

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**JÉSSICA COSTA NASCIMENTO**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DO TRATO  
DIGESTÓRIO DE ABELHAS SEM FERRÃO  
*Scaptotrigona postica* Latreille (1807)(1811) e  
*Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae,  
Meliponini) EXPOSTAS AO TIAMETOXAM**



Rio Claro  
2018

JÉSSICA COSTA NASCIMENTO

ANÁLISE MORFOLÓGICA DO TRATO DIGESTÓRIO DE ABELHAS  
SEM FERRÃO *Scaptotrigona postica* Latreille (1807)(1811) e *Melipona*  
*scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) EXPOSTAS AO  
TIAMETOXAM

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

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  
2018

N244a Nascimento, Jéssica Costa  
Análise Morfológica do Trato Digestório de Abelhas sem Ferrão *Scaptotrigona postica* Latreille (1807)(1811) e *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) Expostas ao Tiametoxam / Jéssica Costa Nascimento. -- Rio Claro, 2018  
20 p. + 1 CD-ROM  
  
Trabalho de conclusão de curso ( - ) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientador: Osmar Malaspina  
  
1. Inseticida. 2. Neonicotinoide. 3. Polinizadores. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente agradeço a Deus pelas oportunidades concedidas, sem Ele minha existência perderia o sentido...*

*Agradeço ao Professor Osmar Malaspina por ter me oferecido a chance de ingressar na iniciação científica logo no primeiro ano de faculdade. Agradeço também a todos do CEIS que me ensinaram e me ajudaram com a realização deste projeto.*

*Agradeço aos meus pais pelo incentivo desde o início, por estarem ao meu lado nos melhores e piores momentos, por apoiarem os meus sonhos e por não me deixarem desistir, sem eles eu jamais teria chegado onde cheguei. Agradeço ao meu irmão e minha cunhada por estarem presentes em minha vida e terem gerado uma das minhas maiores alegrias, minha sobrinha Lívia.*

*~Vocês são o meu lar, posso ir onde for, que me sentirei segura, pois sei que tenho um lugar para voltar~*

*Agradeço as minhas amigas da Rep. "Fuga das Galinhas" - Sabrina, Lara e Giselle - por dividir não só a mesma casa por mais de três anos, mas por compartilharmos segredos, histórias, angústias, alegrias e muita palhaçada. Nós fizemos da nossa república um lugar de tranquilidade e paz (em boa parte do tempo pelo menos... Hahaha), que eu considero como minha casa...*

*~Meu refúgio~*

*Agradeço aos amigos Lucas e Natália (Balde) que ao longo da graduação me acolheram e me cativaram. Foram tantas conversas profundas, choros e risadas, ambos tão necessários.... que guardei para durar uma vida.*

*~Mesmo longe sei que estarão sempre perto~*

*Agradeço aos meus amigos, cujo nome do grupo é intitulado carinhosamente de Gangue do Marrocos. Já festejamos, choramos, estudamos e evoluímos juntos, nos descobrimos quanto ao nosso papel de biólogos e biólogas e tenho muito orgulho do que nos tornamos.*

*~Obrigada amigos, sem vocês a graduação tão teria cor, nem amor, nem graça, nem nada~*

## RESUMO

Há alguns anos abelhas de diversas espécies em diferentes países vem desaparecendo. Acredita-se que um dos fatores que pode estar ocasionando tal fenômeno é o uso indiscriminado de inseticidas. Os neonicotinoides são uma classe de inseticidas que atuam nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) na membrana pós-sináptica da junção neural de insetos em geral, inclusive nos não alvos, como as abelhas, comprometendo sua capacidade de forrageamento e polinização. Dentre os neonicotinoides está o Tiametoxam, que será abordado nesta pesquisa, por ser amplamente utilizado na agricultura. As abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* e *Scaptotrigona postica* tem um papel fundamental na manutenção do ecossistema e nas culturas agrícolas, por serem polinizadoras especializadas, como no caso da *M. scutellaris* que realiza a polinização por vibração. Ante a tal fato, é necessário estudos que demonstrem o efeito que o inseticida pode causar no organismo das abelhas. E para isso são necessárias a determinação da DL<sub>50</sub> e as análises morfológicas das doses subletais deste inseticida, posto que tais doses são aproximadas aquelas encontradas nos campos de cultivos. O trato digestório das abelhas contém órgãos responsáveis pela digestão de alimentos, absorção dos produtos ingeridos e eliminação de materiais tóxicos para o organismo, portanto alterações morfológicas nos tratos digestório de abelhas submetidas aos testes com tais inseticidas, podem indicar sua intoxicação e até morte celular.

**Palavras-chave:** *Inseticida, neonicotinoide, polinizadores.*

## SUMÁRIO

|                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                  | <b>5</b>  |
| 1.1 Meliponínios.....                                                                      | 5         |
| 1.1.1 <i>Melipona scutellaris</i> .....                                                    | 5         |
| 1.1.2 <i>Scaptotrigona postica</i> .....                                                   | 6         |
| 1.2 Inseticidas e suas consequências para as abelhas.....                                  | 6         |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                                                   | <b>8</b>  |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                         | <b>9</b>  |
| 3.1 Análise da morfologia do trato digestivo de <i>M. scutellaris</i> .....                | 9         |
| 3.2 Determinação da DL <sub>50</sub> para <i>S. postica</i> .....                          | 10        |
| 3.3 Análise morfológica do trato digestivo de <i>S. postica</i> .....                      | 10        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                      | <b>11</b> |
| 4.1 Trato digestivo de <i>M. scutellaris</i> expostas a doses subletais do Tiametoxam..... | 11        |
| 4.1.1 Análise dos Ventrículos.....                                                         | 11        |
| 4.1.2 Análise dos Túbulos de Malpighi.....                                                 | 13        |
| 4.2 Determinação da DL <sub>50</sub> para <i>S. postica</i> .....                          | 15        |
| 4.3 Análise do trato digestivo de <i>S. postica</i> expostas a DL <sub>50</sub> .....      | 16        |
| <b>5. CONCLUSÃO.....</b>                                                                   | <b>18</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS.....</b>                                                                 | <b>19</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Entre os insetos polinizadores, as abelhas são extremamente importantes para a manutenção da vida no planeta, uma vez que são responsáveis pela polinização de pelo menos 70% das culturas, o que corresponde a 90% da oferta global de alimentos (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, 2010). Apesar da importância das abelhas para o equilíbrio da estrutura da fauna e da flora tropical, as espécies de abelhas têm diminuído em grande velocidade, devido a uma influência negativa do homem sobre o meio onde elas habitam (SOUZA et al, 2009).

