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

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE
DIMETOATO NO CÉREBRO E VENTRÍCULO DE *Apis mellifera* AFRICANIZADA

RODRIGO AVELAIRA BARBOSA

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

RODRIGO AVELAIRA BARBOSA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE DIMETOATO
NO CÉREBRO E VENTRÍCULO DE *Apis mellifera* AFRICANIZADA

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

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

Rio Claro
2015

595.799 Barbosa, Rodrigo Avelaira
B238a Avaliação dos efeitos de concentrações subletais de
dimetoato no cérebro e ventrículo de *Apis mellifera*
africanizada / Rodrigo Avelaira Barbosa. - Rio Claro, 2015
94 f. : il., figs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Osmar Malaspina
Coorientador: Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

1. Abelha. 2. Inseticida. 3. Toxicidade. 4. Histologia. 5.
Ultraestrutura. 6. Enzima. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

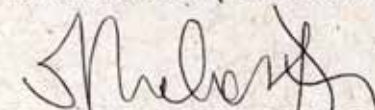
TÍTULO: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE DIMETOATO NO CÉREBRO E VENTRÍCULO DE *Apis mellifera* AFRICANIZADA

AUTOR: RODRIGO AVELAIRA BARBOSA

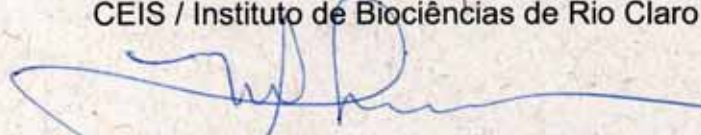
ORIENTADOR: Prof. Dr. OSMAR MALASPINA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN

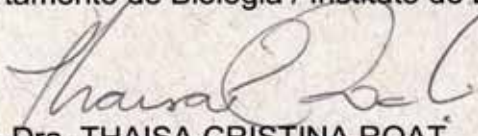
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



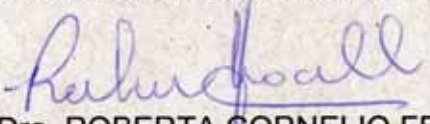
Prof. Dr. OSMAR MALASPINA
CEIS / Instituto de Biociências de Rio Claro



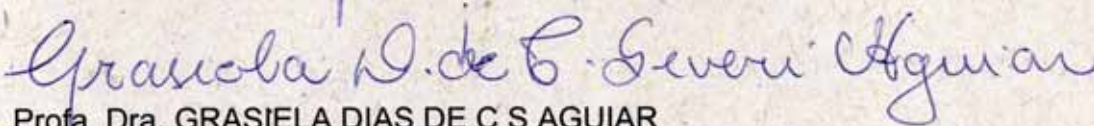
Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Profa. Dra. THAISA CRISTINA ROAT
CEIS / Instituto de Biociências de Rio Claro



Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI
Centro de Ciências Agrárias / UFSCar, campus Araras



Profa. Dra. GRASIELA DIAS DE C S AGUIAR
Laboratório de Micromorfologia / Centro Universitário Herminio Ometto - Uniararas

*Aos meus pais, ao meu irmão
e à minha namorada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo o amor dedicado a mim ao longo da minha vida. Ao meu pai Nelson Enias Barbosa Filho e à minha mãe Eliane Avelaira Barbosa por serem os melhores pais do mundo e por me apoiarem e incentivarem sempre. Ao meu irmão Diego Avelaira Barbosa pelo amor e companheirismo durante todos esses anos.

Agradeço ao eterno amor da minha vida Débora Freitas da Silva por me amar e me fazer a pessoa mais feliz que existe em todos os sentidos e por todos os lindos momentos que passamos juntos. Agradeço também por toda a preocupação e incentivo na realização deste trabalho e por todas as ajudas em diversas partes, seja com opiniões importantes, críticas relevantes, ou mesmo com ajudas práticas, principalmente na edição das imagens e das referências.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado para a realização deste trabalho. Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de verba para o desenvolvimento do Projeto Temático (Processo: 2012/50197-2), que possibilitou a realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Osmar Malaspina pela ótima orientação durante todos os anos de pesquisa e pela preocupação em me ajudar, apoiar e incentivar em todas as fases deste trabalho, sempre com boas ideias e conselhos importantes para minha formação.

Agradeço à Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias Silva Zacarin pela ótima co-orientação ao longo do doutorado, por toda a ajuda em questões decisivas deste trabalho, pelo importante apoio com as questões morfológicas e pelo grande incentivo incondicional.

Agradeço a todos os integrantes e colaboradores do Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA), por toda a ajuda em muitas partes deste trabalho, pelas reuniões, discussões, conversas produtivas, conversas descontraídas, risadas e por toda a ótima convivência ao longo desses anos. Agradeço especialmente à MSc. Daiana Antonia Tavares por me ajudar nos procedimentos das técnicas enzimáticas, sempre solucionando minhas dúvidas, e pela realização da análise dos resultados enzimáticos.

Agradeço ao Dr. Pablo Henrique Nunes pelo grande apoio em todas as etapas da realização da microscopia eletrônica de transmissão, sempre me ensinando e tirando dúvidas, e por todas as boas conversas, principalmente sobre questões profissionais. Agradeço também à Mônica Iamonte e Antônio Yabuki, pelas ajudas no Laboratório de Microscopia Eletrônica

e ao Gérson Mello Souza pelo apoio nas etapas da realização das técnicas histológicas e histoquímicas.

Agradeço aos meus queridos amigos de Graduação e Pós-Graduação por todos os momentos de diversão, jantares, jogatinas, momentos de reflexão e por todas as conversas de apoio e incentivo. Em especial, ao amigo Dr. Rafael Neodini Remedio pela grande ajuda nas partes experimentais e teóricas deste trabalho, sempre contribuindo com valiosas informações, dicas e conselhos de muito bom senso.

Finalmente, agradeço a todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho e não foram mencionadas, mas que se considerem no direito de estarem aqui.

RESUMO

As abelhas africanizadas possuem grande importância econômica para a agricultura brasileira por realizarem a polinização de diversas espécies vegetais cultivadas. A agricultura tornou-se bastante dependente do uso intensivo de pesticidas, principalmente os inseticidas, colocando em risco insetos benéficos como essas abelhas. O dimetoato é um inseticida bastante utilizado no país, sendo aplicado em várias plantações polinizadas por esses insetos. Sua ação ocorre no cérebro desses animais, promovendo a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que resulta em paralisia seguida de morte. Possui também ação sistêmica em plantas, de forma que resíduos presentes no néctar coletado podem chegar até a colônia e serem introduzidos na alimentação dos indivíduos que a compõem. O ventrículo das abelhas faz a digestão e absorção de substâncias ingeridas, além de produzir enzimas de desintoxicação, como a carboxilesterase (CaE). Os objetivos deste trabalho foram avaliar a toxicidade oral do inseticida dimetoato para abelhas africanizadas e analisar os efeitos subletais desse inseticida na sobrevivência, na atividade enzimática da AChE e CaE, e nas características histológicas, histoquímicas e ultraestruturais dos corpos pedunculados e ventrículo dessas abelhas. Foi efetuado um ensaio de toxicidade oral para a determinação da concentração letal média (CL_{50}) após 24 horas. Com base na CL_{50} , foram estabelecidas duas concentrações subletais ($CL_{50}/100$ e $CL_{50}/10$) para serem testadas no ensaio de sobrevivência e para serem administradas de forma contínua nos ensaios de intoxicação durante 1, 5 e 13 dias. A CL_{50} obtida foi equivalente a $7,96 \pm 0,45$ ng i. a./ μ L de dieta, indicando alta toxicidade. As abelhas tratadas com a $CL_{50}/100$ apresentaram sobrevivência semelhante ao grupo controle. A exposição à $CL_{50}/10$ reduziu a sobrevivência. A $CL_{50}/100$ promoveu leves alterações histológicas e histoquímicas em poucas células de Kenyon dos corpos pedunculados. Após 5 dias, a $CL_{50}/10$ promoveu a inibição da AChE e o aparecimento de muitas células de Kenyon condensadas com organelas degradadas e núcleo irregular contendo cromatina compactada. Essas alterações sugerem que essas células podem estar em estágios iniciais de morte celular. No ventrículo, houve o aumento da atividade da CaE de abelhas com 13 dias de exposição em relação às abelhas com 1 e 5 dias de exposição. Foi observada a inibição da CaE em abelhas tratadas com a $CL_{50}/100$ após 13 dias de exposição e em abelhas tratadas com a $CL_{50}/10$ após 5 dias. Não foram observadas alterações histológicas e histoquímicas no epitélio ventricular, nem alterações ultraestruturais nas células digestivas e regenerativas dos grupos tratados com as concentrações subletais. Esses resultados sugerem que a inibição das CaEs no ventrículo pode ter sido o resultado da ligação irreversível dessas

enzimas às moléculas de inseticida ao atuar na desintoxicação e defesa dos tecidos ventriculares, protegendo esse órgão de possíveis efeitos citotóxicos. O dimetoato é altamente tóxico para as abelhas africanizadas e mesmo uma concentração dez vezes menor que a CL_{50} pode causar prejuízos nas células de Kenyon. Alterações nessas células podem comprometer funções importantes como comunicação, aprendizado e orientação, as quais podem afetar o comportamento dessas abelhas e colocar em risco a viabilidade de toda a colônia.

Palavras-chave: Inseticida. Toxicidade. Histologia. Ultraestrutura. Enzima.

ABSTRACT

Africanized honey bees have great economic importance for Brazilian agriculture once they pollinate several crops. Agriculture has become quite dependent on the intensive use of pesticides, especially insecticides, endangering beneficial insects as these bees. Dimethoate is an insecticide widely used in the country and is applied in several crops pollinated by these insects. Its action takes place in the brain of these animals, inducing the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), which results in paralysis followed by death. It also has systemic action in plants, so that residues in nectar collected can reach the colony and be introduced to the feeding of the individuals who compose it. The midgut of bees makes the digestion and absorption of ingested substances, as well as producing detoxifying enzymes such as carboxylesterase (CaE). The objectives of this work were to evaluate the oral toxicity of dimethoate to Africanized honey bees and analyze the sublethal effects of this insecticide on survival, on the enzymatic activity of AChE and CaE, and on the histological, histochemical and ultrastructural characteristics of mushroom bodies and midgut of these bees. An oral toxicity test was conducted to determine the median lethal concentration (LC_{50}) after 24 hours. Based on LC_{50} two sublethal concentrations were established ($LC_{50}/100$ and $LC_{50}/10$) to be tested on the survival assay and to be administered continuously on intoxication assays for 1, 5 and 13 days. The LC_{50} obtained was equivalent to 7.96 ± 0.45 ng a. i./ μ L diet, indicating high toxicity. Bees treated with $LC_{50}/100$ had survival similar to the control group. Exposure to $LC_{50}/10$ reduced survival. The $LC_{50}/100$ promoted mild histological and histochemical changes in a few Kenyon cells from mushroom bodies. After 5 days, the $LC_{50}/10$ promoted the AChE inhibition and the appearance of many condensed Kenyon cells with degraded organelles and irregular nucleus containing condensed chromatin. These changes suggest that these cells may be in the early stages of cell death. In the midgut, there was increased activity of CaE in bees with 13 days of exposure in relation to bees with 1 and 5 days of exposure. It was observed the inhibition of CaE in bees treated with $LC_{50}/100$ after 13 days of exposure and in bees treated with $LC_{50}/10$ after 5 days. There were no histological and histochemical changes in the midgut epithelium, or ultrastructural changes in digestive and regenerative cells of the groups treated with sublethal concentrations. These results suggest that inhibition of CaEs in the midgut may have been the result of irreversible binding of these enzymes to insecticide molecules, acting on the detoxification and defense of midgut tissues, protecting this organ from potential cytotoxic effects. Dimethoate is highly toxic to honeybees and even a concentration ten times smaller than LC_{50} can cause damage to

Kenyon cells. Changes in these cells can compromise important functions such as communication, learning and orientation, which can affect the behavior of these bees and endanger the viability of the whole colony.

Keywords: Insecticide. Toxicity. Histology. Ultrastructure. Enzyme.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	OBJETIVOS GERAIS	16
3	CAPÍTULO 1	17
3.1	RESUMO	18
3.2	INTRODUÇÃO	19
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.4	RESULTADOS	23
3.5	DISCUSSÃO	25
3.6	REFERÊNCIAS	27
4	CAPÍTULO 2	30
4.1	RESUMO	31
4.2	INTRODUÇÃO	32
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.3.1	<i>Atividade enzimática da AChE</i>	35
4.3.2	<i>Microscopia de luz</i>	35
4.3.3	<i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	36
4.4	RESULTADOS	38
4.4.1	<i>Análise enzimática</i>	38
4.4.2	<i>Análise histológica</i>	39
4.4.3	<i>Análise histoquímica</i>	41
4.4.4	<i>Análise ultraestrutural</i>	44
4.5	DISCUSSÃO	49
4.6	REFERÊNCIAS	53
5	CAPÍTULO 3	56
5.1	RESUMO	57
5.2	INTRODUÇÃO	58
5.3	MATERIAL E MÉTODOS	60
5.3.1	<i>Atividade enzimática da CaE</i>	61
5.3.2	<i>Microscopia de luz</i>	62
5.3.3	<i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	62
5.4	RESULTADOS	64
5.4.1	<i>Análise enzimática</i>	64
5.4.2	<i>Análise histológica</i>	64
5.4.3	<i>Análise histoquímica</i>	67
5.4.4	<i>Análise ultraestrutural</i>	71
5.5	DISCUSSÃO	79
5.6	REFERÊNCIAS	82
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
7	CONCLUSÕES GERAIS	86
	REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO GERAL

Apis mellifera é uma espécie de abelha eussocial, dotada de um complexo sistema de comunicação e de uma divisão do trabalho colonial extremamente organizada. Em uma colônia as rainhas e os machos são especializados nas atividades de reprodução, enquanto as operárias são responsáveis pelas demais tarefas, tais como manutenção e defesa da colônia, coleta de água, pólen e néctar.

Essa espécie possui ampla distribuição na superfície terrestre, podendo ser encontrada nos trópicos e zonas temperadas. No Brasil, os indivíduos dessa espécie são híbridos resultantes do cruzamento de subespécies europeias (*Apis mellifera mellifera* e *Apis mellifera ligustica*) introduzidas durante o século 17, com uma subespécie africana (*Apis mellifera scutellata*) introduzida em 1956 (VANDAME et al., 2002). Após um processo de miscigenação, os híbridos passaram a ser denominados abelhas africanizadas, as quais se adaptaram muito bem às condições climáticas brasileiras, sendo a única subespécie de *A. mellifera* vivendo de modo selvagem em todo o território nacional e no continente americano. Em comparação às abelhas europeias, as abelhas africanizadas apresentam maior eficiência na transmissão de informações, comportamento de forrageamento mais longo durante o dia, maior eficiência na coleta de alimentos e maior produtividade de mel (KERR et al., 1970; MALASPINA, STORT, 1987). Esse conjunto de características contribuiu para que essas abelhas se tornassem importantes para a ecologia dos ecossistemas e para a economia agrícola do país.

As abelhas são organismos muito importantes para as comunidades vegetais por serem agentes polinizadores de diferentes espécies (CARVALHO; MARCHINI; ROS, 1999; KEVAN, 1999) contribuindo, portanto, para o equilíbrio das populações de plantas e animais que vivem em ecossistemas naturais e para a preservação da flora de uma região. Além disso, as abelhas podem ser utilizadas como bioindicadores em ecossistemas terrestres, sendo consideradas de grande interesse em estudos ecotoxicológicos (BRAECKAMAN; RAES, 1999; BRAECKAMAN et al., 1999; MALASPINA, SILVA-ZACARIN, 2006), uma vez que o processo de bioacumulação de compostos tóxicos ambientais é comum nesses organismos (INTRONA; CAMPOBASSO; GOFF, 2001).

Com relação à contribuição das abelhas para atividades econômicas, observou-se que cerca de 73% das espécies vegetais cultivadas no mundo são polinizadas por esses insetos, segundo estimativas da FAO (2004). Com relação ao continente americano, estima-se que nos Estados Unidos a espécie *A. mellifera* gere cerca de US\$ 14 bilhões todo ano com sua

atividade de polinização (MORSE; CALDERONE, 2000). Kevan e Phillips (2001), avaliando o potencial de organismos polinizadores, estimaram que o Canadá faturou US\$ 6 milhões com a produção de sementes de alfafa oriundas da polinização realizada por *A. mellifera*. No cenário agrícola brasileiro, as abelhas *A. mellifera* africanizadas são altamente importantes pelo fato de serem generalistas e de fácil manejo (MORETI et al., 1996), sendo um dos principais polinizadores de diversas culturas importantes para o país, como soja, citros, café e girassol (CHIARI et al., 2005; INÁCIO, 2003; SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES; PINTO, 2007).

A extensão de áreas contínuas cultivadas vem sendo ampliada cada dia mais em busca do aumento na produção agrícola. Em termos de qualidade e quantidade da produção de culturas, esse crescimento da agricultura tornou-se cada vez mais dependente do uso de pesticidas eficientes na eliminação de formas de vida consideradas pragas agrícolas. Porém, seu uso indiscriminado e excessivo vem provocando diversos impactos sobre o ambiente, gerando resíduos na água, no solo, no ar e nas plantas (FERNÁNDEZ et al., 2001). Um dos principais problemas resultantes dessa prática é o fato de esses produtos apresentarem um amplo espectro de ação, atuando não somente sobre a praga, mas também em insetos benéficos como as abelhas, que são ótimos agentes polinizadores de culturas agrícolas. Dessa forma, os agroecossistemas estão submetendo esses polinizadores a situações de estresse severo, causando graves consequências à apicultura (WARHURST; GOEBEL, 1995), fato evidenciado pela constante queda da densidade de abelhas nos arredores dos campos agrícolas em várias partes do mundo.

As abelhas melíferas são altamente sensíveis a uma série de pesticidas (DEVILLERS et al., 2002; STEFANIDOU; ATHANASELIS; KOUTSELINIS, 2003). Segundo Silveira (1987), as abelhas mais afetadas pelos pesticidas são as campeiras em trabalho de coleta, pelo contato direto com os produtos tóxicos, no momento da aplicação, ou pela ingestão de néctar ou pólen contaminado. A maioria dos casos de envenenamento de colônias ocorre quando os pesticidas são aplicados nas culturas durante o período de floração da planta cultivada e de outras existentes dentro dos campos (WARHURST; GOEBEL, 1995). A morte imediata das abelhas não é o único problema, pois a exposição a concentrações subletais pode provocar vários distúrbios fisiológicos e comportamentais, afetando com isso a produtividade das colmeias (SMIRLE; WINSTON; WOOD-WARD, 1984), podendo prejudicar as atividades de forrageamento, as quais auxiliam no processo de polinização de espécies nativas e cultivadas. Loper e Ross (1982) citam, em seus estudos com pólen, que vários pesticidas são absorvidos pelos lipídios que participam da constituição dos grãos de pólen. Dessa forma, essa toxicidade

pode ser mantida por tempo prolongado no alimento armazenado, podendo causar aumento de mortalidade na cria e nas abelhas recém-emergidas durante um longo tempo (MOFFETT; MCDONALD; LEWIN, 1970).

No Brasil, a questão do consumo de pesticidas agrícolas é preocupante. Somente no período de 40 anos entre 1964 e 2004 o consumo de agrotóxicos no país aumentou 700% (SPADOTTO et al., 2004). Estimativas do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos de Defesa Agrícola (2003) indicam que o Brasil é o terceiro maior mercado de pesticidas no mundo inteiro e está em oitavo lugar em uso por área cultivada. Com relação à América Latina o país é considerado o maior consumidor de agrotóxicos, sendo seu consumo estimado em 50% da quantidade comercializada nesta região (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001).

São três os principais tipos de pesticidas utilizados na agricultura e que podem causar intoxicação às abelhas: os inseticidas, os herbicidas e os fungicidas. Embora os herbicidas sejam mais utilizados, em geral a toxicidade desse grupo de substâncias é inferior à dos inseticidas. Entre os pesticidas, os inseticidas são os responsáveis pelos maiores danos às abelhas e as principais classes desses produtos são: carbamatos, organofosforados, piretroides, piretrinas e neonicotinoides.

Os organofosforados são uma das classes de inseticidas amplamente utilizados na agricultura. O Brasil é um dos maiores consumidores desses produtos no mundo, tendo participado com cerca de 7% no consumo mundial (BRASIL, 1998). Esses compostos são considerados altamente tóxicos (CLAUDIANOS et al., 2006) e atuam bloqueando irreversivelmente a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) sobre a acetilcolina, evitando a hidrólise desse neurotransmissor, resultando em paralisia espástica e morte (SARTOR; SANTARÉM, 2006).

Entre os inseticidas organofosforados, o dimetoato ($C_5H_{12}NO_3PS_2$) é um dos compostos mais utilizados pelos agricultores no país, tendo aplicação nas culturas de amendoim, cebola, alho, café, feijão, melancia, melão, tomate, berinjela, pimentão, trigo, maçã, pêssego, pera, plantas ornamentais e roseiras (PINHEIRO; FREITAS, 2010). Além disso, esse inseticida é usado em plantações de soja, algodão e citros (BRASIL, 2014), e com grande frequência nas plantações de batata, sendo o seu monitoramento em culturas uma prioridade (PARAÍBA; KATAGUIRI, 2008).

O dimetoato apresenta alta toxicidade para invertebrados em geral, principalmente para as abelhas melíferas. No estudo de Waller et al. (1984) foi observada alta mortalidade de abelhas melíferas 24 horas após a aplicação de dimetoato em culturas de limão. Gough, McIndoe e Lewis (1994) calcularam a dose letal média (DL_{50}) de dimetoato obtida através de

intoxicação oral, em linhagens européias de *A. mellifera* adultas. O valor obtido desse teste foi de 0,18 µg/abelha, indicando alta toxicidade.

A intoxicação oral é uma das principais formas de contaminação por dimetoato, uma vez que esse inseticida apresenta ação sistêmica nos organismos. Essa característica faz com que plantas tratadas com dimetoato absorvam as moléculas de inseticida e incorporem essas substâncias ao seu organismo, produzindo néctar tóxico (BARKER; LEHNER; KUNZMANN, 1980). Waller et al. (1984) encontraram altos níveis tóxicos de resíduos no néctar produzido por limoeiros, até 10 dias após o tratamento com dimetoato. Além disso, foi observado que, após coletarem o néctar contaminado, as operárias forrageadoras levaram resíduos de dimetoato para a colônia, acabando por introduzi-los à sua alimentação. Esse inseticida é considerado um padrão de referência internacional, apresentando grande importância para estudos de toxicidade oral em abelhas (OECD, 1998).

O dimetoato, assim como outros organofosforados, atua no sistema nervoso das abelhas inibindo a ação de AChE, sendo que a maior quantidade dessa enzima localiza-se no cérebro (BADIOU; MELED; BELZUNCES, 2008). O sistema nervoso central das abelhas é constituído pelo cérebro e por uma cadeia nervosa ventral, composta por uma série de gânglios. O cérebro é o principal centro de associação, sendo a sede da integração das atividades, que produzem os padrões organizados do comportamento de longa duração, governando suas modificações pela aprendizagem (CHAPMAN, 1998). Esse órgão apresenta três massas ganglionares: o protocérebro, que é a maior e mais complexa região, constituída pelos corpos pedunculados, ponte protocerebral, corpo central e lobos acessórios, além de receber os nervos dos lobos ópticos; o deutocérebro, que apresenta os lobos antenais e os axônios motores e sensoriais das antenas; e o tritocérebro que contém os centros tritocerebrais. Os corpos pedunculados do protocérebro são também conhecidos como corpos pedunculados (*mushroom bodies*). Essas estruturas são as mais volumosas e apresentam mais células e sinapses nos insetos com o comportamento e o aprendizado mais complexo, uma vez que esse é o centro mais importante de memória (DALY; DOYEN; PURCELL, 1998).

Trabalhos realizados avaliando a atividade de compostos tóxicos sobre *A. mellifera* analisaram a capacidade de tolerância dessas abelhas a determinados inseticidas, verificando haver mecanismos de desintoxicação, constituídos, principalmente, de enzimas produzidas pelo intestino (SMIRLE; WINSTON, 1988; YU; ROBINSON; NATION, 1984). As carboxilesterases (CaEs) são enzimas encontradas no intestino de abelhas que desempenham importantes funções no processo de desintoxicação (CLAUDIANOS et al., 2006). Essa enzima está profundamente envolvida no metabolismo de inseticidas organofosforados e

contribui para a aquisição de resistência metabólica a esses produtos. (OAKESHOTT et al., 2005; RANSON; HEMINGWAY, 2005).

O tubo digestório das abelhas, em geral, é dividido em intestino anterior ou estomodeu, intestino médio ou ventrículo e intestino posterior ou proctodeo (SNODGRASS, 1956). No ventrículo é onde ocorre a maior parte da digestão e a absorção dos nutrientes e substâncias químicas. O ventrículo de abelhas adultas possui três tipos de células: as células digestivas, principais constituintes do epitélio ventricular, que sintetizam enzimas digestivas e absorvem nutrientes; as células endócrinas, que estão distribuídas de forma esparsa na parede do órgão e produzem hormônios e as células regenerativas, responsáveis pela reestruturação do epitélio, que estão agrupadas em ninhos localizados na porção basal do epitélio (CRUZ-LANDIM; SILVA-DE-MORAES; SERRÃO, 1996).

As células digestivas têm um tempo de vida limitado, diminuindo ainda mais em situações patológicas e toxicológicas, onde se encontra maior quantidade de células em degeneração. Para substituir as células mortas e desse modo recompor o epitélio do ventrículo, as células regenerativas sofrem um processo de diferenciação, do qual resulta uma nova célula digestiva que substituirá a célula que foi eliminada na luz do ventrículo (CRUZ-LANDIM, 1999).

O ventrículo apresenta alterações morfológicas em estudos toxicológicos envolvendo as abelhas melíferas. Em um trabalho com operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, Oliveira et al. (2014) observaram que as abelhas tratadas com concentrações subletais de tiametoxam apresentaram células digestivas com vacuolização citoplasmática, aumento de secreção apócrina e aumento da eliminação dessas células, após 1 dia de intoxicação. Além disso, as células regenerativas apresentaram vacuolização do primeiro ao quinto dia de experimento e o número de células presentes nos ninhos diminuiu ao longo dos primeiros dias de intoxicação. Catae et al. (2014) encontraram alterações ultraestruturais nas células digestivas de abelhas africanizadas tratadas com uma concentração subletal de tiametoxam dez vezes menor que a concentração letal média. Após 1 dia de exposição, essas células apresentaram núcleo com formato irregular, mitocôndrias com diminuição de cristas e retículos endoplasmáticos rugosos com menor quantidade de ribossomos aderidos.

