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

**“EFEITOS DO INSETICIDA FIPRONIL SOBRE OS
CORPOS PEDUNCULADOS DE OPERÁRIAS DE
Scaptotrigona postica (LATREILLE, 1807)
(HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)”**

CYNTHIA RENATA DE OLIVEIRA JACOB

**Rio Claro
2012**

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

**“EFEITOS DO INSETICIDA FIPRONIL SOBRE OS
CORPOS PEDUNCULADOS DE OPERÁRIAS DE
Scaptotrigona postica (LATREILLE, 1807)
(HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)”**

CYNTHIA RENATA DE OLIVEIRA JACOB

Orientador: Prof Dr. Osmar Malaspina

Co-orientador: Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

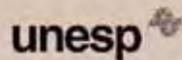
Rio Claro
2012

595.799 Jacob, Cynthia Renata de Oliveira
J15e Efeitos do inseticida fipronil sobre os corpos pedunculados de operárias de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) / Jacob, Cynthia Renata de Oliveira. - Rio Claro : [s.n.], 2012
85 f. : il., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Osmar Malaspina
Co-Orientador: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

1. Abelha. 2. Toxicidade em abelhas sem ferrão. 3. Sistema nervoso central. 4. Atividade neural. 5. Morte celular. I. Título.

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeitos do inseticida Fipronil sobre os corpos pedunculados de operárias de *Scaptotrigona postica* (LATREILLE, 1807) (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)

AUTORA: CYNTHIA RENATA DE OLIVEIRA JACOB

ORIENTADOR: Prof. Dr. OSMAR MALASPINA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI

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

Prof. Dr. OSMAR MALASPINA

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Profa. Dra. ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos, Campus de Sorocaba/SP

Profa. Dra. THAISA CRISTINA ROAT

CEIS - Centro de Estudos de Insetos Sociais, Instituto de Biociências de Rio Claro/SP

Data da realização: 25 de abril de 2012.

*“A competência é essencial para qualquer tarefa
é boa vontade em fazer o que precisa ser feito.
A boa vontade desbanca a competência o tempo todo.
Competência pode ser ensinada - mora na mente.
Boa vontade mora no coração.”*

John Hoover

Agradecimentos

Agradeço a FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro concedido, o qual possibilitou a realização deste trabalho (Processo número: 2010/03723-5).

Ao Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, ao Centro de Estudos de Insetos Sociais e ao Depto de Biologia da UNESP, Rio Claro, pelo apoio técnico fornecido.

Ao Prof Dr Osmar Malaspina e Profa Dra Roberta Cornélio Ferreira Nocelli pela orientação, ensinamentos, confiança no meu trabalho e direcionamento.

Aos técnicos Antônio Sérgio, Gerson, Monika, Pablo, Marcela e Ita pelos serviços técnicos prestados, pela cooperação e amizade, principalmente ao Antonio Yabuki, que viajou comigo alguns quilômetros para que eu conseguisse fotos da MET, muito obrigada.

À Necis, pela atenção e por se mostrar sempre disposta a ajudar.

Aos colegas e amigos de laboratório, pelas conversas, discussões, ajudas e principalmente risadas, o que tornaram a rotina mais divertida. Em especial a Hellen Soares, Clara Lourenço e Stephan Carvalho que sempre estiveram ao meu lado, dispostos a ajudar, conversar, discutir resultados, enfim, pessoas que levarei sempre na memória como uma amizade sincera.

Às amigas Priscila, Ana Carolina, Maíra e Leila pelo apoio, risadas e principalmente pelo carinho durante esses anos.

Aos meus pais Luiza e José e irmã Jéssica pelo apoio, paciência, preocupação, encorajamento nos momentos de desânimo, pelo carinho.

À todos que participaram desta etapa de minha vida de alguma forma, me ajudando a crescer, incentivando e torcendo pelo meu sucesso.

À Deus...

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	7
2.OBJETIVOS GERAIS	17
3. ARTIGO 01	18
Determinação das DL ₅₀ e CL ₅₀ do inseticida fipronil para operárias de abelha sem ferrão <i>Scaptotrigona postica</i> (Latreille,1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).	
4. ARTIGO 02	30
Análise morfológica de doses subletais de fipronil sobre os corpos pedunculados de <i>Scaptotrigona postica</i> (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).	
5. ARTIGO 03	48
Análise fisiológica dos corpos pedunculados de operárias forrageiras de abelha sem ferrão <i>Scaptotrigona postica</i> (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), após contaminação com dose subletal de fipronil	
6. DISCUSSÃO GERAL	72
7. CONCLUSÃO GERAL	74
8. REFERÊNCIAS	745

RESUMO GERAL

Recentemente as abelhas têm sido devidamente valorizadas como importantes polinizadoras de flores silvestres e cultivadas. A densidade populacional de muitos polinizadores tem diminuído devido, principalmente, à intensificação agrícola e ao uso de pesticidas, prejudicando os serviços de polinização. A metodologia clássica para estimar a toxicidade dos produtos químicos para insetos é determinar a dose letal média (DL_{50}) ou a concentração letal média (CL_{50}), podendo então estabelecer doses que sejam mais seguras aos organismos não-alvo ou benéficos. Além dos efeitos de toxicidade aguda, levando a morte das abelhas, doses subletais dos inseticidas podem provocar alterações comportamentais e fisiológicas nos indivíduos, que ao longo do tempo acarretarão em sérios prejuízos na manutenção da colônia. Um dos inseticidas amplamente utilizado é o fipronil, este atua ligando-se aos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), interrompendo os canais de cloro, resultando na perda de sinalização inibitória neural. Na literatura pode-se encontrar diversos trabalhos que utilizam como modelo principal a abelha *Apis mellifera*, porém, é importante ressaltar a diversidade existente entre as abelhas nativas no Brasil, os meliponíneos, e sua participação na conservação da biodiversidade, assim como na polinização de áreas de cultivo, o que torna extremamente importante estudos com essa abelha. Com a finalidade de entender como o fipronil interfere morfo e fisiologicamente em abelhas sem ferrão, a região de interesse deste estudo foram os corpos pedunculados, já que estes são centros cerebrais complexos e tidos como local de convergência multisensorial. Para auxiliar no mapeamento metabólico, utilizou-se como marcador a enzima citocromo oxidase e a enzima caspase-3, técnicas utilizadas na observação de atividade neural e morte celular, respectivamente. Neste trabalho estabeleceu-se a DL_{50} tópica e CL_{50} de ingestão do inseticida fipronil para operárias recém-emergidas da abelha sem ferrão *S. postica* em 0.54ng/abelha e 0.24ng/ μ L de dieta após 24 horas, respectivamente, confirmando a elevada toxicidade deste fenilpirazol. Foram também verificadas alterações morfológicas, de atividade neural e presença de morte celular nos grupos de abelhas forrageiras submetidos à contaminação tópica (doses de

0.27, 0.54 e 1.08 ng/abelha), quando comparada ao grupo controle, apresentando uma relação entre dose e tempo de exposição. No grupo de abelhas forrageiras submetido ao tratamento por ingestão (doses de 0.12, 0.24 e 0.48 ng/ μ L de dieta) as alterações morfológicas e de atividade neural não foram muito evidentes, possivelmente devido ao processo de metabolização do inseticida ao passar pelo trato digestivo. Porém ao realizar a técnica de marcação para morte celular, caspase-3, a resposta foi semelhante ao tratamento tópico, com significância entre as doses de DL₅₀ e CL₅₀ quando comparados com os grupos controle. Tais dados mostraram a toxicidade deste inseticida sobre o tecido nervoso de abelhas sem ferrão, provocando alterações que podem comprometer a sobrevivência do inseto, assim como a manutenção de toda a colônia.

Palavras-chave: Abelha sem ferrão. Sistema nervoso central. Atividade neural. Caspase-3. Morte celular.

ABSTRACT

A few decades the bees are considered an important indicator of high environmental sensitivity, and appreciated as important pollinators of wildflowers and cultivated. The population density of many pollinators have declined to harmful levels to pollination services manly due to agricultural intensification and the use of pesticides. The classic methodology of estimating the effects of chemicals for insects is to determine the median lethal dose (LD₅₀) or median lethal concentration (LC₅₀) that can then establish doses that do not harm non-target organisms or beneficial. Besides the effects of acute toxicity, leading to death bees, sublethal doses of insecticides can cause physiological and behavior changes of individuals over time, resulting in serious harm to maintain the colony. One of the widely used insecticides is fipronil, its acts by binding to gamma-aminobutyric acid (GABA) disrupting chloride channels, resulting in loss of inhibitory neural signaling. In the literature one can find several works using as main bee model *Apis mellifera*, however, it is important to highlight the diversity of Brazilian native bees, the stingless bees, and their participation in biodiversity conversation, as well as in the pollination of

cultivated land. In order to understand how fipronil affect morpho and physiologically the stingless bee *S. postica*, the region of interest in this study were the mushroom bodies, since these are complex brain centers and used as a place of multisensory convergence. This work established the contact LD₅₀ and Ingestion LC₅₀ to the fipronil insecticide for foragers workers stingless bee *Scaptotrigona postica* in 0.54ng/bee and 0.24ng/μL of the food after 24 hours, respectively, confirming the high toxicity of this phenylpyrazole, in the groups submitted to contact contamination, were identify morphological changes, in neural activity and presence of the cell death, compared to the control group, showing a relationship between dose and exposure time. Differences were found between the groups submitted to ingestion treatment, where the morphological changes and neural activity were not evident, possibly due to the metabolism process of the insecticide through the digestive tract. But to make the marking technique to cell death, caspase-3, the response was similar to the contact treatment with significance between LD₅₀ and LC₅₀ dose when compared with control groups. These data show the toxicity of this insecticide on nervous tissue of stingless bees, causing irreversible changes. Affecting the survival of the insect, as well as the maintenance of the colony.

Key-words: Stingless bee. Central nervous system. Neural activity. Caspase-3. Cell death.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas são animais que vivem em íntimo contato com a natureza por meio da coleta de pólen, néctar, água e resina para sua colônia, assim, necessitam que todas as fontes desses recursos sejam puras e isentas de contaminantes (CHAMBÓ et al., 2010). Por este motivo as abelhas são consideradas altamente sensíveis e importantes indicadores ambientais. São organismos que respondem a contaminações químicas ambientais, com elevada mortalidade, devido a presença de partículas em suspensão que se acumulam em seu corpo, além de apresentarem características etiológicas e morfológicas que fornecem dados de avaliação sobre impactos ambientais, tanto em áreas industriais como rurais (CELLI; MACCAGNANI, 2003; GHINI et al, 2004).

As abelhas são importantes polinizadoras de flores silvestres e cultivadas (CASTRO et al, 2006). Um estudo em 200 países demonstrou que das 114 culturas mais importantes, 86 dependem da polinização por animais para a produção de frutos e sementes. Cerca de 75% das 240 mil espécies de plantas existentes no mundo dependem de polinização, sendo as abelhas responsáveis por 73% destas (FAO, 2004).

