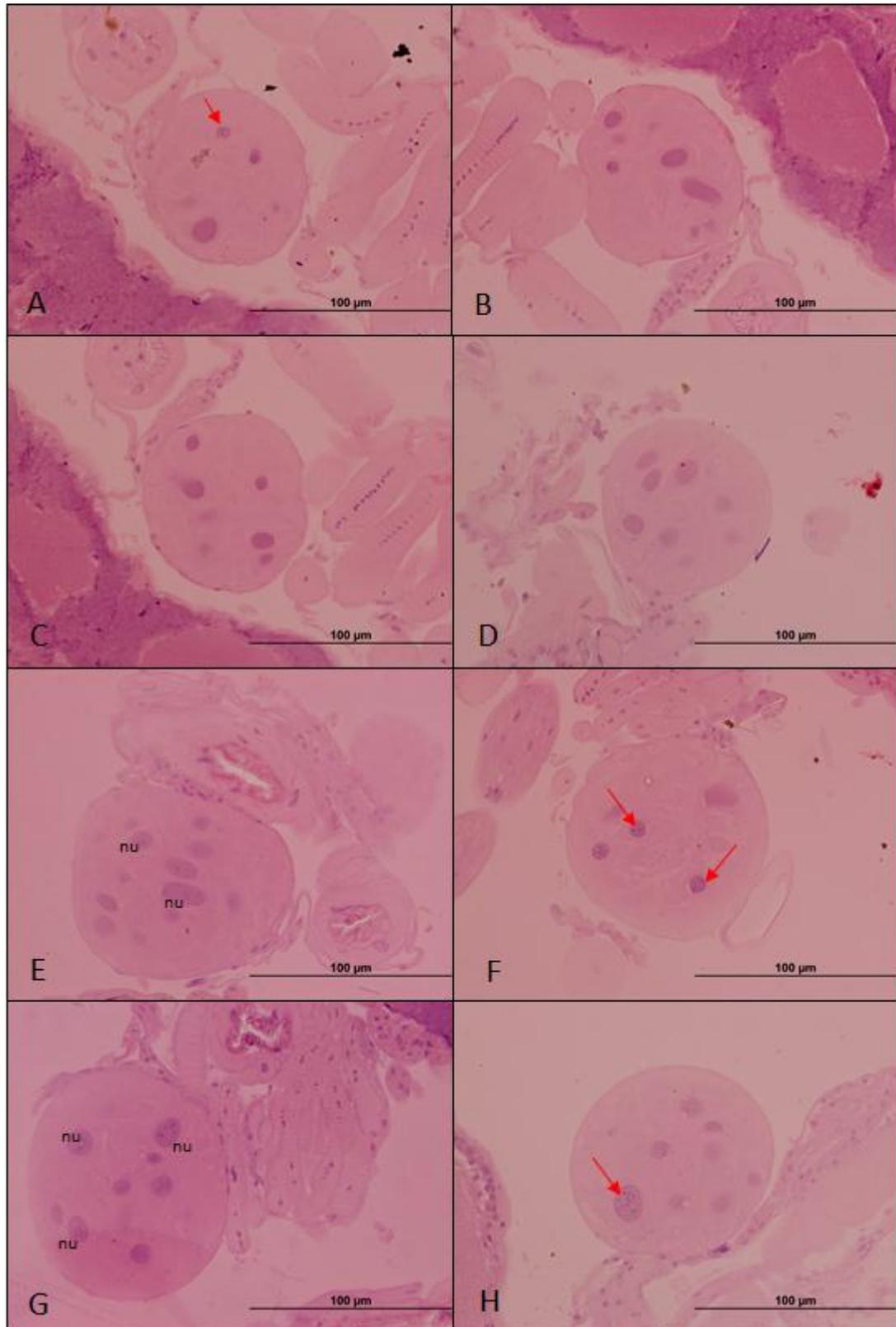


Figura 3: Fotomicrografias dos “corpora allata” de operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. A: Controle 24h; B: Controle 48h; C: Controle acetona 24h; D: Controle acetona 48h; E: DL 50/10 24h; F: DL 50/10 48h; G: DL 50/100 24h; H: DL 50/100 48h. Nas setas vermelhas estão indicadas as heterocromatinas presentes nos núcleos, nu = nucléolo.