2 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a toxicidade oral do dimetoato para abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, por meio da determinação da concentração letal média (CL₅₀);
- Avaliar a sobrevivência dessas abelhas quando intoxicadas por concentrações subletais de dimetoato;
- Analisar, após a intoxicação oral por concentrações subletais de dimetoato em períodos de exposição contínua:
 - a atividade da enzima AChE no cérebro e a atividade da enzima de desintoxicação CaE no ventrículo dessas abelhas;
 - as possíveis alterações histológicas, histoquímicas e ultraestruturais nos corpos pedunculados e no ventrículo dessas abelhas.

3 CAPÍTULO 1: TOXICIDADE ORAL DO DIMETOATO PARA ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera*) E O EFEITO DE CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS NA SOBREVIVÊNCIA

Rodrigo Avelaira Barbosa¹, Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin², Osmar Malaspina¹

¹ Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA) – Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – Departamento de Biologia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rio Claro, São Paulo.

² Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) – Departamento de Biologia – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Sorocaba, São Paulo.

3.1 RESUMO

As abelhas africanizadas possuem grande importância econômica para a agricultura brasileira por realizarem a polinização de diversas espécies vegetais cultivadas. O uso intensivo de pesticidas agrícolas, principalmente os inseticidas, é considerado como uma das grandes causas da perda de colônias de abelhas, registrada em vários países. O dimetoato é um dos inseticidas mais utilizados no Brasil, sendo aplicado em várias culturas polinizadas por essas abelhas. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a toxicidade oral do inseticida dimetoato para abelhas africanizadas e analisar o efeito de concentrações subletais desse inseticida na sobrevivência dessas abelhas. Foi efetuado um ensaio de toxicidade oral para a determinação da concentração letal média (CL_{50}) após 24 horas. Com base na CL_{50} obtida, foram estabelecidas duas concentrações subletais ($CL_{50}/100$ e $CL_{50}/10$) para a realização do ensaio de sobrevivência de abelhas contaminadas por baixas concentrações de dimetoato na dieta. A CL_{50} obtida foi equivalente a $7,96 \pm 0,45$ ng i. a./ μ L de dieta. As abelhas tratadas com a $CL_{50}/100$ apresentaram uma sobrevivência semelhante ao grupo controle. Já as abelhas tratadas com a $CL_{50}/10$ tiveram redução significativa da sobrevivência. Os resultados mostram que o dimetoato é altamente tóxico para as abelhas africanizadas e que a exposição contínua à dieta contendo uma concentração subletal dez vezes menor que a CL_{50} reduz a sobrevivência dessas abelhas. Esses efeitos prejudiciais são comparáveis aos efeitos de inseticidas neonicotinoides observados em abelhas africanizadas.

Palavras-chave: Inseticida. Intoxicação. Concentração letal média. Análise de sobrevivência.

3.2 INTRODUÇÃO

As abelhas melíferas (*Apis mellifera*) são insetos eussociais que possuem ampla distribuição na superfície terrestre, podendo ser encontrados em regiões tropicais e zonas temperadas. No Brasil, os indivíduos dessa espécie são híbridos resultantes do cruzamento de subespécies europeias (*Apis mellifera mellifera* e *Apis mellifera ligustica*) introduzidas durante o século 17, com uma subespécie africana (*Apis mellifera scutellata*) introduzida em 1956 (VANDAME et al., 2002). Após esse processo de miscigenação, os híbridos passaram a ser denominados abelhas africanizadas. Essas abelhas se adaptaram muito bem às condições climáticas brasileiras, se espalhando por todo o território nacional.

As abelhas africanizadas são muito importantes para a agricultura brasileira por realizarem a polinização de diversas espécies vegetais cultivadas (CRANE, 1999). Dentre as culturas de maior importância econômica, se destacam café, soja, citros, trigo e algodão. Essa contribuição se deve, principalmente, ao fato dessas abelhas serem generalistas e de fácil manejo (MORETI et al., 1996).

Nos últimos anos, vem ocorrendo o desaparecimento das abelhas em várias regiões do hemisfério norte. Esse fenômeno, conhecido como *Colony Collapse Disorder* (CCD), teve os principais casos registrados nos Estados Unidos (VANENGELSDROP et al., 2009) e ainda não foi completamente elucidado. As possíveis causas para o CCD são as infecções por vírus (COX-FOSTER et al., 2007), *Nosema* spp. (CAMERON et al., 2011), *Varroa destructor* (THOMPSON et al., 2003) e o efeito de pesticidas (JOHNSON et al., 2010), principalmente a classe dos inseticidas, ou ainda o efeito sinérgico entre esses fatores (VIDAU et al., 2011). Estudos indicam que os inseticidas parecem ser um dos fatores que mais contribuem para a perda de colônias (BLACQUIÈRE et al., 2012). No Brasil, casos de mortalidade de abelhas foram registrados, principalmente nas regiões sul e sudeste do país. Entre 2008 e 2010, cerca de 5000 colônias de abelhas africanizadas foram perdidas na região central do estado de São Paulo, sendo a intoxicação por inseticidas uma das principais causas (MALASPINA et. al, 2010).

Os organofosforados são uma classe de inseticidas amplamente utilizados na agricultura. O Brasil é um dos maiores consumidores desses produtos no mundo, com uma participação que equivale a até 7% do consumo mundial (BRASIL, 1998). Esses compostos são considerados altamente tóxicos e atuam bloqueando irreversivelmente a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) sobre a acetilcolina, evitando a hidrólise deste neurotransmissor, resultando em paralisia espástica e consequente morte do inseto intoxicado (CLAUDIANOS

et al., 2006). Entre os inseticidas organofosforados, o dimetoato é bastante utilizado no Brasil e sua aplicação é realizada em plantações de grande importância econômica, como trigo, algodão, maçã e citros (BRASIL, 2014). Além disso, resíduos desse inseticida também podem ser encontrados em cultivos no Brasil, como banana, abacaxi, pepino e uva (ANVISA, 2013). Todas essas culturas são visitadas e polinizadas por abelhas africanizadas, o que coloca esses insetos benéficos para a agricultura em alto risco de contaminação pelo dimetoato.

A intoxicação oral é uma das principais formas de contaminação por dimetoato, uma vez que esse inseticida apresenta ação sistêmica. Essa característica faz com que plantas tratadas com dimetoato absorvam as moléculas de inseticida e incorporem essas substâncias ao seu organismo, produzindo néctar tóxico (BARKER; LEHNER; KUNZMANN, 1980). Waller et al. (1984) encontraram resíduos de dimetoato no néctar produzido por limoeiros, até 10 dias após o tratamento com esse inseticida. Foi observado que, após coletarem o néctar contaminado, as abelhas operárias forrageiras levaram resíduos de dimetoato para a colônia, acabando por introduzi-los à sua alimentação. Dessa forma, essas concentrações subletais de inseticida que chegam à colônia podem ser mantidas por tempo prolongado no alimento armazenado, causando aumento de mortalidade da cria e de abelhas recém-emergidas a longo prazo (MOFFETT; MACDONALD; LEWIN, 1970).

Com base nessas informações, os objetivos deste trabalho foram avaliar a toxicidade oral do inseticida dimetoato para *A. mellifera* africanizada e analisar o efeito de concentrações subletais desse inseticida na sobrevivência dessas abelhas.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada foram coletadas de colônias do apiário da UNESP – Rio Claro. Para considerar a variabilidade genética entre as colônias, as abelhas foram coletadas de três diferentes colônias saudáveis, todas contendo número semelhante de indivíduos e quantidade de alimento. Imediatamente após a coleta, as abelhas de cada colônia foram colocadas em potes plásticos (1.000 mL) e acondicionadas em incubadora a 32 ± 1 °C e umidade relativa de $60 \pm 10\%$. As abelhas passaram por um período de jejum de 2 h para garantir que se alimentassem a partir do início do experimento.

Os ensaios foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP – Rio Claro, de acordo com as diretrizes internacionais da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), com algumas adaptações. As abelhas foram acondicionadas em potes descartáveis de plástico (250 mL) contendo um tubo plástico (1,5 mL) para colocar a dieta. Em cada pote foram acondicionados 10 indivíduos. Todos os grupos experimentais foram montados em triplicatas, sendo cada réplica composta por indivíduos de uma colônia diferente, totalizando 30 abelhas por grupo experimental.

Para avaliar a toxicidade oral do inseticida dimetoato foi realizado um ensaio de determinação da concentração letal média (CL_{50}) (OECD, 1998). O grupo controle recebeu dieta composta de solução aquosa de sacarose a 50%. Os grupos tratados com dimetoato receberam a dieta contendo o inseticida em diferentes concentrações. Para preparar as dietas contaminadas, foi utilizada a solução estoque de dimetoato PESTANAL[®] (99,6% de pureza, Sigma-Aldrich, Brasil) contendo 1.000 ng i. a./ μ L de água. A partir desta solução foram feitas sucessivas diluições em solução de sacarose a 50% para a obtenção de dietas com as seguintes concentrações de dimetoato: 6, 8, 10, 12 e 14 ng i. a./ μ L de dieta. O experimento teve início a partir do momento em que as dietas foram oferecidas às abelhas de cada grupo. Após 24 h do início do experimento, a mortalidade dos indivíduos foi registrada e os dados foram submetidos à análise estatística.

Com base na CL_{50} (24 h) obtida após as análises do ensaio de toxicidade, foram estabelecidas duas concentrações subletais para avaliar a sobrevivência das abelhas quando contaminadas por baixas concentrações de dimetoato na dieta. Os valores escolhidos foram equivalentes a $CL_{50}/100$ e $CL_{50}/10$. Para realizar o ensaio de sobrevivência, foram organizados três grupos experimentais. O grupo controle recebeu a dieta de solução de sacarose a 50% e cada grupo de tratamento recebeu a dieta de solução de sacarose contendo as respectivas concentrações subletais do inseticida. Cada grupo experimental recebeu

somente o respectivo tipo de dieta ao longo de todos os dias do experimento, havendo o preenchimento diário dos alimentadores. O experimento começou assim que as dietas foram oferecidas às abelhas e durou até a morte do último indivíduo. A mortalidade foi registrada a cada 6 h e os dados foram organizados para a realização da análise estatística.

Os dados de mortalidade do ensaio de toxicidade foram submetidos à análise probit do software BioStat 2009 (Analystsoft), pelo método de Finney (distribuição log-normal). Os dados de mortalidade do ensaio de sobrevivência foram analisados com auxílio do software SigmaPlot 11.0, (Systat), utilizando o teste Log-Rank para comparar as curvas de sobrevivência de cada grupo experimental (método de Kaplan-Meier). Para identificar as diferenças estatísticas significativas entre os grupos foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak.

3.4 RESULTADOS

Após a análise da mortalidade de *A. mellifera* africanizada registrada no ensaio de toxicidade, a CL_{50} (24 h) oral do dimetoato foi calculada. O valor obtido foi $7,96 \pm 0,45$ ng i. a./ μ L de dieta (L. C.₉₅ % = 7,01 – 8,75 ng i. a./ μ L de dieta; G. L. = 3; $\chi^2 = 0,77$) (Figura 1). Com base nesse valor, foram calculadas concentrações subletais correspondentes a $CL_{50}/100$ e $CL_{50}/10$, equivalentes a 0,0796 e 0,796 ng i. a./ μ L de dieta, respectivamente. Essas concentrações de dimetoato foram incorporadas às dietas oferecidas às abelhas dos grupos experimentais, durante o ensaio de sobrevivência.

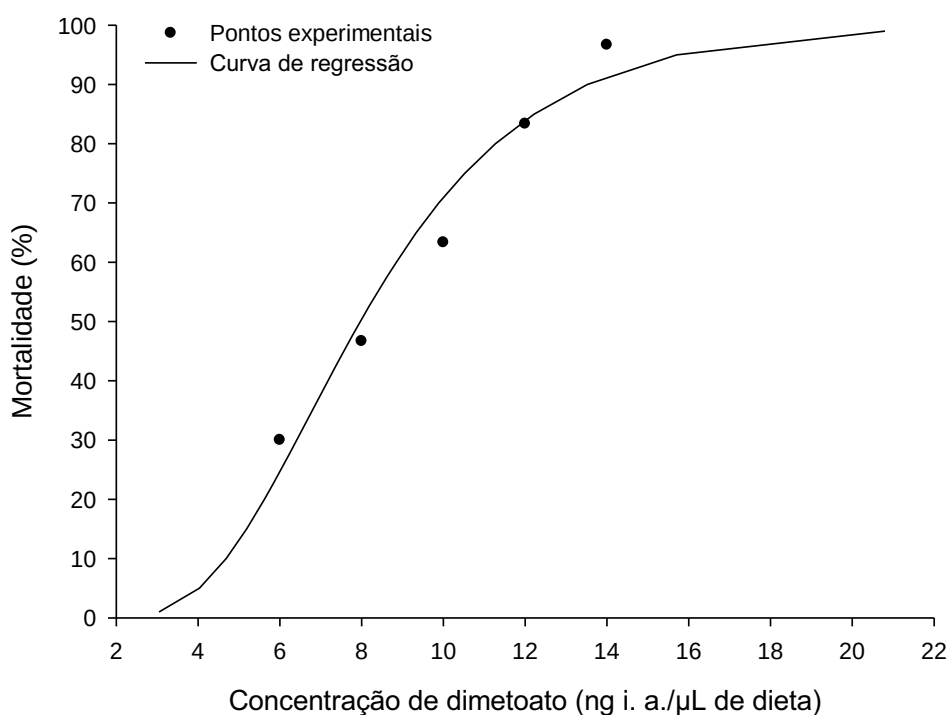


Figura 1. Toxicidade oral (24 h) do inseticida dimetoato para abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada. $CL_{50} = 7,96$ ng i. a./ μ L de dieta (L. C.₉₅ % = 7,01 – 8,75; G. L. = 3; $\chi^2 = 0,77$).

A análise de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier está representada na Figura 2. O teste Log-Rank permitiu a comparação entre as curvas de sobrevivência dos grupos experimentais e o cálculo do tempo médio de sobrevivência (TS_{50}) para cada curva. Foi constatada diferença estatística significativa entre as curvas de sobrevivência ($p < 0,001$). O grupo alimentado com dieta contendo a $CL_{50}/100$ teve um valor de TS_{50} equivalente a $315,6 \pm 15,39$ h (L. C.₉₅ % = 285,44 – 345,76 h), estatisticamente semelhante ao observado no grupo controle, o qual apresentou um TS_{50} de $328 \pm 16,23$ h (L. C.₉₅ % = 296,06 – 359,93 h). Não

houve diferença significativa entre esses grupos ($p > 0,05$). O grupo que recebeu dieta contendo a $CL_{50}/10$ apresentou uma diminuição significativa da sobrevivência em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), com TS_{50} igual a $119,4 \pm 2,88$ h (L. C.₉₅ % = 113,75 – 125,05 h).

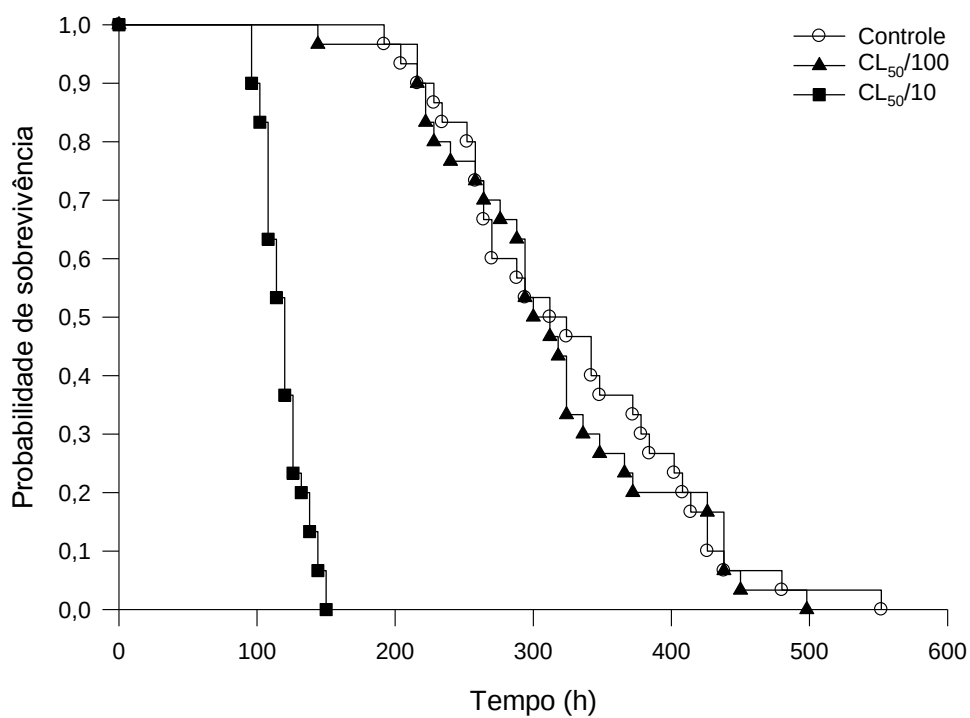


Figura 2. Sobrevivência de operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada quando expostas a dietas contendo concentrações subletais de dimetoato.

3.5 DISCUSSÃO

Este trabalho apresenta a toxicidade oral do inseticida dimetoato para abelhas africanizadas. A CL_{50} obtida após 24 h foi igual a 7,96 ng i. a./ μ L de dieta, indicando alta toxicidade para as abelhas. Esse valor é próximo ao registrado no mais amplo trabalho envolvendo a toxicidade do dimetoato em abelhas europeias, realizado por Gough, McIndoe e Lewis (1994). Os autores calcularam a média de valores de DL_{50} oral de dimetoato ao longo de 12 anos de estudo e obtiveram 0,177 μ g i. a./abelha (24 h). Para as análises, eles consideraram que cada abelha ingeriu uma média de 20 μ L de dieta contaminada. Dividindo 0,177 μ g por 20 μ L e corrigindo a unidade de concentração (μ g para ng), tem-se que a estimativa média de valores de CL_{50} à qual as abelhas foram expostas é equivalente a 8,85 ng i. a./ μ L de dieta. Dessa forma, o dimetoato apresenta uma toxicidade semelhante para abelhas africanizadas em comparação às abelhas europeias. A leve diferença observada entre esses valores de CL_{50} pode estar relacionada às idades das abelhas utilizadas em cada trabalho. No presente trabalho, a toxicidade do dimetoato foi avaliada em abelhas recém-emergidas, que são mais suscetíveis à ação de poluentes ambientais por não possuírem ainda uma alta atividade de enzimas de desintoxicação (glutathione S-transferase e oxidases de funções mistas) em seu organismo (SMIRLE; WINSTON, 1988). Com isso, a ação do inseticida deve ser levemente mais intensa nessas abelhas do que em abelhas forrageiras, as quais foram utilizadas nos experimentos de Gough, McIndoe e Lewis (1994).

A alta toxicidade do dimetoato para abelhas africanizadas é também comparável à toxicidade do imidacloprido. Rossi et al. (2013), avaliaram a toxicidade oral desse inseticida neonicotinoide em abelhas africanizadas e encontraram a DL_{50} para o imidacloprido igual a 80 ng/abelha. Considerando que as abelhas ingeriram em média 10 μ L de dieta (ROSSI et al., 2014 – comunicação pessoal), a estimativa da CL_{50} é equivalente a 8 ng/ μ L de dieta. Este valor é bastante próximo à CL_{50} do dimetoato relatada no presente trabalho, apontando uma toxicidade semelhante. Dessa forma, assim como o imidacloprido, o dimetoato apresenta um alto risco para esses importantes polinizadores.

Além da determinação da toxicidade oral do dimetoato, este trabalho avaliou o efeito de concentrações subletais desse inseticida na sobrevivência das abelhas africanizadas. A análise mostrou que não são somente as concentrações letais de dimetoato que podem ser prejudiciais às abelhas. Quando expostas à $CL_{50}/10$ (0,796 ng i. a./ μ L de dieta), as abelhas sobreviveram em média 119,4 h, em comparação ao período de 328 h observado nas abelhas do grupo controle. Isso significa que houve redução de 63,6% no período de vida dessas

abelhas, o que é bastante preocupante, já que se trata de uma concentração de dimetoato dez vezes mais baixa que a CL_{50} . Essa rápida mortalidade também evidencia a alta toxicidade desse inseticida. Quando alimentadas com a dieta contendo a $CL_{50}/100$ (0,0796 ng i. a./ μ L de dieta), as abelhas sobreviveram em média 315,6 h. Esse TS_{50} , apesar de ser mais curto que o registrado no grupo controle, não apresentou diferença significativa na análise estatística. Isso mostra que a concentração de dimetoato cem vezes mais baixa que a CL_{50} não interfere na sobrevivência de abelhas africanizadas. Isso ocorreu, provavelmente, pelo fato dessa concentração ser baixa e, portanto, de maior tolerância para as abelhas. Como o dimetoato apresenta um efeito diretamente dependente da concentração, é mais provável que concentrações baixas apresentem efeitos mais tênues ou até nulos em relação às concentrações mais altas.

O efeito de concentrações subletais de dimetoato na sobrevivência de abelhas africanizadas observado no presente trabalho é semelhante ao efeito causado pelo tiametoxam, outro inseticida neonicotinoide. No estudo de Oliveira et al. (2014), os autores avaliaram o efeito de duas concentrações subletais ($CL_{50}/100$ e $CL_{50}/10$) na sobrevivência dos indivíduos. O tratamento com a $CL_{50}/100$ de tiametoxam resultou no tempo médio de sobrevivência de 192,96 h, estatisticamente igual ao observado nos grupos controles. Como observado para o dimetoato, a $CL_{50}/100$ de tiametoxam não promoveu diminuição da mortalidade. Já o tempo médio de sobrevivência registrado após o tratamento oral com a $CL_{50}/10$ foi de 125,28 h, um valor semelhante ao encontrado para o dimetoato no presente trabalho. Isso mostra que, assim como ocorre com o tiametoxam, a $CL_{50}/10$ de dimetoato é prejudicial para a sobrevivência das abelhas. Apesar de o tiametoxam possuir uma toxicidade maior (4,28 ng i. a./ μ L de dieta) que a do dimetoato (7,96 ng i. a./ μ L de dieta), o efeito das respectivas concentrações subletais nessas abelhas foi semelhante. Dessa forma, assim como o tiametoxam, o dimetoato também oferece risco para a sobrevivência das abelhas africanizadas.

Com base nos resultados deste trabalho, é possível concluir que o inseticida dimetoato é altamente tóxico para abelhas africanizadas e que a exposição contínua dessas abelhas a uma dieta contendo uma concentração subletal dez vezes menor que a CL_{50} aqui estabelecida reduz a sobrevivência. Estudos posteriores verificarão os efeitos subletais que essas abelhas podem sofrer em órgãos relacionados diretamente com a ação do inseticida no órgão alvo (cérebro) e no órgão envolvido na sua absorção por via oral (ventrículo).

3.6 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**: Relatório de atividades de 2011 e 2012. Brasília: Gerência-Geral de Toxicologia, 2013.

BARKER, R. J.; LEHNER, Y.; KUNZMANN, M. R. Pesticides and honey bees: nectar and pollen contamination in alfalfa treated with dimethoate. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 9, n. 2, p. 125-133, fev. 1980.

BLACQUIÈRE, T.; SMAGGHE, G.; VAN GESTEL, C.; MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, New York, v. 21, n. 4, p. 973-992, mai. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2014. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 17 set. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Intoxicações por agrotóxicos. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 4ª ed. Brasília: FUNASA, 1998.

CAMERON, S. A.; LOZIER, J. D.; STRANGE, J. P.; KOCH, J. B.; CORDES, N.; SOLTER, L. F.; GRUSWOLD, T. L. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 2, p. 662-667, jan. 2011.

CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R. M.; BISWAS, S.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT, J. G. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 615-636, out. 2006.

COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D.; MORAN, N. A.; QUAN, P. L.; BRIESE, T.; HORNIG, M.; GEISER, D. M.; MARTINSON, V.; VANENGELSDORP, D.; KALKSTEIN, A. L.; DRYSDALE, A.; HUI, J.; ZHAI, J.; CUI, L.; HUTCHISON, S. K.; SIMONS, J. F.; EGHOLM, M.; PETTIS J. S.; LIPKIN, W. I. A metagenomic survey of microbes in honey bee Colony Collapse Disorder. **Science**, Washington, v. 318, n. 5848, p. 283-287, out. 2007.

CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. New York: Routledge, 1999.

GOUGH, H. J.; MCINDOE, E. C.; LEWIS, G. B. The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera* L.) 1981–1992. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 33, n. 2, p. 119-125, mar. 1994.

JOHNSON, R. M.; ELLIS, M. D.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, M. Pesticides and honey bee toxicity - USA. **Apidologie**, Versailles, v. 41, n. 3, p. 312-331, mai./jun. 2010.

MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; SOUZA, T. F. Defesa de apiários e meliponários contra agrotóxicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 18.; CONGRESSO BRASILEIRO DE MELIPONICULTURA, 4., 2010, Cuiabá, **Anais...** Cuiabá: Confederação Brasileira de Apicultura, 2010, 5p.

MOFFETT, J. O.; MACDONALD, R. H.; LEWIN, M. D. Toxicity of carbaryl contaminated pollen to adult honey bees. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 63, n. 2, p. 475-476, abr. 1970.

MORETI, A. C de C. C.; SILVA, R. M. B.; SILVA, E. C. A.; ALVES, M. L. T. M. F.; OTSUK, I. P. Aumento na produção de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) pela ação de insetos polinizadores. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 53, n. 2-3, p. 280-284, mai./dez. 1996.

OLIVEIRA, R. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the Africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, New York, v. 29, n. 10, p. 1122-1133, out. 2014.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **OECD guidelines for the testing of chemicals: honeybees, acute oral toxicity test**. 1998. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-213-honeybees-acute-oral-toxicity-test_9789264070165-en>. Acesso em: 16 dez. 2014.

ROSSI, C. A.; ROAT, T.C.; TAVARES, D. A.; CINTRA-SOCOLOWSKI, P.; MALASPINA, O. Brain morphophysiology of Africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 65, n. 2, p. 234-243, ago. 2013.

SMIRLE, M. J.; WINSTON, M. L. Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: an adaptation for foraging in contaminated ecosystems. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 66, n. 9, p. 1938-1942, jan. 1988.

THOMPSON, H.; BALL, R.; BROWN, M.; BEW, M. Varroa destructor resistance to pyrethroid treatments in the United Kingdom. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 56, n. 1, p. 175-181, 2003.

VANDAME, R.; MORAND, S.; COLIN, M-E.; BELZUNCES, L. P. Parasitism in the social bee *Apis mellifera*: quantifying costs and benefits of behavioral resistance to *Varroa destructor* mites. **Apidologie**, Versailles, v. 33, n. 5, p. 433-445, set./out. 2002.

VANENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Colony collapse disorder: a descriptive study. **Plos One**, San Francisco, v. 4, n. 8, e6481, ago. 2009.