Nos últimos cinquenta anos ou mais, as populações de abelhas têm diminuído em diversos países industrializados, com tendência de aceleração, levando a preocupações ecológicas e econômicas, devido a perdas, tanto na produtividade agrícola como na biodiversidade. Em 1894, as colheitas de mel foram prejudicadas por condições meteorológicas desfavoráveis, em 1926, os prejuízos ocorreram devido a doenças na colmeia. A partir de 1998, foram relatados enfraquecimentos e mortalidades incomuns em colônias de abelhas na França, Suíça, Bélgica, Itália e outros países (ALIX et al, 2008).

O número de apicultores relatando tais problemas e, conseqüentemente, as elevadas perdas tornaram-se alarmantes, sendo estes fenômenos denominados "*Colony Collapse Disorder*" (CCD). Cientistas definiram alguns sintomas do CCD, como: completa ausência de abelhas adultas em colônias com pouca ou nenhuma abelha morta em torno da mesma; presença de ninhada operculada, presença de alimentos estocados e parasitas típicos de colônias (ELLIS et al, 2010). Embora estas perdas não sejam compreendidas

completamente, algumas hipóteses são apresentadas, tais como: existência de parasitas e patógenos, manejo de abelhas (gestão de estresse), baixa variabilidade genética, uso de produtos químicos para controle de pragas de colmeias e a presença de toxinas no ambiente (ELLIS et al, 2010; ALIX et al, 2008).

Entre as possíveis causas, uma que se tornou tema de debates é o uso de determinados produtos químicos ou a combinação de produtos que podem contribuir para o CCD, incluindo pesticidas e alguns fungicidas (JOHNSON et al, 2010), já que os casos foram observados, principalmente, em áreas de culturas agrícolas (ALIX et al, 2008).

Pesquisadores relataram que, tanto nos Estados Unidos de 1966 a 1979 (ATKINS, 1992 apud JOHNSON et al, 2010) como no Reino Unido, entre os anos de 1989 a 2003 (BARNETT et al, 2007), a queda na população de abelhas estava relacionada com a aplicação de inseticidas organofosforados, carbamatos e piretroides. Já no Brasil, o declínio no número de colônias foi simultâneo a expansão de culturas para biocombustível e ao aumento no uso de pesticidas (VANDAME; PALACIO, 2010). Segundo levantamentos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola (SINDAG), realizados em 2009, houve um crescimento de 4,59% da área cultivada no período entre 2004 e 2008 e aumento no consumo de pesticidas, no mesmo período, de 44,6%. Isso equivale a um aumento de vendas 10 vezes superior à área plantada no país (CARNEIRO; ALMEIDA, 2010).

A toxicidade dos inseticidas começou a ser estudada nos países de clima temperado, os quais foram os principais realizadores deste tipo de estudo mesmo antes da introdução do DDT em 1942 (MORAIS et al, 2000). A maior parte das abelhas utilizadas nestes testes são de espécies europeias, diferentemente do Brasil onde são utilizadas as abelhas da espécie *Apis mellifera* africanizada, um híbrido amplamente distribuído pelo país, com grande importância social e econômica principalmente para a apicultura e produtividade de diversas culturas comerciais (DEL SARTO, 2009).

No Brasil são utilizados diversos pesticidas, tornando-se importante a realização de estudos sobre seus mecanismos de ação, sobre as

transformações que os pesticidas sofrem no ambiente e sua toxicidade, tanto para os organismos-alvo (COUTINHO et al, 2005) como para os não- alvo, visto que apenas 4% dos insetos existentes são tidos como pragas agrícolas e o Brasil possui a maior diversidade de abelhas existentes (ABD AL-FATTAH; EL-SHEMY, 1990).

Os testes realizados apresentam métodos de estudo de toxicidade e riscos dos pesticidas para abelhas em laboratório, condições de campo e semi-campo seguindo orientações de organizações como a OECD- Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico (Guidelines for the testing of chemicals, 1998). A metodologia clássica para estimar os efeitos dos produtos químicos para insetos benéficos ou não-alvo é determinar a dose letal média (DL_{50}) ou a concentração letal média (CL_{50}) (SOUZA, 2009). A dose letal média corresponde a única dose de inseticida, administrada por ingestão ou contato que provoca a morte de 50% do grupo de abelhas tratadas em 24 ou 48 horas (DL_{50} expressa em peso de ingrediente ativo por abelha) e a concentração letal média corresponde a concentração de inseticida presente no ambiente ou alimento que provoca a morte de 50% da população após 24 ou 48 horas, sendo impossível estabelecer a quantidade absorvida pelo organismo (RORTAIS et al, 2005).

Os inseticidas são classificados de acordo com sua toxicidade, baseado em valores de DL_{50} para qualquer uma das vias de contaminação (ingestão ou tópico) apresentando as seguintes categorias toxicológicas: **I-** extremamente tóxico ($DL_{50} < 50$ mg/kg de peso vivo), **II-** muito tóxico (DL_{50} 50 a 500 mg/kg de peso vivo), **III-** moderadamente tóxico (DL_{50} 500 a 5000 mg/kg de peso vivo) e **IV-** pouco tóxico ($DL_{50} > 5000$ mg/kg de peso vivo) (EMBRAPA, 2011).

Os pesticidas em geral e os inseticidas podem induzir dois tipos de efeitos em abelhas, o efeito letal (morte) e o subletal. Os efeitos letais são fáceis de serem caracterizados e podem ser estudados pela exposição das abelhas a esses produtos, de forma aguda ou crônica. Os efeitos subletais apesar de não apresentarem efeitos deletérios imediatos ou aparentes como indícios de intoxicação, também comprometem a viabilidade, a sobrevivência e o tamanho da população da colmeia (DEVILLERS, 2002; MALASPINA; SOUZA, 2006).

Devido ao desenvolvimento de resistência por alguns insetos e a consequente necessidade de uma maior eficácia sobre pragas agrícolas, foram produzidas duas novas classes de inseticidas sistêmicos, os neonicotinóides e os fenilpirazóis, substituindo muitos dos antigos pesticidas. Os neonicotinóides representados pelo Admire®, Confidor®, Muralla®, Provado®, tem como ingrediente ativo o imidacloprido, um agonista que se liga aos receptores nicotínicos da acetilcolina localizados nos neurônios pós-sinápticos, causando ativação persistente de receptores colinérgicos que levam à hiperexcitação e morte (SUCHAIL et al, 2003). Já os fenilpirazóis, que tem como principais representantes o Regente®, Termitor®, Frontline® possuem como ingrediente ativo o fipronil.

O fipronil (5-amino-1-(2,3-dicloro- α - α - α -trifluor-p-tolil)4-trifluorometilsulfonil-pirazol-3 carbonitrila), fórmula química $C_{12}H_4C_{12}F_6N_4OS$ foi desenvolvido em 1987, por Rhone-Poulenc Ag Company (atualmente Bayer CropScience), comercializado a partir de 1993 e registrado pelos Estados Unidos em 1996. Este pesticida não exibe apenas uma toxicidade seletiva entre insetos e mamíferos, mas também ação de largo espectro (NARAHASHI et al, 2007). Ele foi o primeiro produto do grupo dos fenilpirazóis a ser introduzido no controle de pragas (ALIOUANE et al, 2009). É um inseticida relativamente móvel no solo e sua degradação produz diferentes produtos, dependendo do local em que se encontra. No solo, quando na superfície, por estar exposto à luz solar sua degradação produz o densulfonil-fipronil. A oxidação próxima ao solo produz o sulfone-fipronil e a hidrólise do composto produz o amide-fipronil. A meia vida deste inseticida e seus produtos no solo indicam que são persistentes, com degradação total entre 111-350 dias, dependendo das condições do solo (GUNASEKARA et al, 2007).

Este inseticida age no sistema nervoso ligando-se aos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), que controlam o fluxo de íons cloro através da membrana da célula nervosa, causando inibição da transmissão sináptica. Dessa forma a ausência de inibição sináptica causa hiperexcitação, convulsão e paralisia do sistema nervoso central (SNC), levando o organismo à morte (EL HASSANI et al, 2005; NARAHASHI et al, 2007; ALIOUANE et al, 2009). O GABA é um importante neurotransmissor inibitório em invertebrados, sendo

amplamente distribuído no cérebro de abelhas e nos gânglios ventrais de Hymenoptera e Orthoptera (EL HASSANI et al, 2005). Embora o fipronil seja altamente tóxico para abelhas, o produto apresenta uma toxicidade moderada para mamíferos (TINGLE et al, 2003).

Com um mercado mundial estimado em U\$150 bilhões (ALIOUANE et al, 2009), o fipronil é utilizado por possuir um amplo espectro de ação, sendo aplicado no solo em culturas de batata, cana de açúcar e milho; em folhas nas culturas de algodão, arroz, milho e soja; nas sementes de arroz, cevada, soja e feijão e na água para irrigação do arroz. Além de ser utilizado em animais no controle de pulgas e carrapatos e domesticamente no controle de baratas e formigas (AAJOUND et al, 2003; COUTINHO et al, 2005). Este pesticida apresenta modo de ação diferente dos organofosforados e carbamatos (ambos inibidores de colinesterases) e alguns piretróides (ativadores de canais de sódio), inseticidas clássicos aos quais alguns insetos adquiriram resistência (GUNASEKARA et al, 2007).

Em estudos sobre os efeitos tóxicos de inseticidas sobre abelhas Decourtye et al (2009) realizaram testes de capacidade associativa para encontro de alimento em abelhas *A. mellifera* e observaram que o tratamento com dose subletal de 1ng/mg de fipronil prejudicou a execução da tarefa em relação ao grupo controle, com uma queda no número de abelhas que entram no labirinto para a coleta de alimento e um aumento no número de abelhas que não chegaram ao destino corretamente. Segundo este mesmo autor (2005), numa pesquisa comportamental de reflexo de extensão de probóscide, após ingestão de 0.15ng/abelha/dia, ocorreu uma diminuição no nível de resposta. Assim, como El Hassani et al (2005), que apesar de não observar efeitos sobre a atividade locomotora após tratamento com 0.01 e 0.5ng de fipronil, verificou, que as mesmas doses estudadas provocaram uma diminuição na sensibilidade à sacarose em concentrações de 1% e 0.3% respectivamente.

No Brasil as abelhas utilizadas como modelo experimental são da espécie *A. mellifera*, introduzidas no Brasil a partir da Europa e África. Porém, além desta, existem espécies brasileiras solitárias e sociais, também importantes para a polinização de diversas plantas (LOPES et al, 2005),

(MALASPINA; STORT, 1983; KERR et al, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997; MORAES et al, 2000).

As abelhas da subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) são também conhecidas como abelhas sem ferrão, pelo fato de possuírem ferrão atrofiado. Estão subdivididas, taxonomicamente, em duas tribos: Meliponini e Trigonini. No Brasil, os meliponíneos são responsáveis por aproximadamente 40- 90% da polinização de árvores nativas dependendo do ecossistema considerado e, conseqüentemente, da produção de frutos e sementes. A riqueza de diversidade dessas abelhas é estimada em 3.000 espécies, sendo encontradas na América do Sul, América Central, Ásia, Ilhas do Pacífico, Austrália, Nova Zelândia e África, (KERR et al, 1996; MORAES et al, 2000).