### 1.1 Meliponínios

Os meliponíneos são conhecidos por serem abelhas sem ferrão (possuem um ferrão atrofiado que não é utilizado para a defesa). Constituem um grupo de abelhas formado por mais de 300 espécies conhecidas em todo o mundo e são de grande importância para o ecossistema brasileiro, que apresenta dois principais gêneros: *Melipona* e *Trigona*. Eles são os principais responsáveis pela polinização da grande maioria das espécies vegetais no Brasil. Além disso, seus produtos (mel, geoprópolis) são utilizados pela população rural como medicamentos e existe uma forte cultura popular do seu criatório e da apreciação de tais produtos (FREITAS, 2003).

A extinção das espécies de Meliponini causará um problema ecológico de enormes proporções, uma vez que elas são responsáveis, dependendo do bioma, pela polinização de 80 a 90% das plantas nativas no Brasil. Assim, o desaparecimento das abelhas causaria a extinção de boa parte da flora brasileira e de toda a fauna que dependa dessas espécies vegetais para alimentação ou nidificação (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016).

#### 1.1.1 *Melipona scutellaris*

A espécie nativa *Melipona scutellaris* tem um potencial considerável para polinização tanto em ambientes fechados quanto abertos, devido a sua eficiência, especialização e a facilidade que se tem de manter e transportar suas colônias (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2006). Além de realizar a polinização por vibração, na qual as abelhas agarram as anteras e vibram seus tórax, agitando-as e liberando o pólen. Esse tipo de polinização é particularmente relevante para o cultivo de espécies da família Solanaceae, como, por exemplo, o tomate, a berinjela, o jiló, pimentas e pimentões (NUNES-SILVA et al., 2010).

### 1.1.2 *Scaptotrigona postica*

A proteção dos ninhos em muitos desses himenópteros, como nos do gênero *Scaptotrigona*, se dá por ataques em massa levando vantagem numérica sobre outros organismos. A trilha de cheiro exalada pela glândula mandibular dessas abelhas é o que garante tal estratégia de defesa. As abelhas *Scaptotrigona postica* são importantes insetos polinizadores da flora nativa e pequenas doses de inseticidas, dentre eles os neonicotinoides, levam a alterações comportamentais que comprometem a atividade destes indivíduos no ambiente. (MICHENER, 1974; NOGUEIRA- NETO, 1997; SOARES, 2012).

## 1.2 Inseticidas e suas consequências para as abelhas

Em 2006 foi iniciado os primeiros relatos sobre o repentino sumiço de abelhas das colônias nos Estados Unidos, posteriormente, outros casos idênticos espalhados pela América e Europa, deixaram alarmados os produtores, ambientalistas, pesquisadores e público em geral. Tal fenômeno foi chamado de Desordem do Colapso das Colônias - DCC (GIFFORD, 2011). A perda das abelhas ou o DCC tem sido atribuída, entre outros fatores, à intensificação do uso de inseticidas em agroecossistemas.

Os neonicotinoides têm sido alvo de investigações, devido a sua ação sistêmica que transloca a substância ativa pela planta e atinge o pólen e néctar como resíduos (ROSA, 2014). Provavelmente os neonicotinoides afetam o comportamento das operárias, atuando diretamente nos receptores de nicotina e acetilcolina, podendo causar excitação, paralisia e até morte (ISHAAYA et al., 2007). Além da toxicidade e alterações comportamentais, esses inseticidas podem acumular no interior da colônia (TAVARES, 2011).

O Tiametoxam é uma substância pertencente à classe dos neonicotinoides. É um inseticida de classe III na classificação toxicológica determinada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Ele interfere nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) na membrana pós-sináptica da junção neural (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004). A redução da movimentação e da mobilidade, diminuição da capacidade de comunicação e de aprendizagem, dificuldades de retorno à colônia, no comportamento de forrageamento e na polinização foram observados em pesquisas feitas com abelhas das espécies *Apis mellifera* e *M. scutellaris* tratadas com doses subletais desse inseticida, além de alterações morfológicas no cérebro e intestino (DECOURTYE et al., 2005; SOARES, 2012; GRELLA, 2014; RODRIGUES, 2015).

Outros estudos relacionados aos efeitos do tiametoxam foram realizados, sendo determinada a  $DL_{50}$  para diferentes espécies de abelhas. A  $DL_{50}$  é a dose capaz de ocasionar 50% de mortalidade dos indivíduos testados, através do contato dérmico destes com o inseticida, isolando o fator ingestão. Um estudo recente determinou a  $DL_{50}$  para a espécie *M. scutellaris*, no valor de 2.51 ng/abelha, demonstrando que esta espécie é mais sensível ao Tiametoxam do que, por exemplo, a espécie *A. mellifera* que apresentou a  $DL_{50}$  nos valores de 7.85 ng/abelha (NOMINATO, 2012; RODRIGUES, 2015) e 17ng/abelha (PEREIRA, 2010; RODRIGUES, 2015).

Ante a tais fatos, o projeto em questão visou avaliar alterações no ventrículo e túbulos de Malpighi das operárias das espécies *M. scutellaris* e *S. postica* expostas ao tiametoxam. O intestino médio, ou ventrículo, das abelhas é o responsável pela digestão de alimentos e absorção dos produtos ingeridos, sendo considerado o estômago funcional dos insetos. Ao redor do ventrículo e conectados ao tubo digestório, encontram-se os túbulos de Malpighi, órgão responsável pela eliminação de materiais tóxicos para o organismo (CRUZ-LANDIM, 2009). Devido às características desses órgãos as alterações acentuadas em suas morfologias, decorrentes da exposição aos defensivos agrícolas, devem ser cuidadosamente investigadas.