Na Figura 4, que ilustra os cortes histológicos realizados no ensaio com CL₅₀, é possível verificar nos grupos controle (O5 e O6) células e núcleos intactos sem a presença de heterocromatina (Figuras 4A, 4B, 4C e 4D). Porém, nesse ensaio, todos os grupos expostos (O7 e O8) apresentaram acúmulo de heterocromatina no núcleo, indicado pela seta vermelha (Figuras 4E, 4F, 4G e 4H), e apenas nos grupos CL_{50/100} 24h e 48h verificamos a presença de nucléolos (Figuras 4G e 4H). Os resultados obtidos para DL₅₀ foram os mesmos verificados para esse ensaio, porém nos grupos expostos a concentrações de CL₅₀ houve maior acúmulo de heterocromatina, que apareceu em mais núcleos nas células, sendo possível observar um núcleo com presença de nucléolo e heterocromatina dispersa por toda superfície próxima à membrana interna do núcleo (Figura 4H). Além disso, não verificamos a presença de heterocromatina nos núcleos dos grupos controle. É possível sugerir que as alterações morfológicas decorrentes da contaminação via ingestão (CL) com tiametoxam foram mais evidentes e indicam a hiperexcitação da célula.

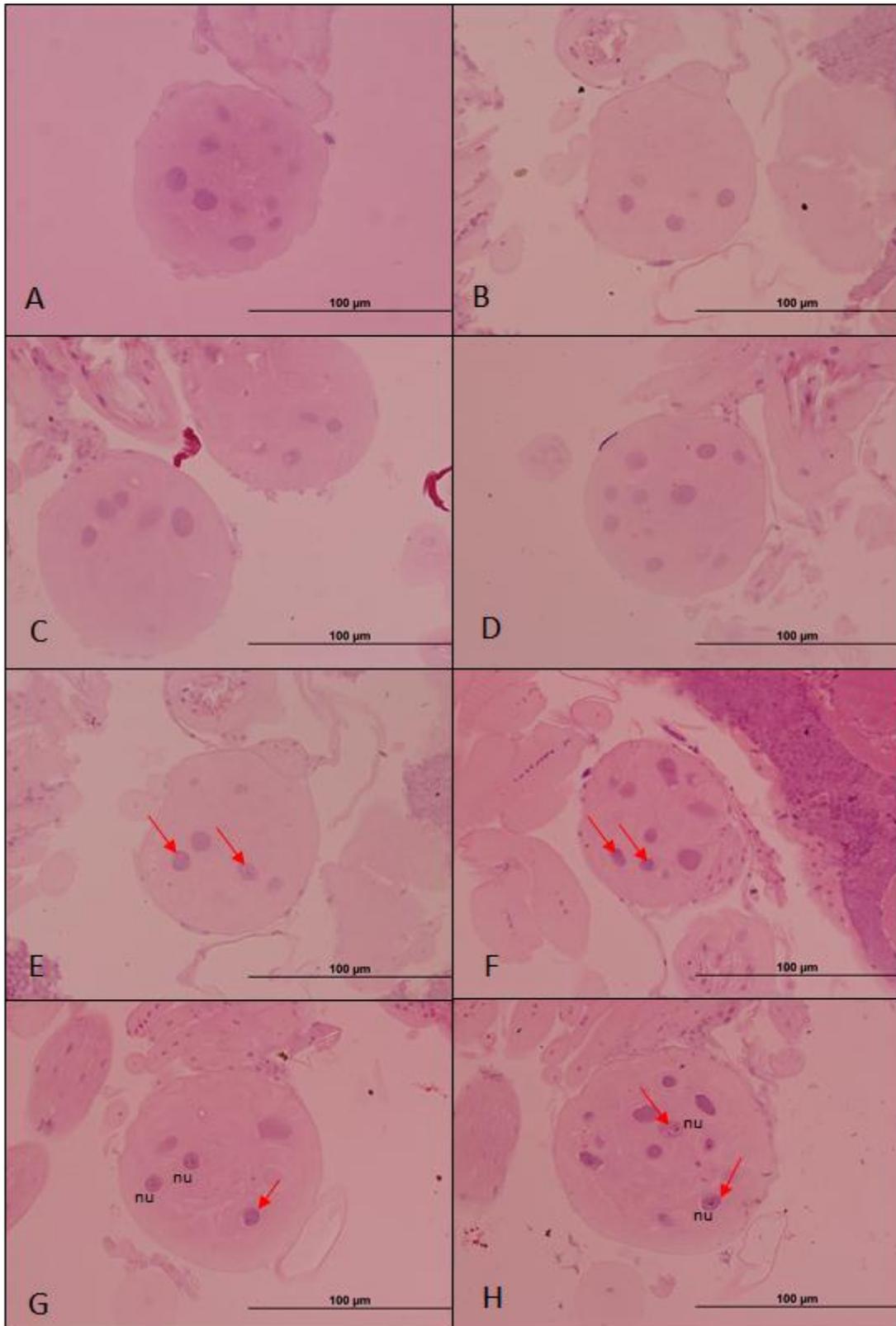


Figura 4: Fotomicrografias dos “corpora allata” de operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. A: Controle 24h; B: Controle 48h; C: Controle acetona 24h; D: Controle acetona 48h; E: CL 50/10 24h; F: CL 50/10 48h; G: CL 50/100 24h; H: CL 50/100 48h. Nas setas vermelhas estão indicadas as heterocromatinas presentes nos núcleos, nu = nucléolo.