Os meliponíneos chegam a polinizar, em áreas agrícolas, cerca de 66% das 1.500 espécies cultivadas no mundo, resultando em uma estimativa de 15 a 30% da produção mundial de alimentos (KREMEN et al, 2002). Alguns exemplos no Brasil são as abelhas *Nannotrigona testaceicornis* e *Tetragonisca angustula* utilizadas em estufas para cultivo de morango e *Melipona subnitida* usada em pomares de goiaba (CASTRO et al, 2006).

As abelhas da espécie *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) também conhecida como “mandaguari” ou “canudo”, pertencem a um grupo de meliponíneos que vive em ocos de árvores e podem ser encontradas em todas as áreas de clima tropical e subtropical, estendendo-se desde o México até o Rio Grande do Sul (NOGUEIRA-NETO 1997; MACIEIRA; PRONI, 2004).

A divisão de trabalho entre as operárias está baseada na capacitação do indivíduo para exercer determinada tarefa, que é alcançada através da maturação fisiológica para seu desempenho e adquirida por etapas, com o avanço da idade, no polietismo etário (FREE, 1980). As abelhas sem ferrão, assim como as abelhas melíferas, apresentam dois sexos – masculino e feminino – sendo o último dividido em duas castas – operárias e rainhas (VELTHUIS, 1997).

Às rainhas cabem basicamente a postura de ovos férteis. Após o acasalamento, elas têm seu abdome amplamente desenvolvido, pois geralmente a produção e postura de ovos é intensa. Nesta fase são chamadas de rainhas poedeiras ou fisiogástricas. As operárias constituem a casta que

realiza as tarefas do ninho que seguem uma determinada sequência, de acordo com a idade do indivíduo e com as necessidades da colônia. Assim, as abelhas recém-emergidas cuidam primeiro da cria e das atividades diretas ou indiretamente ligadas a ela, posteriormente realizam atividades no interior do ninho, como limpeza e manipulação de alimentos. Finalmente, passam a ser forrageiras, trabalhando com a coleta de alimentos. Os machos tem a função de se acasalar com as rainhas (NOGUEIRA-NETO, 1997), e diferentemente de *Apis* os machos de meliponíneos também realizam funções no interior da colônia, como incubação de favos de cria, desidratação de néctar, defesa do ninho e outras (KERR; CUNHA, 1990).

Na fase de forrageira, o processo de coleta de alimento expõe a abelha ao meio externo, colocando-a em contato com predadores, patógenos, estímulos visuais, tácteis e olfativos, envolvendo informações complexas de aprendizado, memória, comunicação, navegação, entre outras respostas flexíveis (DECOURTYE et al, 2009). O processamento destas informações complexas é atribuído a uma região cerebral que tem despertado grande interesse na comunidade científica desde sua primeira descrição em 1850 por Dujardin (MOBBS, 1985).

O sistema nervoso dos insetos é organizado em Sistema Nervoso Central e Periférico, constituído basicamente por dois tipos celulares, sendo os neurônios a unidade fundamental, apresentando morfologia e função especializada na percepção e condução de estímulos, e as células gliais ou neuroglias que ocupam os espaços entre os neurônios e têm a função de sustentação e isolamento dos neurônios, entre outras (KRETZSCHMAR; PFLUGFELDER, 2002). Além do cérebro, situado dorsalmente na cabeça, o sistema nervoso é constituído pela cadeia nervosa ventral e pelo sistema estomogástrico (CHAPMAN, 1998).

O cérebro é constituído por regiões contendo os corpos celulares de neurônios, denominadas somata, e as regiões que contém os prolongamentos celulares, chamados de neurólipas (CHAPMAN, 1998; MACHADO, 2006). Em abelhas adultas este é formado pela fusão de três gânglios e apresentam três regiões distintas: o protocérebro, o deutocérebro e o tritocérebro (CRUZ-LANDIM, 2009).

A região do protocérebro apresenta os lobos ópticos (LO) e os corpos pedunculados (CP). Os LO são estruturas complexas e estão presentes como projeções laterais que contém elementos nervosos formando os olhos compostos, responsáveis pela captação de estímulos visuais (RIBI et al, 2008). Os corpos pedunculados (CP), são estruturas encontradas no cérebro de todos os insetos, sendo descrito também em muitos crustáceos e anelídeos. Estão localizados nas regiões médio-laterais (BRANDT et al, 2005), envolvidos no processamento sensorial (MENZEL; MANZ, 2005).

A região do deutero cérebro apresenta os lobos antenais, que são estruturas esféricas que recebem estímulos olfatórios captados por neurônios sensitivos presentes nas antenas e nas estruturas da boca (RIBI et al, 2008). O tritocérebro é uma pequena região composta por um par de lobos localizados ventralmente aos lobos antenais e paralelamente ao esôfago, esta porção do sistema nervoso fica localizada fora da estrutura cerebral e apresenta elementos motores e sensoriais que o ligam ao sistema estomogástrico (CRUZ-LANDIM, 2009).

Segundo Dujardim (1850), estas seriam regiões envolvidas no comportamento de “inteligência”, devido a sua proeminência particular no cérebro de Hymenoptera sociais (FARRIS; SINAKEVITCH, 2003; HEISENBERG, 1998). Estudos recentes suportam tal sugestão, mostrando seu envolvimento no contexto de integração sensorial multimodal, no monitoramento do comportamento motor e certamente nos tipos de aprendizagem e memória (FARRIS; SINAKEVITCH, 2003).

Os corpos pedunculados são formados pelo cálice, que em abelhas são em número par, sendo um em cada lado do protocérebro. Em outras espécies os cálices podem ser únicos (MOBBS, 1985; FAHRBACH, 2006). No interior dos cálices existem aproximadamente 340.000 neurônios (cérebro de *A. mellifera*) denominadas interneurônios ou células de Kenyon, que consistem em pequenas células nervosas intrínsecas (ZARS, 2000), arranjadas de maneira altamente organizada com dendritos, corpos celulares e terminais axonais separados dentro de neurópilas distintas chamadas de cálice (região de entrada), pedúnculo e lobos α e β (região de saída) (OLESKEVICH et al, 1997). Essa região do protocérebro é formada por três tipos de interneurônios,

facilmente identificados pelo tamanho e localização de seus corpos celulares: as células de Kenyon compactas internas, uma subpopulação com pequenos corpos celulares presentes no centro do cálice; as células de Kenyon não-compactas internas, células com grandes corpos celulares, que preenchem o restante do cálice; e as células de Kenyon compactas externas, outra subpopulação de células com pequenos corpos celulares presentes no exterior do cálice (FARRIS; SINAKEVITCH, 2003; KIYA et al, 2007).

O tamanho relativo dos CPs está relacionado com a complexidade do comportamento dos insetos e com a organização social (FARRIS, 2008; CRUZ-LANDIM, 2009). Ao comparar o tamanho relativo desta estrutura entre operárias, rainhas e zangões de *A. mellifera*, verifica-se que estas são maiores em operárias, as quais apresentam comportamentos mais diversificados dentro da colmeia (ROAT, 2008).

As abelhas são modelos importantes na neurobiologia, devido ao seu sistema nervoso relativamente simples, em termos de estrutura e número de células nervosas, quando comparado ao cérebro humano, apresentando surpreendentes habilidades cognitivas (RIBI et al, 2008). Assim, os CP são regiões de interesse quando se procura identificar os efeitos dos pesticidas que agem sobre o sistema nervoso.

Diante de diversas técnicas utilizadas para mapeamento de regiões cerebrais, a citocromo oxidase (CO) é uma técnica amplamente utilizada como marcador mitocondrial para função neural em mamíferos, sendo um método válido também em invertebrados (DÉGLISE et al, 2003). Trabalhos como de Armengaud et al (2000; 2001) utilizaram tal técnica a fim de avaliar alterações no metabolismo neural, após contaminação por produtos químicos, como os inseticidas.

A citocromo oxidase (CO) ou Complexo IV é um complexo proteico transmembrana encontrado nas mitocôndrias que desempenha um importante papel na geração de ATP por fosforilação oxidativa, já que é a última enzima do transporte de elétrons da cadeia respiratória (PRIDGEON et al, 2009). Em adição a função de respiração e síntese de ATP, a mitocôndria apresenta funções dependentes de energia como a regulação de funções celulares, incluindo metabolismo intermediário, regulação iônica, transporte iônico e

motilidade celular, além de ser alvo de produtos tóxicos (SCHRAF; SIEGFRIED, 1999).

A CO apresenta três subunidades (I-III) que são codificadas pelo DNA mitocondrial, formando um núcleo funcional e catalítico da enzima. Em estudos sobre essa enzima foram observados que a superexpressão da subunidade I estaria associada à resistência aos piretroides, a subunidade II à resistência ao metotrexato (droga usada em quimioterapia) e a subunidade III que foi recentemente identificada como ser especialmente induzida por doses de alguns inseticidas (PRIDGEON et al, 2009). A distribuição da atividade de CO pode ser visualizada em tecidos seccionados, sendo um indicador da capacidade metabólica do tecido, que varia de acordo com sua região no organismo (HEVNER; WONG-RILEY, 1989).

Decourtye et al (2004) observou o aumento na atividade de CO nos corpos pedunculados em operárias de *A. mellifera*, após tratamento com inseticida imidacloprido. Além deste, outros pesquisadores como Déglise et al (2003) e Armengaud et al (2000) utilizaram esta técnica para avaliar os efeitos de curta duração de ligantes colinérgicos no metabolismo de diferentes estruturas cerebrais, focando suas investigações nas regiões dos lobos antenais (LA) e corpos pedunculados, já que estas são estruturas relacionadas ao processo de aprendizado e memória.

Outra técnica interessante utilizada para avaliação dos efeitos de doses subletais de substâncias tóxicas no sistema nervoso é a verificação da presença de proteases apoptóticas.

Como se sabe a apoptose ou morte celular programada (MCP) é um evento celular geneticamente programado, importante em organismos multicelulares durante seu desenvolvimento e como defesa para uma variedade de estímulos como infecções, mutações, vírus, agressão tóxica ou presença de células danificadas (EARNSHAW et al, 1999; WOO et al, 1998). Existem pelo menos três formas de morte celular programada diferente: a MCP nuclear ou apoptótica, a autofágica e citoplasmática (BREDESEN et al, 2006).

A apoptose é realizada por uma família de proteases chamadas de caspases. A função das caspases foi identificada, primeiramente, no nematoide *Caenorhabditis elegans* e atualmente a família de genes das caspases contém

ao menos 14 membros em mamíferos, sendo 11 enzimas conhecidas em humanos (PETTMANN; HENDERSON, 1998; NICHOLSON, 1999).

Desde que o conceito de apoptose foi estabelecido em 1972, foram realizadas diversas pesquisas genéticas sobre a iniciação, execução e regulação da morte celular. Evidências demonstram que seus mecanismos são conservados através da evolução. Caspases e seus homólogos foram descritos em espécies distantes como nematóides (*Caenorhabditis elegans*), dípteros (*Drosophila melanogaster*) e lepdópteros (*Scodoptera frugiperda*) (RIEDL; SHI, 2004). São divididas em duas classes: os iniciadores de caspases, que clivam formas inativas de caspases efetores para ativa-las que incluem as caspases 2,8,9 e 10 em mamíferos e Dronc e Dredd em mosca de fruta, e as caspases efetoras 3,6 e 7 em mamíferos e Drice, Decay, Damm, Dcpl e Strica em mosca de fruta. A CED-3 é a caspase apenas de nematóides e funciona tanto como iniciador quanto como efetor da morte celular programada (RIELD; SHI, 2004).