## 2. OBJETIVOS

- I. Analisar alterações do trato digestório de abelhas sem ferrão *M. scutellaris* expostas a doses subletais do Tiametoxam.
- II. Determinar a  $DL_{50}$  do inseticida Tiametoxam para abelhas sem ferrão *S. postica*.
- III. Analisar a morfologia do trato digestório da espécie *S. postica* expostas a  $DL_{50}$  do Tiametoxam.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados exemplares de abelhas das espécies *M. scutellaris* e *S. postica* coletados nos meliponários e ninhos mantidos pelo CEIS - Centro de Estudos de Insetos Sociais, Departamento de Biologia - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP - Campus de Rio Claro.

#### 3.1 Análise da morfologia do trato digestório de *M. scutellaris*

Foram coletadas 240 operárias, divididas em quatro grupos: controle, controle acetona, DL<sub>50/10</sub> e DL<sub>50/100</sub>, sendo 10 indivíduos para cada pote plástico (250mL) previamente perfurados em suas superfícies. Submeteu-se as abelhas do grupo experimental (DL<sub>50/10</sub> e DL<sub>50/100</sub>) ao tratamento tópico, aplicando 1 µL do inseticida na região do pronoto; e as do grupo controle acetona foram submetidas ao mesmo tipo de tratamento tópico, porém contendo 1 µL de acetona.

As operárias foram mantidas por 24 e 48 horas dentro dos potes plásticos, juntamente com o alimento - solução de sacarose a 50% (v/v). O experimento foi mantido em uma estufa do tipo BOD a 28°C ±1°C e umidade relativa de 70% ±5%. Após esse período, foi feita a dissecação do trato digestório das operárias sob lupa Leica EZ4, os quais foram colocados em eppendorfs contendo o fixador paraformaldeído 4% por 24 horas, passando-os, em seguida, para a solução tampão - fosfato de sódio pH 7.4 a 0,1 M.

Na próxima etapa executou-se a desidratação lenta do material em alcoóis (15% à 90%) progressivamente, sendo substituídos em um intervalo de 2 horas, excetuando a concentração de álcool 70% que pode permanecer overnight. Findada a última troca, de álcool 95%, o material foi colocado em resina de embebição, onde foi mantido por 24h.

Seguidamente, os tratos digestórios das abelhas foram incluídos em resina de inclusão, a qual é necessária para que o material possa ser seccionado. Quando secos e desemblocados, os blocos foram colados em suportes de madeira e seccionados no micrótomo (Leica), com espessura de 6µm. Os cortes foram colocados sobre lâminas histológicas e, após a secagem das lâminas, submetidos a técnica de PAS. Em sequência, fotomicrografias foram feitas por meio de uma câmera digital, Olympus DP-71, adaptada a um microscópio, Olympus BX51, e a um computador Dell. Para a aquisição das imagens utilizou-se o software DP Controller.

### 3.2 Determinação da DL<sub>50</sub> para *S. postica*

Após a coleta, foi iniciada a determinação da DL<sub>50</sub> de acordo com o protocolo da OECD (1998a) estabelecido para *Apis mellifera*. Tal determinação se realizou com as operárias anestesiadas com CO<sub>2</sub> e tratadas, na região do pronoto, utilizando uma micropipeta contendo 1µL do inseticida diluído em acetona nas seguintes concentrações: 0,75ng i.a./µL, 1,5 ng i.a./µL, 3 ng i.a./µL, 6ng i.a./µL e 12 ng i.a./µL para estabelecer a dose após 48 horas da aplicação. Já o grupo controle recebeu a aplicação de 1µL de acetona. Os dados de mortalidade observados no bioensaio foram submetidos à análise Próbit, no programa BioStat, para se obter o valor da DL<sub>50</sub>.

### 3.3 Análise morfológica do trato digestório de *S. postica*

Determinada a DL<sub>50</sub>, outra coleta foi realizada, na qual as operárias foram divididas em grupos contendo 10 indivíduos, totalizando três grupos: controle, controle acetona e DL<sub>50</sub>. As operárias foram transferidas para potes plásticos previamente perfurados contendo a dieta *ad libitum*, e mantidas em estufa BOD, com temperatura a 28 °C +- 1°C e umidade relativa de 70% +- 5%.

Os tratos digestórios foram dissecados e fixados em paraformaldeído 4% por 48h, transferidos para o tampão fosfato de sódio pH 7,4 a 0,1 M, desidratados lentamente sob refrigeração em concentrações crescentes de álcool: 15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 90% e 95% e depois imersos em resina de embebição. Após esse processo as amostras foram incluídas em historesina, e processadas em micrótomo Leica do laboratório de Histologia do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, originando cortes de 6µm de espessura. Os cortes foram depositados em lâminas e corados com Hematoxilina-Eosina, para se obter as fotomicrografias dos tratos digestórios, pesquisas foram adquiridas por meio de uma câmera digital, Olympus DP-71, adaptada a um microscópio, Olympus BX51, e a um computador Dell, junto ao Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica do Centro de Estudos Sociais da UNESP de Rio Claro-SP. Para a aquisição das imagens foi utilizado o software DP Controller.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Trato digestório de *M. scutellaris* expostas a doses subletais do Tiametoxam