VIDAU, C.; DIOGON, M.; AUFAUVRE, J.; FONTBONNE, R.; VIGUÈS, B.; BRUNET, J. L.; TEXIER, C.; BIRON, D. G.; BLOT, N.; EL ALOUI, H.; BELZUNCES, L. P.; DELBAC, F. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 6, e21550, jun. 2011.

WALLER, G. D.; ERICKSON, B. J.; HARVEY, J.; MARTIN, J. H. Effects of dimethoate on honey bees (Hymenoptera: Apidae) when applied to flowering lemons. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 77, n. 1, p. 70-74, fev. 1984.

4 CAPÍTULO 2: EFEITOS SUBLETAIS DO DIMETOATO NOS CORPOS PEDUNCULADOS DE ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera*)

Rodrigo Avelaira Barbosa¹, Daiana Antonia Tavares¹, Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin², Osmar Malaspina¹

¹ Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA) – Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – Departamento de Biologia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rio Claro, São Paulo.

² Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) – Departamento de Biologia – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Sorocaba, São Paulo.

4.1 RESUMO

O dimetoato é um inseticida bastante utilizado em uma série de culturas de grande importância para agricultura brasileira. Sua aplicação pode afetar insetos benéficos, como as abelhas, que são importantes polinizadoras dessas culturas. Ao entrar em contato com essas abelhas, o dimetoato age diretamente no cérebro promovendo a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que resulta em paralisia seguida de morte. Os objetivos desse trabalho foram avaliar os efeitos subletais do dimetoato na atividade da AChE no cérebro e nas características histológicas, histoquímicas e ultraestruturais dos corpos pedunculados de abelhas africanizadas. Com base na concentração letal média (CL_{50}) previamente obtida, duas concentrações subletais ($CL_{50}/100$ e $CL_{50}/10$) foram estabelecidas para serem administradas via oral durante 1, 5 e 13 dias. A $CL_{50}/100$ promoveu poucas alterações histológicas e histoquímicas nas células de Kenyon. Estas alterações foram recuperadas ao longo dos dias de exposição contínua. Já a $CL_{50}/10$, promoveu alterações leves após 1 dia e alterações intensas após 5 dias. Neste período, foram observadas a diminuição da atividade da AChE, a presença de células de Kenyon com citoplasma condensado, organelas degradadas e núcleo irregular contendo cromatina compactada. Este conjunto de alterações sugere que essas células podem estar em estágios iniciais de morte celular. Prejuízos nas células de Kenyon podem comprometer funções importantes como comunicação, aprendizado e orientação, as quais podem afetar o comportamento dessas abelhas e colocar em risco a viabilidade de toda a colônia.

Palavras-chave: Cérebro. Acetilcolinesterase. Células de Kenyon. Histologia. Ultraestrutura.

4.2 INTRODUÇÃO

O dimetoato é um inseticida pertencente à classe dos organofosforados, compostos amplamente utilizados na agricultura brasileira (BRASIL, 1998). Sua aplicação é realizada em muitas plantações de importância econômica relevante para o país e seus resíduos podem ser identificados em cultivos de trigo, algodão, maçã e citros (ANVISA, 2013; BRASIL, 2014). Isso coloca em risco a vida de insetos benéficos, como as abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), que visitam essas plantações e realizam importantes serviços de polinização. Esse inseticida é considerado altamente tóxico para abelhas africanizadas, apresentando uma CL_{50} oral equivalente a 7,96 ng i. a./ μ L de dieta (Capítulo 1).

Quando em contato com as abelhas, o dimetoato age diretamente no sistema nervoso central, inibindo a ação da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela rápida hidrólise de acetilcolina em sinapses colinérgicas, permitindo o controle preciso da transmissão nervosa. A inibição da função dessa enzima resulta em paralisia espástica e consequente morte do inseto intoxicado (CLAUDIANOS et al., 2006). Pelo fato de ser alvo direto da ação de organofosforados, a AChE é considerada como um biomarcador de neurotoxicidade, que é amplamente utilizado para identificar a exposição dos animais a esses inseticidas (FULTON; KEY, 2001). A maior quantidade de AChE está localizada na cabeça, principalmente nos tecidos cerebrais (BELZUNCES; LENOIR-ROUSSEAUX; BOUNIAS, 1988).

O cérebro das abelhas é formado por regiões constituídas por corpos celulares de neurônios, denominadas de somata, e por regiões que contêm os prolongamentos dos neurônios, chamadas de neurólipas (BRANDT et al., 2005; CHAPMAN, 1998). Em abelhas adultas, o cérebro é formado pela fusão de três gânglios: protocérebro, deutocérebro e tritocérebro. No protocérebro estão localizados os corpos pedunculados, estruturas constituídas por neurópilas que formam um par de cálices ligados a um pedúnculo. O interior dos cálices é preenchido pelos corpos celulares de neurônios intrínsecos conhecidos como células de Kenyon (NOCELLI et al., 2011; RYBAK; MENZEL, 1993). Os corpos pedunculados são responsáveis pelo processamento de informações olfativas, visuais, e gustatórias, sendo de grande importância para a plasticidade comportamental das abelhas.

Quando as abelhas são expostas a concentrações letais de inseticida, um dos efeitos mais imediatos é a morte. Porém, o contato com concentrações subletais desses compostos pode não causar morte imediata das abelhas, mas ainda assim, induzir a mudanças no comportamento, orientação e comunicação que afetam toda a colônia (THOMPSON, 2003).

Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram avaliar os efeitos de concentrações subletais de dimetoato na atividade enzimática da AChE no cérebro e nas características histológicas, histoquímicas e ultraestruturais dos corpos pedunculados de abelhas africanizadas.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada foram coletadas de colônias do apiário da UNESP – Rio Claro. Para considerar a variabilidade genética entre as colônias, as abelhas foram coletadas de três diferentes colônias saudáveis, todas contendo número semelhante de indivíduos e quantidade de alimento. Imediatamente após a coleta, as abelhas de cada colônia foram colocadas em potes plásticos (1.000 mL) e acondicionadas em incubadora a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 10\%$. As abelhas passaram por um período de jejum de 2 h para garantir que se alimentassem a partir do início do experimento.

Os ensaios de intoxicação foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP – Rio Claro. As abelhas foram acondicionadas em potes descartáveis de plástico (250 mL) contendo um tubo plástico de microteste (1,5 mL) para colocar a dieta. Em cada gaiola foram acondicionados 10 indivíduos. Todos os grupos experimentais foram montados com indivíduos das três colônias, cada pote contendo abelhas de uma única colônia, totalizando 60 abelhas por grupo experimental.

Durante os ensaios de intoxicação o grupo controle recebeu uma dieta composta de solução aquosa de sacarose a 50%. Com base no ensaio de toxicidade (determinação da CL_{50}) descrito previamente (Capítulo 1), foram estabelecidas duas concentrações subletais de dimetoato para serem adicionadas às dietas dos grupos expostos ao inseticida. Para preparar essas dietas, foi utilizada uma solução estoque de dimetoato PESTANAL® (99,6% de pureza, Sigma-Aldrich, Brasil) contendo 1.000 ng i. a./ μL de água. A partir dessa solução foram feitas sucessivas diluições em solução de sacarose a 50% para a obtenção de dietas contendo as concentrações subletais. Dessa forma, um grupo de tratamento recebeu a $CL_{50}/100$ (0,0796 ng i. a./ μL de dieta) adicionada à dieta e o outro recebeu a $CL_{50}/10$ (0,796 ng i. a./ μL de dieta). Cada um dos três grupos experimentais recebeu somente o respectivo tipo de dieta ao longo de todos os dias do experimento, havendo o preenchimento diário dos alimentadores. Os ensaios tiveram início assim que as dietas foram oferecidas às abelhas. A escolha dos períodos de coleta de abelhas para as análises foi baseada nos resultados do ensaio de sobrevivência relatados no Capítulo 1. Foram considerados como referência os valores de tempo médio de sobrevivência (TS_{50}) para cada concentração subletal testada. Abelhas dos três grupos experimentais foram coletadas após 1 dia (exposição aguda) e 5 dias de exposição contínua (TS_{50} aproximado de abelhas tratadas com a $CL_{50}/10$). As abelhas do grupo controle e do grupo tratado com a $CL_{50}/100$ foram coletadas também após 13 dias de exposição contínua (TS_{50} aproximado de abelhas tratadas com a $CL_{50}/100$). As abelhas do grupo tratado com a

CL₅₀/10 não foram coletadas após 13 dias porque não sobreviveram até o fim desse período. Dessa forma, foram estabelecidos um total de oito grupos experimentais, levando em consideração o tipo de dieta administrada e o período de coleta para as análises.

4.3.1 Atividade enzimática da AChE

Para avaliar o efeito tóxico das duas concentrações subletais de dimetoato nas abelhas, foi realizado um ensaio de cinética enzimática com a AChE, enzima alvo do inseticida. Para cada grupo experimental, 18 abelhas tiveram suas cabeças retiradas e agrupadas em 6 amostras (3 cabeças por amostra). A cada amostra foi adicionada uma quantidade específica de solução de extração (tampão fosfato de sódio 40 mM, pH = 7,4, cloreto de sódio 10 mM e 1% de Triton X100) contendo 10% (m/v) para a realização da maceração. As cabeças foram maceradas durante 1 min com auxílio de um pistilo e os extratos brutos foram centrifugados a 15.000 g, durante 20 min, a 4 °C. Após a centrifugação, os sobrenadantes contendo os extratos proteicos foram coletados e preparados para as análises. Foram preparadas microplacas de 96 poços, adicionando em cada poço 5 µL de extrato proteico de cada amostra, em triplicatas. Após o preparo das placas, foi adicionado em cada poço 195 µL de solução de dosagem (iodeto de acetilcolina 3 mM, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzólico 15 mM e tampão fosfato de sódio 500 mM pH = 7,0), segundo Ellman et al. (1961), para iniciar a atividade enzimática, a 25 °C. As leituras das densidades ópticas foram realizadas no leitor de placas VersaMax (Molecular Devices) na faixa de comprimento de onda de 412 nm, a 25 °C, pelo programa SoftMax Pro 6.3 (Molecular Devices).

As densidades ópticas obtidas nas leituras foram trabalhadas no programa R[®], em função do tempo em que a reação foi observada e da quantidade de extrato utilizada nas amostras. Essas análises resultaram na obtenção da atividade enzimática média de cada uma das 6 amostras, para cada grupo experimental. Para comparar as médias dos grupos, os dados foram então submetidos à análise de variância ANOVA *one way* com auxílio do programa SigmaPlot 11.0, (Systat). Para identificar as diferenças estatísticas entre os grupos, foi utilizado o teste de Holm-Sidak com nível de significância fixado em $p < 0,05$.

4.3.2 Microscopia de luz

Para cada grupo experimental, 5 abelhas foram dissecadas em placas de Petri contendo a respectiva solução fixadora no estereomicroscópio EZ4 (Leica) para a retirada dos cérebros.

Os órgãos foram colocados em solução fixadora de paraformaldeído 4%, transferidos para a solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH = 7,4) e desidratados em graduações crescentes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 90%, 95% e 100%) a 4 °C, segundo Silva-Zacarin et al. (2012). Após a desidratação, os órgãos foram embebidos em historesina (Leica) e polimerizados em historesina com adição do endurecedor catalítico, a 37 °C. Os blocos de resina contendo os cérebros foram seccionados no micrótomo RM2255 (Leica) obtendo-se secções histológicas de 5 µm de espessura. As secções histológicas foram colocadas sobre lâminas de vidro e secas em estufa a 37 °C. Lâminas contendo as secções do cérebro dos indivíduos de cada grupo experimental foram submetidas à coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise histológica dos corpos pedunculados (adaptado de JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M., 1983). As demais lâminas contendo as secções do cérebro dos indivíduos de cada grupo experimental foram submetidas às seguintes técnicas histoquímicas: Xylidine Ponceau, para detecção de proteínas totais (adaptado de JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M., 1983); Azul de Toluidina, para a detecção de ácidos nucléicos e macromoléculas ácidas (adaptado de JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M., 1983); PAS-Alcian Blue, para a detecção de polissacarídeos neutros e ácidos (adaptado de MCMANUS, 1946). Após a realização das técnicas histológicas e histoquímicas, todas as lâminas foram montadas em bálsamo sintético. Os corpos pedunculados dos cérebros foram observados e fotografados ao fotomicroscópio BX-51 (Olympus), equipado com a câmera DP-71 (Olympus), pelo programa DP Controller (Olympus).

4.3.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Para cada grupo experimental, 5 abelhas foram dissecadas em placas de Petri contendo a respectiva solução fixadora no estereomicroscópio EZ4 (Leica) para a retirada dos cérebros. Os órgãos removidos foram colocados em solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH = 7,4), lavados em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH = 7,4) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 h. Os órgãos foram novamente lavados no mesmo tampão, contrastados em acetato de uranila 1%, dissolvido em álcool 10%, por 2 h e desidratados em graduações crescentes de etanol (70% a 100%). Após a desidratação, os órgãos foram embebidos em resina Epon-Araldite e polimerizados em resina mais catalizador, a 60 °C. Os blocos de resina contendo os órgãos foram seccionados no ultramicrotomo Supernova (Reichert) em cortes ultrafinos, colocados sobre grades de cobre e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo. Os corpos pedunculados dos cérebros foram

analisados e fotografados ao microscópio eletrônico de transmissão CM100 (Philips), equipado com a câmera Veleta (Olympus), pelo programa iTEM 5.2 (Olympus).

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Análise enzimática

Os resultados referentes à atividade enzimática da AChE estão resumidos na Figura 1. Após 1 dia, a atividade da AChE nas abelhas expostas à CL₅₀/100 foi equivalente a $186,58 \pm 29,39$ mUA/min/mg de tecido. As abelhas expostas à CL₅₀/10 apresentaram atividade igual a $154,146 \pm 20,343$ mUA/min/mg de tecido. Não houve diferença estatística significativa entre esses dois tratamentos e o respectivo grupo controle, o qual apresentou atividade de $176,01 \pm 28,36$ mUA/min/mg de tecido.

A atividade da AChE em abelhas expostas à CL₅₀/100 por 5 dias foi $192,88 \pm 32,65$ mUA/min/mg de tecido, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle (5 dias), que apresentou atividade igual a $190,39 \pm 25,74$ mUA/min/mg de tecido. No entanto, no grupo de abelhas expostas à CL₅₀/10 por 5 dias foi observada a diminuição da atividade, equivalente a $74,49 \pm 16,10$ mUA/min/mg de tecido. Essa atividade foi significativamente inferior à observada no respectivo grupo controle ($p < 0,001$), correspondendo a uma redução de 60,87%.

As abelhas expostas à CL₅₀/100 por 13 dias apresentaram atividade igual a $141,65 \pm 23,62$ mUA/min/mg de tecido. Não houve diferença estatística significativa entre esse tratamento e o respectivo grupo controle, cuja atividade foi equivalente a $184,10 \pm 29,45$ mUA/min/mg de tecido.

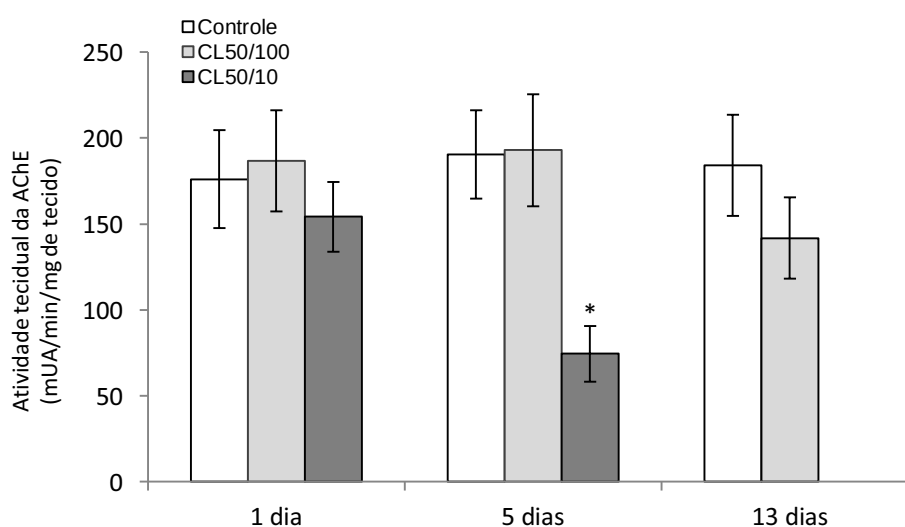


Figura 1. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) presente nos tecidos cerebrais de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, com ou sem a exposição a concentrações subletais de dimetoato. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. (*) diferença estatística significativa em relação ao respectivo controle.

4.4.2 Análise histológica

A análise histológica dos corpos pedunculados corados pela técnica HE evidenciou os corpos pedunculados com sua estrutura característica em todos os grupos experimentais, não havendo diferenças evidentes nos pedúnculos e cálices, os quais são formados por densas regiões de neurópilas compostas por prolongamentos de neurônios e células de glia. As principais diferenças entre os grupos experimentais ocorreram nas células de Kenyon, cujos corpos celulares preenchem o interior dos cálices. Os resultados referentes à intensidade de coloração observada nessas células estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Análises histológicas e histoquímicas das células de Kenyon nos corpos pedunculados de abelhas africanizadas expostas a concentrações subletais de dimetoato

Exposição	Grupo	Histologia	Histoquímica		
		HE	XP	AT	PAS-AB
1 dia	Controle	+	+	+	+
	CL ₅₀ /100	+	++	+	+
	CL ₅₀ /10	++	+++	+	+
5 dias	Controle	+	+	+	+
	CL ₅₀ /100	++	+	+	+
	CL ₅₀ /10	++++	++++	++++	++++
13 dias	Controle	+	+	+	+
	CL ₅₀ /100	+	+	+	+

(+) Reação padrão; (++) Reação levemente intensa; (+++) Reação intensa; (++++) Reação muito intensa; (HE) Hematoxilina e eosina; (XP) Xylidine Ponceau; (AT) Azul de Toluidina; (PAS-AB) PAS-Alcian Blue.

As abelhas expostas à CL₅₀/100 por 1 dia não apresentaram alterações evidentes nas células de Kenyon, quando comparadas ao respectivo controle. Após a exposição à CL₅₀/10 por 1 dia, os corpos pedunculados apresentaram a maioria das células de Kenyon semelhantes às aquelas presentes no controle de 1 dia, porém a minoria destas células, localizadas na região central, apresentaram-se condensadas e com intensa basofilia, evidenciada pela forte intensidade de coloração pela hematoxilina.

Quando expostas à CL₅₀/100 por 5 dias, as abelhas apresentaram corpos pedunculados contendo poucas células de Kenyon com intensa basofilia na região central do interior dos cálices, o que não foi observado no grupo controle de 5 dias. A quantidade de células de Kenyon com basofilia muito intensa nos corpos pedunculados aumentou nas abelhas expostas à CL₅₀/10 por 5 dias (Figuras 2C e 2D). Estas células aparecem concentradas na região centro-basal do interior dos cálices. Elas apresentaram tamanho aparentemente menor que as

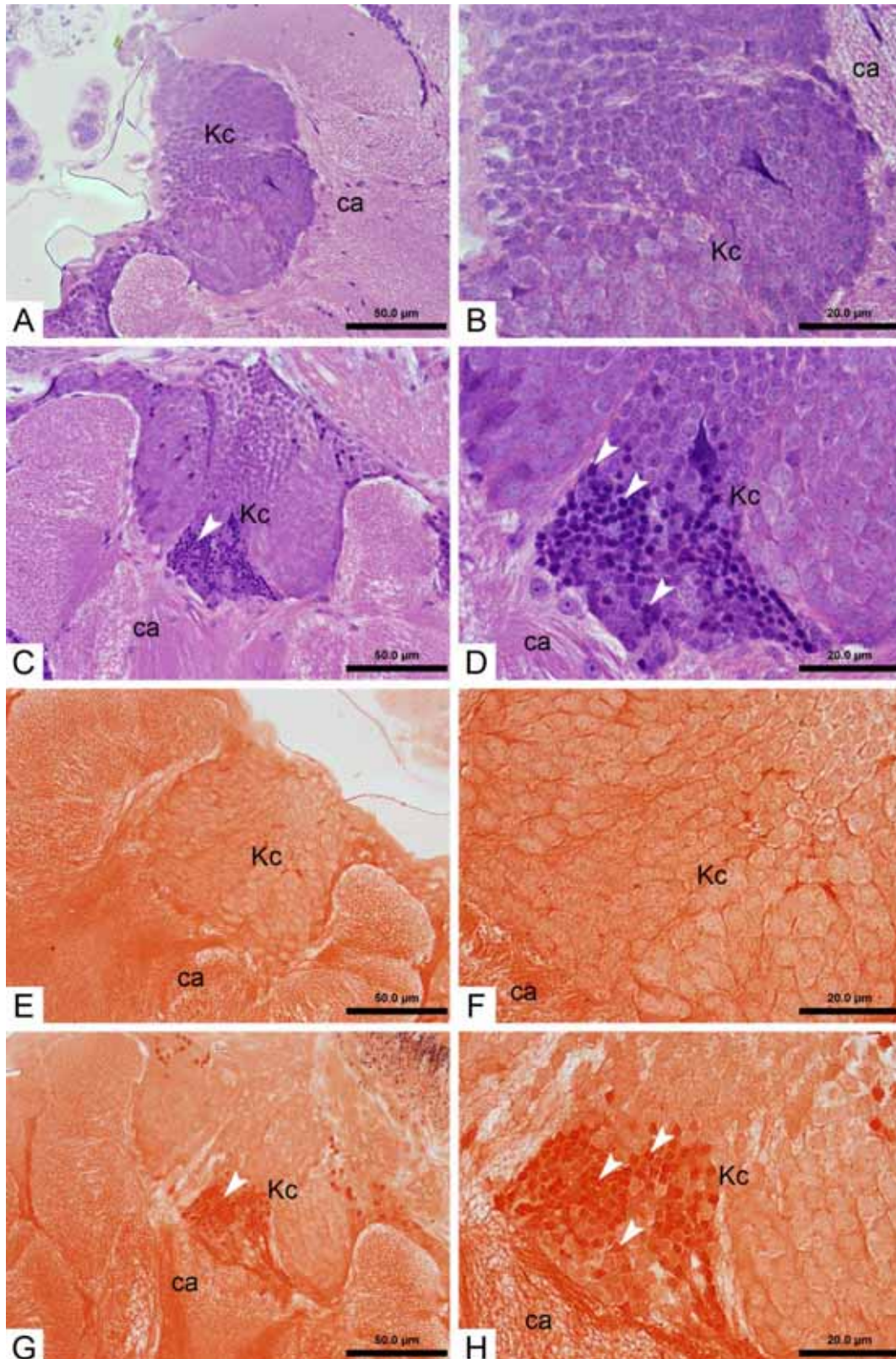


Figura 2. Fotomicrografias dos corpos pedunculados de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, com ou sem exposição ao dimetoato, submetidos às técnicas HE (A-D) e Xylidine Ponceau (E-H). (A) e (B) Visão geral e detalhe de um corpo pedunculado do grupo controle 5 dias. (C) e (D) Visão geral e detalhe de um corpo pedunculado do grupo exposto à CL₅₀/10 por 5 dias. (E) e (F) Visão geral e detalhe de um corpo pedunculado do grupo controle 5 dias. (G) e (H) Visão geral e detalhe de um corpo pedunculado do grupo exposto à CL₅₀/10 por 5 dias. ca = cálice; Kc = células de Kenyon; cabeças de setas = células de Kenyon alteradas.

outras células de Kenyon, exibindo um aspecto condensado. Tanto o núcleo quanto o citoplasma dessas células estavam intensamente corados pela hematoxilina, indicando compactação cromatínica e condensação citoplasmática. Além dessas células mais condensadas, foi possível observar células com intensidade de coloração intermediária, sugerindo que algumas estão mais alteradas que outras. De uma forma geral, todas essas alterações não foram observadas no grupo controle de 5 dias (Figuras 2A e 2B).

Após 13 dias, as abelhas expostas à CL₅₀/100 não apresentaram diferenças morfológicas nas células de Kenyon em relação ao grupo controle.

4.4.3 Análise histoquímica

Pela realização das análises histoquímicas foi possível identificar substâncias específicas presentes nos tecidos dos corpos pedunculados. Os resultados referentes à intensidade de coloração observada nas estruturas estão resumidos na Tabela 1. Assim como na análise histológica, não foram observadas alterações histoquímicas evidentes nos pedúnculos e cálices cerebrais.

A técnica Xylidine Ponceau evidenciou proteínas totais presentes nas células de Kenyon. Nos corpos pedunculados de abelhas expostas à CL₅₀/100 por 1 dia foram observadas algumas células de Kenyon com intensidade de coloração levemente maior que a encontrada nas células do grupo controle 1 dia. Já o grupo de abelhas expostas à CL₅₀/10 por 1 dia apresentou poucas células com marcação intensa para proteínas totais, na região superior interna, próxima à borda do cálice. Não foram observadas células com essa característica no grupo controle 1 dia. Após 5 dias, não foram observadas diferenças na intensidade de coloração das células de Kenyon entre os grupos CL₅₀/100 e o controle. No caso do grupo CL₅₀/10, foram observadas muitas células de Kenyon com marcação bastante intensa para proteínas totais (Figuras 2G e 2H). A maioria dessas células ocorre no interior do centro dos cálices, mas algumas delas ocorrem próximas às bordas. O aspecto dessas células é o mesmo descrito na análise histológica. Isso indica que elas apresentam grandes concentrações de proteínas tanto no citoplasma quanto no núcleo, uma vez que é difícil distinguir os limites entre essas estruturas. Também é possível perceber algumas dessas células com intensidades de coloração intermediárias entre as células com coloração típica e as células intensamente coradas pela hematoxilina. Células com essas características não foram observadas no grupo controle 5 dias (Figuras 2E e 2F). As abelhas expostas à CL₅₀/100 por 13 dias não apresentaram diferenças histoquímicas quando comparadas ao respectivo controle.

A técnica Azul de Toluidina evidenciou ácidos nucleicos e macromoléculas ácidas presentes nas células de Kenyon. As abelhas expostas à CL₅₀/100 por 1, 5 e 13 dias e à CL₅₀/10 por 1 dia não apresentaram diferenças na intensidade de coloração das células de Kenyon. Os corpos pedunculados das abelhas expostas à CL₅₀/10 por 5 dias apresentaram muitas células de Kenyon com alta intensidade de coloração (Figuras 3C e 3D). Isso indica grandes aglomerados de ácidos nucleicos, tanto no citoplasma como no núcleo. Assim como nas outras técnicas histológicas e histoquímicas, essas células foram encontradas na região centro-basal do interior dos cálices e próximas às bordas. Além disso, algumas delas possuem intensidades intermediárias de coloração entre as células com coloração típica e as células intensamente coradas pelo azul de toluidina. As abelhas do grupo controle 5 dias não apresentaram células de Kenyon com essas características (Figuras 3A e 3B).