A caspase-3 esta presente no processo de morte celular programada de células neurais, estas foram observadas através de experimentos onde a ação desta caspase era inibida, segundo os resultados, houve aumento no tamanho cerebral de roedores, correlacionando este com a diminuição de apoptose (PETTMANN; HENDERSON, 1998), o que faz da caspase-3 um excelente marcador dos processos de morte celular dependentes de caspase.

2. OBJETIVOS GERAIS

Diante da extrema importância em se avaliar os efeitos de doses subletais dos pesticidas sobre o sistema nervoso de abelhas sem ferrão, os objetivos desse trabalho foram:

- Determinar a dose letal média (DL₅₀) tópico e concentração letal média (CL₅₀) por ingestão do inseticida fipronil, para operárias recém- emergidas de *S. postica*;
- Verificar a ocorrência de alterações morfológicas na região cerebral dos corpos pedunculados após tratamentos tópico e de ingestão do inseticida fipronil, para operárias forrageiras da abelha *S. postica*;

- Verificar alterações fisiológicas na região dos corpos pedunculados através de avaliação de atividade neural a partir de marcação pela enzima citocromo oxidase e o aumento de morte celular pela marcação de caspase-3, após tratamentos tóxico e por ingestão de inseticida fipronil, para operárias forrageiras da abelha *S. postica*.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Biológico

Foram utilizados exemplares de operárias de *Scaptotrigona postica* coletados no apiário o Departamento de Biologia – Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP - *Campus* de Rio Claro.

3.2. Metodologia

- Estabelecimento da dose letal média (DL₅₀)
- Estabelecimento da concentração letal média (CL₅₀)

3.4 Análise dos resultados

3.4.1 Morfológica

- Microscopia de Luz (ML): Técnica de coloração com Hematoxilina e Eosina
- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): Contraste com solução de acetato de uranila e citrato de chumbo.

3.5.2 Fisiológica

- Análise da atividade neural- Histoquímica para marcação da enzima citocromo oxidase
- Análise de morte celular - Imunoistoquímica para marcação da enzima proteolítica Caspase 3

Os detalhes das técnicas utilizadas estão descritas nos artigos.

4. ARTIGO 01

DETERMINAÇÃO DAS DL₅₀ E CL₅₀ DO INSETICIDA FIPRONIL PARA OPERÁRIAS DE ABELHA SEM FERRÃO *Scaptotrigona postica* (Latreille,1807) (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI).

4.1 RESUMO

Para evitar danos nos cultivos e prejuízos financeiros, o sistema faz uso de diferentes substâncias químicas para o controle de insetos praga e ervas daninhas. Porém, tais substâncias podem afetar também insetos considerados benéficos, como as abelhas. Estas são os principais agentes polinizadores de aproximadamente 33% de todas as culturas utilizadas como alimento humano. Por ser um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo e apresentar grande diversidade de espécie de abelhas é importante que no Brasil sejam desenvolvidos estudos sobre a toxicidade desses produtos em diferentes espécies, como as abelhas sem ferrão. O fipronil é um inseticida amplamente utilizado no controle de diversas pragas, sendo utilizado no presente trabalho para a determinação da dose e concentração letal média (DL₅₀ e CL₅₀) sobre abelhas sem ferrão. Os valores de DL₅₀ e CL₅₀ foram de 0.54ng/abelha e 0.24 ng/μL de dieta, após 24 horas, respectivamente, sobre a espécie de operárias recém-emergidas de abelha sem ferrão *S. postica*, sendo estes valores considerados, de acordo com a tabela de classificação de toxicidade, como muito tóxico para as abelhas.

Palavras- chave: Neurotóxico. Fenilpirazóis. Inseticida. GABA

4.2 INTRODUÇÃO

Insetos praga e ervas daninha sempre foram os principais causadores de prejuízos na produção agrícola, sendo necessário o desenvolvimento contínuo de novas substâncias químicas (HAINZL; CASIDA, 1996) com propriedades seletivas e de ação específica (ISHAAYA, 2001) para o controle dos mesmos. Para serem lançado no mercado os agrotóxicos, entre eles os inseticidas, passam por testes, necessários para assegurar que estes produtos químicos não causarão nenhum dano ao meio ambiente, em especial aos polinizadores (RORTAIS et al, 2005).

Aproximadamente 200 mil espécies de animais são agentes polinizadores das mais de 250 mil espécies de vegetais no mundo, entre eles alguns vertebrados, como aves e mamíferos; porém, os insetos são os principais agentes polinizadores, e as abelhas os mais eficientes nesse processo (DEVILLERS et al, 2002).

Estima-se que 33% de todas as culturas usadas na alimentação humana seja dependente da polinização por abelhas (KLEIN et al, 2007; BERNAL et al, 2011), agravando a preocupação sobre a redução da densidade populacional deste inseto, que pode prejudicar não apenas a produção em áreas agrícolas, mas também comprometer os serviços de polinização de diversos ecossistemas naturais (PINHEIRO;FREITAS, 2010). Fatores como a fragmentação do habitat, plantio de monoculturas e a baixa oferta de alimento favorecem o declínio das populações de abelhas, entretanto, o uso de agrotóxicos, como os inseticidas, é o agente mais impactante para os polinizadores (CARVALHO et al, 2009).

Desde 2008, o Brasil assumiu o posto de maior consumidor de agrotóxicos em todo o mundo, com uma movimentação de mais de 11 bilhões de reais por ano. A introdução dos agrotóxicos no país teve início em 1943, quando chegaram as primeiras amostras de DDT. Atualmente existem cerca de 431 moléculas autorizadas para serem utilizadas como agrotóxicos no país, (ORTIZ, 2011) dentre elas o fipronil, um inseticida neurotóxico do grupo dos fenilpirazóis, que age como bloqueador dos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), impedindo a inibição normal do impulso nervoso e consequentemente causando excesso de atividade neural, o que resulta em

hiperexcitação, paralisia e morte do organismo (CONNELLY, 2001; ZHAO et al, 2004).

Este é um inseticida utilizado no controle de pragas em grandes áreas de cultivo, como cana de açúcar, soja, milho; de parasitas veterinários, como pulgas e carrapatos e de baratas e formigas no uso doméstico (COUTINHO et al, 2005). Porém, além dos insetos alvo, o fipronil tem demonstrado uma elevada toxicidade sobre insetos não-alvo (EL HASSANI et al, 2005). Estudos utilizando a abelha *Apis mellifera*, demonstraram que doses subletais de fipronil podem provocar alterações de sensibilidade a sacarose (ALIOUANE et al, 2009), efeito sobre o desempenho de aprendizagem (DECOURTYE et al, 2005), orientação e forrageamento (DECOURTYE, 2009).

A toxicidade de pesticidas é bem documentada para as abelhas melíferas, especialmente sobre os efeitos de curto prazo, sendo limitado o número de trabalhos com abelhas sem ferrão, uma vez que estas espécies não ocorrem em clima temperado, os quais são os principais realizadores deste tipo de pesquisa (MORAES et al, 2000; LADURNER et al, 2003).

Os meliponíneos formam um grupo altamente especializado, dependente de características climáticas e florísticas de suas regiões de origem. Foram recentemente reconhecidos como importantes agentes polinizadores de áreas agrícolas, além de apresentar papel fundamental na conservação da biodiversidade (DEVILLERS, 2003).

Tendo em vista a importância ecológica deste grupo, principalmente como polinizadores e suas relações com o ambiente, faz-se necessária a avaliação dos efeitos toxicológicos dos inseticidas sobre estas abelhas. Sendo o fipronil um dos pesticidas mais utilizados na agricultura brasileira e as abelhas *S. postica* importantes polinizadores de plantas silvestres e cultivadas, este trabalho teve por objetivo determinar a dose e concentração letal média deste inseticida, por via tópica e ingestão, sobre operárias recém-emergidas desta espécie.

4.3 METODOLOGIA

3.3.1 Material e Métodos

Material Biológico

Foram utilizados exemplares de operárias de *S. postica* recém-emergidas, coletados no meliponário do Departamento de Biologia – Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP - *Campus* de Rio Claro.

4.3.2 Testes de Toxicidade

Para determinação de dose letal média e concentração letal média foram coletados favos com indivíduos prestes a emergir, que foram posteriormente colocados em estufa BOD (Demanda Bioquímica do Oxigênio) com temperatura e umidade relativa controlados ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 70% U.R.) com alimento e água disponíveis durante 4 dias, quando os indivíduos foram então coletados.

Operárias de *S. postica* recém-emergidas foram acondicionadas em caixas plásticas descartáveis com volume de 250mL com alimento (cândi) e algodão embebido em água.

O inseticida utilizado nos experimentos foi uma formulação técnica do Fipronil 95%, fornecido pela Bayer CropScience Ltda.

4.3.3 Teste para determinação da dose letal de contato (DL₅₀)

. O inseticida foi diluído em 1mL do solvente acetona, sendo preparadas uma solução de concentração inicial de 1µg/abelha para o fipronil e realizada sucessivas diluições até as concentrações desejadas (1.0, 0.8, 0.6, 0.5, 0.4, 0.2 ng), além de um grupo controle com aplicação apenas do solvente acetona. Estas doses foram estabelecidas a partir da DL₅₀ para *A. mellifera* (1.06ng/abelha -ROAT et al, 2010) e seguindo as normas da OECD- Diretrizes para o ensaio de substâncias químicas (Guidelines for the testing of chemicals, 1998). Para cada abelha foi aplicado 1 µL da solução correspondente na região do pronoto com o auxílio de uma microseringa. Após aplicação, as abelhas

permaneceram 5 minutos em uma bandeja plástica para permitir a evaporação do solvente. Passado este período, as abelhas foram acondicionadas em caixas plásticas forradas previamente com papel filtro, contendo alimento e água e mantidas em estufa BOD com temperatura e umidade controlada ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 70% U.R.). Foram realizadas três repetições para cada dose testada, contendo 20 abelhas em cada caixa plástica. Os dados foram obtidos após 24h, sendo o número de abelhas mortas por repetição/concentração contabilizado e submetido à análise estatística do tipo dose-resposta, empregando-se um modelo do pacote “*drc*” (Analysis of Dose-Response Curves) (RITZ; STREIBIG, 2005), compilado pelo software R® (2011).

4.3.4 Teste para determinação da concentração letal por ingestão (CL_{50})

O inseticida fipronil foi diluído em solvente acetona até a dose de 10ng e posteriormente o alimento (cândi + gelatina) foi utilizado como solvente da solução até a obtenção de alimentos com as concentrações desejadas (0.05, 0.15, 0.30, 0.5, 0.8, 1.2ng), além de um grupo controle com alimento sem contaminação. As doses foram estabelecidas a partir da DL_{50} previamente estabelecida neste trabalho para *S. postica*, seguindo as normas da OECD (1998).