5.1.2. “Corpora allata” de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*

As Figuras 5 e 6 ilustram os resultados obtidos para os cortes histológicos dos “corpora allata” de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* nos ensaios com exposição ao Tiametoxam nas doses DL 50 e CL 50, respectivamente. Em ambos os ensaios verificamos alterações nas células dos grupos tratados (Figuras 5 e 6), como o aumento do núcleo e o acúmulo de heterocromatina.

Nos ensaios realizados com DL 50, os grupos controles (R1 e R2) apresentaram células intactas com núcleos menores, quando comparados aos núcleos dos grupos tratados, e pequeno acúmulo de heterocromatina (Figuras 5A, 5B, 5C e 5D). Os grupos tratados (R3 e R4) apresentaram núcleos maiores e com grande acúmulo de heterocromatina (seta vermelha) (Figuras 5E, 5F, 5G e 5H). A seta em azul delimitou o comprimento na diagonal de núcleos do controle e dos grupos DL 50/100 24h e DL 50/10 48h (Figuras 5A, 5B, 5F e 5G) para facilitar a comparação do tamanho dos núcleos dos grupos tratados que se apresentaram maiores que os do controle. Esse aumento e a presença de heterocromatina indicam intensa atividade celular dos “corpora allata”, assim como verificado em operárias.