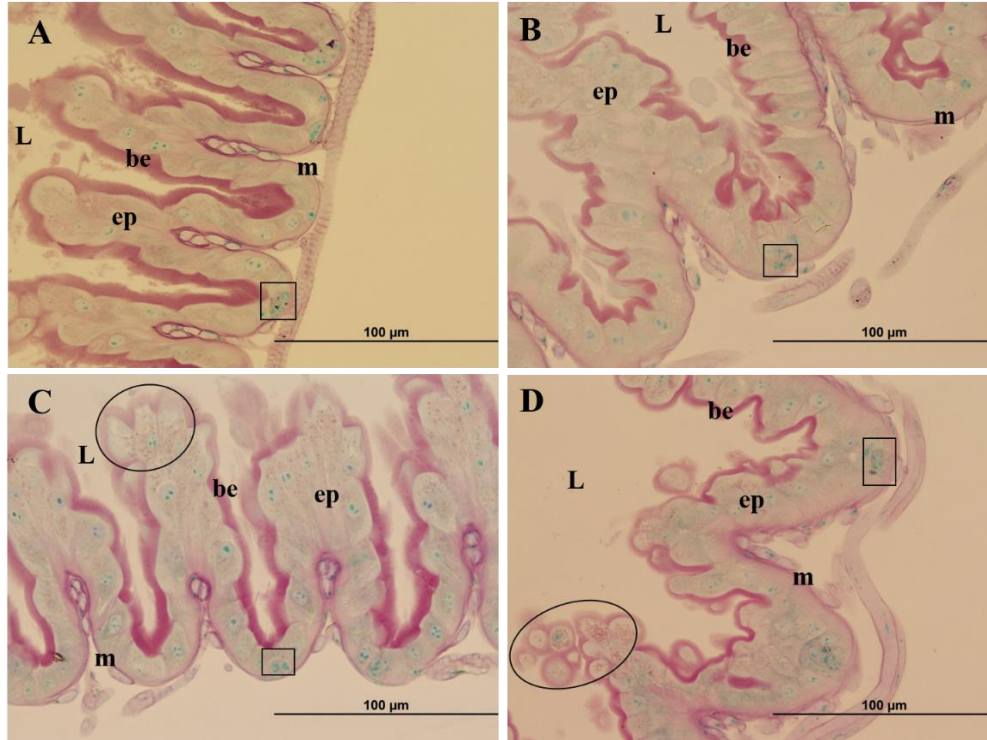
#### 4.1.1 Análise dos Ventrículos

Nas amostras das lâminas submetidas ao PAS, pode-se observar nos ventrículos dos grupos experimentais um desarranjo epitelial e assim como uma grande quantidade de células se desprendendo do epitélio e indo em direção ao lúmen (figs. 1C, 1D, 2C e 2D), se comparados com os grupos controles (figs. 1A, 1B, 2A e 2B). Também é possível identificar que os grupos expostos à DL<sub>50/10</sub> (figs. 1D e 2D) apresentaram estes efeitos de modo mais acentuado do que os grupos expostos à DL<sub>50/100</sub> (figs. 1C e 2C), sendo este um resultado esperado, pois a dose do inseticida é maior.

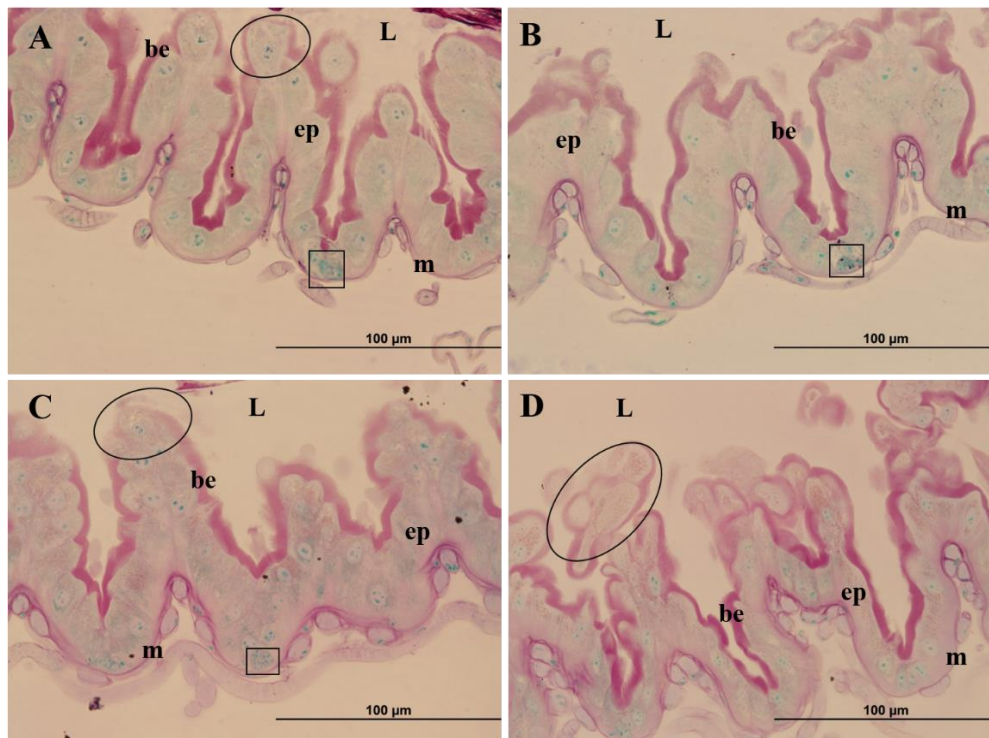
É comum que ocorra o desprendimento das células voltadas ao lúmen, uma vez que, as células digestivas possuem curto período de vida e constantemente são substituídas pela diferenciação de células regenerativas (CRUZLANDIM, 2009), mas como visto os efeitos nos grupos experimentais foram mais acentuados. A perda de material citoplasmático pode representar a ausência do contato celular que indicaria a ocorrência de desorganização tecidual precedendo a morte celular, cuja mudança marcante seria o rompimento da célula com suas células adjacentes (HACKER, 2000).

Os resultados obtidos acima também foram observados para abelhas da espécie *M. scutellaris* tratadas com o inseticida Imidacloprido (neonicotinoide). De acordo com Grella (2014), nos grupos experimentais houve maior número de locais com perda de material citoplasmático, grande quantidade de células sendo eliminadas para o lúmen e ausência de ninhos de células regenerativas em algumas anelações, indicando uma tentativa de desintoxicação do epitélio.

**Figura 1.** Ventriculos de abelhas da espécie *M. scutellaris* corados com PAS e contra corados com verde de metila, após o período de 24h. A: Grupo controle. B: Grupo controle acetona. C: Grupo exposto à  $DL_{50/10}$  do Tiametoxam. D: Grupo exposto à  $DL_{50/100}$  do Tiametoxam. (L) Lúmen, (be) borda em escova, (m) membrana peritrófica e (ep) epitélio. O retângulo indica um ninho de células regenerativas e os círculos indicam a eliminação de células para o lúmen.



**Figura 2.** Ventriculos de abelhas da espécie *M. scutellaris* corados com PAS e contra corados com verde de metila, após o período de 48h. A: Grupo controle. B: Grupo controle acetona. C: Grupo exposto à  $DL_{50/10}$  do Tiametoxam. D: Grupo exposto à  $DL_{50/100}$  do Tiametoxam. (L) Lúmen, (be) borda em escova, (m) membrana peritrófica e (ep) epitélio. O retângulo indica um ninho de células regenerativas e os círculos indicam a eliminação de células para o lúmen.