As abelhas foram acondicionadas em caixas plásticas descartáveis, forradas previamente com papel filtro e mantidas em jejum durante 1 hora e 30 minutos, passado este período os alimentos e água foram colocados durante 24 horas. Foram realizadas três repetições para cada dose testada, contendo 20 abelhas em cada caixa plástico. Após 24 horas, o número de abelhas mortas por repetição/concentração foi contabilizado e submetido à análise estatística do tipo dose-resposta, empregando-se um modelo do pacote “*drc*” (Analysis of Dose-Response Curves) (RITZ; STREIBIG, 2005), compilado pelo software R® (2011).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O valor obtido para DL₅₀ tópico do inseticida fipronil para a abelha sem ferrão *S. postica* foi de 0.54 ng/abelha (**FIGURA 1**) e CL₅₀ de ingestão de 0.24 ng/μL dieta (**FIGURA 2**), ambos obtidos após 24 horas de exposição.

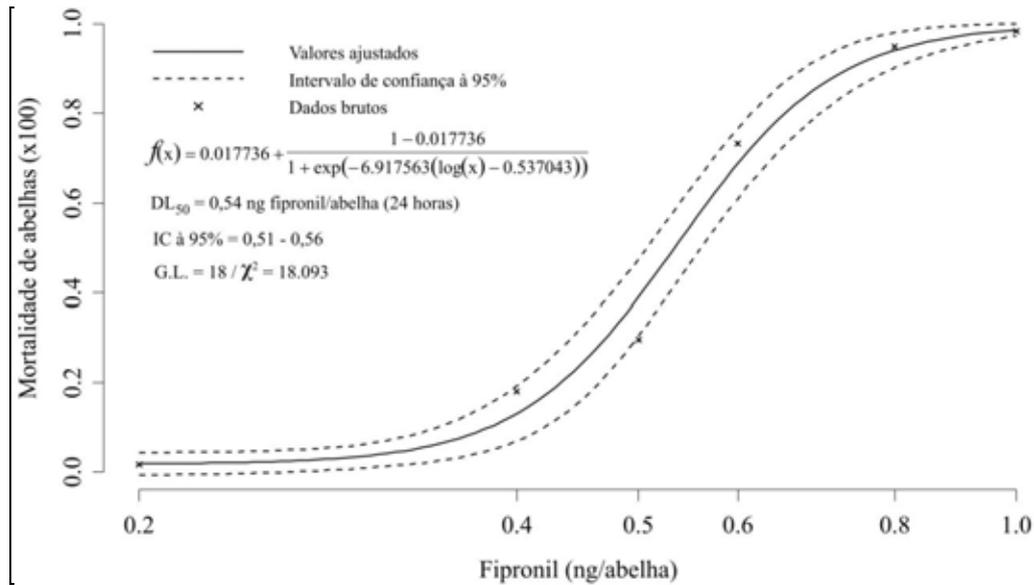


Figura 1: Curva de DL₅₀ indicando a mortalidade de abelhas 24 horas após a exposição tópica do inseticida fipronil.

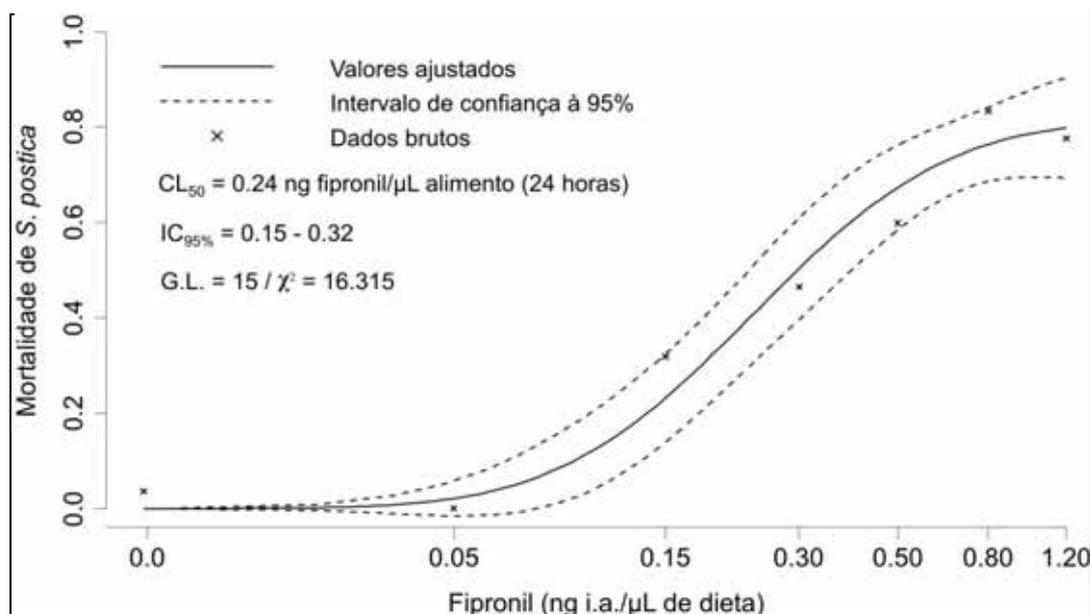


Figura 2: Curva de CL_{50} indicando a mortalidade de abelhas 24 horas após a exposição por ingestão do inseticida fipronil.

Estes valores são menores do que os apresentados para abelha *A. mellifera* encontrados em literatura (*A. mellifera* africanizada- 1.06ng/abelha: ROAT et al, 2010; *A. mellifera* L.- 6.2ng/abelha: DECOURTYE, 2005 e 4ng/abelha: TINGLE, 2003 para contaminação tópica e *A. mellifera* africanizada- 1.27ng/ μ L dieta: ROAT et al, 2010 para contaminação por ingestão) se enquadrando na categoria II (muito tóxico) da classificação toxicológica de agrotóxicos (EMBRAPA, 2011).

Segundo Ferreira (2010) o tratamento crônico de abelhas *S. postica* com alimento contaminado a 0.1 μ g/Kg de fipronil apresentou uma curva de sobrevivência significativamente diferente daquele apresentado pelo grupo controle, obtendo 100% da mortalidade do grupo experimental, 14 dias após o início do bioensaio. Stuchi (2009) realizou testes toxicológicos com vários inseticidas, entre eles o fipronil, para duas espécies de abelhas nativas (*Tetragonista angustula* e *Tetragonista fiebrige*), obtendo como valor de CL_{50} para o fipronil entre 0.00053- 0.00062%, valores que comprovaram sua alta toxicidade diante dos demais inseticidas testados.

Apesar das pesquisas no Brasil utilizarem como principal modelo experimental as abelhas, *A. mellifera* africanizada, existem trabalhos como o de Del Sarto (2009) e Moraes et al (2000), que comparam a tolerância entre abelhas africanizadas e as abelhas sem ferrão, mostrando que para a maioria dos casos, as

abelhas africanizadas possuem maior resistência aos inseticidas mais utilizados em áreas agrícolas no país.

Tendo em vista a importância da diversidade biológica de polinizadores para os diferentes cultivos (IMPERATRIZ-FONSECA, [20-]a), assim como o conhecimento dos benefícios proporcionados por esses insetos, dentre eles o aumento na qualidade e quantidade de frutos e sementes, mesmo em culturas que não dependem de polinização, como o café (FAO, 2008; BREEZE et al, 2011), estudos sobre os efeitos de inseticidas em diferentes espécies de abelhas são extremamente necessários. Sendo que o declínio desses polinizadores provocaria a queda ou a eliminação total da complexidade existente nos diferentes ambientes, sejam eles selvagens ou agrícolas, visto que a manutenção desses locais são totalmente dependentes de interações entre plantas e animais e que a ausência de um deles afetará a sobrevivência de outros (IMPERATRIZ-FONSECA, [20-]b; SILVA, 2002).

4.5 CONCLUSÃO

O presente trabalho possibilitou a determinação da DL_{50} tóxico em 0.54ng/abelha e CL_{50} de ingestão em 0.24ng i.a/ μ L de dieta, mostrando que tanto a dose letal média como a concentração letal média do inseticida fipronil, foram baixas para as abelhas sem ferrão, *S. postica*. Comprovando que estas abelhas são sensíveis à intoxicação pelo inseticida fipronil, quando realizam a coleta de alimento próximo a áreas agrícolas, enfatizando a necessidade de pesquisas com espécies diferentes de polinizadores e a sua conservação.

4.6 REFERÊNCIAS

ALIOUANE, Y.; HASSANI, A.K.E.; GARY, V.; ARMENGAUD, C.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M.. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.28, n.1, p.113-122, jul. 2009.

BERNAL, J.; MARTIN-HERNANDEZ, R.; DIEGO, J.C.; NOZAL, M.J.; GONZALEZ-PORTO, A.V.; BERNAL, J.L.; HIGES, M.. An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. **Pest Management Science**, Sussex, v.67, p.1320–1331, mar. 2011.

BREEZE, T.D.; BAILEY, A.P.; BALCOMBE, K.G.; POTTS, S.G.. Pollination services in the UK: How important are honeybees?. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.142, p.137– 143, mar. 2011.

CARVALHO, S.M.; CARVALHO, G.A.; CARVALHO, C.F.; BUENO FILHO, J.S.S.; BAPTISTA, A.P.M.. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para abelha africanizada *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.4, p.597-606, out./dez. 2009.

CONNELLY, P.. **Environmental fate of fipronil**. p.1-17, dez. 2001. Disponível em: <<http://fluoridealert.org/pesticides/fipronil.ca.epa.2001.pdf>>. Acesso em: 29 de jun. 2011.

COUTINHO, C.F.B.; TANIMOTO, S.T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G.S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S.. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.15, p.65-72, jan. 2005.

DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; GENECQUE, E.; MENACH, K.L.; BUDZINSKI, H.; CLUZEAU, S.; PHAM-DELEGUE, M.H.. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.48, p.242-250. 2005.

DECOURTYE, A.; LEFORT, S.; DEVILLERS, J.; GAUTHIER, M.; AUPINEL, P.; TISSEUR, M.. Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex maze. **Hazards of pesticides to bees – 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group**. 2009.

DEL SARTO, M.C.L.. **Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. 75f. Tese (Doctor Scientiae do Programa de Pós- Graduação em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

DEVILLERS, J.. The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology. Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. **Taylor & Francis**, London and New York, 2002.

DEVILLERS, J. ; DECOURTYE, A. ; BUDZINSKI, H. ; PHAM-DELÈGUE, M.H. ; CLUZEAU, S. ; MAURIN, G.. Comparative toxicity and hazards of pesticides to *Apis*

and non-Apis bees. A chemometrical study. **SAR and QSAR in Environmental Research**, Colchester, v. 14, p. 389–403, dez. 2003.

EL HASSANI,A.K.E.; DACHER,M.; GAUTHIER,M.; ARMENGAUD,C.. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Fayrtteville, v.82, p.30-39, ago. 2005.

FAO. **Rapid assessment of pollinators' status. A contribution to the international initiative for the conservation and sustainable use of pollinators.** p.113, mar. 2008. Disponível em: < http://www.fao.org/agriculture/crops/news-events-bulletins/detail/en/item/8902/icode/?no_cache=1>. Acesso em : 31 abr. 2011.

FERREIRA,R.A.C.. **Análise morfológica e histoquímbulos de Malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas -Biologia Celular e Molecular), 83f. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro- São Paulo, 2010.

HAINZL,D; CASIDA,J.E.. Fipronil insecticide: Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America**,Washington, vol. 93, p.12764–12767, nov. 1996.