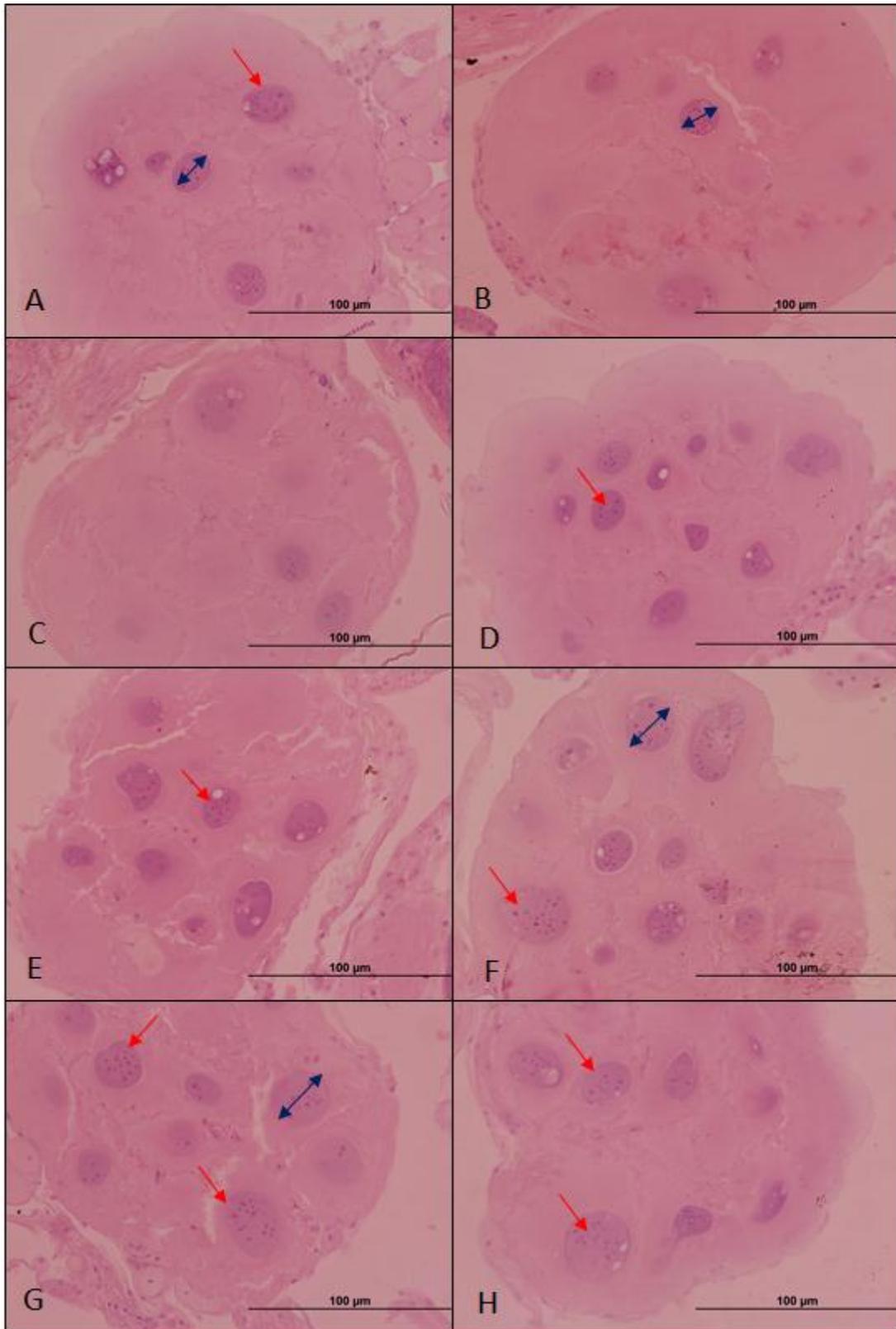


Figura 5: Fotomicrografias dos “corpora allata” de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*. A: Controle 24h; B: Controle 48h; C: Controle acetona 24h; D: Controle acetona 48h; E: DL 50/10 24h; F: DL 50/10 48h; G: DL 50/100 24h; H: DL 50/100 48h. Nas setas vermelhas estão indicadas as heterocromatinas presentes nos núcleos.

Os ensaios realizados em rainhas nas concentrações de CL_{50} demonstraram as mesmas alterações verificadas para os ensaios com DL_{50} . Na Figura 6, podemos observar células intactas nos grupos controle (R5) e controle acetona (R6) com núcleos pequenos (Figuras 6A, 6B, 6C e 6D), quando comparados aos dos grupos tratados. Os grupos expostos apresentaram núcleos visivelmente maiores em relação aos núcleos dos grupos controles, as setas azuis facilitam essa observação (Figuras 6A, 6B, 6F e 6G). Além disso, verificamos intenso acúmulo de heterocromatina nos núcleos maiores dos grupos tratados (R7 e R8), que estão indicados pelas setas vermelhas (Figuras 6E, 6F, 6G e 6H). Alguns núcleos dos grupos controle também apresentaram heterocromatina, mas em menor quantidade (Figuras 6B e 6D). Não foi possível observar nucléolos, como foi observado em operárias, nos grupos desse ensaio e do com DL_{50} com rainhas.