A técnica PAS-Alcian Blue evidenciou polissacarídeos neutros presentes nas regiões de contatos entre as células de Kenyon e nas regiões de contato dessas células com o cálice. Essas regiões foram marcadas pelo reativo de Schiff em uma coloração rosa e mostram porções de substância extracelular presentes nos espaços intercelulares. O núcleo e o citoplasma das células de Kenyon se apresentaram negativos para essa reação. Não foram evidenciadas regiões coradas pelo Alcian Blue, o que indica ausência de polissacarídeos ácidos nos tecidos. Os corpos pedunculados das abelhas expostas à CL₅₀/100 por 1, 5 e 13 dias e à CL₅₀/10 por 1 dia não apresentaram diferenças quanto à marcação de polissacarídeos neutros, quando comparadas aos respectivos grupos controle. Porém, as abelhas expostas à CL₅₀/10 por 5 dias apresentaram intensa marcação na região central do interior dos cálices, entre as células de Kenyon (Figuras 3G e 3H). Foi possível perceber a presença intensa de polissacarídeos neutros ao redor dessas células, nos espaços intercelulares, diferentemente do observado no controle 5 dias (Figuras 3E e 3F). Essa região marcada coincide com o local onde foram encontradas as células de Kenyon com intensa basofilia, na técnica HE.

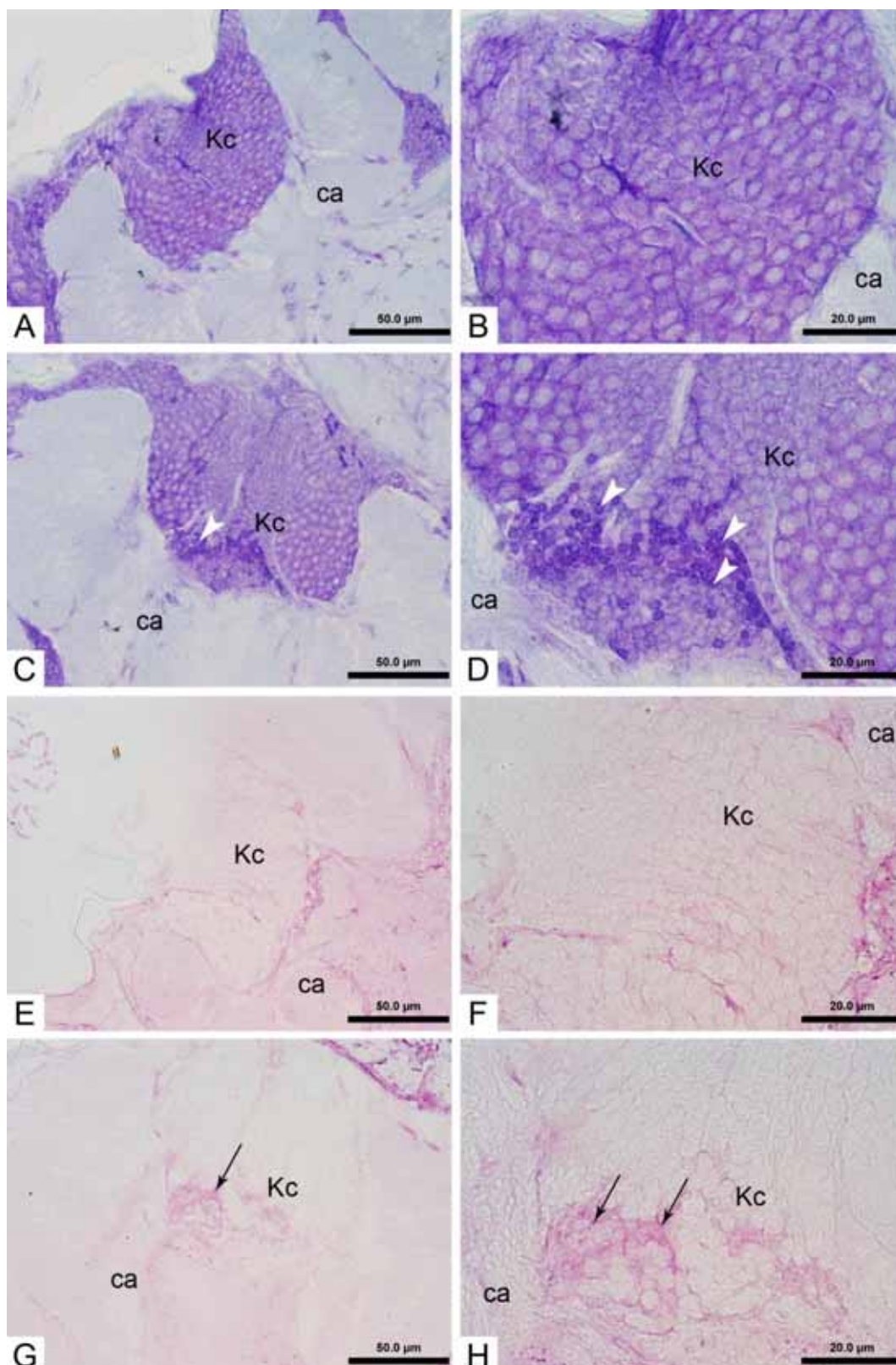


Figura 3. Fotomicrografias dos corpos pedunculados de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, com ou sem exposição ao dimetoato, submetidos às técnicas Azul de Toluidina (A-D) e PAS-Alcian Blue (E-H). (A) e (B) Visão geral e detalhe de um corpo pedunculado do grupo controle 5 dias. (C) e (D) Visão geral e detalhe de um corpo pedunculado do grupo exposto à CL₅₀/10 por 5 dias. (E) e (F) Visão geral e detalhe de um corpo pedunculado do grupo controle 5 dias. (G) e (H) Visão geral e detalhe de um corpo pedunculado do grupo exposto à CL₅₀/10 por 5 dias. ca = cálice; Kc = células de Kenyon; cabeças de setas = células de Kenyon alteradas; setas = espaços intercelulares.

4.4.4 Análise ultraestrutural

A análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão permitiu a observação dos detalhes ultraestruturais dos corpos pedunculados das abelhas em cada grupo experimental. Assim como nas análises histológicas e histoquímicas, não foram observadas diferenças nas características ultraestruturais dos pedúnculos e cálices. As diferenças ultraestruturais observadas entre os grupos experimentais foram observadas nas células de Kenyon. Nos grupos controles de 1, 5 e 13 dias, essas células apresentaram características ultraestruturais típicas: células de formato ovalado, com núcleos variando de oval a esférico, ocupando grande parte da célula. O núcleo apresenta um envoltório nuclear com membranas evidentes e o espaçamento entre elas geralmente é regular. O interior do núcleo é preenchido, principalmente, por cromatina descondensada (eucromatina), com algumas poucas regiões de cromatina condensada (heterocromatina) ao longo da face interna do envoltório nuclear e na região central nuclear. O citoplasma dessas células apresenta mitocôndrias, complexos de Golgi, polirribossomos e ribossomos livres, e poucas regiões de retículo endoplasmático rugoso (RER). As mitocôndrias estão distribuídas ao longo do citoplasma e apresentam membranas e cristas evidentes. A matriz mitocondrial é eletrondensa e homogênea. Os complexos de Golgi possuem cisternas paralelas, bem próximas umas das outras, com material eletrondenso no interior das cisternas e algumas delas estão com o seu lúmen dilatado. Ao redor podem ser encontradas muitas vesículas contendo material eletrondenso. Grande quantidade de polirribossomos e ribossomos livres estão amplamente distribuídos de forma homogênea pelo citoplasma. Os RERs, em geral, são pouco desenvolvidos e estão presentes em pequena quantidade, apresentando material eletrondenso em seu lúmen.

As abelhas expostas à CL₅₀/100 por 1 dia não apresentaram alterações ultraestruturais nas células de Kenyon, quando comparadas ao respectivo grupo controle. As abelhas expostas à CL₅₀/10 por 1 dia apresentaram alterações mitocondriais nas células de Kenyon em relação ao controle 1 dia (Figuras 4A e 4B). A matriz mitocondrial apresentou conteúdo pouco eletrondenso e bastante difuso. Nessas regiões, as cristas mitocondriais aparecem mais desorganizadas.

Após 5 dias de exposição à CL₅₀/100, não foram observadas alterações ultraestruturais nas células de Kenyon. Porém, a exposição à CL₅₀/10 promoveu uma série de alterações em células de Kenyon localizadas na região centro-basal do interior dos cálices, quando comparadas ao grupo controle (Figuras 4C e 4D). Essas células alteradas foram as mesmas descritas nas análises histológicas e histoquímicas, para esse grupo experimental. As células

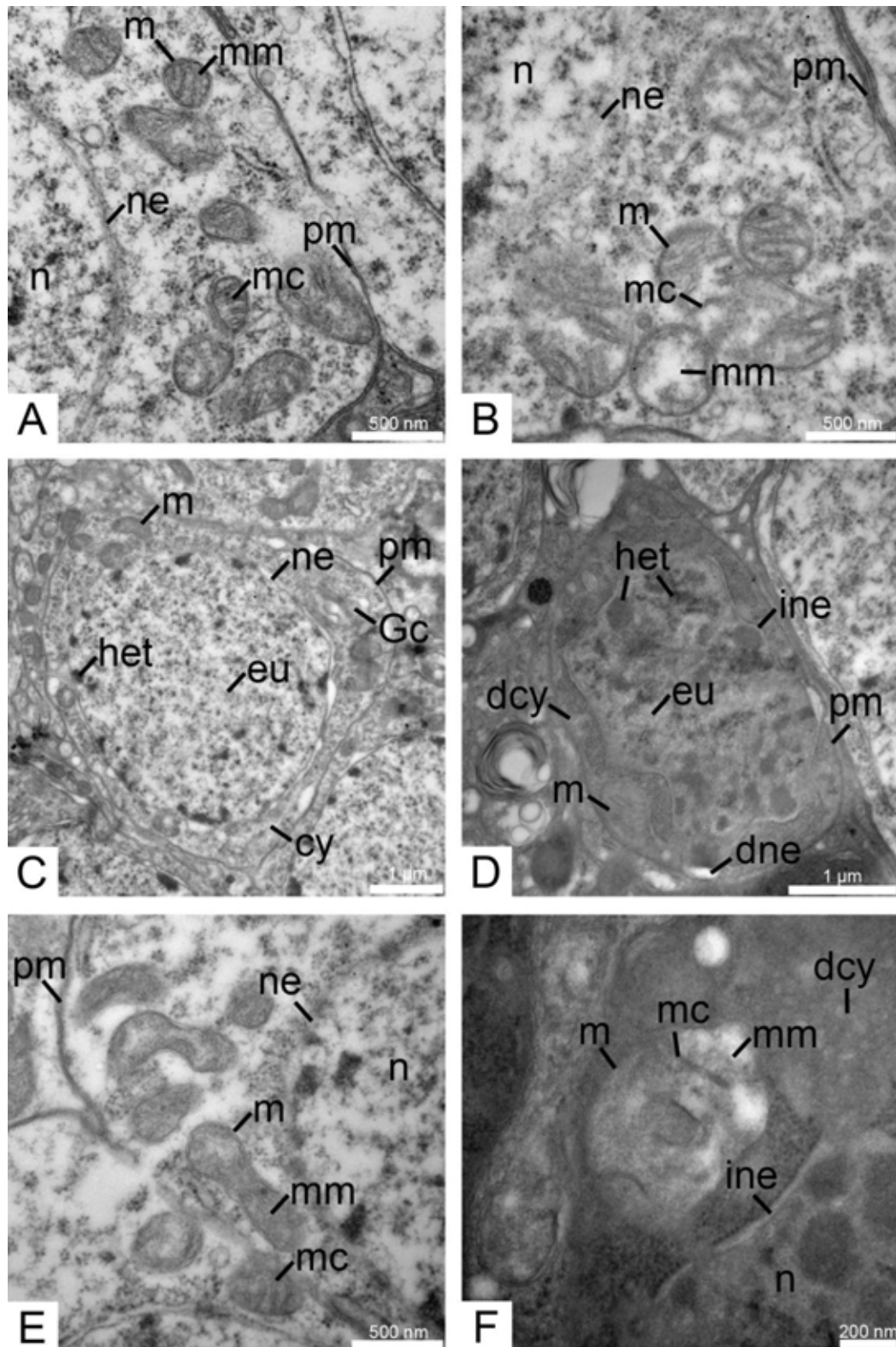


Figura 4. Eletromicrografias de transmissão das células de Kenyon dos corpos pedunculados de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, com ou sem exposição ao dimetoato. (A) Mitocôndrias de uma célula do grupo controle 1 dia. (B) Mitocôndrias de uma célula do grupo exposto à $CL_{50}/10$ por 1 dia. (C) Visão geral de uma célula normal do grupo controle 5 dias. (D) Visão geral de uma célula alterada do grupo exposto à $CL_{50}/10$ por 5 dias. (E) Mitocôndrias de uma célula do grupo controle 5 dias. (F) Detalhe de uma mitocôndria de uma célula alterada do grupo exposto à $CL_{50}/10$ por 5 dias. cy = citosol; dcy = citoplasma danificado/desorganizado; dne = envoltório nuclear dilatado; eu = eucromatina; Gc = complexo de Golgi het = heterocromatina; ine = envoltório nuclear irregular; m = mitocôndria; mc = crista mitocondrial; mm = matriz mitocondrial; n = núcleo; ne = envoltório nuclear; pm = membrana plasmática.

alteradas apresentaram tamanho menor em comparação às células normais e formato ovalado, porém com sinuosidades e irregularidades ao longo da membrana plasmática. Além dessa redução, o citoplasma apresentou-se eletrondenso ao longo de toda célula. Esta característica foi acentuada pela maior concentração de polirribossomos e ribossomos livres, que estão mais próximos entre si devido a redução da área citoplasmática. A intensa eletrondensidade citoplasmática dificultou a visualização das organelas. Da mesma forma que a célula como um todo, o núcleo também sofreu uma redução de tamanho. Porém, ele se apresenta mais próximo às regiões de membrana plasmática do que nas células não alteradas, devido ao estreitamento da faixa citoplasmática ao seu redor. O formato do núcleo permaneceu ovalado, acompanhando o formato da célula, mas com sinuosidades ao longo do envoltório nuclear. O interior do núcleo apresentou intensa eletrondensidade, semelhante à observada no citoplasma, devido à compactação cromatínica que foi evidenciada como extensos aglomerados de heterocromatina. A heterocromatina apresentou dois níveis de compactação: um mais compactado, com alto grau de eletrondensidade, que ocorre em menores aglomerados em pequenas extensões da área nuclear; um menos compactado, com menor grau de eletrondensidade, que ocorre em grandes aglomerados em grandes extensões da área nuclear. O restante da cromatina, que é pouco eletrondensa, está mais condensada que a observada nas células normais, na qual há cromatina elétronlúcida. Nesse grupo experimental, algumas organelas citoplasmáticas apresentaram alterações em comparação às células normais, tais como as mitocôndrias que apresentaram matriz eletronlúcida, com provável perda de seu conteúdo (Figuras 4E e 4F) e os RERs que apresentaram conteúdo luminal mais eletrondenso. Não foram identificados complexos de Golgi nessas células.

Entre as características ultraestruturais das células típicas e as das células mais alteradas, foi possível identificar estágios intermediários de alterações. Isso permitiu acompanhar o processo gradual de degradação dessas células em algumas fases aparentes (Figuras 5A a 5F). Analisando essas etapas, nota-se que as células inicialmente sofreram uma redução no tamanho total e, portanto, do núcleo e do citoplasma. O citoplasma começou a ficar mais estreito e eletrondenso e o núcleo, mais irregular, com aumento das regiões heterocromatínicas. Na sequência, as células apresentaram aumento do grau de eletrondensidade do citoplasma, com algumas organelas indistinguíveis e outras com sinais de degradação. O núcleo passou a ter um formato ainda mais irregular, com regiões de dilatação do envoltório nuclear e, no seu interior, a formação de densas regiões de heterocromatina eletrondensas. Finalmente, as células apresentaram o citoplasma altamente eletrondenso e bastante irregular, com organelas degradadas e vacúolos, alguns contendo materiais

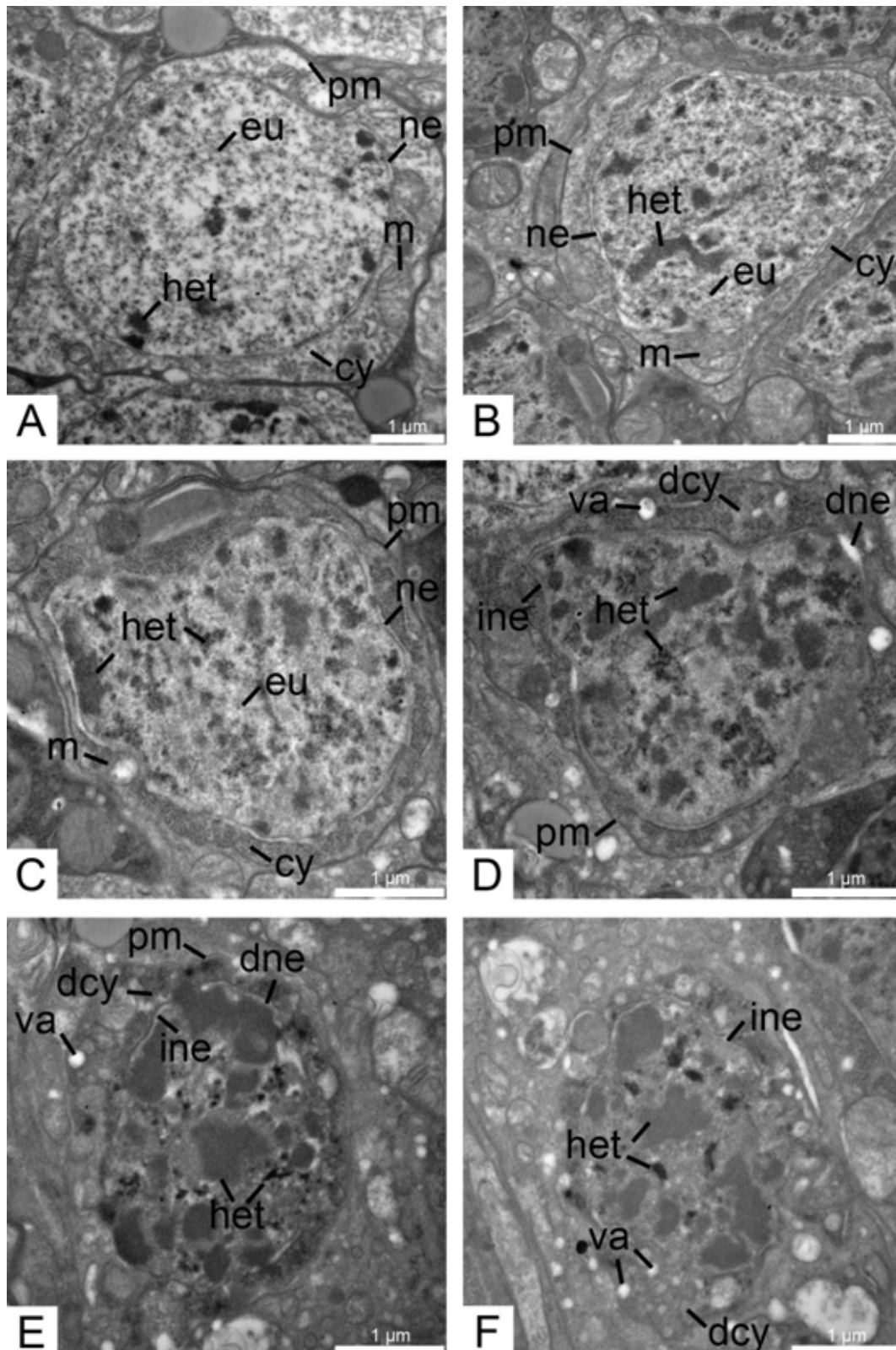


Figura 5. Eletromicrografias de transmissão das células de Kenyon dos corpos pedunculados de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada expostas à CL₅₀/10 por 5 dias. (A) Célula normal. (B-F) Células em estágios graduais de alterações estruturais. cy = citosol; dcy = citoplasma danificado/desorganizado; dne = envoltório nuclear dilatado; eu = eucromatina; het = heterocromatina; ine = envoltório nuclear irregular; m = mitocôndria; mc = crista mitocondrial; mm = matriz mitocondrial; n = núcleo; ne = envoltório nuclear; pm = membrana plasmática; va = vacúolo.

eletrondensos em seu interior. O núcleo apresentou o envoltório nuclear com mais sinuosidades e com regiões dilatadas. A compactação cromatínica progrediu e chegou a ocupar grande parte da área nuclear. Nos estágios mais avançados de alteração, as células apresentaram características estruturais indicativas de degradação, que se assemelham a células em processo de morte celular.

As células de Kenyon das abelhas expostas à $CL_{50}/100$ por 13 dias não apresentaram diferenças ultraestruturais em relação ao respectivo grupo controle.

4.5 DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível observar os efeitos tóxicos do inseticida dimetoato, quando administrado em concentrações subletais para abelhas africanizadas. Com relação à atividade enzimática da AChE, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com ambas concentrações subletais e o respectivo controle após 1 dia de exposição, nem entre o grupo tratado com a CL₅₀/100 e seu controle, após 13 dias. Porém, foi observada redução significativa da atividade dessa enzima nas abelhas tratadas com a CL₅₀/10, após 5 dias. Esses resultados, indicam que a CL₅₀/100 não altera a atividade da AChE nos tecidos cerebrais, quando expostas aos períodos em questão, apontando não ser neurotóxica nessa concentração. Já a CL₅₀/10 mostrou ser prejudicial para as abelhas após 5 dias de exposição. A grande diminuição da atividade da AChE comprova que o dimetoato realmente agiu nessas abelhas, promovendo a inibição dessas enzimas no cérebro. Dessa forma, as alterações histológicas, histoquímicas e ultraestruturais observadas nesse grupo de tratamento estão relacionadas de fato com o efeito do inseticida.

De uma forma geral, a CL₅₀/100 promoveu poucas alterações nas células de Kenyon das abelhas nos períodos analisados. Após 1 dia de exposição, foram observadas células com reação levemente intensa para proteínas totais. Porém, após 5 e 13 dias, essas alterações não foram mais identificadas. Com relação à análise histológica, foram observadas células de Kenyon com basofilia intensa após 5 dias de exposição, mas essas alterações não foram observadas após 13 dias. Esses resultados indicam que essa concentração subletal foi menos agressiva para as abelhas. Assim, os prejuízos causados foram tolerados e, provavelmente, recuperados durante a exposição, já que não foram observadas alterações nos períodos mais longos. As principais alterações histológicas, histoquímicas e ultraestruturais observadas ocorreram nos corpos pedunculados de abelhas expostas à CL₅₀/10 por 1 dia e, principalmente, por 5 dias. O aparecimento de células de Kenyon com intensa basofilia e o aumento da concentração de proteínas totais nessas células ocorreram de forma gradual ao longo desses períodos de exposição, sendo, portanto, dose-dependentes. Apesar da CL₅₀/10 ser a maior concentração subletal testada neste trabalho, ainda assim consiste em uma concentração dez vezes mais baixa que a CL₅₀. Com isso, os resultados mostram que mesmo uma menor concentração de dimetoato já é suficiente para promover alterações nas células de Kenyon, durante um período de exposição contínua.

As alterações histológicas mais evidentes encontradas no grupo CL₅₀/10 por 5 dias também foram observadas nas técnicas histoquímicas e a análise ultraestrutural ajudou a

entender melhor que tipos de alterações estavam ocorrendo com essas células. A análise histológica pela técnica HE identificou nos corpos pedunculados células de Kenyon com intensa basofilia, ou seja, grande quantidade de estruturas ácidas coradas pela hematoxilina, principalmente no núcleo, mas também no citoplasma. No núcleo essa marcação ocorreu devido à grande compactação cromatínica que ocorre nessas células afetadas, como pôde ser evidenciado pela técnica Azul de Toluidina e pela análise ultraestrutural. A alteração do citoplasma pode ser explicada pela alta concentração de ribossomos observados nas micrografias eletrônicas e, portanto, de RNAs de vários tipos, marcados pelo Azul de Toluidina. O aumento da concentração desses componentes citoplasmáticos provavelmente resultou no aumento da síntese e concentração de proteínas nesse compartimento, como observado na técnica Xylidine Ponceau. É possível que parte dessa síntese seja de proteínas envolvidas na proteção das células de Kenyon à exposição ao dimetoato na tentativa de suportarem a intoxicação contínua pela CL₅₀/10. Futuros estudos deverão ser desenvolvidos para elucidar os tipos de proteínas, cuja síntese nas células de Kenyon foi ativada em resposta à exposição pelo dimetoato. Proteínas de estresse celular, conhecidas como HSPs (*heat shock proteins*), são exemplos de proteínas que apresentam aumento da sua expressão em resposta à exposição aos xenobióticos (MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006), podendo prevenir a morte celular (família HSP 70) ou até mesmo participar de vias regulatórias que ativam a morte celular (família HSP 90 e outras) quando o estresse atinge o seu limiar. Durante esse período de exposição contínua pela CL₅₀/10, as células de Kenyon alteradas tiveram seu tamanho diminuído em comparação às células típicas, como pôde ser comprovado pela análise ultraestrutural. A redução do tamanho observada em várias células concentradas em uma mesma região fez com que elas se distanciassem umas das outras deixando maiores extensões de espaços intercelulares, evidenciados pela técnica PAS-Alcian Blue. Devido ao fato de as células de Kenyon alteradas estarem concentradas em uma mesma região (região centro-basal do interior dos cálices), foi possível constatar a presença de vários estágios celulares intermediários de alterações, evidenciadas pela redução no tamanho, aumento da eletrondensidade e degradação de organelas, como as mitocôndrias. Isso indica que, ao longo do período de exposição à CL₅₀/10, essas células passaram por um processo gradual de degradação celular que pode ser um passo inicial no processo de morte celular.

O processo de morte celular pode ser identificado por uma série de alterações celulares características, como o aspecto condensado da célula (BOWEN, I.; BOWEN, S.; JONES, 1998), retração celular, perda de aderência com células vizinhas e condensação da cromatina (EARNSHAW, 1995; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; WOO et al., 1998). Segundo

Häcker (2000), as mitocôndrias podem permanecer fisicamente intactas nos estágios iniciais de morte celular. Porém, a perda de conteúdo da matriz mitocondrial também pode ser observada em células que passam por esse processo. Quando sinais indutores de morte celular chegam às mitocôndrias, ocorrem alterações na permeabilidade das membranas resultando na liberação de proteínas ativadoras da morte celular para o citoplasma e interrupção da síntese de ATP (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; LOEFFLER; KROEMER, 2000). No presente estudo, alterações como essas foram encontradas nas células de Kenyon das abelhas expostas à CL₅₀/10 por 5 dias. Essas evidências dão indícios de que essas células estão em estágios iniciais do processo de morte celular, o que pode afetar a estrutura e função dos corpos pedunculados. Como essas regiões cerebrais são centros de integração responsáveis por receber e interpretar informações olfativas e gustatórias, a morte dessas células pode resultar em prejuízos no comportamento, aprendizagem, memória e distinção olfativa das abelhas (KIYA; KUNIEDA; KUBO, 2007; KOMISCHKE et al., 2005; ZARS, 2000). Dessa forma, atividades de forrageamento estariam prejudicadas, podendo comprometer a longevidade de toda a colônia.