#### **4.1.2 Análise dos Túbulos de Malpighi**

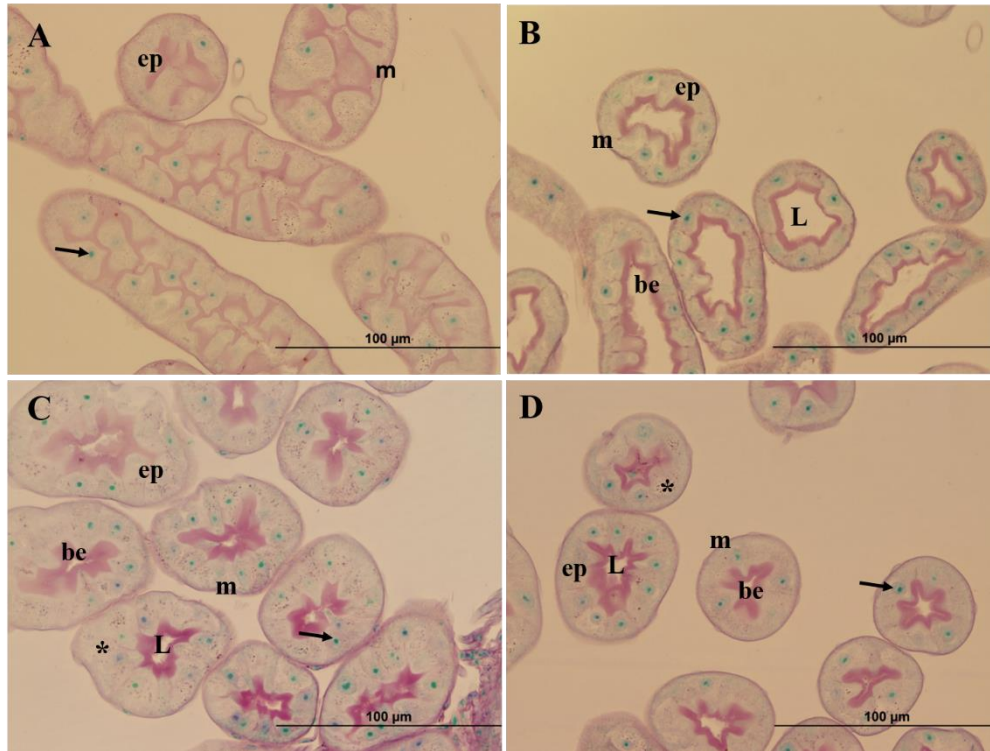
De acordo com a análise das micrografias de túbulos de Malpighi, os grupos experimentais, se comparados aos grupos controles (figs 3A, 3B, 4A e 4B), apresentaram uma maior perda de material citoplasmático e acentuado inchaço das células (figs 3C, 3D, 4C e 4D). Os grupos dissecados após 48h evidenciaram mais as mudanças morfológicas, devido, possivelmente, ao tempo necessário para que o material tóxico pudesse ser metabolizado e eliminado pelo organismo através dos túbulos de Malpighi.

O inchaço celular apresentado pode ter sido ocasionado pelo aumento no metabolismo celular indicando uma tentativa de neutralizar e eliminar o composto tóxico do organismo.

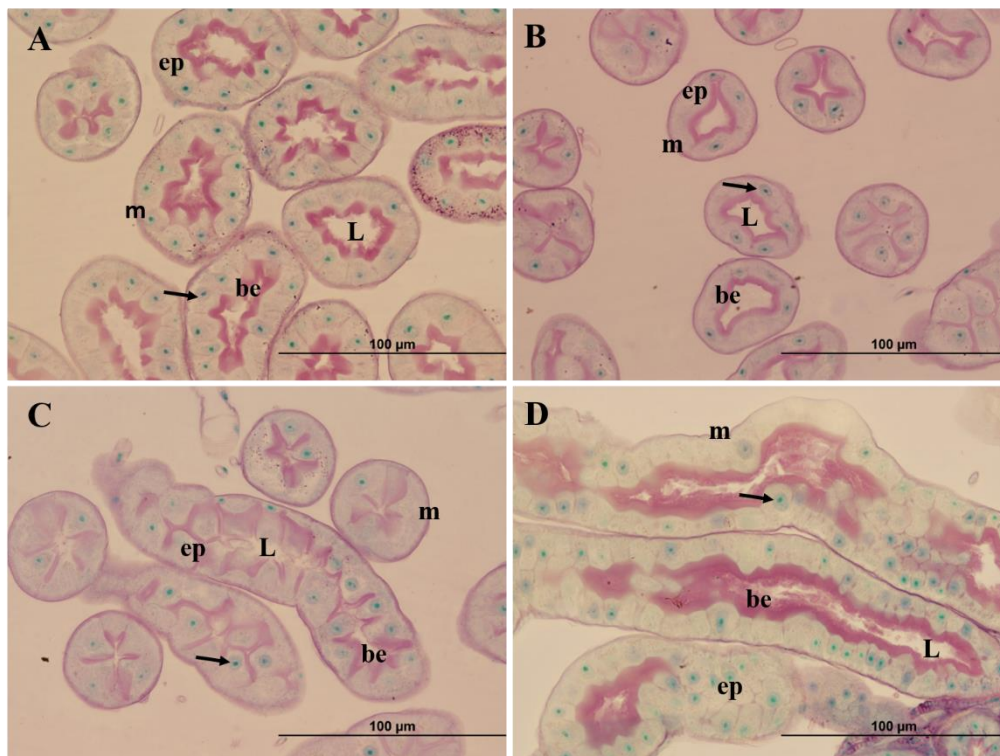
Resultados semelhantes foram observados com abelhas tratadas com o inseticida Imidacloprido. No trabalho realizado por Soares (2012), houve um certo grau de inchaço celular, aumento do volume citoplasmático além do aparecimento de protuberâncias citoplasmáticas na porção basal e obstrução do lúmen decorrentes do inchaço nas células.