IMPERATRIZ-FONSECA,V.L.(a) **Serviços aos ecossistemas, com ênfase nos polinizadores e polinização.** [20-]. Disponível em: http://www.ib.usp.br/vinces/logo/servicos%20aos%20ecossistemas_polinizadores_vera.pdf Acesso em : 22 jan 2012.

IMPERATRIZ-FONSECA,V.L.(b). Polinização: Os desafios de um Brasil biodiverso para o uso dos serviços ambientais prestados pelas abelhas. [20-]. Disponível em: < http://200.144.189.76/bioabelha/images/pdfs/projeto33/nacionais/2009_imperatriz_fonseca.pdf>. Acesso em: 10 out 2009.

ISHAAYA,I.. Biochemical processes related to insecticide action: an overview. **Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance**, Berlin. 2001.

KLEIN,A.M.; VAISSIÈRE,B.E.; CANE,J.H.; STEFFAN-DEWENTER,I.; CUNNINGHAM,S.A.; KREMEN,C.; TSCHARNTKE,T.. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal of Society**, London, vol.274, p.303-313, out. 2007.

LADURNER,E.; BOSCH,J.; MAINI,S.; KEMO,W.P.. A method to feed individual bees (*Hymenoptera:Apiformes*) known amounts of pesticides. **Apidologie**, Versailles, v.34, p.597–602, mai. 2003.

MORAES,S.S; BAUTISTA,A.R.L.; VIANA,B.F. Avaliação da toxicidade aguda (DL₅₀ e CL₅₀) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (*Hymenoptera: Apidae*): via de contato. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. Jaboticabal- São Paulo, v.29, n.1, p.32- 37, mar. 2000.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, p.1-8, set. 1998.

ORTIZ,F.. Como andam os agrotóxicos no Brasil. 2011. OEKO Reportagens, Disponível em <<http://www.oeco.com.br/reportagens/25276-como-andam-os-agrotoxicos-no-brasil>> , Acesso em: 14 fev.2012.

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

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 20 jun. 2011.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, Los Angeles, v.12, n.5, p.1-22, jan. 2005.

ROAT,T.C., Carvalho,S.M., NOCELLI,R.C.F., SILVA-ZACARIN,E. C. M., MALASPINA,O.. Acute toxicity of fopronil to newly-emerged honeybee *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) africanized In: **IX Encontro sobre abelhas**, 2010, Ribeirão Preto.

RORTAIS,A.; ARNOLD,G.; HALM,M.P.; TOUFFET-BRIENS,F.. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, Versailles, v.36, p.71-83. 2005.

SILVA,P.N. (Trad.). **Documento sobre o Plano de Ação para a Iniciativa Internacional dos Polinizadores**. In: CONFERÊNCIA DAS PARTES 6 DA CONVENÇÃO DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA, 2002, Haya. Disponível em: <http://www.webbee.org.br/bpi/pdfs/plano_acao_ipi_port.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2012.

SISTEMAS de produção. **EMBRAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Disponível em: <<http://www.sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 21 jun. 2011.

STUCHI,A.L.P.B.. **Toxicidade e expressão gênica em abelhas do gênero *Tetragonista* após a contaminação por agrotóxicos**. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2009.

TINGLE,C.C.; ROTHER,J.A.; DEWHURST,C.F.; LAUER,S.; KING,W.J.. Fipronil environmental fate, ecotoxicology and human health concerns. **Reviews Environmental Contamination & Toxicology**, New York, v.176, p.1-66. 2003.

ZHAO,X.; YEH,J.Z.; SALGADO,V.L.; NARAHASHI,T.. Sulfone metabolite of fipronil blocks α -aminobutyric acid- and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. Bethesda, vol.314, n.1, p.363-373, fev. 2005.

5. ARTIGO 02

ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS CORPOS PEDUNCULADOS DA ABELHA *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI) SUBMETIDAS À DOSE SUBLETAL DO INSETICIDA FIPRONIL

5.1 RESUMO

O grupo das abelhas sem ferrão apresenta grande diversidade morfológica e comportamental. Apesar disso, pesquisas utilizando os meliponíneos são escassas e pouco se conhece sobre esses insetos, principalmente sobre os efeitos de sua contaminação por substâncias tóxicas, tais como os inseticidas. Estudos com abelhas *Apis mellifera* submetidas à contaminação pelo inseticida fipronil, um produto neurotóxico da classe dos fenilpirazóis, demonstraram efeitos sobre as atividades de comunicação, aprendizado, orientação entre outras. Buscando compreender melhor os efeitos de doses subletais desse inseticida sobre as abelhas sem ferrão, este trabalho analisou por microscopia de luz e eletrônica de transmissão a região cerebral dos corpos pedunculados a fim verificar possíveis alterações morfológicas da área tida como local de integração de informações nos insetos. Os resultados mostraram que tanto no tratamento tópico como no de ingestão as células neurais apresentaram alterações, com características de morte celular. O aumento da ocorrência de núcleos picnóticos foram observados através de microscopia de luz e a presença de cromatina condensada de acordo com a dose e tempo de exposição pode ser observada na ultraestrutura, assim como a alteração de organelas como as mitocôndrias e o aparelho de Golgi, além de autofagossomos, formados durante o processo de autofagia do material intracelular. Este estudo possibilitou demonstrar a elevada toxicidade do fipronil, através das modificações de células neurais, quando operárias forrageiras de abelhas sem ferrão *S. postica* são submetidas a baixas doses do inseticida fipronil por um curto período de tempo.

Palavras- chave: Abelha sem ferrão. Inseticida. Sistema nervoso. Ultraestrutura.

5.2 INTRODUÇÃO

Com aproximadamente 400 espécies descritas, os Meliponíneos, também conhecidos como abelhas sem ferrão, formam um grupo constituído por cerca de 40 gêneros que apresentam morfologia, fisiologia e comportamento amplamente diversificados (VALDOVINOS-NUNEZ et al, 2009; VELTHUIS et al, 1997). Estes são insetos sociais, cuja organização é comparável a da abelha *Apis mellifera* (IMPERATRIZ-FONSECA, [20-]a) com divisão de castas e atividades realizadas de acordo com o polietismo etário (FREE, 1980; NOGUEIRA-NETO, 1997).

Por apresentar importante valor econômico, rendendo cerca de 11,6 bilhões de euros por ano só na América do Sul, com os serviços de polinização, a abelha *Apis* é um dos insetos mais estudados, possuindo pesquisas sobre seu comportamento, fisiologia, morfologia e resistência a produtos tóxicos (POTTS et al, 2010), em contrapartida são poucas as pesquisas com as abelhas sem ferrão (DEL SARTO, 2009).

Estudos com meliponíneos são importantes, já que se encontram em rápido processo de desaparecimento, com aproximadamente 100 espécies, das descritas em risco de extinção (KERR, 1996). Isso se deve a fragmentação de florestas nativas, queda na disponibilidade de alimento e locais para nidificação, plantio de monoculturas e o uso de agrotóxicos no controle de pragas agrícolas (LOPES et al, 2005).

Entre os agrotóxicos utilizados nas lavouras, os inseticidas recebem atenção especial, uma vez que estão entre os possíveis causadores do desaparecimento das abelhas (VALDOVINOS-NÚÑEZ et al, 2009; JOHNSON et al, 2009). Segundo pesquisas não são apenas as doses letais que representam perigo para estes insetos, mas também as doses subletais que podem afetar a longevidade e comportamento, modificando as interações da colônia (MORITZ et al, 2010).

O fipronil representa a segunda geração de inseticidas neurotóxicos, atuando na inibição dos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) levando ao excesso de atividade neural (CONNELLY, 2001; COUTINHO et al, 2005). Por ser um inseticida efetivo e fornecer proteção por longo prazo em amplas áreas de cultivo (HAINZL; CASIDA, 1996; COUTINHO et al, 2005), pesquisas sobre os efeitos da contaminação de insetos não-alvo, como as abelhas, com doses subletais de fipronil foram realizados, mostrando que tais doses podem provocar a desorientação (DECOURTYE et al, 2009), alteração na percepção gustativa (COLIN et al, 2004, EL

HASSANI et al, 2005; PINHEIRO; FREITAS, 2010; ALIOUANE et al, 2009) e olfativa (DECOURTYE et al, 2005; EL HASSANI et al, 2005), perda de memória (ALIOUANE et al, 2009) e deficiência locomotora (COLIN et al, 2004).

Como o processo de forrageamento envolve a integração de habilidades complexas, como orientação, memória, aprendizado, comunicação e outros, (AAJOURD et al, 2003; COLIN et al, 2004) são necessários estudos sobre possíveis alterações nas regiões cerebrais onde ocorre o processamento destas informações. Os corpos pedunculados (CP) são conhecidos por serem estes centros de integração, e seu desenvolvimento está relacionado com a complexidade comportamental em insetos sociais (MOBBS, 1982; FARRIS et al, 2001).

Na literatura é possível verificar um número considerável de pesquisas associando os CP com a fisiologia e controle do comportamento de insetos (MOBBS, 1982; OLESKEVICH et al, 1997; ZARS, 2000; KIYA, et al, 2007), sendo necessários estudos sobre os efeitos morfológicos nas células neurais após a intoxicação destes, com baixas doses de fipronil. Buscando compreender melhor os efeitos de doses subletais desse inseticida sobre as abelhas sem ferrão, este trabalho analisou por microscopia de luz e eletrônica de transmissão a região cerebral dos corpos pedunculados a fim verificar possíveis alterações morfológicas da área tida como local de integração de informações nos insetos.

5.3 METODOLOGIA

5.3.1 Materiais e Métodos

Material Biológico

Foram utilizados exemplares de operárias forrageiras de *S. postica*, coletados no meliponário do Departamento de Biologia– Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP - *Campus* de Rio Claro. Os exemplares foram coletados diretamente da entrada do ninho, sendo utilizadas 12 abelhas para cada dose e tempo testados.

O inseticida utilizado durante os experimentos foi uma formulação técnica do Fipronil 95%, fornecido pela Bayer CropScience Ltda.

5.3.2 Contaminação tópica

O inseticida fipronil foi diluído em 1mL do solvente acetona, sendo preparadas uma solução de concentração inicial de 1µg/abelha e realizada sucessivas diluições até as concentrações de $DL_{50}/2$, DL_{50} e $DL_{50} \times 2$, 0.27, 0.54 e 1.08 ng/ abelha respectivamente, doses estas estabelecidas a partir da dose letal média estabelecida por JACOB (2012). Para cada abelha foi aplicado 1µL da solução correspondente na região do pronoto com o auxílio de uma microseringa. As abelhas foram coletadas para dissecação 30 minutos, 6, 12, 24 e 48 horas após cada tratamento. Neste experimento foi utilizado um grupo controle com aplicação apenas do solvente acetona.