Os resultados descritos no presente estudo foram semelhantes aos encontrados por Rossi et al. (2013), em um trabalho que avaliou os efeitos de doses subletais do imidacloprido, um inseticida neonicotinoide, no cérebro de abelhas africanizadas. Os autores observaram nos corpos pedunculados de abelhas expostas à DL₅₀/10 após 3, 5, 7 e 10 dias a presença de células de Kenyon com intensa basofilia, cromatina condensada e intensa marcação de proteínas totais. Além disso, durante esses períodos de exposição, foram identificadas fragmentações de DNA no núcleo dessas células, reveladas pela técnica de TUNEL. Esse conjunto de alterações apontou que essas células estavam em estágios iniciais de morte celular. Assim como o imidacloprido, o inseticida tiametoxam também causa algumas alterações celulares semelhantes às observadas no presente estudo. Oliveira et al. (2014) investigaram o efeito de concentrações subletais desse neonicotinoide (CL₅₀/100 e CL₅₀/10) no cérebro de abelhas africanizadas e observaram a presença de células de Kenyon condensadas. Essas alterações foram identificadas após 5 e 8 dias de exposição à CL₅₀/10. Foi observada uma intensa marcação de proteínas totais nas células de Kenyon de abelhas expostas à CL₅₀/100 por 1 e 3 dias. Porém, essa marcação foi menos intensa que nos períodos de 5 e 8 dias, indicando uma provável recuperação da característica alterada. Em geral, a comparação desses resultados com os obtidos no presente estudo mostra que o dimetoato promove efeitos subletais nas células de Kenyon dessas abelhas, de maneira semelhante aos

inseticidas imidacloprido e tiametoxam. Dessa forma, assim como esses inseticidas neonicotinoides, o dimetoato também apresenta um alto risco para as abelhas africanizadas.

Os resultados aqui apresentados mostram que concentrações subletais de dimetoato são prejudiciais para as abelhas africanizadas, causando alterações enzimáticas no cérebro e alterações histológicas, histoquímicas e ultraestruturais nas células de Kenyon. Essas alterações celulares, que foram mais evidentes nos tratamentos com a maior concentração subletal testada durante o maior período de exposição, sugerem a ocorrência do início do processo de morte celular nos corpos pedunculados, indicando neurotoxicidade. Estudos adicionais avaliarão o quanto esse grau de neurotoxicidade induzida pelo dimetoato pode comprometer funções importantes como comunicação, aprendizado e orientação, as quais podem afetar o comportamento dessas abelhas e colocar em risco a viabilidade de toda a colônia.

4.6 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**: Relatório de atividades de 2011 e 2012. Brasília: Gerência-Geral de Toxicologia, 2013.

BELZUNCES, L. P.; LENOIR-ROUSSEAU, J-J.; BOUNIAS, M. Properties of acetylcholinesterase from *Apis mellifera* heads, **Insect Biochemistry**, London, v. 18, n. 8, p. 811-819, jun. 1988.

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

BRANDT, R.; ROHLFING, T.; RYBAK, J.; KROFCZIK, S.; MAYE, A.; WESTERHOFF, M.; HEGE, H-C.; MENZEL, R. Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. **The Journal of Comparative Neurology**, Philadelphia, v. 492, n. 1, p. 1-19, nov. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2014. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 17 set. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Intoxicações por agrotóxicos. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 4ª ed. Brasília: FUNASA, 1998.

CHAPMAN, R. F. **The insects**: structure and function. 5th ed. New York: Cambridge University Press, 1998.

CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R. M.; BISWAS, S.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT, J. G. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 615-636, out. 2006.

EARNSHAW, W. C. Nuclear changes in apoptosis. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 7, n. 3, p. 337-343, 1995.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 7, n. 2, p. 88-95, jul. 1961.

FULTON, M. H.; KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 20, n. 1, p. 37-45, jan. 2001.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 335-343, jul. 2007.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 301, n. 1, p. 5-17, jul. 2000.

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

KIYA, T.; KUNIEDA, T.; KUBO, T. Increased neural activity of a mushroom body neuron subtype in the brains of forager honeybees. **Plos One**, San Francisco, v. 2, n. 4, e371, abr. 2007.

KOMISCHKE, B.; SANDOZ, J-C.; MALUN, D.; GIURFA, M. Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. **European Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 477-485, jan. 2005.

LOEFFLER, M.; KROEMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Experimental Cell Research**, New York, v. 256, n. 1, p. 19-26, abr. 2000.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v. 23, n. 1-3, p. 303-309, 2006.

MCMANUS, J. F. A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, London, v. 158, p. 202-202, ago. 1946.

NOCELLI, R. C. F.; ROAT, T. C.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Social Insects: morphophysiology of the nervous system. In: STEWART, E. M. **Social Insects: structure, function, and behavior**. New York: Nova Science Publishers, 2011, p. 105-120.

OLIVEIRA, R. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the Africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, New York, v. 29, n. 10, p. 1122-1133, out. 2014.

ROSSI, C. A.; ROAT, T. C.; TAVARES, D. A.; CINTRA-SOŁOŁOWSKI, P.; MALASPINA, O. Brain morphophysiology of Africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 65, n. 2, p. 234-243, ago. 2013.

RYBAK, J; MENZEL, R. Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the alpha-lobe. **Journal of Comparative Neurology**, Philadelphia, v. 334, n. 3, p. 444-465, ago. 1993.

SILVA-ZACARIN, E. C. M.; CHAUZAT, M. P.; ZEGGANE, S.; DRAJNUDEL, P.; SCHURR, F.; FAUCON, J. P.; MALASPINA, O.; ENGLER, J. A. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**, Badajoz, v. 1, p. 696-703, 2012.

THOMPSON, H. Behavioral effects of pesticides in bees – their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, New York, v. 12, n. 1-4, p. 317-330, fev./ago. 2003.

WOO, M.; HAKEM, R.; SOENGAS, M. S.; DUNCAN, G. S.; SHAHINIAN, A.; KÄGI, D.; HAKEM, A.; MCCURRACK, M.; KHOO, W.; KAUFMAN, S. A.; SENALDI, G.; HOWARD, T.; LOWE, S. W.; MAK, T. W. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 12, p. 806-819. jan. 1998.

ZARS, T. Behavioral functions of the insect mushroom bodies. **Current Opinion in Neurobiology**, London, v. 10, n. 6, p. 790-795, dez. 2000.

5 CAPÍTULO 3: EFEITOS SUBLETAIS DO DIMETOATO NO VENTRÍCULO DE ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera*)

Rodrigo Avelaira Barbosa¹, Daiana Antonia Tavares¹, Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin², Osmar Malaspina¹

¹ Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA) – Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – Departamento de Biologia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rio Claro, São Paulo.

² Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) – Departamento de Biologia – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Sorocaba, São Paulo.

5.1 RESUMO

Com o desenvolvimento das práticas agrícolas, a agricultura tornou-se bastante dependente do uso intensivo de pesticidas. Esses compostos colocam em risco insetos benéficos como as abelhas, as quais realizam a polinização de diversas plantas cultivadas. O inseticida dimetoato possui ação sistêmica em plantas, de forma que resíduos presentes no néctar coletado podem chegar até a colônia e serem introduzidos à alimentação dos indivíduos que a compõem. O ventrículo das abelhas faz a digestão e absorção de substâncias ingeridas, além de produzir enzimas de desintoxicação, como a carboxilesterase (CaE). Os objetivos desse trabalho foram avaliar os efeitos subletais do dimetoato na atividade da CaE e nas características histológicas, histoquímicas e ultraestruturais do ventrículo de abelhas africanizadas. Com base na concentração letal média (CL_{50}) previamente obtida, duas concentrações subletais ($CL_{50}/100$ e $CL_{50}/10$) foram estabelecidas para serem administradas via oral durante 1, 5 e 13 dias. Houve o aumento da atividade da CaE em abelhas com 13 dias de exposição contínua em relação às abelhas com 1 e 5 dias de exposição. Foi observada a inibição da CaE nas abelhas tratadas com a $CL_{50}/100$ após 13 dias e nas abelhas tratadas com a $CL_{50}/10$ após 5 dias de exposição. Não foram observadas alterações histológicas e histoquímicas no epitélio ventricular, nem alterações ultraestruturais nas células digestivas e regenerativas dos grupos tratados com as concentrações subletais de dimetoato. Esses resultados sugerem que a inibição das CaEs no ventrículo pode ter sido o resultado da ligação irreversível dessas enzimas às moléculas de inseticida ao atuar na desintoxicação e defesa dos tecidos ventriculares, protegendo esse órgão de possíveis efeitos citotóxicos.

Palavras-chave: Intestino. Carboxilesterase. Histologia. Histoquímica. Ultraestrutura.

5.2 INTRODUÇÃO

As abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) são de grande importância para a agricultura e economia por realizarem a polinização de diversas plantas cultivadas. Dessa forma, elas contribuem para o aumento da produção das plantações e da qualidade dos alimentos (GALLAI et al., 2009). Com o desenvolvimento das práticas agrícolas e o crescimento das monoculturas, a agricultura tornou-se cada vez mais dependente do uso intensivo de pesticidas (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007). Um dos principais problemas resultantes desta prática é o fato desses produtos apresentarem um amplo espectro de ação, atuando não somente sobre a praga, mas também em insetos benéficos como as abelhas. Assim, este fator pode estar relacionado diretamente ao desaparecimento de populações de abelhas e perdas na produção de alimentos (STOKSTAD, 2012).

Considerando os pesticidas utilizados na agricultura brasileira, os inseticidas organofosforados se destacam por apresentarem aplicação em diversos tipos de cultivos. O alvo desses compostos é a acetilcolinesterase (AChE), enzima presente no sistema nervoso dos insetos, que é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. A inibição da AChE realizada por esses inseticidas provoca paralisia e morte do inseto (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998). Entre os organofosforados, o dimetoato é muito utilizado no Brasil, sendo aplicado em culturas de grande importância econômica, como trigo, algodão, maçã e citros (BRASIL, 2014). Esse inseticida é considerado altamente tóxico para abelhas e possui ação sistêmica na planta. Com isso, plantas tratadas com dimetoato absorvem e incorporam moléculas do inseticida, que é translocado para o néctar, tornando-o tóxico (BARKER; LEHNER; KUNZMANN, 1980). Quando coletado por abelhas forrageiras, esse néctar contendo resíduos de dimetoato é levado para a colônia, sendo introduzido à sua alimentação (WALLER et al., 1984). Ao ser ingerido, o alimento contaminado entra em contato direto com o sistema digestório dos indivíduos.

O tubo digestório das abelhas é dividido em intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (SNODGRASS, 1956). O intestino médio, também chamado de ventrículo, consiste em um tubo cilíndrico, grosso e longo, que se dobra em forma de arco no interior da cavidade abdominal. É nessa região do tubo digestório onde ocorre a maior parte da digestão e a absorção dos nutrientes, bem como das substâncias químicas ingeridas (CRUZ-LANDIM, 2009). O ventrículo de abelhas adultas é constituído, principalmente, por dois tipos celulares que formam a porção básica e funcional do epitélio. As células digestivas são os principais constituintes do epitélio ventricular e possuem a função de sintetizar enzimas digestivas e

absorver nutrientes. As células regenerativas estão agrupadas em ninhos localizados na porção basal do epitélio e são responsáveis pela reestruturação do epitélio substituindo as células principais quando estas são eliminadas por desgaste (CRUZ-LANDIM; SILVA-DE-MORAES; SERRÃO, 1996).

Além de executar funções digestivas, o ventrículo é responsável pela síntese de enzimas envolvidas em mecanismos de desintoxicação contra xenobióticos (SMIRLE; WINSTON, 1988; YU; ROBINSON; NATION, 1984). Dentre essas enzimas estão as carboxilesterases (CaEs), importantes componentes na defesa do organismo contra inseticidas organofosforados, como o dimetoato. As CaEs atuam se ligando de forma irreversível (sequestro) às moléculas de inseticida (MAXWELL, 1992).

Os objetivos desse trabalho foram avaliar os efeitos de concentrações subletais de dimetoato na atividade enzimática da CaE e nas características histológicas, histoquímicas e ultraestruturais do ventrículo de abelhas africanizadas.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

Abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada foram coletadas de colônias do apiário da UNESP – Rio Claro. Para considerar a variabilidade genética entre as colônias, as abelhas foram coletadas de três diferentes colônias saudáveis, todas contendo número semelhante de indivíduos e quantidade de alimento. Imediatamente após a coleta, as abelhas de cada colônia foram colocadas em potes plásticos (1.000 mL) e acondicionadas em incubadora a 32 ± 1 °C e umidade relativa de $60 \pm 10\%$. As abelhas passaram por um período de jejum de 2 h para garantir que se alimentassem a partir do início do experimento.

Os ensaios de intoxicação foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP – Rio Claro. As abelhas foram acondicionadas em potes descartáveis de plástico (250 mL) contendo um tubo plástico de microteste (1,5 mL) para colocar a dieta. Em cada gaiola foram acondicionados 10 indivíduos. Todos os grupos experimentais foram montados com indivíduos das três colônias, cada pote contendo abelhas de uma única colônia, totalizando 60 abelhas por grupo experimental.

Durante os ensaios de intoxicação o grupo controle recebeu uma dieta composta de solução aquosa de sacarose a 50%. Com base no ensaio de toxicidade (determinação da CL_{50}) descrito previamente (Capítulo 1), foram estabelecidas duas concentrações subletais de dimetoato para serem adicionadas às dietas dos grupos expostos ao inseticida. Para preparar essas dietas, foi utilizada uma solução estoque de dimetoato PESTANAL® (99,6% de pureza, Sigma-Aldrich, Brasil) contendo 1.000 ng i. a./ μ L de água. A partir dessa solução foram feitas sucessivas diluições em solução de sacarose a 50% para a obtenção de dietas contendo as concentrações subletais. Dessa forma, um grupo de tratamento recebeu a $CL_{50}/100$ (0,0796 ng i. a./ μ L de dieta) adicionada à dieta e o outro recebeu a $CL_{50}/10$ (0,796 ng i. a./ μ L de dieta). Cada um dos três grupos experimentais recebeu somente o respectivo tipo de dieta ao longo de todos os dias do experimento, havendo um preenchimento diário dos alimentadores. Os ensaios tiveram início assim que as dietas foram oferecidas às abelhas. A escolha dos períodos de coleta de abelhas para as análises foi baseada nos resultados do ensaio de sobrevivência relatados no Capítulo 1. Foram considerados como referência os valores de tempo médio de sobrevivência (TS_{50}) para cada concentração subletal testada. Abelhas dos três grupos experimentais foram coletadas após 1 dia (exposição aguda) e 5 dias de exposição contínua (TS_{50} aproximado de abelhas tratadas com a $CL_{50}/10$). As abelhas do grupo controle e do grupo tratado com a $CL_{50}/100$ foram coletadas também após 13 dias de exposição contínua (TS_{50} aproximado de abelhas tratadas com a $CL_{50}/100$). As abelhas do grupo tratado com a

CL₅₀/10 não foram coletadas após 13 dias porque não sobreviveram até o fim desse período. Dessa forma, foram estabelecidos um total de oito grupos experimentais, levando em consideração o tipo de dieta administrada e o período de coleta para as análises.

5.3.1 Atividade enzimática da CaE

Para avaliar o efeito das duas concentrações subletais de dimetoato nas abelhas, foi realizado um ensaio de cinética enzimática com a CaE, enzima envolvida em processos de desintoxicação contra xenobióticos. Para cada grupo experimental, 18 abelhas tiveram seus ventrículos retirados e agrupados em 6 amostras (3 ventrículos por amostra). A cada amostra foi adicionada uma quantidade específica de solução de extração (tampão fosfato de sódio 40 mM pH = 7,4, cloreto de sódio 10 mM e 1% de Triton X100) contendo 10% (m/v) para a realização da maceração. Os ventrículos foram macerados durante 1 min com auxílio de um pistilo e os extratos brutos foram centrifugados a 15.000 g, durante 20 min, a 4 °C. Após a centrifugação, os sobrenadantes contendo os extratos proteicos foram coletados e preparados para as análises. Foram preparadas microplacas de 96 poços adicionando em cada poço 5 µL de extrato proteico de cada amostra, em triplicatas. Após o preparo das placas, foi adicionado em cada poço 195 µL de solução de dosagem contendo acetato de p-nitrofenila 10 mM, 1,5-bis(4-allyldimethylammonium-phenyl)pentan-3-one-dibromide (BW284C51) 1 mM e tampão fosfato de sódio 500 mM pH = 7,0) para iniciar a atividade enzimática, a 25 °C. As leituras das densidades ópticas foram realizadas no leitor de placas VersaMax (Molecular Devices) na faixa de comprimento de onda de 410 nm, a 25 °C, pelo programa SoftMax Pro 6.3 (Molecular Devices).

As densidades ópticas obtidas nas leituras foram trabalhadas no programa R[®], em função do tempo em que a reação foi observada e da quantidade de extrato utilizada nas amostras. Essas análises resultaram na obtenção da atividade enzimática média de cada uma das 6 amostras, para cada grupo experimental. Para comparar as médias dos grupos, os dados foram então submetidos à análise de variância ANOVA *one way* com auxílio do programa SigmaPlot 11.0, (Systat). Para identificar as diferenças estatísticas entre os grupos, foi utilizado o teste de Holm-Sidak com nível de significância fixado em $p < 0,05$.

5.3.2 Microscopia de luz

Para cada grupo experimental, 5 abelhas foram dissecadas em placas de Petri contendo a respectiva solução fixadora no estereomicroscópio EZ4 (Leica) para a retirada dos ventrículos. Os órgãos foram colocados em solução fixadora de paraformaldeído 4%, transferidos para a solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH = 7,4) e desidratados em graduações crescentes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 90%, 95% e 100%) a 4 °C, segundo Silva-Zacarin et al. (2012). Após a desidratação, os órgãos foram embebidos em historesina (Leica) e polimerizados em historesina com adição do endurecedor catalítico a 37 °C. Os blocos de resina contendo os ventrículos foram seccionados no micrótomo RM2255 (Leica) obtendo-se secções histológicas de 5 µm de espessura. As secções histológicas foram colocadas sobre lâminas de vidro e secas em estufa a 37 °C. Lâminas contendo as secções dos ventrículos dos indivíduos de cada grupo experimental foram submetidas à coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise histológica dos ventrículos (adaptado de JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M., 1983). As demais lâminas contendo as secções do ventrículo dos indivíduos de cada grupo experimental foram submetidas às seguintes técnicas histoquímicas: PAS-Alcian Blue, para a detecção de polissacarídeos neutros e ácidos (adaptado de MCMANUS, 1946); Xylidine Ponceau, para detecção de proteínas totais (adaptado de JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M., 1983); Azul de Toluidina, para a detecção de ácidos nucleicos e macromoléculas ácidas (adaptado de JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M., 1983). Após a realização das técnicas histológicas e histoquímicas, todas as lâminas foram montadas em bálsamo sintético. Os ventrículos foram observados e fotografados ao fotomicroscópio BX-51 (Olympus), equipado com a câmera DP-71 (Olympus), pelo programa DP Controller (Olympus).

5.3.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Para cada grupo experimental, 5 abelhas foram dissecadas em placas de Petri contendo a respectiva solução fixadora no estereomicroscópio EZ4 (Leica) para a retirada dos ventrículos. Os órgãos removidos foram colocados em solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH = 7,4), lavados em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH = 7,4) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 h. Os órgãos foram novamente lavados no mesmo tampão, contrastados em acetato de uranila 1%, dissolvido em álcool 10%, por 2 h e desidratadas em graduações crescentes de etanol (70% a 100%), 15 min cada. Após

a desidratação, os órgãos foram embebidos em resina Epon-Araldite por 24 h e polimerizados em resina mais catalizador, a 60 °C. Os blocos de resina contendo os órgãos foram seccionados no ultramicrotomo Supernova (Reichert) em cortes ultrafinos, colocados sobre grades de cobre e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo. Os ventrículos foram analisados e fotografados ao microscópio eletrônico de transmissão CM100 (Philips), equipado com a câmera Veleta (Olympus), pelo programa iTEM 5.2 (Olympus).

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Análise enzimática

Os resultados referentes à atividade enzimática da CaE estão resumidos na Figura 1. Após 1 dia, a atividade da CaE nas abelhas expostas à CL₅₀/100 foi equivalente a $78,16 \pm 17,08$ mUA/min/mg de tecido. As abelhas expostas à CL₅₀/10 apresentaram atividade igual a $89,69 \pm 13,40$ mUA/min/mg de tecido. Não houve diferença estatística significativa entre esses dois tratamentos e o respectivo grupo controle, o qual apresentou atividade de $95,03 \pm 24,25$ mUA/min/mg de tecido.

A atividade da CaE em abelhas expostas à CL₅₀/100 por 5 dias foi $133,31 \pm 34,97$ mUA/min/mg de tecido, não apresentando diferença significativa em relação ao controle de 5 dias, que teve atividade igual a $138,32 \pm 25,52$ mUA/min/mg de tecido. No entanto, no grupo de abelhas expostas à CL₅₀/10 por 5 dias foi observada diminuição da atividade enzimática, equivalente a $75,89 \pm 12,16$ mUA/min/mg de tecido. Essa atividade foi significativamente inferior à observada no respectivo grupo controle ($p = 0,001$), correspondendo a uma redução de 45,12%.

Após 13 dias, foi observado aumento significativo ($p < 0,001$) da atividade enzimática tanto no grupo controle, como no grupo tratado com a CL₅₀/100, em relação aos grupos de 1 e 5 dias. As abelhas tratadas com a CL₅₀/100 por 13 dias tiveram atividade equivalente a $291,47 \pm 43,34$ mUA/min/mg de tecido, significativamente inferior ($p < 0,001$) à observada no grupo controle de 13 dias, o qual apresentou atividade igual a $378,04 \pm 56,61$ mUA/min/mg de tecido.

5.4.2 Análise histológica

A análise histológica dos ventrículos corados pela técnica HE permitiu observar de forma geral os principais tipos celulares presentes nesse órgão. Os resultados referentes à intensidade de coloração observada estão resumidos na Tabela 1.

As células digestivas dos grupos controles de 1, 5 e 13 dias se apresentaram com as mesmas características típicas: células colunares com núcleo central, de formato ovalado, intensamente corado pela hematoxilina (basófilo) e ápice celular coberto por microvilosidades. O citoplasma apresentou pequenas regiões basófilas localizadas ao redor do núcleo. Não foram observadas diferenças histológicas nestas células entre os grupos tratados

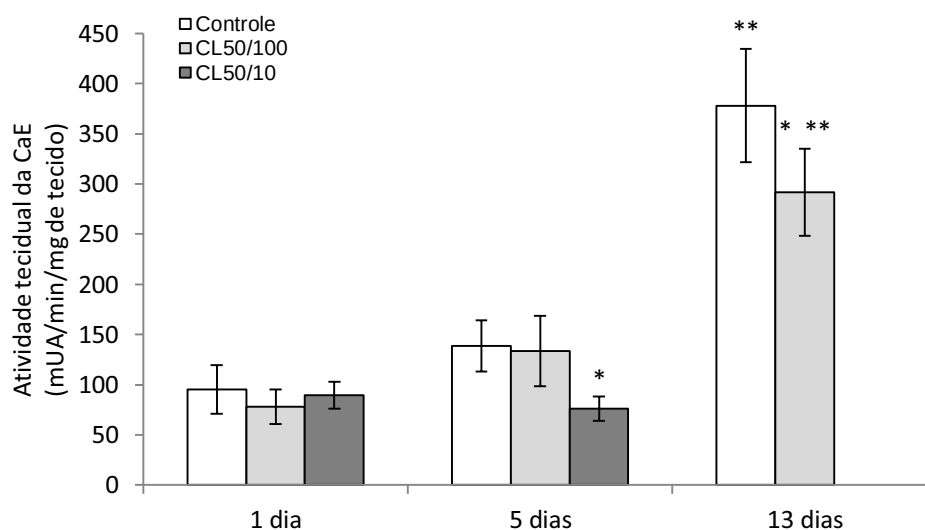


Figura 1. Atividade da enzima carboxilesterase (CaE) presente nos tecidos do ventrículo de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, com ou sem exposição ao dimetoato. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. (*) diferença estatística significativa em relação ao respectivo controle. (**) diferença estatística significativa em relação a todos os outros grupos.

Tabela 1. Análises histológicas e histoquímicas dos ventrículos de abelhas africanizadas expostas a concentrações subletais de dimetoato

Exposição	Grupo	Histologia		Histoquímica		
		HE	XP	AT	PAS-AB	
1 dia	Controle	+	+	+	+	
	CL ₅₀ /100	+	+	+	+	
	CL ₅₀ /10	+	+	+	+	
5 dias	Controle	+	+	+	+	
	CL ₅₀ /100	+	+	+	+	
	CL ₅₀ /10	+	+	+	+	
13 dias	Controle	+	+	+	+	
	CL ₅₀ /100	+	+	+	+	

(+) Reação padrão; (HE) Hematoxilina e eosina; (XP) Xylidine Ponceau; (AT) Azul de Toluidina; (PAS-AB) PAS-Alcian Blue.

com as concentrações subletais de dimetoato e seus respectivos controles, ao longo dos dias de exposição (Figura 2).

Assim como as células digestivas, as células regenerativas apresentaram as mesmas características histológicas típicas em todos os grupos experimentais (Figura 2): agrupamentos (ninhos) de células pequenas cujo ápice não chega à luz do ventrículo, de formato esférico ou alongado, com núcleo basófilo acompanhando o formato da célula e citoplasma contendo regiões basófilas dispersas.