Já no proposto por Grella (2014), observou-se um formato irregular dos túbulos e a perda de material citoplasmático, surgindo células emparelhadas com a membrana do túbulo, que podem indicar início de morte celular ou ainda incapacidade de síntese. Além do formato irregular do túbulo de Malpighi, o inchaço celular, a perda da borda em escova, o núcleo onde não aparecem nucléolos, inferem a paralisação de síntese proteica e núcleos em paralelo com a membrana do túbulo, podendo indicar morte celular possivelmente causadas pelo inseticida.

**Figura 3.** Túbulos de Malpighi de abelhas da espécie *M. scutellaris* corados com PAS e contra corados com verde de metila, após o período de 24h. A: Grupo controle. B: Grupo controle acetona. C: Grupo exposto à  $DL_{50/10}$  do Tiametoxam. D: Grupo exposto à  $DL_{50/100}$  do Tiametoxam. (L) Lúmen, (be) borda em escova, (m) membrana peritrófica e (ep) epitélio. As setas indicam o núcleo e o asterisco indica inchaço celular.



**Figura 4.** Túbulos de Malpighi de abelhas da espécie *M. scutellaris* corados com PAS e contra corados com verde de metila, após o período de 48h. A: Grupo controle. B: Grupo controle acetona. C: Grupo exposto à  $DL_{50/10}$  do Tiametoxam. D: Grupo exposto à  $DL_{50/100}$  do Tiametoxam. (L) Lúmen, (be) borda em escova, (m) membrana peritrófica e (ep) epitélio. As setas indicam o núcleo.



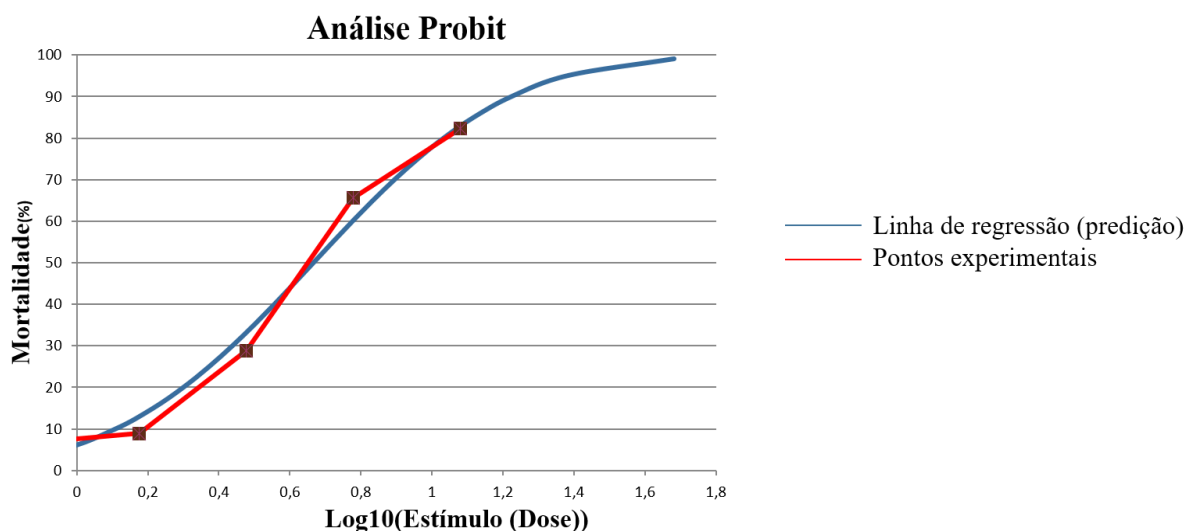
#### 4.2 Determinação da $DL_{50}$ para *S. postica*

Os dados de mortalidade observados no bioensaio, após 48 horas, foram submetidos à análise Probit, obtendo-se a  $DL_{50}$  no valor de 4,63 ng/abelha com um intervalo de confiança de 4,29 a 4,97 ng/abelha (tabela 1 e gráfico 1).

**Tabela 1.** Valores de toxicidade aguda do Tiametoxam para *S. postica*. ( $DL_{50}$ ) dose letal média; ( $IC_{95\%}$ ) intervalo de confiança 95%; ( $X^2$ ) qui-quadrado e (G.L.) grau de liberdade.

| $DL_{50}$ | $IC_{95\%}$ | $X^2$ | G.L. |
|-----------|-------------|-------|------|
| 4,63      | 4.29 – 4.97 | 4.7   | 3    |

**Gráfico 1.** Regressão realizada pela análise Probit a partir da mortalidade registrada para a determinação da  $DL_{50}$  48h após a aplicação do Tiametoxam.



Ao comparar este resultado a  $DL_{50}$  para *M. scutellaris* (2,51 ng/abelha – RODRIGUES, 2015), as abelhas da espécie *S. postica* se mostraram mais resistentes ao Tiametoxam. Entretanto, ao comparar a  $DL_{50}$  para *A. mellifera* (7.85 ng/abelha - NOMINATO, 2012 e 17ng/abelha – PEREIRA, 2010), as abelhas da espécie *S. postica* se mostraram mais sensíveis ao inseticida. A variação desse resultado pode estar relacionada a diversos fatores que diferem entre os grupos e podem alterar a estabilidade do ingrediente ativo do inseticida no organismo. Tais fatores são: tamanho corporal, níveis de gordura corporal, pH da hemolinfa e desenvolvimento de enzimas de desintoxicação (AHMAD et al. 1973).

Dependendo do tipo de cultivo e da diluição do agrotóxico, as concentrações das aplicações na agricultura brasileira podem atingir valores que variam entre 500 e 1000 µg/ml, aproximadamente 100 a 200 vezes maior que o valor da DL<sub>50</sub> encontrada neste estudo (PEREIRA, 2010; RODRIGUES, 2015).