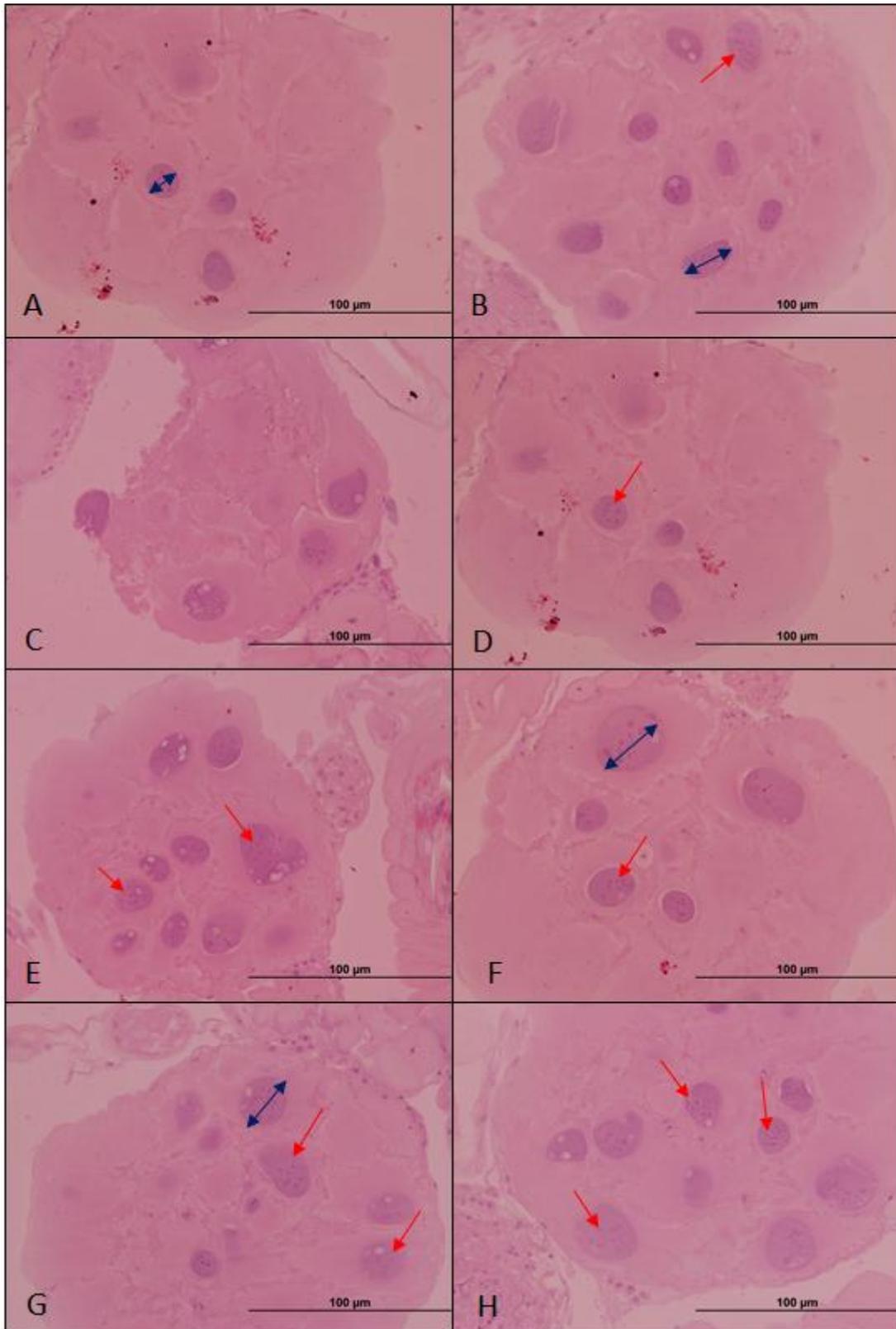


Figura 6: Fotomicrografias dos “corpora allata” de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*. A: Controle 24h; B: Controle 48h; C: Controle acetona 24h; D: Controle acetona 48h; E: CL 50/10 24h; F: CL 50/10 48h; G: CL 50/100 24h; H: CL 50/100 48h. Nas setas vermelhas estão indicadas as heterocromatinas presentes nos núcleos.

6. Discussão

Os resultados obtidos revelam que o tiametoxam, mesmo em doses baixas, pode causar alterações morfológicas nos “corpora allata” de operárias e rainhas submetidas à contaminação tópica e via ingestão. As mudanças histológicas observadas no núcleo indicam alteração do nível de atividade celular, de maneira que o aumento do volume do núcleo e a morfologia condensada da cromatina indicam aumento da atividade da glândula. Essa característica também foi descrita por Forster e Camargo-Mathias (2002) que verificou diferentes níveis de atividade dos “corpora allata” de operárias e rainhas de *Pachycondila striata*, de acordo com o volume nuclear e a morfologia de sua cromatina. Novak (1966) sugeriu que somente mudanças citológicas e histológicas podem indicar o nível atividade dos “corpora allata”, corroborando os dados deste trabalho.

As alterações do núcleo, de nucléolos e da cromatina foram semelhantes em operárias e rainhas, porém as consequências da ação tóxica do tiametoxam não podem ser comparadas entre as castas por tratarem-se de organismos diferentes com características metabólicas e comportamentais próprias. Em rainhas, verificamos um aumento acentuado do núcleo e grande acúmulo de heterocromatina, indicando aumento da atividade celular da glândula. Considerando que fêmeas reprodutoras não acasaladas possuem produção ativa de hormônio juvenil, o qual regula aspectos relacionados à reprodução, é possível que a hiperexcitação do sistema nervoso, causada pelo inseticida, tenha provocado também o aumento da atividade celular e, possivelmente a produção de hormônio juvenil pela glândula em questão.