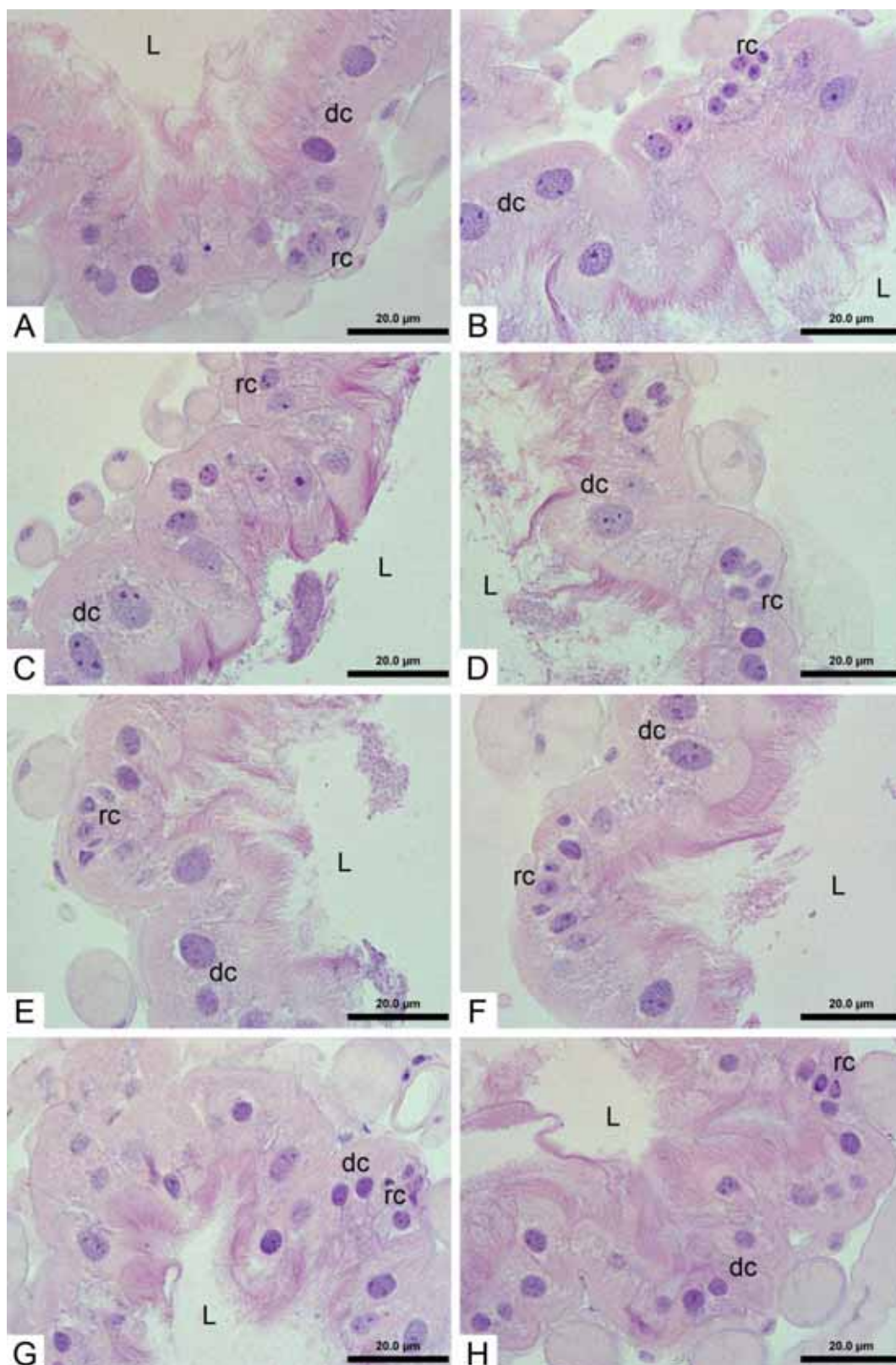


Figura 2. Fotomicrografias dos ventrículos de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, com ou sem exposição ao dimetoato, submetidos à técnica HE. (A) Grupo controle 1 dia. (B) Grupo controle 5 dias. (C) Grupo exposto à $CL_{50}/100$ por 1 dia. (D) Grupo exposto à $CL_{50}/100$ por 5 dias. (E) Grupo exposto à $CL_{50}/10$ por 1 dia. (F) Grupo exposto à $CL_{50}/10$ por 5 dias. (G) Grupo controle 13 dias. (H) Grupo exposto à $CL_{50}/100$ por 13 dias. dc = células digestivas; L = lúmen; rc = células regenerativas.

5.4.3 Análise histoquímica

A partir da realização das análises histoquímicas foi possível identificar macromoléculas específicas presentes no ventrículo. Os resultados referentes à intensidade de coloração observada nessas estruturas estão resumidos na Tabela 1.

A técnica Xylidine Ponceau evidenciou as proteínas totais presentes no citoplasma e núcleo das células digestivas e regenerativas. A intensidade de coloração observada foi a mesma em todos os grupos (Figura 3), indicando não haver diferenças entre os grupos expostos ao dimetoato e seus respectivos controles. A técnica Azul de Toluidina evidenciou ácidos nucléicos e macromoléculas ácidas presentes nas células digestivas e regenerativas. Não foram observadas diferenças entre os grupos, quanto à presença e distribuição dessas moléculas (Figura 4). A técnica PAS-Alcian Blue marcou polissacarídeos neutros presentes na substância amorfa que recobre a superfície das microvilosidades das células digestivas. Essas regiões foram marcadas pelo reativo de Schiff, resultando em uma coloração rosa. Não foram observadas regiões coradas pelo Alcian Blue. As células regenerativas apresentaram reação negativa a essa técnica, não sendo identificadas no tecido. De uma forma geral, todos os grupos experimentais apresentaram as mesmas intensidades de reação histoquímica (Figura 5).

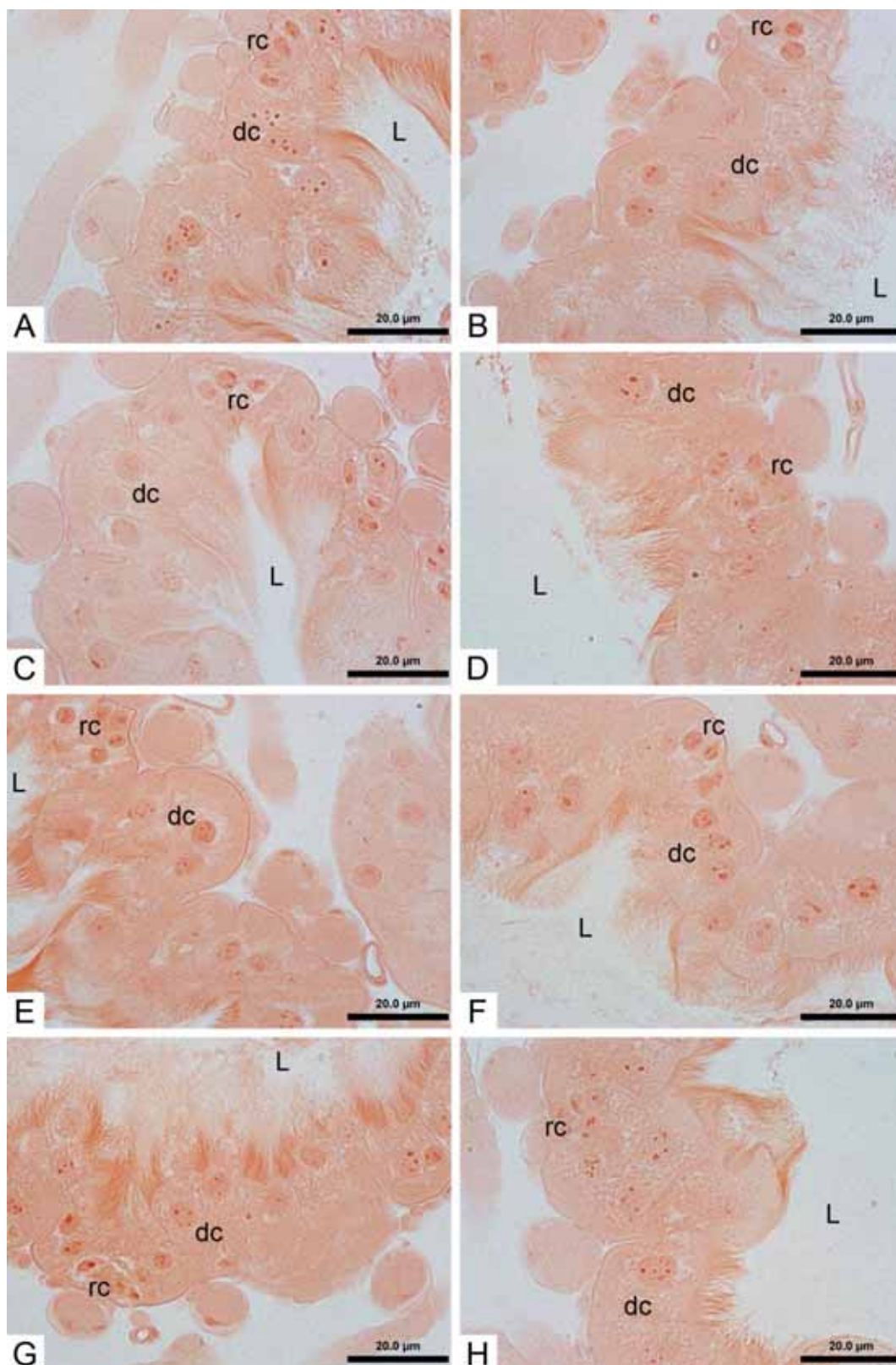


Figura 3. Fotomicrografias dos ventrículos de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, com ou sem exposição ao dimetoato, submetidos à técnica Xylidine Ponceau. (A) Grupo controle 1 dia. (B) Grupo controle 5 dias. (C) Grupo exposto à CL₅₀/100 por 1 dia. (D) Grupo exposto à CL₅₀/100 por 5 dias. (E) Grupo exposto à CL₅₀/10 por 1 dia. (F) Grupo exposto à CL₅₀/10 por 5 dias. (G) Grupo controle 13 dias. (H) Grupo exposto à CL₅₀/100 por 13 dias. dc = células digestivas; L = lúmen; rc = células regenerativas.

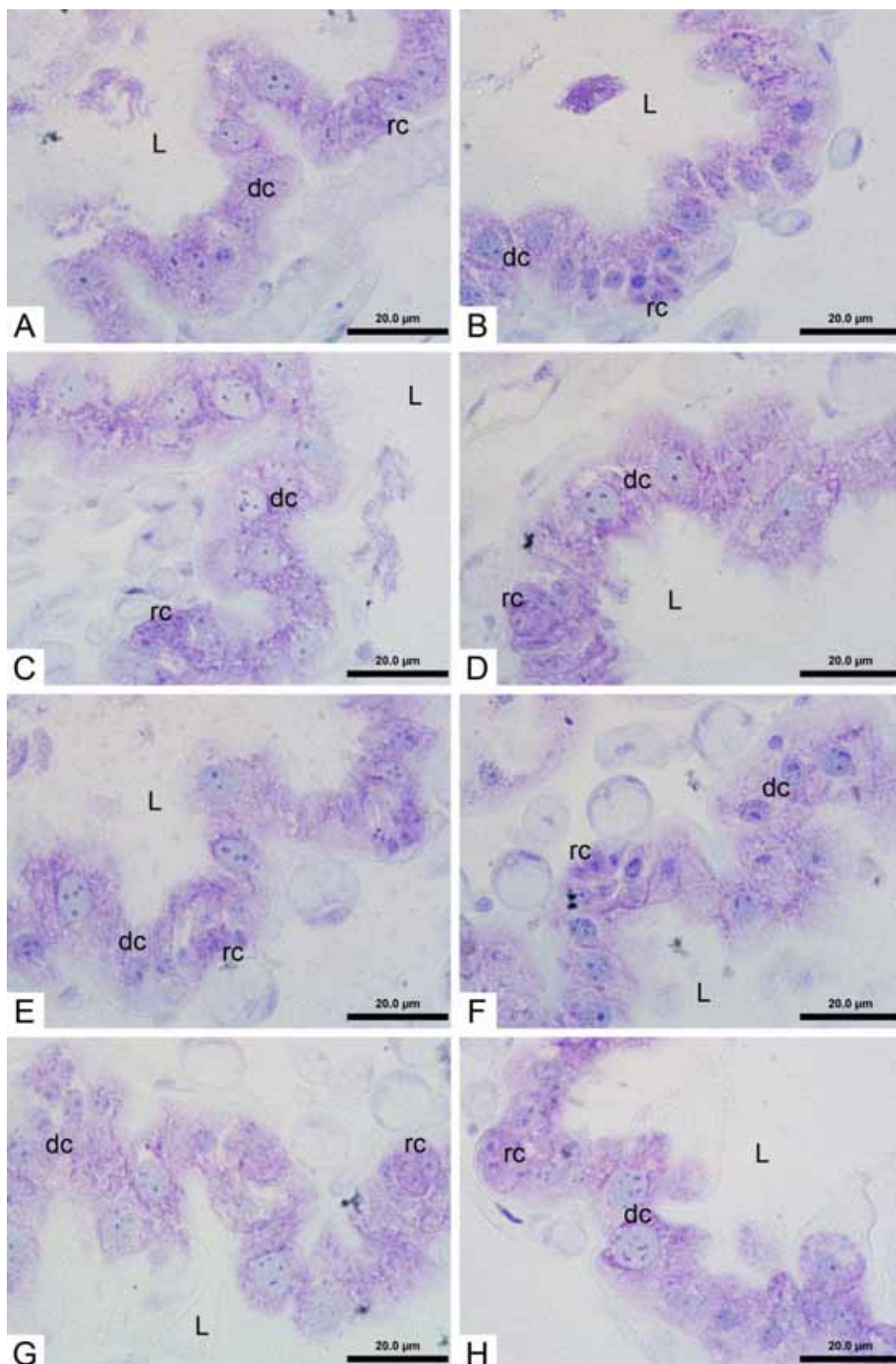


Figura 4. Fotomicrografias dos ventrículos de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, com ou sem exposição ao dimetoato, submetidos à técnica Azul de Toluidina. (A) Grupo controle 1 dia. (B) Grupo controle 5 dias. (C) Grupo exposto à $CL_{50}/100$ por 1 dia. (D) Grupo exposto à $CL_{50}/100$ por 5 dias. (E) Grupo exposto à $CL_{50}/10$ por 1 dia. (F) Grupo exposto à $CL_{50}/10$ por 5 dias. (G) Grupo controle 13 dias. (H) Grupo exposto à $CL_{50}/100$ por 13 dias. dc = células digestivas; L = lúmen; rc = células regenerativas.

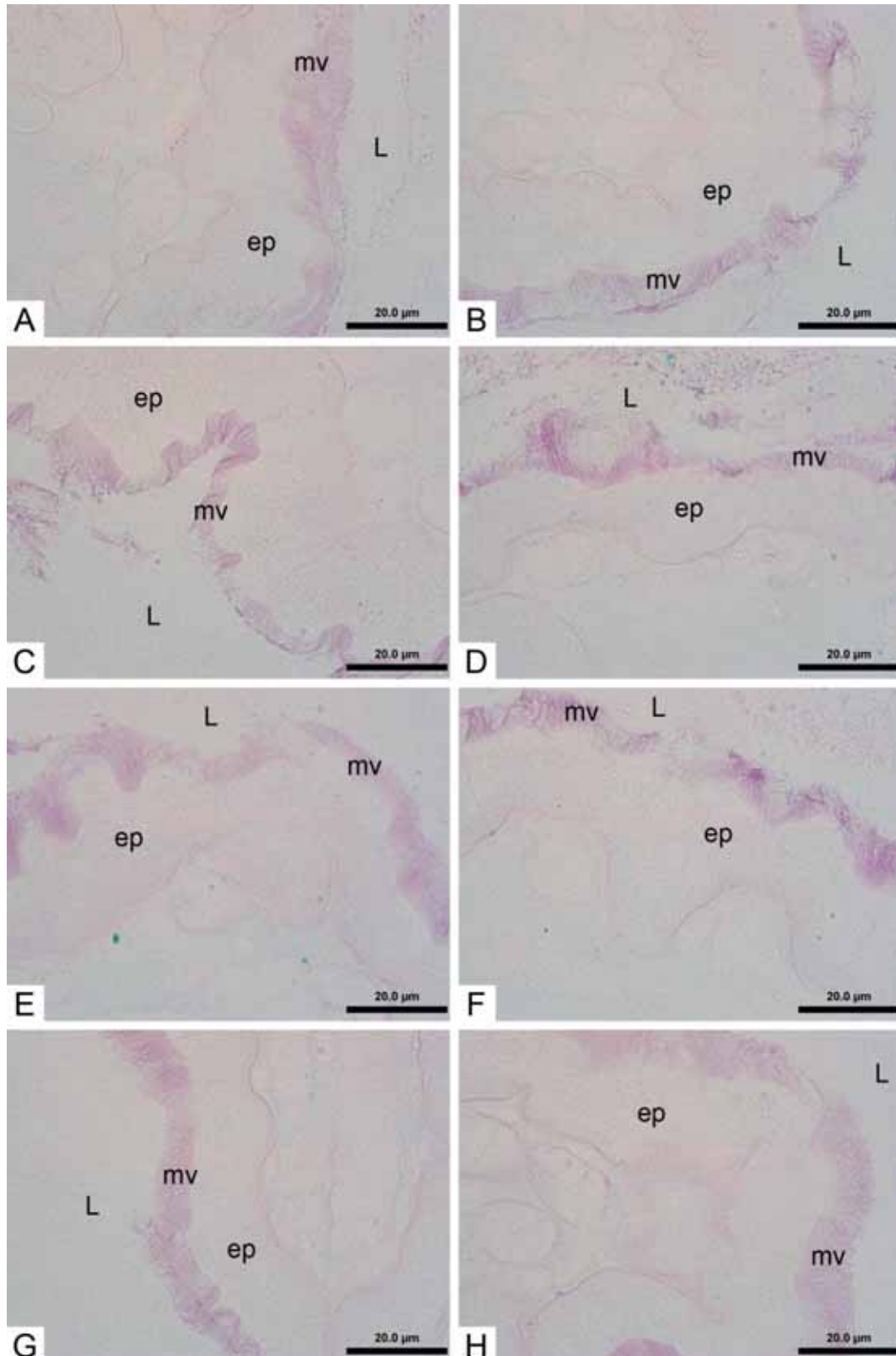


Figura 5. Fotomicrografias dos ventrículos de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, com ou sem exposição ao dimetoato, submetidos à técnica PAS-Alcian Blue. (A) Grupo controle 1 dia. (B) Grupo controle 5 dias. (C) Grupo exposto à CL₅₀/100 por 1 dia. (D) Grupo exposto à CL₅₀/100 por 5 dias. (E) Grupo exposto à CL₅₀/10 por 1 dia. (F) Grupo exposto à CL₅₀/10 por 5 dias. (G) Grupo controle 13 dias. (H) Grupo exposto à CL₅₀/100 por 13 dias. ep = epitélio; L = lúmen; mv = microvilosidades.

5.4.4 Análise ultraestrutural

A análise ultraestrutural permitiu a observação de detalhes das estruturas presentes nas células digestivas e regenerativas, complementando as análises histológicas e histoquímicas.

As células digestivas dos grupos controles de 1, 5 e 13 dias apresentaram estruturas celulares com características bastante semelhantes (Figuras 6 a 8). Estas células possuem três regiões bem definidas: basal, mediana e apical. Na região basal, apresentam extenso contato com a lâmina basal e a membrana plasmática forma um labirinto basal bastante elaborado. Ao redor desta estrutura existem muitas mitocôndrias, retículos endoplasmáticos rugosos (RERs), ribossomos e polirribossomos livres. Na região mediana, é possível observar o núcleo com formato ovalado acompanhando o formato colunar da célula. O núcleo possui extensas regiões de cromatina descondensada (eucromatina) no seu interior e pequenas regiões de cromatina condensada (heterocromatina) e, em geral, observa-se um ou mais nucléolos reticulares. O envoltório nuclear é regular, apresentando poucas sinuosidades em algumas regiões e o espaço entre as membranas nucleares é bastante regular, sem espessamentos. Próximas ao núcleo estão presentes extensas regiões de RERs com muitos ribossomos aderidos, lúmen levemente dilatado em algumas porções e conteúdo eletrondenso. Adicionalmente, na região mediana são observados complexos de Golgi com cisternas paralelas, bem próximas umas das outras, com material eletrondenso no lúmen. Algumas cisternas apresentam lúmen dilatado e a formação de vesículas nas extremidades. Na região apical existe um acúmulo de vacúolos, grandes estruturas com formato esférico ou ovalado, envolto por membrana. Aparentemente, a maior parte dessas estruturas apresentam interior homogeneamente eletrólucido. Em alguns vacúolos é possível observar resquícios de material celular. A forma, tamanho e quantidade de vacúolos variaram de célula para célula, em cada indivíduo observado. Próximo à membrana plasmática apical há grande acúmulo de mitocôndrias de formato alongado, sinuoso, com membranas e cristas evidentes e matriz eletrondensa. A membrana plasmática apical forma muitas microvilosidades finas e longas em direção ao lúmen do ventrículo. As células digestivas dos grupos expostos às concentrações subletais de dimetoato apresentaram as mesmas características ultraestruturais descritas acima, sendo muito semelhantes aos seus respectivos controles (Figuras 6 a 8).

As células regenerativas dos grupos controles de 1, 5 e 13 dias também apresentaram características ultraestruturais muito parecidas entre si (Figuras 9 a 11). As células mais internas dos ninhos apresentaram formato esférico e núcleo esférico, enquanto que as mais externas possuem formato alongado, mais próximo do colunar, com núcleo ovalado. O núcleo

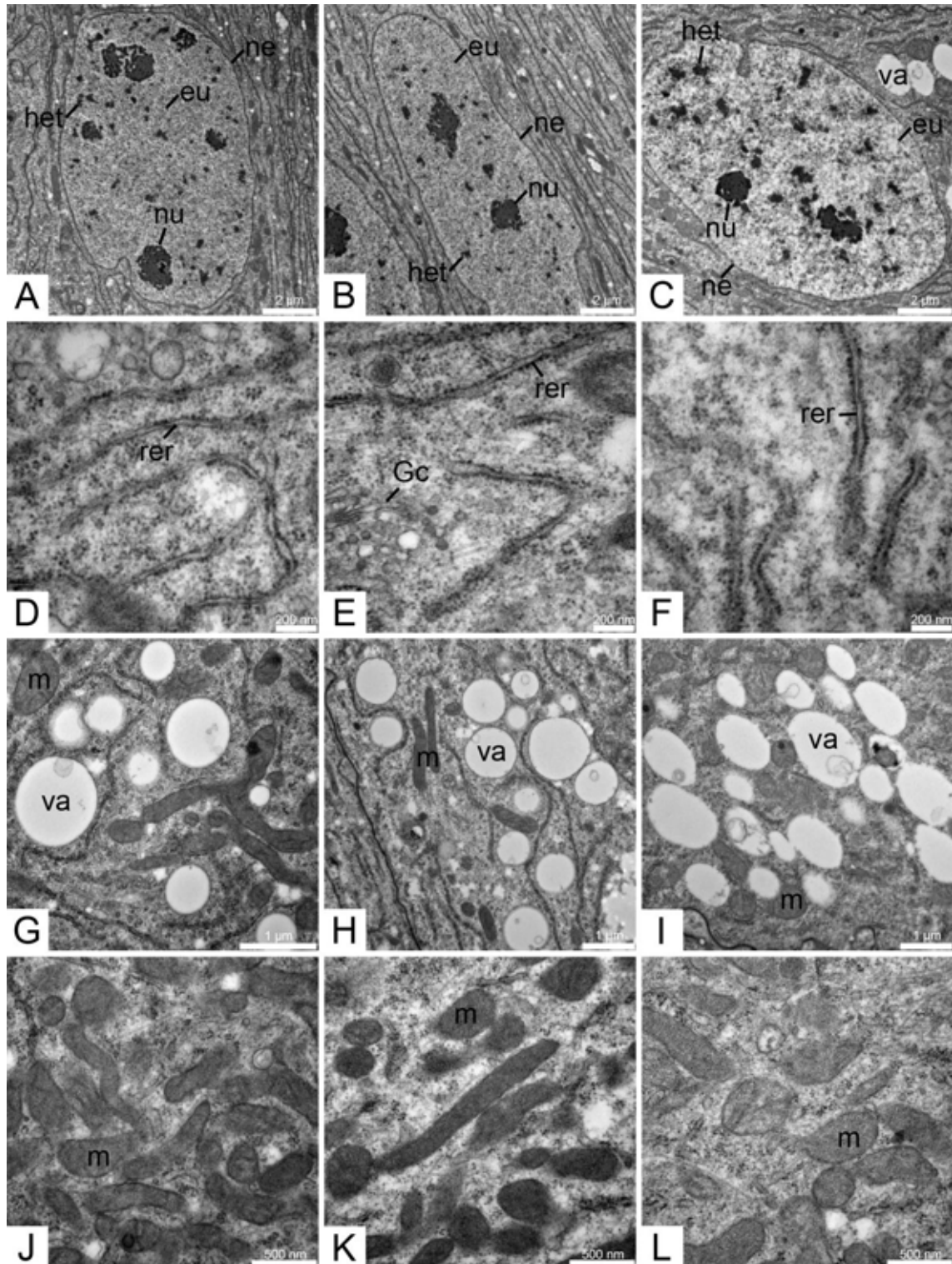


Figura 6. Eletromicrografias de transmissão das células digestivas dos ventrículos de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada. A figura mostra as principais estruturas celulares dos grupos expostos ao dimetoato por 1 dia e seu respectivo controle. (A) Núcleo de uma célula do grupo controle. (B) Núcleo de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (C) Núcleo de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. (D) Retículo endoplasmático rugoso (RER) de uma célula do grupo controle. (E) RER de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (F) RER de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. (G) Vacúolos de uma célula do grupo controle. (H) Vacúolos de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (I) Vacúolos de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. (J) Mitocôndrias de uma célula do grupo controle. (K) Mitocôndrias de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (L) Mitocôndrias de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. eu = eucromatina; Gc = complexo de Golgi; het = heterocromatina; m = mitocôndria; ne = envoltório nuclear; nu = nucléolo; rer = RER; va = vacúolo.