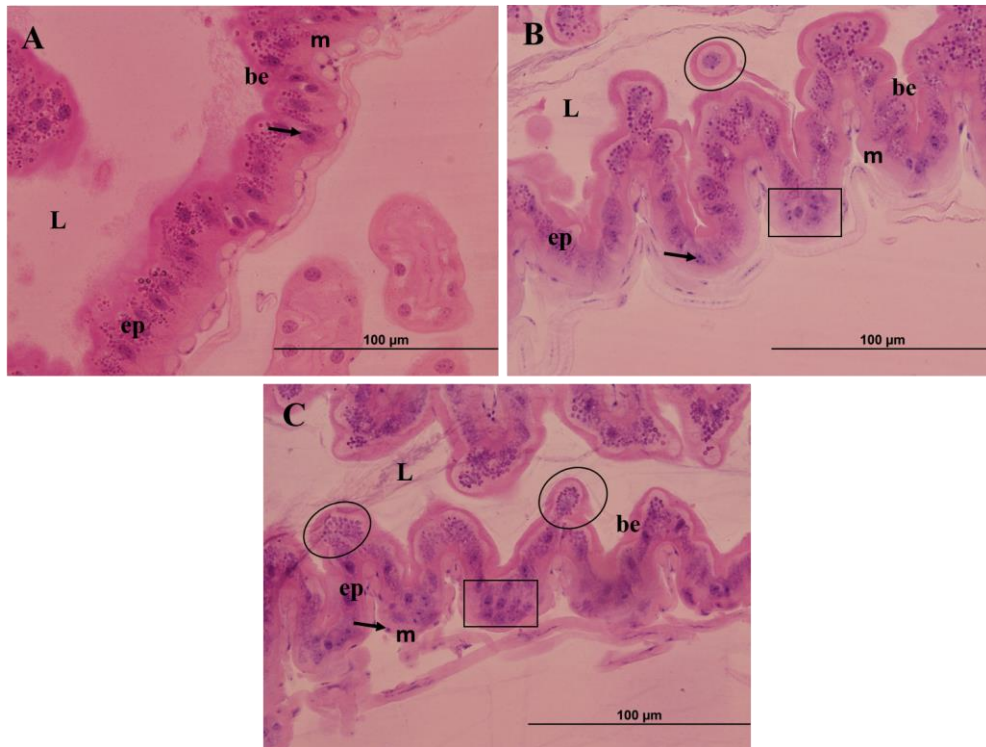
#### **4.3 Análise do trato digestório de *S. postica* expostas a DL<sub>50</sub>**

Ao analisar as amostras das lâminas não foi possível observar grandes diferenças entre os grupos controle e experimental, tanto para os ventrículos quanto para os túbulos de Malpighi (figs. 5 e 6). Tal resultado pode estar relacionado com a duração do experimento (48h), ou seja, ou o tempo de duração não foi suficiente para que o organismo da abelha pudesse absorver os compostos e metabolizá-los no trato digestório, ou o tempo foi demasiado e os compostos foram metabolizados e eliminados pelo organismo. Esta última hipótese seria mais provável, posto que a única diferença significativa entre os grupos foi que nos ventrículos dos grupos experimentais houve um maior desarranjo epitelial (fig.5C), se comparados com os grupos controles (figs. 5A e 5B).

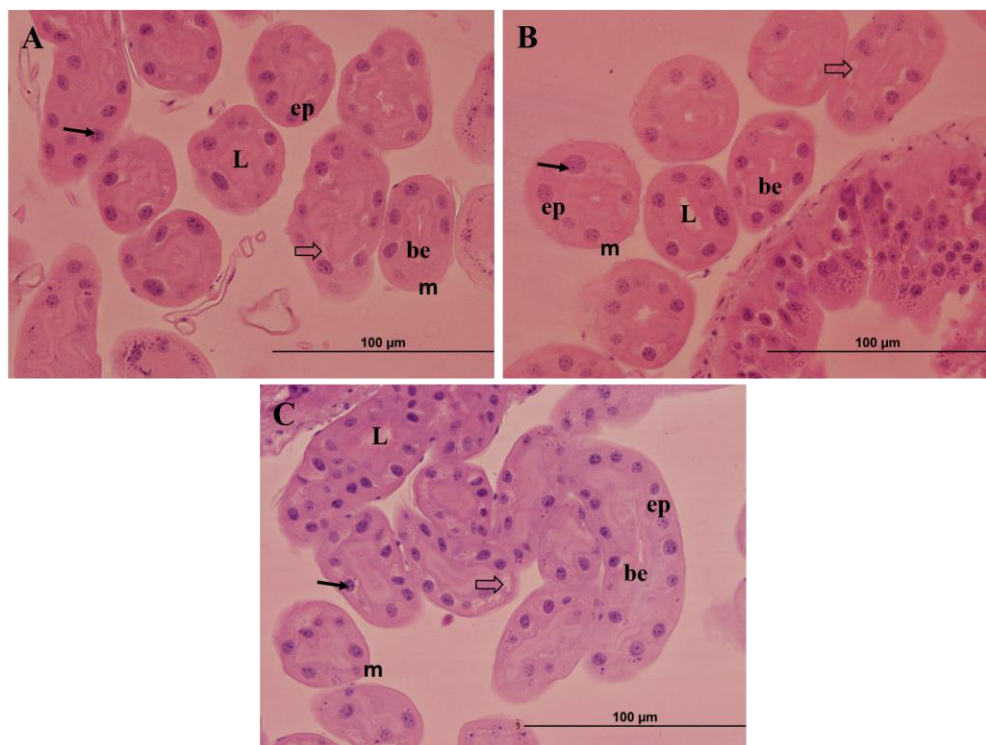
Este desarranjo epitelial pode ter sido causado pela excessiva perda de material citoplasmático e uma grande quantidade de células sendo eliminadas em direção ao lúmen (fig. 5C). Nos ventrículos do grupo controle acetona (fig. 5B) também é possível ver as células sendo eliminadas em direção ao lúmen, entretanto, é comum que ocorra o desprendimento das células voltadas ao lúmen (CRUZ-LANDIM, 2009).

Igualmente aos ventrículos, os túbulos de Malpighi dos grupos controle, controle acetona e DL<sub>50</sub> também apresentaram perda de material citoplasmático (fig. 6). Entretanto, não houveram outras alterações como descritas por Soares (2012), Grella (2014), Rodrigues (2015) e observada na análise acima (figs. 1 2, 3 e 4) para abelhas da espécie *M. scutellaris* tratadas com inseticidas Tiametoxam e Imidacloprido, como a ausência de ninhos de células regenerativas e perda da borda em escova nos ventrículos e inchaço das células dos túbulos de Malpighi.