Um estudo realizado Rachinsky et al. (1990), demonstrou que a taxa de liberação de hormônio juvenil é 26 vezes maior em larvas de rainha do que de operárias na fase de desenvolvimento correspondente. Durante a fase de pré-pupa há uma gradual diminuição da produção de hormônio juvenil em operárias e rainhas (RACHINSKY et al., 1990), mas essa última mantém ativa a produção do hormônio até sua fase reprodutiva, já que ele regula os processos de ovogênese, comportamento pós-copulatório e comportamento de oviposição (HARTFELDER, 2000).

Dessa forma, a idade das operárias também deve ser considerada na análise dos resultados, já que operárias adultas não possuem produção ativa de hormônio juvenil e responde de maneira diferente às modificações glandulares. Em operárias verificamos o acúmulo de heterocromatina e a presença de nucléolos nos núcleos dos grupos expostos ao

tiametoxam. A presença de nucléolos, que estão relacionados a organização de ribossomos, pode indicar o aumento da síntese proteica da célula dos “corpora allata” de operárias. Assim, as alterações verificadas, que indicam aumento da atividade celular, indicam também o aumento da síntese proteica, que pode estar relacionada ao início do processo de divisão celular.

Dessa forma, o sistema endócrino pode apresentar alterações morfológicas em seus órgãos após a exposição com inseticida, como pudemos verificar no presente estudo em que os “corpora allata” apresentaram núcleos alterados. Em outro estudo, a glândula pós-faríngea de *A. sexdens rubropilosa*, analisada após tratamento com tiametoxam, apresentou núcleos achatados e desorganização citoplasmática (LORENZON, 2014). Klotz et al. (2000), analisou a mesma glândula de formigas tratadas com ácido bórico e também verificou a vacuolização do citoplasma. Mudanças na morfologia do núcleo e do citoplasma glandular são respostas celulares à ação de compostos tóxicos.

Diferentes compostos podem alterar as glândulas do sistema endócrino e conseqüentemente modificar o nível de atividade de secreção da glândula. Toscano et al. (2001), verificaram que os “corpora allata” são sensíveis ao uso do composto Piriproxifem. Esse composto mimetiza o hormônio juvenil e inibe sua síntese nos “corpora allata”, o que estimula atividade de hormônio juvenil endógeno, afetando a eclosão e manutenção de ninfas (TOSCANO et al., 2001). No presente estudo, o tiametoxam levou ao aumento da atividade celular dos “corpora allata”, o que não nos permite inferir se houve um aumento na produção de hormônio juvenil após a contaminação, mas que a função de atividade glandular foi alterada pela ação do inseticida.

O trato digestório também pode apresentar características de degeneração quando há exposição a inseticidas. Análises do ventrículo de operárias de *A. sexdens rubropilosa* após exposição ao inseticida hidrametilnona revelaram importantes alterações morfológicas, como a presença de células regenerativas, núcleos picnóticos, a vacuolização citoplasmática e o deslocamento da camada de células voltada para o lúmen (DECIO et al., 2013). Soares et al. (2012) verificaram efeito semelhante na abelha nativa *Scaptotrigona postica* tratadas com ácido bórico e fipronil.

De acordo com os dados apresentados, os efeitos causados por diferentes agentes tóxicos desencadeiam alterações morfológicas nas células glandulares do sistema endócrino e

de órgãos do trato digestório. Em particular, os “corpora allata” da casta estéril e fértil de *A. sexdens rubropilosa* apresentaram alterações morfológicas nos núcleos. A análise morfológica dos órgãos é de suma importância, uma vez que o estabelecimento dos valores de CL₅₀ e DL₅₀ não é suficiente para esclarecer os efeitos subletais de um determinado pesticida (MALASPINA e SILVA-ZACARIN, 2006) e investigações como essa podem representar uma importante ferramenta para melhor entender as vias de ativação de morte celular em tecidos de insetos em resposta a agentes tóxicos.

Essas alterações podem afetar a fisiologia das formigas, prejudicando os processos de desenvolvimento e reprodução. Considerando-se a grande quantidade de inseticidas usado no campo e a alta toxicidade do tiametoxam, estudos ecotoxicológicos tornam-se pertinentes para a avaliação do potencial risco deste inseticida.