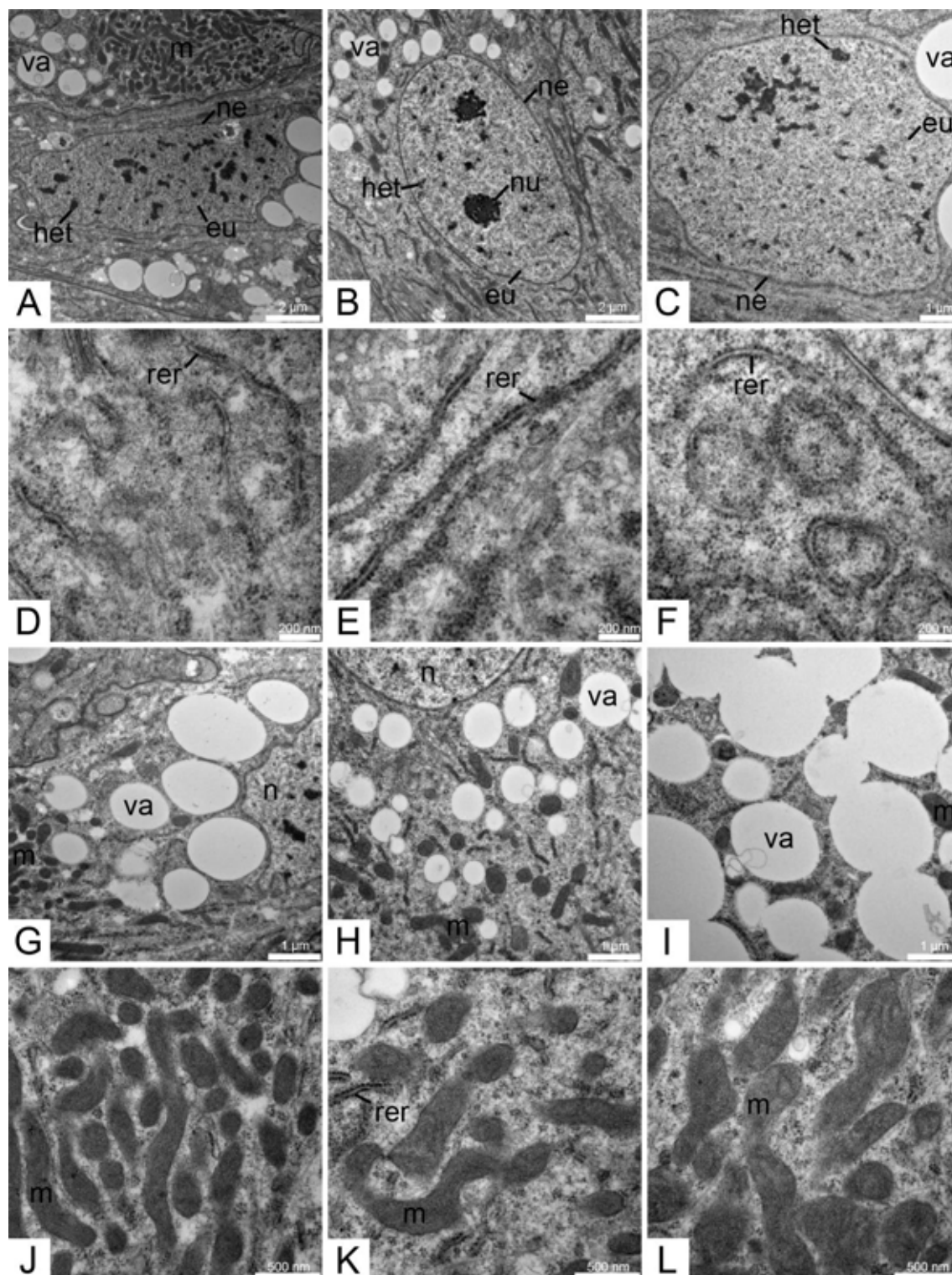


Figura 7. Eletromicrografias de transmissão das células digestivas dos ventrículos de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada. A figura mostra as principais estruturas celulares dos grupos expostos ao dimetoato por 5 dias e seus respectivos controles. (A) Núcleo de uma célula do grupo controle. (B) Núcleo de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (C) Núcleo de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. (D) Retículo endoplasmático rugoso (RER) de uma célula do grupo controle. (E) RER de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (F) RER de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. (G) Vacúolos de uma célula do grupo controle. (H) Vacúolos de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (I) Vacúolos de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. (J) Mitocôndrias de uma célula do grupo controle. (K) Mitocôndrias de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (L) Mitocôndrias de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. eu = eucromatina; het = heterocromatina; m = mitocôndria; n = núcleo; ne = envoltório nuclear; nu = nucléolo; rer = RER; va = vacúolo.

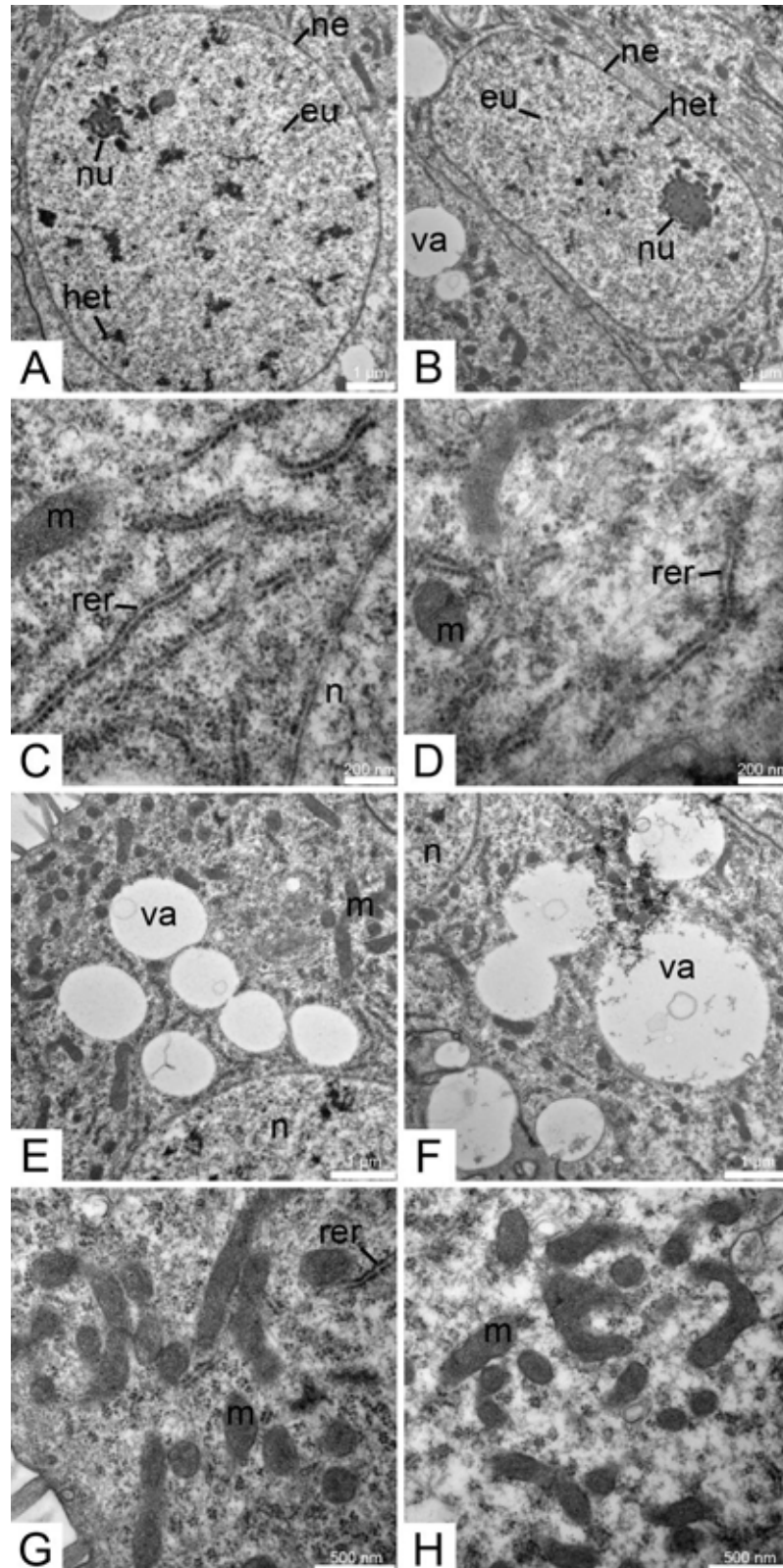


Figura 8. Eletromicrografias de transmissão das células digestivas dos ventrículos de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada. A figura mostra as principais estruturas celulares do grupo exposto ao dimetoato por 13 dias e seu respectivo controle. (A) Núcleo de uma célula do grupo controle. (B) Núcleo de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (C) Retículo endoplasmático rugoso (RER) de uma célula do grupo controle. (D) RER de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (E) Vacúolos de uma célula do grupo controle. (F) Vacúolos de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (G) Mitocôndrias de uma célula do grupo controle. (H) Mitocôndrias de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. eu = eucromatina; het = heterocromatina; m = mitocôndria; n = núcleo; ne = envoltório nuclear; nu = nucléolo; rer = RER; va = vacúolo.

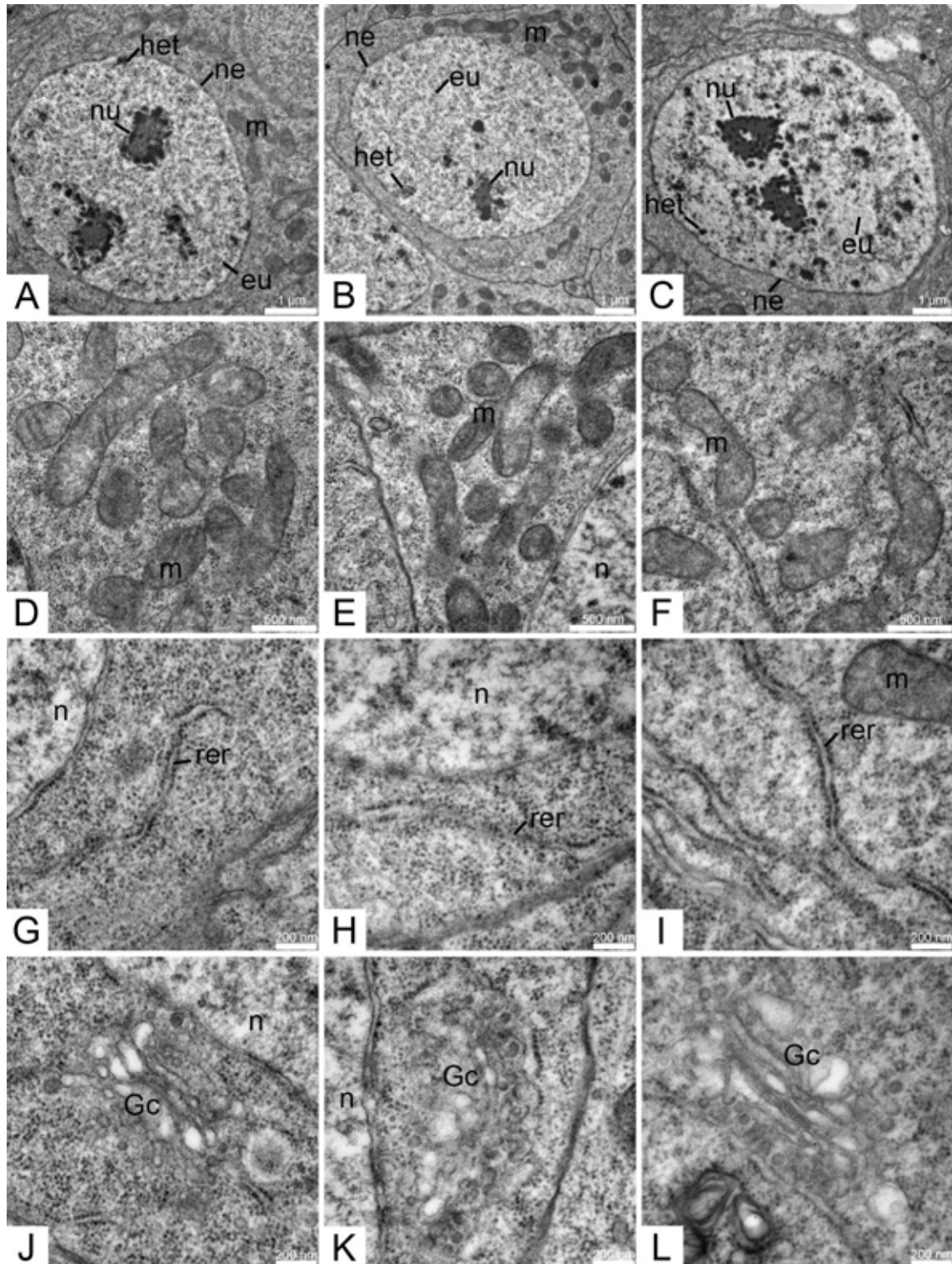


Figura 9. Eletromicrografias de transmissão das células regenerativas dos ventrículos de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada. A figura mostra as principais estruturas celulares dos grupos expostos ao dimetoato por 1 dia e seus respectivos controles. (A) Núcleo de uma célula do grupo controle. (B) Núcleo de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (C) Núcleo de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. (D) Mitocôndrias de uma célula do grupo controle. (E) Mitocôndrias de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (F) Mitocôndrias de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. (G) Retículo endoplasmático rugoso (RER) de uma célula do grupo controle. (H) RER de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (I) RER de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. (J) Complexo de Golgi de uma célula do grupo controle. (K) Complexo de Golgi de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (L) Complexo de Golgi de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. eu = eucromatina; Gc = complexo de Golgi; het = heterocromatina; m = mitocôndria; n = núcleo; ne = envoltório nuclear; nu = nucléolo; rer = RER.

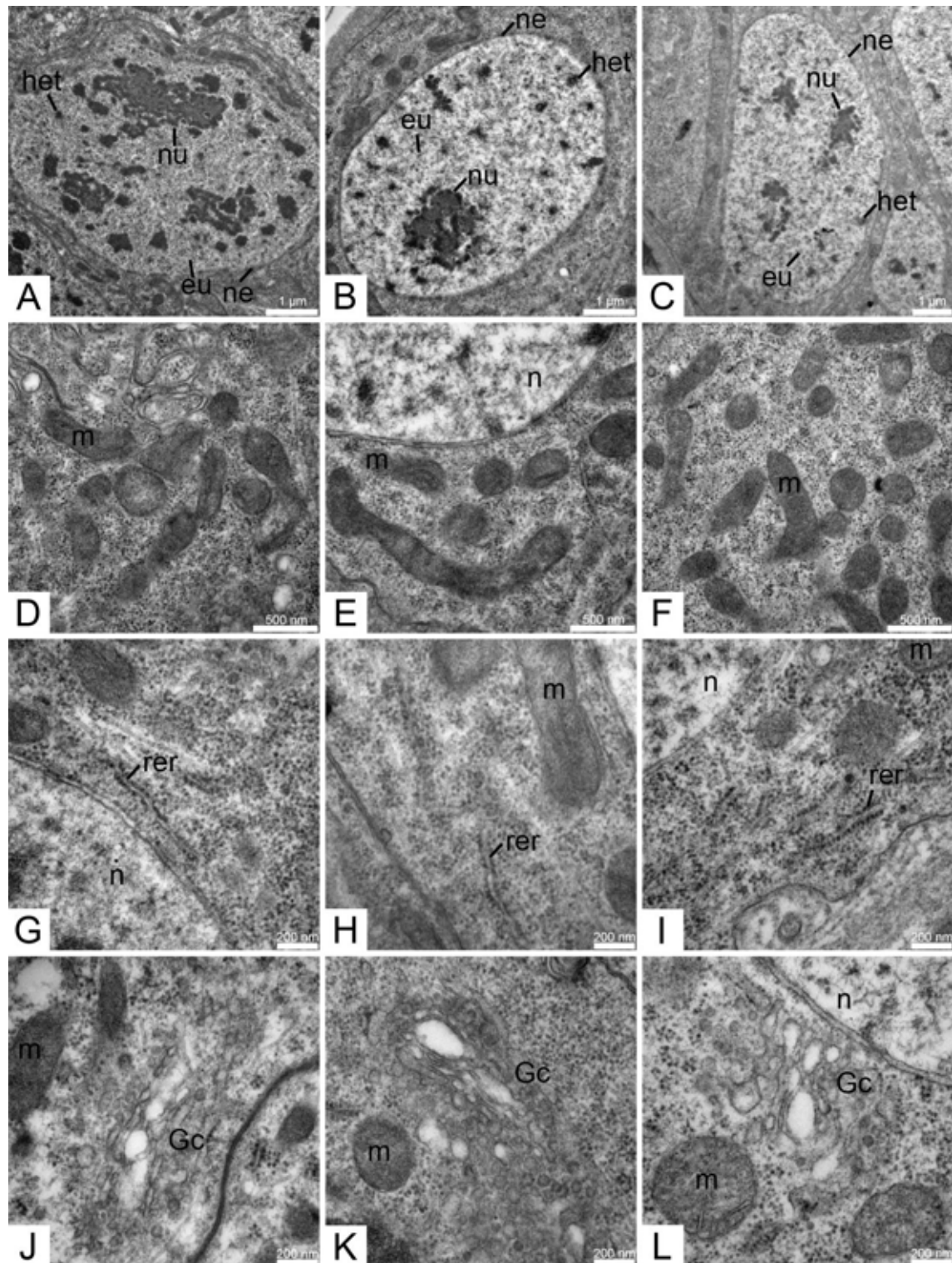


Figura 10. Eletromicrografias de transmissão das células regenerativas dos ventrículos de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada. A figura mostra as principais estruturas celulares dos grupos expostos ao dimetoato por 5 dias e seus respectivos controles. (A) Núcleo de uma célula do grupo controle. (B) Núcleo de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (C) Núcleo de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. (D) Mitocôndrias de uma célula do grupo controle. (E) Mitocôndrias de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (F) Mitocôndrias de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. (G) Retículo endoplasmático rugoso (RER) de uma célula do grupo controle. (H) RER de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (I) RER de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. (J) Complexo de Golgi de uma célula do grupo controle. (K) Complexo de Golgi de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (L) Complexo de Golgi de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/10. eu = eucromatina; Gc = complexo de Golgi; het = heterocromatina; m = mitocôndria; n = núcleo; ne = envoltório nuclear; nu = nucléolo; rer = RER.

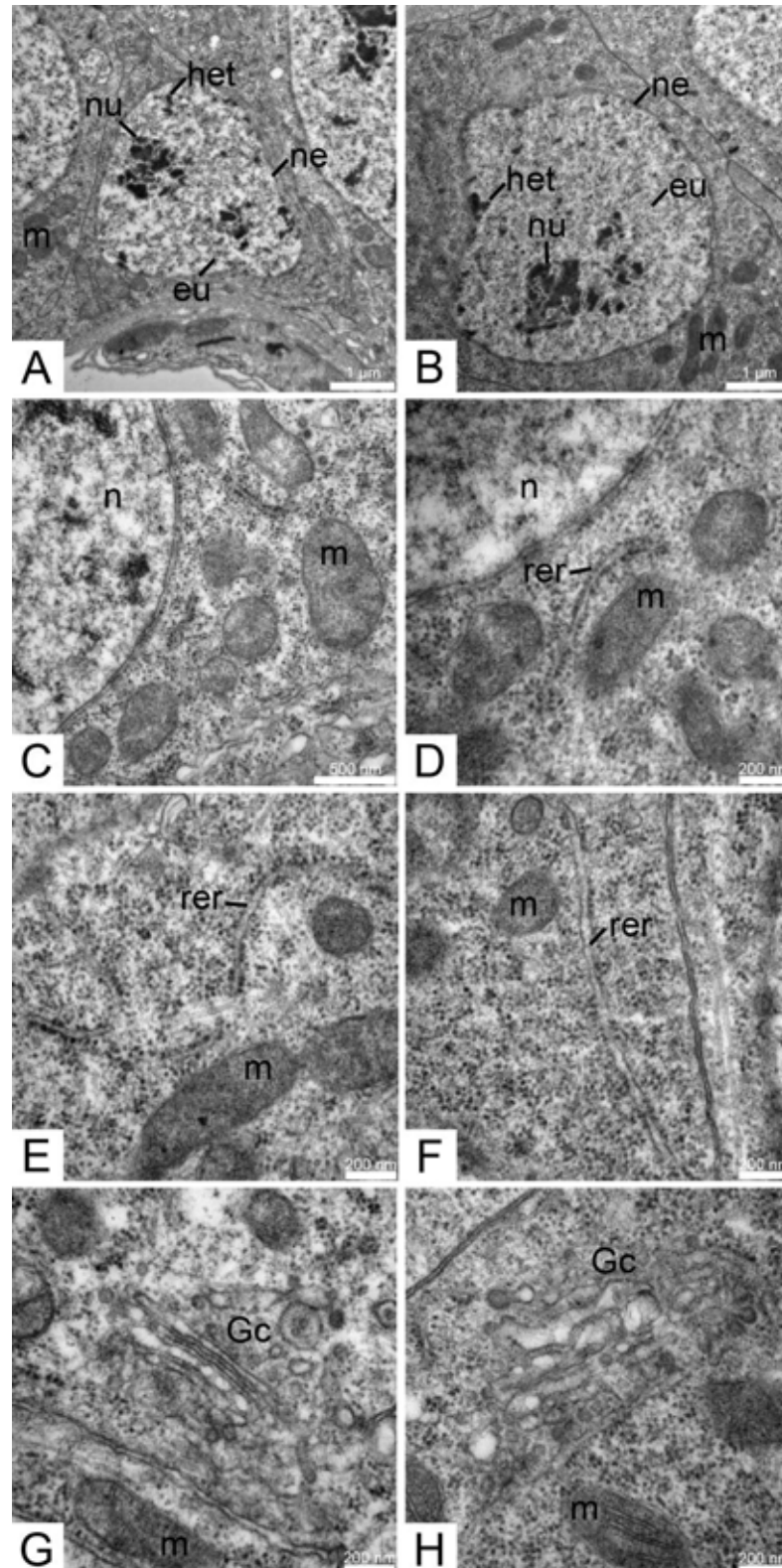


Figura 11. Eletromicrografias de transmissão das células regenerativas dos ventrículos de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada. A figura mostra as principais estruturas celulares do grupo exposto ao dimetoato por 13 dias e seu respectivo controle. (A) Núcleo de uma célula do grupo controle. (B) Núcleo de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (G) Mitocôndrias de uma célula do grupo controle. (H) Mitocôndrias de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (C) Retículo endoplasmático rugoso (RER) de uma célula do grupo controle. (D) RER de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. (E) Complexo de Golgi de uma célula do grupo controle. (F) Complexo de Golgi de uma célula do grupo exposto à CL₅₀/100. eu = eucromatina; Gc = complexo de Golgi; het = heterocromatina; m = mitocôndria; n = núcleo; ne = envoltório nuclear; nu = nucléolo; rer = RER.

das células regenerativas possui um ou mais nucléolos reticulares bastante evidentes e é composto principalmente por eucromatina, com poucas regiões de heterocromatina próximas ao envoltório nuclear e no interior do núcleo. O envoltório nuclear em geral é regular, ou seja, sem sinuosidades pronunciadas e com espaço intermembranar de espessura constante. O citoplasma dessas células é repleto de ribossomos e polirribossomos (mais comuns), distribuídos de forma homogênea. Possui mitocôndrias alongadas com membranas e cristas evidentes, e matriz eletrondensa. O RER é pouco desenvolvido e os complexos de Golgi apresentam características típicas, como descrito para as células digestivas. Não foram observadas diferenças ultraestruturais entre os grupos expostos às concentrações subletais de dimetoato e seus respectivos controles (Figuras 9 a 11).

5.5 DISCUSSÃO

Os resultados dos testes enzimáticos mostraram o aumento considerável da atividade da CaE nas abelhas expostas por 13 dias em relação às expostas por 1 e 5 dias. Isso indica que as abelhas mais velhas possuem maior atividade dessa enzima de desintoxicação nos tecidos do ventrículo em relação às abelhas mais jovens. Assim como a atividade da CaE observada no presente trabalho, outras enzimas de desintoxicação com funções semelhantes apresentam esse padrão de variação da atividade em função da idade. Segundo Smirle e Winston (1988), abelhas com 14 ou mais dias de idade possuem alta atividade específica da glutathione-S-transferase e de oxidases de funções mistas. No entanto, as abelhas com idades entre 1 e 5 dias apresentaram baixos níveis de proteínas e baixa atividade específica dessas enzimas. Essas observações sugerem que as abelhas mais velhas possuem mecanismos bioquímicos elaborados na defesa do organismo contra xenobióticos, principalmente durante a fase de forrageamento, na qual as abelhas entram em maior contato com ambientes possivelmente contaminados com resíduos de pesticidas e outros xenobióticos.

A análise enzimática da CaE também mostrou a influência de concentrações subletais de dimetoato na atividade dessa enzima. A $CL_{50}/100$ não alterou a atividade da CaE após 1 e 5 dias de exposição. Isso indica que essa concentração provavelmente é muito baixa para produzir efeitos após alguns dias de exposição. Porém, após 13 dias de exposição contínua a essa concentração foi observada diminuição significativa da atividade da CaE, mostrando que em um período de exposição mais longo essa concentração baixa pode induzir alterações no sistema de desintoxicação do organismo. Não foi observada alteração da atividade da CaE em abelhas expostas à $CL_{50}/10$ após 1 dia. Mesmo sendo a concentração mais alta testada no presente trabalho, a exposição de 1 dia pode ainda ter sido muito curta para que pudesse causar efeitos consideráveis no sistema de desintoxicação dessas abelhas. Já após 5 dias de exposição, houve a diminuição significativa da atividade da CaE, indicando que essa concentração causa alterações quando exposta de forma contínua, por mais tempo. Dessa forma é possível dizer que concentrações subletais de dimetoato promoveram a inibição da atividade enzimática da CaE nos períodos mais longos de exposição.

A inibição da CaE por inseticidas organofosforados é observada em estudos com abelhas (YU; ROBINSON; NATION, 1984) e com outros invertebrados terrestres como as minhocas (VELKI; HACKENBERGER, 2012). Essa inibição é considerada como um resultado dos mecanismos de desintoxicação do organismo para diminuir a concentração de moléculas de inseticida que chega ao alvo de ação, no caso, a enzima AChE (CHANDA et al.,

1997; MAXWELL, 1992). Sabe-se que a CaE participa ativamente da desintoxicação de organofosforados ligando-se de forma irreversível (1:1) às moléculas de inseticida (CHAMBERS et al., 1994; MAXWELL, 1992; WHEELOCK; SHAN; OTTEA, 2005). Essa ação faz com que as moléculas de inseticida sejam sequestradas, ou seja, removidas de circulação. Porém, ao se ligarem de forma irreversível ao inseticida, as CaEs ficam inativas, impedidas de catalisarem outras reações. Provavelmente, é por esse motivo que houve a diminuição (inibição) da atividade dessa enzima para o substrato acetato de p-naftila nos grupos tratados com a CL₅₀/100 por 13 dias e com a CL₅₀/10 por 5 dias. Essa diminuição da atividade enzimática indica que os tecidos do ventrículo tiveram suas CaEs inibidas justamente por estarem combatendo a intoxicação pelo dimetoato, se ligando às moléculas de inseticida. De uma forma geral, essas informações sugerem que as CaEs protegeram os tecidos do ventrículo, atuando de forma importante ao longo do período de exposição, evitando possíveis prejuízos induzidos pelo dimetoato. Essa pode ser uma possível explicação para a ausência de alterações celulares e teciduais no ventrículo após a exposição contínua às concentrações subletais de dimetoato.