**Figura 5.** Ventriculos de abelhas da espécie *S. postica* corados com hematoxilina-eosina (HE) após o período de 48h. A: Grupo controle. B: Grupo controle acetona. C: Grupo exposto à  $DL_{50}$  do Tiametoxam. (L) Lúmen, (be) borda em escova, (m) membrana peritrófica e (ep) epitélio. O retângulo indica um ninho de células regenerativas, os círculos indicam a eliminação de células para o lúmen e as setas, os núcleos das células.



**Figura 6.** Túbulos de Malpighi de abelhas da espécie *S. postica* corados com hematoxilina-eosina (HE), após o período de 48h. A: Grupo controle. B: Grupo controle acetona. C: Grupo exposto à  $DL_{50}$  do Tiametoxam. (L) Lúmen, (be) borda em escova, (m) membrana peritrófica e (ep) epitélio. As setas vazadas indicam a perda de material citoplasmático e as setas cheias, os núcleos.



## 5. CONCLUSÃO

- I. Com base nos dados obtidos, pode-se verificar que houve alterações consideráveis nos grupos experimentais se comparados aos grupos controle. As alterações como: o desarranjo epitelial das células dos ventrículos e o desprendimento das células em direção ao lúmen podem ser um indício de morte celular; assim como, a perda de material citoplasmático e inchaço nos túbulos de Malpighi podem sugerir que houve intoxicação devido ao Tiametoxam, posto que este órgão é o responsável pela eliminação de materiais tóxicos para o organismo.
- II. O resultado da  $DL_{50}$  neste estudo e em outros estudos com meliponíneos citados acima podem indicar que as abelhas nativas são mais sensíveis aos inseticidas do que a *A. mellifera*, ante a tal fato é ideal que o padrão de regulamentação e comercialização dos defensores agrícolas tenha em consideração não só os estudos para *A. mellifera* mas também para as abelhas nativas.
- III. Apesar de não ter apresentado alterações significativas nas análises morfológicas de *S. postica*, o desarranjo epitelial pode indicar a tentativa de desintoxicação do organismo, devido à alta toxicidade dos reagentes.

Devido à importância ecológica e econômica das espécies de abelhas, tornam-se imprescindíveis futuras avaliações sobre os efeitos dos agrotóxicos no comportamento e na morfologia destes organismos, incluindo análises moleculares e morfológicas.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD Z. ; JOHANSEN C. Selective toxicity of carbophenotion and thricloroform to the honey bee and the alfalfa leaf cutting bee. *Environ Entomol* n. 2, 1973, p. 27-30.
- ANVISA-AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **O Tiametoxam**, nov. 2004. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[8682-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[8682-1-0].PDF)>. Acesso em 25 nov. 2014.
- FREITAS, B.M. **Meliponíneos**. Universidade Federal do Ceará. Centro de Ciências Agrárias, Depto. Zootecnia. Fortaleza, 2003.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Ed. UNESP, 2009. 416p.
- DECOURTYE, A. et al. **Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera***. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, New York, n. 48, 2005, p. 242-250.
- GIFFORD, C. The Vanishing Honeybee. **Colony Collapse Disorder**. Tese - University of Colorado at Boulder. May, 2011.
- GRELLA, T.C. **Análise dos efeitos do inseticida Imidacloprido sobre o intestino e túbulos de Malpighi de abelhas *Melipona scutellaris***. Monografia apresentada no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas. Araras, 2014.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; SARAIVA, A.M.; DE JONG, D. **Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices**. Ribeirão Preto: Holos, 112 p. 2006.
- ISHAAYA, I.; BARAZANI, A.; KONTSEDALOV, S.; HOROWITZ, A.R. Insecticides with novel modes of action: Mechanism, selectivity and cross-resistance. **Entomological Research**, v.37, n.3, p.148-152, 2007.
- MALASPINA, O.; NOCELLI, R.C.F.; ROAT, T.C.; SILVA-ZACARIN, E.C.M. **Riscos de pesticida sobre as abelhas**. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69299/1/Roberta.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2014.
- MICHENER, C.D. **The social behavior of the bees: a comparative study**. Cambridge: Harvard Univ. Press, 1974. 404p.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (EMBRAPA). **Abelhas sem ferrão, a importância da preservação**. Disponível em: <<http://www.cpamn.embrapa.br/apicultura/abelhasSemFerraio.php>>. Acesso em: 18 abril. 2016.
- NOGUEIRA-NETO, P; PERUQUETTI, R. C; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L Stingless bee. In: **Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices**. Ribeirão Preto: Holos, 2006. 75-83p.
- NOMINATO, F. C. **Estudo da ação do inseticida tiametoxam na sobrevivência e no comportamento de operárias de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) em diferentes idades**. 2012, 43f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2012.

NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. **A polinização por vibração.** Oecologia Australis, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1 2010, p. 140-151.

PEREIRA, A. M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas.** 2010, 123f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2010.

RODRIGUES, C.A.S. **Análise morfológica do cérebro de abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* expostas ao tiametoxam.** 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Campus Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ROSA, A.S. **Efeitos da exposição de *Bombus terrestris audax*, *Apis mellifera carnica* e *Scaptotrigona bipunctata* ao neonicotinóide tiametoxam e uso de *Scaptotrigona* aff. *Depilis* como bioindicador.** Tese (Pós-graduação em Entomologia) – FFCLRP – Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo. 2014. 21 p.

SOARES, H.M. **Avaliação dos efeitos do inseticida Imidacloprido para abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* LATREILLE, 1807 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI).** 2012. Dissertação (Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Campus Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2012.

SOUZA, B.A.; CARVALHO, C.A.L.; ROGÉRIO, M.O.D.; DIAS, C.S.; CLARTON, L. **Munduri (*Melipona asilvai*): A abelha sestrota.** Bahia: Cruz das Almas, 2009. 1 p. (Série Meliponicultura, V. 7).

TAVARES, D.A. **Análise morfológica e imunocitoquímica do cérebro de abelhas africanizadas *Apis mellifera* após exposição à doses subletais do inseticida Tiametoxam.** 2011. Dissertação (Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Campus Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2011.

---

Autora

---

Orientador