7. Conclusões

Os resultados obtidos indicam que doses subletais (DL_{50/10}, DL_{50/100}, CL_{50/10} e CL_{50/100}) de tiametoxam, quando administradas via ingestão ou topicamente desencadeiam alterações morfológicas nas células dos “corpora allata” de operárias e rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*, quando expostas por períodos de 24h e 48h. As alterações verificadas, como o aumento do núcleo, presença de nucléolo e cromatina condensada, indicam aumento da atividade celular da glândula pela hiperexcitação do sistema neuroendócrino provocada pelo inseticida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Índice monográfico T48: Tiametoxam. 2008b. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/t048.pdf>. Acesso em: 15 julho de 2016.
- ANJOS, N.; DELLA LUCIA, T. M. C.; MAYHÉ-NUNES, A. J. Guia prático sobre formigas-cortadeiras em reflorestamento. Ponte Nova, MG: Graff Cor., 1998. 100 p.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva. Arquivos do Instituto Biológico, v. 12, p. 196-231, 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.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas-cortadeiras. Série Técnica IPEF, Botucatu, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997
- BORTOLLI, L.; MONTANARI, R.; MARCELINO, J.; MENDRZYCHI, P.; MAINI, S.; PORRINI, C. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. Bulletin of Insectology, Bologna, v. 56, n. 1, p. 63 – 67, 2003.
- BRUNET, J. L.; BADIOU, A.; BELZUNCES, L. P. In vivo metabolic fate of [C-14] acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. Pest management Science, Chichester, v. 61, n. 8, p. 742-748, 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.; BEIG, D. Biometric study of the corpora allata in *Scaptotrigona postica* during post-embryonic development. Journal of Apicultural Research, v. 19, n. 4, p. 219-223, 1980.
- 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.; 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.;
- CAMARGO-MATHIAS, M. I.; CAETANO, F. H. Corpora allata and corpora cardiaca in female ants of the species *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Ponerinae): morphology and histology. Revista Brasileira de Biologia, v. 51, n. 2, p. 349-354, 1991.
- CHAPMAN, R. F. The Insects: structure and function. New York: American Elsevier. 1975. 819 p.

- CHONG, C.S.; HOFFMAN, A.A.; THOMSON L. J. Commercial agrochemical applications in Vineyards do not influence ant communities. Environ. Entomol., v. 36, n. 6, p. 1374-83, 2007.
- CURRIE, C.R.; STUART, A.E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. The Royal Society. v. 268, p.1033-1039, 2001.
- DECIO, P., SILVIA-ZACARIN, E.C.M., BUENO, F.C. & BUENO, O.C. Toxicological and histopathological effects of hydramethylnon on *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers. Micron, v. 45, p. 22-31, 2013.
- DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; GENECQUE, E.; LE MENACH, K.; BUDZINSKI, H.; CLUZEANUS, S.; PHAM-DELEGHE, M. H. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 48, p. 242-250, 2005.
- DELLA LUCIA, T. M. C., Moreira, D. D. O., Oliveira, M. A., & Araújo, M. S. Perda de peso de rainhas de *Atta* durante a fundação e o estabelecimento das colônias. Revista Brasileira Biologia, v. 55, n. 4, p. 533-536, 1995.
- DELLA LUCIA, T.M.C, GANDRAB L.C., GUEDES, R.N.C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. Pest Manag, v. 70, p. 14–23, 2014.
- DUMPERT, K. The Social Biology of Ants. London: Pitman, 1978
- FARIA, A. B. C., A review of some insecticide groups used in forest pest integrated management. Ambiência, Guarapuava, PR, v. 5 n. 2, p.345 – 358, 2009.
- FORSTER FIGUEIRA, C. R.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Histological, histochemical and morphometric study of female corpora allata of *Pachycondyla striata* ants (Hymenoptera: Ponerinae). Sociobiology, v. 39, n. 1, p. 77-87, 2002.
- GAMA, V.; DA CRUZ LANDIM, C. Estudo comparativo das glândulas do sistema salivar de formigas (Hymenoptera, Formicidae). Naturalia, v. 7, p. 145-165, 1982.
- GARCIA, E. S., CASTRO, D. P., FIGUEIREDO, M. B., GONZALES, M. S., AZAMBUJA, P. O sistema neuroendócrino de insetos. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. INCT-Molecular Entomology, 2012. Disponível em: <<http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1>>. Acessado em: 02 de setembro de 2016.
- HARTENSTEIN, V. The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. Journal of endocrinology, v. 190, n. 3, p. 555-570, 2006.
- HARTFELDER, K. Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 33, n. 2, p. 157-177, 2000.
- HÖLLDOBLER, B., WILSON, E. O. The ants. Berlin: Springer-Verlag, 1990. 732p.