As análises histológicas e histoquímicas revelaram ausência de alterações no epitélio ventricular dos grupos expostos ao dimetoato em comparação aos seus controles, seja nas células digestivas, seja nas células regenerativas. Da mesma forma, a ultraestrutura das organelas desses dois tipos celulares permaneceu inalterada após a exposição ao inseticida. Inicialmente, o dimetoato tem como principal órgão-alvo o sistema nervoso central dos insetos, promovendo a inibição da AChE que resulta em paralisia espástica seguida de morte do inseto (CLAUDIANOS et al., 2006). No presente trabalho foi utilizada a via oral como forma de exposição ao dimetoato. Assim que o inseticida é ingerido pelas abelhas, um dos principais órgãos que entra em contato direto com o inseticida é o ventrículo. Com isso, poderia se esperar que os tecidos desse órgão sofressem alterações morfológicas ou histoquímicas decorrentes dessa forma de exposição, uma vez que ele faz a digestão e absorção dos alimentos e das demais substâncias ingeridas. Porém, não foram observados danos nesses tecidos, indicando que, de alguma forma, o ventrículo não foi afetado pela exposição ao dimetoato. Nesse caso, esse órgão pode ter sido protegido pela ação de desintoxicação das CaEs presentes nos tecidos, as quais se ligaram de forma irreversível às moléculas de dimetoato, impedindo possíveis efeitos citotóxicos desse inseticida.

Com base nessas informações, conclui-se que a intoxicação oral por concentrações subletais de dimetoato inibe a atividade da CaE no ventrículo de abelhas africanizadas, em períodos mais longos de exposição ao inseticida, mas não promove alterações celulares e

teciduais nesse órgão. A inibição da CaE pode ter sido o resultado da ação dessa enzima ao se ligar irreversivelmente às moléculas de dimetoato, atuando na desintoxicação do ventrículo. Estudos posteriores relacionados à metabolização e absorção do dimetoato nos tecidos do ventrículo podem ajudar a entender melhor essas questões.

5.6 REFERÊNCIAS

- BARKER, R. J.; LEHNER, Y.; KUNZMANN, M. R. Pesticides and honey bees: nectar and pollen contamination in alfalfa treated with dimethoate. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 9, n. 2, p. 125-133, fev. 1980.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2014. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 17 set. 2014.
- CHAMBERS, J. E.; MA, T.; BOONE, J. S.; CHAMBERS, H.W. Role of detoxication pathways in acute toxicity levels of phosphorothionate insecticides in the rat. **Life Sciences**, Elmsford, v. 54, n. 18, p. 1357-1364, fev. 1994.
- CHANDA, S. M.; MORTENSEN, S. R.; MOSER, V. C.; PADILLA, S. Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an *in vitro* and *in vivo* comparison. **Fundamental and Applied Toxicology**, Akron, v. 38, n. 2, p. 148-157, mai. 1997.
- CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R. M.; BISWAS, S.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT, J. G. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 615-636, out. 2006.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009.
- CRUZ-LANDIM, C.; SILVA-DE-MORAES, R. L. M.; SERRÃO, J. E. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Comparative Biology**, São Paulo, v. 1, n. 1-2, p. 29-40, 1996.
- DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J-M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 52, p. 81-106, jan. 2007.
- GALLAI, N.; SALLES, J-M.; SETTELE, J.; VAISSIÈRE, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 810-821, jan. 2009.
- HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. H. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 1-12, jan. 1998.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983.
- MAXWELL, D. M. The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 114, n. 2, p. 306-312, jun. 1992.

MCMANUS, J. F. A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, London, v. 158, p. 202-202, ago. 1946.

SILVA-ZACARIN, E. C. M.; CHAUZAT, M. P.; ZEGGANE, S.; DRAJNUDEL, P.; SCHURR, F.; FAUCON, J. P.; MALASPINA, O.; ENGLER, J. A. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**, Badajoz, v. 1, p. 696-703, 2012.

SMIRLE, M. J.; WINSTON, M. L. Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: an adaptation for foraging in contaminated ecosystems. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 66, n. 9, p. 1938-1942, jan. 1988.

SNODGRASS, R. E. **Anatomy and physiology of the honeybees**. New York: Comstock Publishing Associates, 1956.

STOKSTAD, E. Field research on bees raises concern about low-dose pesticides. **Science**, Washington, v. 335, n. 6076, p. 1555, mar. 2012.

VELKI, M.; HACKENBERGER, B. K. Species-specific differences in biomarker responses in two ecologically different earthworms exposed to the insecticide dimethoate. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 156, n. 2, p. 104-112, ago. 2012.

WALLER, G. D.; ERICKSON, B. J.; HARVEY, J.; MARTIN, J. H. Effects of dimethoate on honey bees (Hymenoptera: Apidae) when applied to flowering lemons. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 77, n. 1, p. 70-74, fev. 1984.

WHEELOCK, C. E.; SHAN, G.; OTTEA, J. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 30, n. 2, p. 75-83, jun. 2005.

YU, S. J.; ROBINSON, F. A.; NATION, J. L. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 22, n. 3, p. 360-368, dez. 1984.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho avaliou a toxicidade oral do dimetoato para abelhas africanizadas. Com base na CL_{50} obtida (7,96 ng i. a./ μ L de dieta) é possível dizer que esse inseticida é altamente tóxico. Essa alta toxicidade oral faz com que concentrações subletais de dimetoato ($CL_{50}/100$ e $CL_{50}/10$) possam prejudicar esses organismos de alguma forma, o que pôde ser observado ao longo deste trabalho.

A análise de sobrevivência de abelhas expostas a cada uma das concentrações subletais testadas mostrou que a $CL_{50}/100$ não alterou a sobrevivência, com um TS_{50} aproximado de 13 dias, semelhante ao grupo controle. No entanto, a $CL_{50}/10$ promoveu uma considerável diminuição da sobrevivência, com um TS_{50} aproximado de 5 dias. Esses resultados, além de chamarem a atenção para os efeitos prejudiciais da $CL_{50}/10$, foram utilizados como referência para estabelecer períodos de exposição contínua considerados nas análises enzimáticas, histológicas, histoquímicas e ultraestruturais dos corpos pedunculados e ventrículos. Dessa forma, os grupos expostos à $CL_{50}/100$ foram analisados até 13 dias e os grupos expostos à $CL_{50}/10$ foram analisados até 5 dias. Para essas análises também foram considerados os efeitos da exposição aguda (após 1 dia) às concentrações subletais.

Quando as abelhas ingerem a dieta contendo concentrações subletais de dimetoato, moléculas desse inseticida entram em contato com o sistema digestório, principalmente com o ventrículo. Esse órgão é responsável pela digestão e absorção das substâncias ingeridas na alimentação. Outra função exercida pelo ventrículo é a síntese de enzimas envolvidas em mecanismos de desintoxicação contra xenobióticos, sendo a CaE uma das principais atuantes nesse processo. Assim que as moléculas de dimetoato chegam ao ventrículo, as CaEs fazem seu papel na desintoxicação se ligando de forma irreversível a essas moléculas, ficando inibidas. Com isso, parte das moléculas de dimetoato acabam sendo capturadas e inutilizadas pelas CaEs, diminuindo os possíveis prejuízos nos tecidos do ventrículo. Isso pôde ser comprovado pela não observação de alterações histológicas, histoquímicas e ultraestruturais nas células digestivas e regenerativas do ventrículo e pela diminuição da atividade da CaE observada nos grupos expostos à $CL_{50}/100$ por 13 dias e à $CL_{50}/10$ por 5 dias. Esses resultados indicam que a intoxicação pelo dimetoato foi combatida, principalmente nos períodos de maior exposição às concentrações subletais, e os tecidos do ventrículo foram protegidos.

O mecanismo de desintoxicação realizado pelas CaEs do ventrículo pareceu ser eficaz contra a exposição à $CL_{50}/100$. Os resultados da atividade enzimática mostram que não houve

inibição da AChE presente no cérebro (alvo da ação do dimetoato) para essa concentração. Ainda que a exposição a essa concentração subletal tenha promovido leves alterações histológicas e histoquímicas em poucas células de Kenyon dos corpos pedunculados, essas alterações foram toleradas ou recuperadas pelo organismo após 13 dias de exposição, não sendo prejudiciais a ponto de afetar a sobrevivência dessas abelhas.

Embora os tecidos do ventrículo tenham sido preservados, provavelmente, pela ação das CaEs, uma parte das moléculas de dimetoato foi absorvida pelo epitélio ventricular. Após a absorção, moléculas de inseticida chegaram ao sistema circulatório e, finalmente, ao sistema nervoso central, alvo da ação do dimetoato. Isso ficou evidente pela observação dos efeitos da $CL_{50}/10$ no cérebro das abelhas, principalmente após 5 dias de exposição. Além da inibição da AChE, foram identificadas consideráveis alterações histológicas, histoquímicas e ultraestruturais nas células de Kenyon. Essas alterações sugerem que essas células estavam em estágios iniciais de morte celular, o que pode acabar prejudicando funções importantes do organismo, como comunicação, aprendizado e orientação. Essas alterações enzimáticas e morfológicas podem ainda ter contribuído para a diminuição da sobrevivência dessas abelhas, como foi observado no presente estudo.

A $CL_{50}/100$ não causou grandes prejuízos para as abelhas, uma vez que as poucas alterações morfológicas identificadas foram toleradas ou recuperadas pelo organismo, não afetando a sobrevivência. A atuação da CaE na desintoxicação do ventrículo permitiu a proteção desse órgão e minimizou os efeitos dessa concentração subletal na atividade da AChE do cérebro e nas células de Kenyon dos corpos pedunculados. A $CL_{50}/10$ promoveu consideráveis alterações histológicas, histoquímicas e ultraestruturais nessas células, principalmente após 5 dias de exposição, comprovadas pela inibição da AChE nesse período. A atuação da CaE na desintoxicação do ventrículo para essa concentração subletal também protegeu esse órgão, mas isso não foi suficiente para evitar os prejuízos morfológicos observados nas células de Kenyon, a inibição da AChE e a redução da sobrevivência. Portanto, o dimetoato é altamente tóxico para as abelhas africanizadas e mesmo uma concentração dez vezes menor que a CL_{50} pode causar prejuízos que afetem a vida desses insetos.

7 CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

- O dimetoato apresentou alta toxicidade oral para operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, com CL_{50} equivalente a 7,96 ng i. a./ μ L de dieta.
- A $CL_{50}/100$ não afetou a sobrevivência dessas abelhas, mas a $CL_{50}/10$ promoveu uma redução significativa do tempo médio de vida.
- A $CL_{50}/100$ não alterou a atividade enzimática da AChE presente no cérebro das abelhas, nos períodos de exposição testados. A exposição à $CL_{50}/10$ durante 5 dias promoveu a inibição da atividade dessa enzima.
- A $CL_{50}/100$ diminuiu a atividade enzimática da CaE presente no ventrículo das abelhas após 13 dias de exposição. A exposição à $CL_{50}/10$ durante 5 dias também promoveu a diminuição da atividade dessa enzima.
- A $CL_{50}/100$ promoveu leves alterações histológicas e histoquímicas em poucas células de Kenyon dos corpos pedunculados. Essas alterações foram toleradas ou recuperadas após 13 dias de exposição. A $CL_{50}/10$ promoveu consideráveis alterações histológicas, histoquímicas e ultraestruturais nessas células, principalmente após 5 dias de exposição.
- Tanto a $CL_{50}/100$ quanto a $CL_{50}/10$ não promoveram alterações histológicas, histoquímicas e ultraestruturais nas células do ventrículo.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**: Relatório de atividades de 2011 e 2012. Brasília: Gerência-Geral de Toxicologia, 2013.
- BADIOU, A.; MELED, M.; BELZUNCES, L. P. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase: a biomarker to detect deltamethrin exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 69, n. 2, p. 246-253, fev. 2008.
- BARKER, R. J.; LEHNER, Y.; KUNZMANN, M. R. Pesticides and honey bees: nectar and pollen contamination in alfalfa treated with dimethoate. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 9, n. 2, p. 125-133, fev. 1980.
- BELZUNCES, L. P.; LENOIR-ROUSSEAUX, J-J.; BOUNIAS, M. Properties of acetylcholinesterase from *Apis mellifera* heads, **Insect Biochemistry**, London, v. 18, n. 8, p. 811-819, jun. 1988.
- BLACQUIÈRE, T.; SMAGGHE, G.; VAN GESTEL, C.; MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, New York, v. 21, n. 4, p. 973-992, mai. 2012.
- BOWEN, I. D.; BOWEN, S. M.; JONES, A. H. **Mitosis and Apoptosis**: matters of life and death. London: Chapman & Hall, 1998.
- BRAECKMAN, B.; BRYN K.; RZEZNIK U.; RAES H. Cadmium pathology in an insect cell line: ultrastructural and biochemical effects. **Tissue and Cell**, Essex, v. 31, n. 1, p. 45-53, fev. 1999.
- BRAECKMAN, B.; RAES, H. The ultrastructural effect and subcellular localization of mercuric chloride and methylmercuric chloride in insect cells (*Aedes albopictus* C6/36). **Tissue and Cell**, v. 31, n. 2, p. 223-232, jun. 1999.
- BRANDT, R.; ROHLFING, T.; RYBAK, J.; KROFCZIK, S.; MAYE, A.; WESTERHOFF, M.; HEGE, H-C.; MENZEL, R. Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. **The Journal of Comparative Neurology**, Philadelphia, v. 492, n. 1, p. 1-19, nov. 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2014. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 17 set. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Intoxicações por agrotóxicos. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 4ª ed. Brasília: FUNASA, 1998.

CAMERON, S. A.; LOZIER, J. D.; STRANGE, J. P.; KOCH, J. B.; CORDES, N.; SOLTER, L. F.; GRUSWOLD, T. L. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 2, p. 662-667, jan. 2011.

CARVALHO, C. A. L.; MARCHINI, L. C.; ROS, P. B. Fontes de pólen utilizadas por *Apis mellifera* L. e algumas espécies de Trigonini (Apidae) em Piracicaba (SP). **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 1, p. 49-56, abr. 1999.

CATAE, A. F.; ROAT, T. C.; OLIVEIRA, R. A.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 77, n. 4, p. 274-281, abr. 2014.

CHAMBERS, J. E.; MA, T.; BOONE, J. S.; CHAMBERS, H.W. Role of detoxication pathways in acute toxicity levels of phosphorothionate insecticides in the rat. **Life Sciences**, Elmsford, v. 54, n. 18, p. 1357-1364, fev. 1994.

CHANDA, S. M.; MORTENSEN, S. R.; MOSER, V. C.; PADILLA, S. Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an *in vitro* and *in vivo* comparison. **Fundamental and Applied Toxicology**, Akron, v. 38, n. 2, p. 148-157, mai. 1997.

CHAPMAN, R. F. **The insects**: structure and function. 5th ed. New York: Cambridge University Press, 1998.

CHIARI, W. C.; TOLEDO, V. A. A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; OLIVEIRA, A. J. B.; SAKAGUTI, E. S.; ATTENCIA, V. M.; COSTA, F. M.; MITSUI, M. H. Pollination of Soybean (*Glycine max* L. Merrill) by Honeybees (*Apis mellifera* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 1, p. 31-36, jan. 2005.

CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R. M.; BISWAS, S.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT, J. G. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 615-636, out. 2006.

COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D.; MORAN, N. A.; QUAN, P. L.; BRIESE, T.; HORNIG, M.; GEISER, D. M.; MARTINSON, V.; VANENGELSDORP, D.; KALKSTEIN, A. L.; DRYSDALE, A.; HUI, J.; ZHAI, J.; CUI, L.; HUTCHISON, S. K.; SIMONS, J. F.; EGHOLM, M.; PETTIS J. S.; LIPKIN, W. I. A metagenomic survey of microbes in honey bee Colony Collapse Disorder. **Science**, Washington, v. 318, n. 5848, p. 283-287, out. 2007.

CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. New York: Routledge, 1999.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas**: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Editora UNESP, 2009.

CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructural features of the regenerative cells of the bees (Hymenoptera, Apidae) midguts. **Sociobiology**, Chico, v. 34, n. 3, p. 597-603, jan. 1999.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA-DE-MORAES, R. L. M.; SERRÃO, J. E. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Comparative Biology**, São Paulo, v. 1, n. 1-2, p. 29-40, 1996.

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

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J-M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 52, p. 81-106, jan. 2007.

DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M. H.; DECOURTYE, A.; BUDZINSKI, H.; CLUZEAU, S., MAURIN, G. Structure-toxicity modeling of pesticides to honey bees. **SAR and QSAR in Environmental Research**, Abingdon, v. 13, n. 7-8, p. 641-648, dez. 2002.

EARNSHAW, W. C. Nuclear changes in apoptosis. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 7, n. 3, p. 337-343, 1995.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 7, n. 2, p. 88-95, jul. 1961.

FAO. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture the international response. In: FREITAS, B. M.; PEREIRA, J. O. P. **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2004, p. 19-22.

FERNÁNDEZ, M.; PADRÓN C.; MARCONI L.; GHINI S.; COLOMBO R.; SABATINI A. G.; GIROTTI S. Determination of organophosphorus pesticides in honeybees alter solid phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 922, n. 1-2, p. 257-265, jul. 2001.

FULTON, M. H.; KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 20, n. 1, p. 37-45, jan. 2001.

GALLAI, N.; SALLES, J-M.; SETTELE, J.; VAISSIÈRE, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 810-821, jan. 2009.

GOUGH, H. J.; MCINDOE, E. C.; LEWIS, G. B. The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera* L.) 1981–1992. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 33, n. 2, p. 119-125, mar. 1994.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 335-343, jul. 2007.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 301, n. 1, p. 5-17, jul. 2000.

HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. H. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 1-12, jan. 1998.

INÁCIO, F. R. Influência de diferentes espaçamentos de plantio na visitação de *Apis mellifera* L. e na produtividade da cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 15, n. 1, p. 93-10, 2003.

INTRONA, F.; CAMPOBASSO, C. P.; GOFF, M. L. Entomotoxicology. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 120, n. 1-2, p. 42-47, ago. 2001.

JOHNSON, R. M.; ELLIS, M. D.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, M. Pesticides and honey bee toxicity - USA. **Apidologie**, Versailles, v. 41, n. 3, p. 312-331, mai./jun. 2010.

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

KERR, W. E.; GONÇALVES, L. S.; BLOTTA, L. F.; MACIEL, H. B. Biologia comparada de abelhas italianas (*Apis mellifera ligustica*), africanas (*Apis mellifera adansonii*) e suas híbridas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1., 1970, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Confederação Brasileira de Apicultura, 1970, p. 151-185.

KEVAN, P. G. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, n. 1-3, p. 373-393, ago. 1999.

KEVAN, P. G.; PHILLIPS, T. P. The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences. **Conservation Ecology**, Waterloo, v. 5, n. 1, p. 1-17, abr. 2001.

KIYA, T.; KUNIEDA, T.; KUBO, T. Increased neural activity of a mushroom body neuron subtype in the brains of forager honeybees. **Plos One**, San Francisco, v. 2, n. 4, e371, abr. 2007.

KOMISCHKE, B.; SANDOZ, J-C.; MALUN, D.; GIURFA, M. Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. **European Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 477-485, jan. 2005.

LOEFFLER, M.; KROEMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Experimental Cell Research**, New York, v. 256, n. 1, p. 19-26, abr. 2000.

LOPER, G. M.; ROSS, B. H. Concentration of methyl parathion from PennCap-M in pollens of various lipid and oil contents. **Environmental Entomology**, College Park, v. 11, n. 4, p. 925-927, ago. 1982.

MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; SOUZA, T. F. Defesa de apiários e meliponários contra agrotóxicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 18.; CONGRESSO BRASILEIRO DE MELIPONICULTURA, 4., 2010, Cuiabá, **Anais...** Cuiabá: Confederação Brasileira de Apicultura, 2010, 5p.

- MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v. 23, n. 1-3, p. 303-309, 2006.
- MALASPINA, O.; STORT, A. C. Sucrose syrup-collecting behavior in Africanized and Caucasian bees and in the descendants of their crossings. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 3, p. 459-469, set. 1987.
- MAXWELL, D. M. The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 114, n. 2, p. 306-312, jun. 1992.
- MCMANUS, J. F. A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, London, v. 158, p. 202-202, ago. 1946.
- MOFFETT, J. O.; MACDONALD, R. H.; LEWIN, M. D. Toxicity of carbaryl contaminated pollen to adult honey bees. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 63, n. 2, p. 475-476, abr. 1970.
- MORETI, A. C de C. C.; SILVA, R. M. B.; SILVA, E. C. A.; ALVES, M. L. T. M. F.; OTSUK, I. P. Aumento na produção de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) pela ação de insetos polinizadores. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 53, n. 2-3, p. 280-284, mai./dez. 1996.
- MORSE, R. A.; CALDERONE, N. W. The value of honeybees as pollinators of U.S. crops in 2000. **Bee Culture**, Medina, v. 128, p. 1-15, 2000.
- NOCELLI, R. C. F.; ROAT, T. C.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Social Insects: morphophysiology of the nervous system. In: STEWART, E. M. **Social Insects: structure, function, and behavior**. New York: Nova Science Publishers, 2011, p. 105-120.
- OAKESHOTT, J. G.; CLAUDIANOS, C.; CAMPBELL, P. M.; NEWCOMB, R. D.; RUSSELL, R. J. Biochemical genetics and genomics of insect esterases. **Comprehensive Molecular Insect Science**, Washington, v. 5, p. 309-381, mai. 2005.
- OLIVEIRA, R. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the Africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, New York, v. 29, n. 10, p. 1122-1133, out. 2014.
- OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P. N.; MATTOS, R. C. C.; MOREIRA, J. C. Influence of social-economic factors on the pesticide poisoning, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 130-135, abr. 2001.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **OECD guidelines for the testing of chemicals: honeybees, acute oral toxicity test**. 1998. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-213-honeybees-acute-oral-toxicity-test_9789264070165-en>. Acesso em: 16 dez. 2014.

PARAÍBA, L. C.; KATAGUIRI, K. Model approach for estimating potato pesticide bioconcentration factor. **Chemosphere**, Oxford, v. 73, n. 8, p. 1247-1252, nov. 2008.

PINHEIRO, J. N.; FREITAS, B. M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 266-281, mar. 2010.

RANSON, H., HEMINGWAY, J. Glutathione transferases. **Comprehensive Molecular Insect Science**, Washington, v. 5, p. 383-402, mai. 2005.

ROSSI, C. A.; ROAT, T. C.; TAVARES, D. A.; CINTRA-SOCOLOWSKI, P.; MALASPINA, O. Brain morphophysiology of Africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 65, n. 2, p. 234-243, ago. 2013.

RYBAK, J.; MENZEL, R. Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the alpha-lobe. **Journal of Comparative Neurology**, Philadelphia, v. 334, n. 3, p. 444-465, ago. 1993.

SARTOR, I. F.; SANTARÉM, V. A. Agentes empregados no controle de ectoparasitos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 567-583.

SILVA-ZACARIN, E. C. M.; CHAUZAT, M. P.; ZEGGANE, S.; DRAJNUDEL, P.; SCHURR, F.; FAUCON, J. P.; MALASPINA, O.; ENGLER, J. A. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**, Badajoz, v. 1, p. 696-703, 2012.

SILVEIRA, F. A. Praguicidas: mortalidade de abelhas, contaminação dos produtos apícolas e proteção do apiário. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 149, p. 44-50, 1987.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS DE DEFESA AGRÍCOLA (SINDAG). **Defensivos agrícolas em linha de comercialização**. 2003. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br/new/setor/index.php>>. Acesso em: 14 mai. 2013.

SMIRLE, M. J.; WINSTON, M. L. Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: an adaptation for foraging in contaminated ecosystems. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 66, n. 9, p. 1938-1942, jan. 1988.

SMIRLE, M. J.; WINSTON, M. L.; WOOD-WARD, K. L. Development of a sensitive bioassay for evaluating sublethal pesticides effects on the honey bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 77, n. 1, p. 63-67, fev. 1984.

SNODGRASS, R. E. **Anatomy and physiology of the honeybees**. New York: Comstock Publishing Associates, 1956.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; PINTO, M. S. C. As abelhas como agentes polinizadores. **Revista Electrónica de Veterinaria**, Espanha, v. 8, n. 3, p. 1-7, mar. 2007.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. Z.; ANDRÉA, M. M. **Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos**: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, Brasil, 2004.

STEFANIDOU, M.; ATHANASELIS, S.; KOUTSELINIS, A. The toxicology of honey bee poisoning. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 45, n. 5, p. 261-265, out. 2003.

STOKSTAD, E. Field research on bees raises concern about low-dose pesticides. **Science**, Washington, v. 335, n. 6076, p. 1555, mar. 2012.

THOMPSON, H. Behavioral effects of pesticides in bees – their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, New York, v. 12, n. 1-4, p. 317-330, fev./ago. 2003.

THOMPSON, H.; BALL, R.; BROWN, M.; BEW, M. Varroa destructor resistance to pyrethroid treatments in the United Kingdom. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 56, n. 1, p. 175-181, 2003.

VANDAME, R.; MORAND, S.; COLIN, M-E.; BELZUNCES, L. P. Parasitism in the social bee *Apis mellifera*: quantifying costs and benefits of behavioral resistance to *Varroa destructor* mites. **Apidologie**, Versailles, v. 33, n. 5, p. 433-445, set./out. 2002.

VANENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Colony collapse disorder: a descriptive study. **Plos One**, San Francisco, v. 4, n. 8, e6481, ago. 2009.

VELKI, M.; HACKENBERGER, B. K. Species-specific differences in biomarker responses in two ecologically different earthworms exposed to the insecticide dimethoate. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 156, n. 2, p. 104-112, ago. 2012.

VIDAU, C.; DIOGON, M.; AUFAUVRE, J.; FONTBONNE, R.; VIGUÈS, B.; BRUNET, J. L.; TEXIER, C.; BIRON, D. G.; BLOT, N.; EL ALOUI, H.; BELZUNCES, L. P.; DELBAC, F. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 6, e21550, jun. 2011.

WALLER, G. D.; ERICKSON, B. J.; HARVEY, J.; MARTIN, J. H. Effects of dimethoate on honey bees (Hymenoptera: Apidae) when applied to flowering lemons. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 77, n. 1, p. 70-74, fev. 1984.

WARHURST, P.; GOEBEL, R. **Bee book**: beekeeping in the warmer areas of Australia. Queensland: Department of Primary Industries, 1995.

WHEELOCK, C. E.; SHAN, G.; OTTEA, J. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 30, n. 2, p. 75-83, jun. 2005.

WOO, M.; HAKEM, R.; SOENGAS, M. S.; DUNCAN, G. S.; SHAHINIAN, A.; KÄGI, D.; HAKEM, A.; MCCURRACK, M.; KHOO, W.; KAUFMAN, S. A.; SENALDI, G.; HOWARD, T.; LOWE, S. W.; MAK, T. W. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 12, p. 806-819. jan. 1998.

YU, S. J.; ROBINSON, F. A.; NATION, J. L. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 22, n. 3, p. 360-368, dez. 1984.

ZARS, T. Behavioral functions of the insect mushroom bodies. **Current Opinion in Neurobiology**, London, v. 10, n. 6, p. 790-795, dez. 2000.