5.3.3 Contaminação por ingestão

O inseticida fipronil foi diluído em 1mL do solvente acetona, sendo preparadas uma solução de concentração inicial de 1µg/abelha e realizadas sucessivas diluições em alimento (cândi e gelatina) até as concentrações de $CL_{50}/2$, CL_{50} e $CL_{50} \times 2$, 0.12, 0.24 e 0.48 ng/ µL de dieta respectivamente, doses estas estabelecidas a partir da concentração letal média estabelecida por JACOB (2012). As abelhas foram mantidas em jejum durante 1 hora e 30 minutos e posteriormente fornecido o alimento contaminado com as diferentes doses. As abelhas foram coletadas para dissecação 30 minutos, 6, 12 e 24 e 48 horas após cada tratamento. Neste experimento foi utilizado um grupo controle, o qual recebeu alimento sem contaminação.

5.3.4 Microscopia de Luz (ML)

As abelhas foram dissecadas e seus cérebros fixados em paraformaldeído a 4% e posteriormente foram lavados em tampão fosfato de sódio 0.1M (pH 7.4). O material biológico foi desidratado em série crescente de alcoóis (15% a 95%) e transferidos para a resina de embebição (overnight). Após a embebição, os órgãos foram incluídos em historesina (Leica). As secções histológicas de 6µm de espessura obtidas, foram estendidas sobre lâmina de vidro e secas em temperatura ambiente. As secções histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina e posteriormente, preparadas para análise em microscópio de luz.

As fotomicrografias foram adquiridas por meio de uma câmera digital, Olympus DP-71, adaptada a um microscópio, Olympus BX51, e a um computador Dell. Para a aquisição foi utilizado o software DP Controller.

5.3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As abelhas foram dissecadas e seus cérebros fixados em glutaraldeído 2.5% com tampão cacodilato de sódio 0.2M, pH 7.4, por 2h e lavadas em tampão cacodilato de sódio 0.2M. Posteriormente, o material foi fixado em tetróxido de osmio 1%, por 2 horas e lavado em tampão cacodilato (duas vezes de 5 minutos cada), desidratado em uma serie crescente de álcool (30%- 100% e óxido de propileno), embebido e incluído em resina Epon-Araldite. O material foi seccionado com aproximadamente 2 µm de espessura, os cortes recolhidos em grades de cobre e contrastados com solução saturada de acetato de uranila 2% em álcool e citrato de chumbo 0.4%. As observações foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP de Rio Claro-SP e da USP de Piracicaba-SP (Esalq), para análise de ultraestrutura.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na região de foco do estudo, os corpos pedunculados, foram observados nas células do interior do cálice, as células de Kenyon (CK) (**FIGURA 1 A e B**), núcleos com um grande número de nucléolos(**FIGURA 1 C**), demonstrando alta atividade sintética nestas células.

Ao compararmos sob microscópio de luz, os resultados obtidos com as três doses do tratamento tópico (0.27, 0.54 e 1.08ng) em diferentes tempos de exposição ao inseticida fipronil, com o grupo controle (**FIGURAS 2 e 3 A**), nota-se que na dose de 0.27ng/abelha ($DL_{50}/2$) os CP apresentaram células com alterações morfológicas a partir de 12 horas (**FIGURA 2 B**) e 24 horas de exposição ao fipronil (**FIGURA 2 D**), apresentando núcleos picnóticos (**FIGURA 1 D**) e cromatina condensada marginalizada (**FIGURA 1 E**), o que sugere a ocorrência de morte celular. Já nas doses de 0.54 e 1.08ng/abelha (**FIGURAS 2 C**) (DL_{50} e $DL_{50} \times 2$, respectivamente) estas alterações nucleares podem ser observados em material coletado 30 minutos após aplicação do inseticida, com um aumento no número de células com tais características conforme o tempo de exposição (6 e 12 horas) (**TABELA 1**).

TABELA 1: Alterações morfológicas após tratamento tópico de operárias forrageiras de abelhas sem ferrão *S. postica*.

TEMPOS	DOSES (ng/abelha)	NÚCLEO PICNOTICO	CROMATINA CONDENSADA MARGINALIZADA
30 minutos	0,0	-	-
	0,27	-	-
	0,54	-	X
	1,08	-	X
6 horas	0,0	-	-
	0,27	-	-
	0,54	-	X
	1,08	X	X
12 horas	0,0	-	-
	0,27	X	X
	0,54	X	X
	1,08	X	X
24 horas	0,0	-	-
	0,27	X	X
	0,54	Ø	Ø
	1,08	Ø	Ø
48 horas	0,0	-	-
	0,27	X	X
	0,54	Ø	Ø
	1,08	Ø	Ø

Ausência de núcleos picnóticos e cromatina condensada marginalizada (-), presença de núcleos picnóticos e cromatina condensada marginalizada (X) e ausência de exemplares para coleta (Ø).

No tratamento por ingestão nas três doses utilizadas 0.12 (**FIGURAS 3 C**), 0.24 (**FIGURAS 3 D**) e 0.48 ng/ μ L de dieta (**FIGURAS 3 B**), quando comparadas ao grupo controle (**FIGURAS 3 A**) nota-se a presença de nucléolos, sugerindo aumento na atividade sintética. O número de células com características de morte, ou seja, a presença de cromatina condensada na periferia do núcleo, aumentou após a ingestão das maiores doses do inseticida (0.24 e 0.48ng/ μ L de dieta) (**TABELA 2**).

TABELA 2: Alterações morfológicas após tratamento por ingestão de operárias forrageiras de abelhas sem ferrão *S. postica*.

TEMPOS	DOSES (μ L/dieta)	NÚCLEO PICNOTICO	CROMATINA CONDENSADA MARGINALIZADA
30 minutos	0,0	-	-
	0,12	-	-
	0,24	-	X
	0,48	X	X
6 horas	0,0	-	-
	0,12	X	X
	0,24	X	X
	0,48	X	X
12 horas	0,0	-	-
	0,12	-	X
	0,24	X	X
	0,48	Ø	Ø
24 horas	0,0	-	-
	0,12	X	X
	0,24	Ø	Ø
	0,48	Ø	Ø

Ausência de núcleos picnóticos e cromatina condensada marginalizada (-), presença de núcleos picnóticos e cromatina condensada marginalizada (X) e ausência de exemplares para coleta (Ø).

Stuchi (2009) verificou a presença de células cerebrais com indício de apoptose após contaminação por ingestão da abelha nativa *T. fiebrige* por malathion, ao contrário da contaminação tópica que apresentaram núcleos com relaxamento da estrutura da cromatina, indicando, possivelmente, a transcrição e síntese de polipeptídeos utilizados na detoxificação do organismo dos insetos.

Rossi (2011) ao trabalhar com o inseticida imidacloprido, obteve como resultado a presença de cromatina condensada, núcleos picnóticos e aumento da síntese protéica nas células de Kenyon compactas e não compactas internas após tratamento crônico por ingestão ($DL_{50}/10$) em abelhas africanizadas, estes resultados foram verificados em grupos tratados para 3, 5, 7 e 10 dias de exposição, concluindo que a morte celular programada em insetos, além de estar presente durante a metamorfose, pode ser observada também em órgãos de animais submetidos à exposição com substâncias tóxicas.

Tais resultados foram notados também em microscopia eletrônica de transmissão (MET), onde se verificou para o tratamento tópico um aumento na presença de núcleos com cromatina condensada próxima à membrana nuclear de acordo com a dose e tempo de exposição ao inseticida fipronil. Sendo que a dose de

1.08ng (**FIGURA 4, 5 e 6 C**) apresenta tais características de forma mais evidente já no primeiro tempo testado (30 minutos) e a dose de 0.27ng (**FIGURAS 4, 5 e 6 B**) após 6 horas da intoxicação, quando comparados com o grupo controle (**FIGURAS 4, 5 e 6 A**).

Ling (2011) relata resultados semelhantes ao observar sob MET o sistema nervoso da cigarrinha marrom (*Nilaparvata lugens*) após a contaminação por fipronil, onde foram utilizadas as doses de 10.3 e 24.9mg/L, durante 7 dias de tratamento.

Segundo este autor, o tratamento com a dose de 10.3mg/L causou alterações nucleares e nas organelas, com condensação da cromatina e sua marginalização, a presença de vacúolos citoplasmáticos e modificações mitocondriais com ausência de cristas, inchaço, distorção e ruptura de membranas, sendo tais características acentuadas na maior dose utilizada (24.9mg/L), além de observar a presença de autofagossomos, aumento no número de nucléolos e dilatações atípicas nas vesículas do Golgi.

Na dose subletal (0.27ng/abelha) além da cromatina condensada, indicando morte celular, verificou-se dilatações na membrana nuclear, alterações nas organelas, com diminuição das cristas mitocondriais (**FIGURA 7 A, B, C e F**), Golgi com vesículas alteradas (**FIGURA 7 D e E**), a presença de autofagossomos (**FIGURA 7 A, C, D e F**) e corpos multivesiculares (**FIGURA 7 B**), um indicativo, este, de que as células estão realizando a retirada de estruturas danificadas através de fagocitose. Ling (2011) sugere que as mitocôndrias podem ser o alvo principal ou o alvo primário de ação citotóxica do inseticida fipronil ao entrar na célula do tecido nervoso, o que poderia explicar o aumento de mitocôndrias envoltas por autofagossomo observado no presente estudo.

No tratamento por ingestão, quando comparadas as doses de 0.12 (**FIGURA 8 e 9 B**) e 0.48ng/ μ L de dieta (**FIGURA 8 e 9 C**) com o grupo controle (**FIGURA 8 e 9 A**) a presença de cromatina condensada não foi evidente, porém nota-se que as células neurais apresentam algumas alterações 6 horas após tratamento com a dose subletal do inseticida fipronil (0.12ng/ μ L de dieta). Com a presença de dilatações na membrana nuclear (**FIGURA 10 A e D**), alterações em organelas com ruptura de membrana e perda de cristas mitocondriais (**FIGURA 10 B e D**) e a presença de lisossomos (**FIGURA 10 C**). Estes resultados mostram que apesar do processo de digestão e metabolização das moléculas do inseticida fipronil uma pequena quantidade chegou ao cérebro, provocando danos celulares.