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

KLOTZ, J. H; GREENBERG, L.; AMRHEIN, C.; RUST, M. K. Toxicity and repellency of borate-sucrose water baits to Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). Journal of Economic Entomology, v. 93, n. 4, p. 1256-1258, 2000.

LITTLEDYKE, M, CHERRETT, J. M. Defense mechanisms in young and old leaves against cutting by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae). Bulletin of Entomological Research, v. 68, p. 263-270, 1978.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. Apoptosis, autophagy, and more. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 36, p. 2405-2419, 2004.

LORENZON, N. Análise morfológica de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com thiamethoxam. 2014, 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso Unesp (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2014.

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

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

MONTOYA-LERMA J., GIRALDO-ECHEVERRI C., ARMBRECHT I., FARJI-BRENER A., CALLE, Z. Leaf-cutting ants revisited: towards rational management and control. Int J Pest Manag, v. 58, n. 3, p. 53:225–247., 2012.

MUELLER, U. G. Ant versus fungus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. American Naturalist, Chicago. v. 160, p. 67-98, 2002.

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

NIJHOUT, H. F. Insect hormones. New Jersey: Princeton University Press, 267p., 1994.

NOGUEIRA-NETO, P. Características diversas, distribuição geográfica e aclimatação. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis, 1997, p. 33 -38.

NORTH, R. D.; JACKSON, C. W.; HOWSE, P. E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. Tree, Canberra, v.12, n.10, p.386-389, 1997.

NORTH, R.D.; JACKSON, C.W.; HOWSE, P.E. Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate for the fungus. Physiological Entomology, Oxford, v. 24, p. 127-133, 1999.

NOVAK, V. J. A. Insect hormones. London: Methuen and Co, 1966.

- PENER, M. P.; ORSHAN, L.; DE WILDE, J. Precocene II causes atrophy of corpora allata in *Locusta migratoria*. *Nature*, Jerusalém, v. 272, p. 350-353, 1978.
- PERFECT, I., VANDERMEER, J. Distribution and turnover rate of a population of *Atta cephalotes* in a tropical rain forest in Costa Rica. *Biotropica*, v. 25, p. 316-321, 1993.
- PIMENTEL, M. A. L. Estudo do sistema neuroendócrino em abelhas *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). 1985. 88 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual “Júlio Mesquita Filho”, Rio Claro, 1985.
- PRATT, G. E.; BOWERS, W. S. Precocene II inhibits juvenile hormone biosynthesis by cockroach corpora allata in vitro. *Nature*, v. 265, p. 548-550, 1977.
- RACHINSKY, A; HARTFELDER, K. Corpora allata activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titre in honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). *Journal of Insect Physiology*, v. 36, n. 3, p. 189-194, 1990.
- RENZO, A.; CANTONI, A.; GAMBI, E. Confidor e Gaucho: nuovi insetticidi sistemici a base di Imidacloprid. *Informatore Fitopatológico*. Milano, v. 47, n. 1, p. 25-34, 1997.
- RITCEY G.M., DIXON, S.E. Post embryonic development of the endocrine system in the female honeybee castes, *Apis mellifera* L. *Proc. Ent. Soc. Int.*, v. 100, p. 124-138, 1969
- SILVA, A. C. da. Implantação da meliponicultura e etnobiologia de abelhas sem ferrão (*Melipona*) em comunidades indígenas no estado do Amazonas. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.
- SOARES, H. M.; JACOB, C. R. O; NOCELLI, R. C. F; MALASPINA, O. Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* LATREILLE, 1807 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI). 2012. 88p. Tese de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2012.
- SUMIDA, S., SILVA-ZACARIN, E.C.M., DECIO, P.; MALASPINA, O., BUENO, F.C., BUENO, O. Toxicological and histopathological effects of boric acid on *Atta Sexdens rubopilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers. *J. Econ. Entomol.* 103(3):[s.l.], p. 676-690, 2010
- TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual review of entomology*, v. 48, n. 1, p. 339-364, 2003.
- TOSCANO, N. C.; PRABHAKER, N.; CASTLE, S. J.; HENNEBERRY, T. J. Inter-regional differences in baseline toxicity of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) to the insect growth regulators, buprofezin and pyriproxifen. *Journal of Economic Entomology*, v. 94, p. 1538-1546, 2001.

WARE, G. W. An introduction to insecticides. Department of Entomology, University of Arizona, Tucson, Arizona, 2003. Disponível em:
<<http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>>. Acesso em: 05 set. 2016.

WILSON, E. O. The insect societies. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press, 548p, 1971.