5.5 FIGURAS

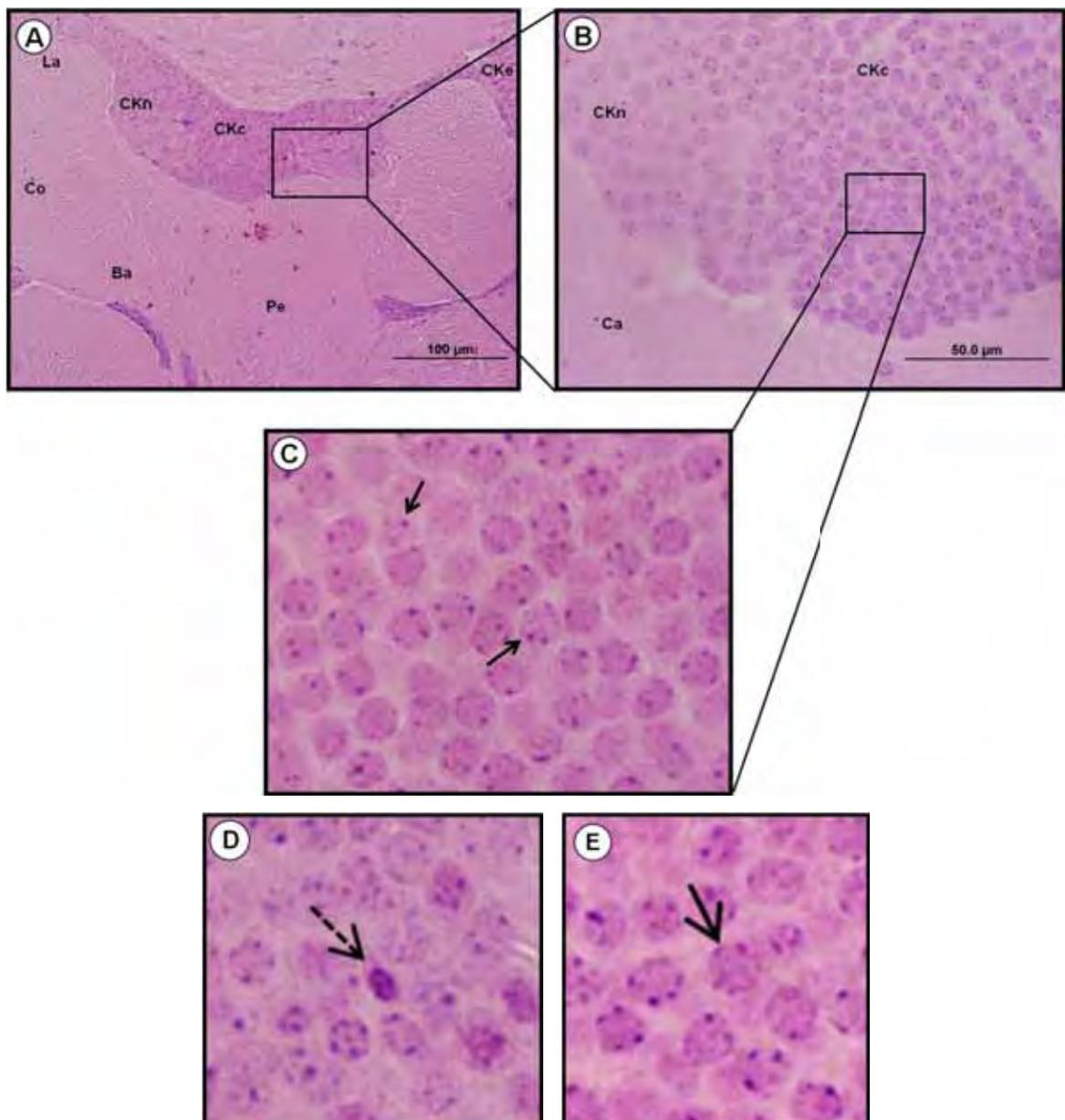


FIGURA 1: Fotomicrografia do corpo pedunculado (A) mostrando as regiões do cálice: Labio (La), Corpo (Co), Base (Ba) e pedúnculo (Pe) e as células de Kenyon: compactas internas (CKc) e externas (CKe), não compactas internas (CKn), detalhe do corpo pedunculado (B) com cálice (Ca) e células de Kenyon compactas internas (CKc) e não compactas (CKn) e detalhe das células de Kenyon (C) (aumento de 1000x) evidenciando os nucléolos (seta) e núcleos picnóticos (D) (seta pontilhada) e núcleos com cromatina condensada (E) (seta).

- Microscopia de Luz: Abelhas contaminadas por via tópica

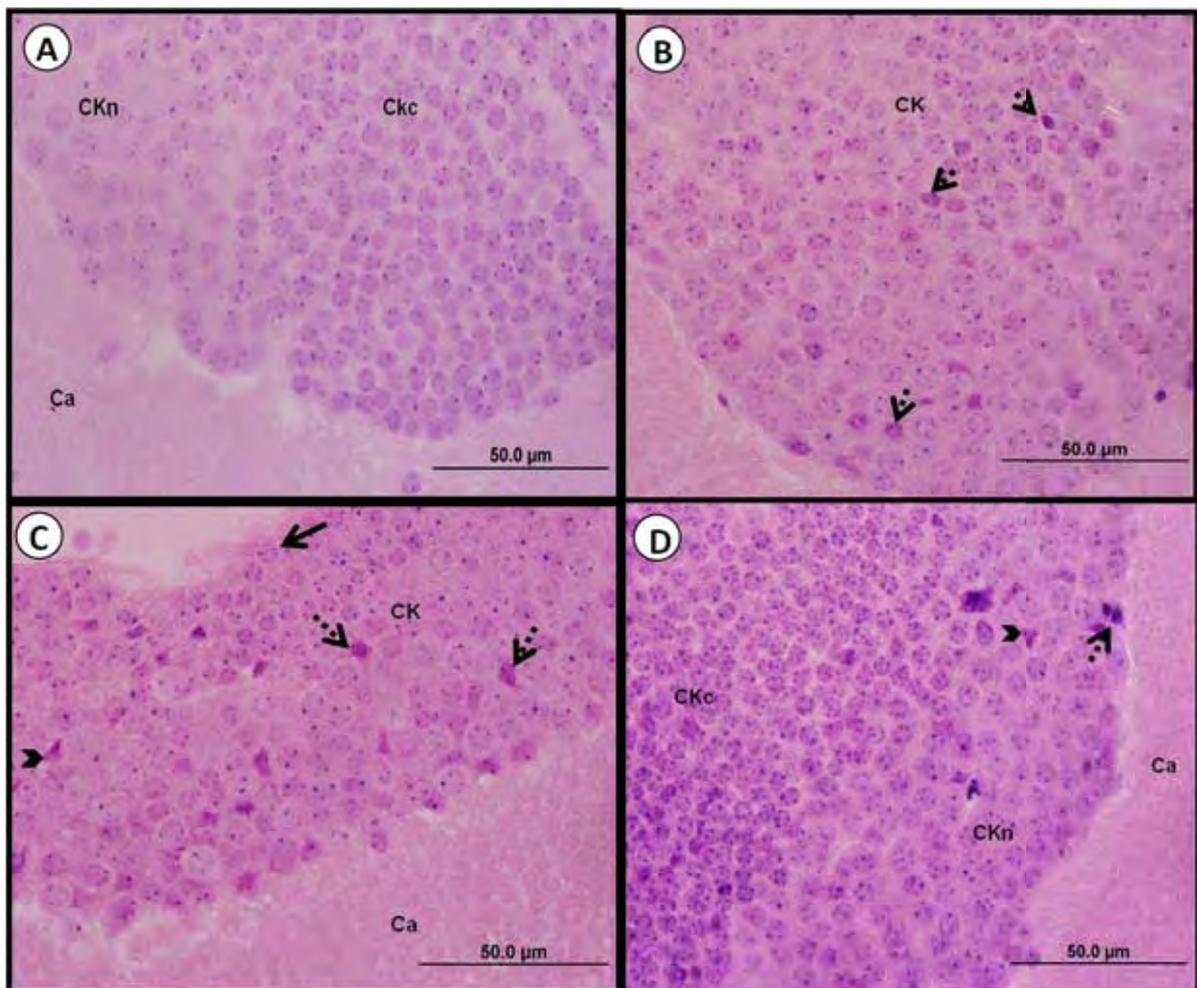


FIGURA 2: Fotomicrografia do corpo pedunculado de operárias de *S. postica* tratadas com as seguintes doses e tempos do inseticida fipronil: 0.0-30 minutos (A), 0.27ng- 12 horas (B), 1.08ng- 6 horas (C) e 0.27ng- 24 horas (D), após tratamento tópico, evidenciando região dos núcleos com cromatina condensada marginalizada (seta) e núcleos picnóticos (seta tracejada). Indicando as regiões do Cálice (Ca), células de Kenyon (CK), células de Kenyon compactas (Ckc) e células de Kenyon não-compactas (CKn), coradas com hematoxilina e eosina.

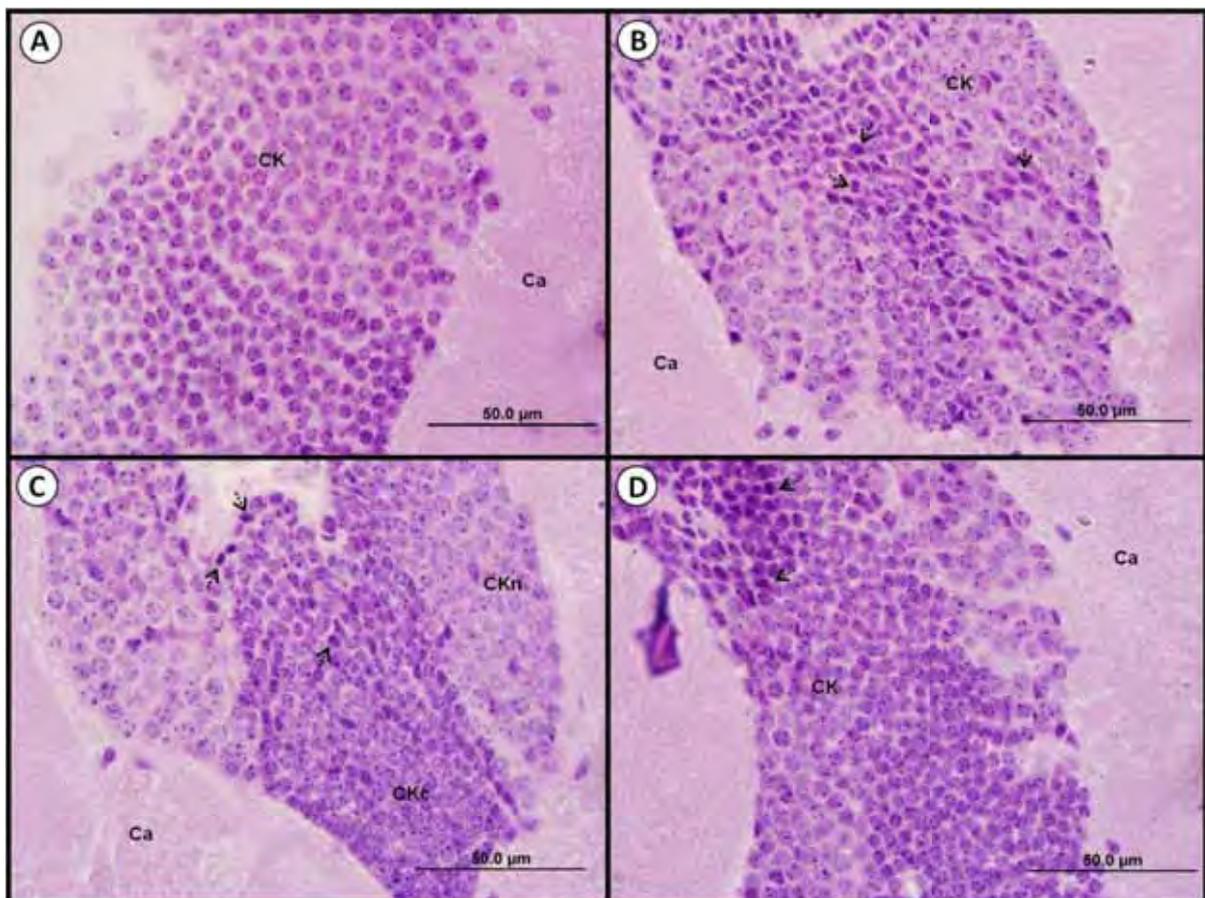
- Microscopia de Luz: Abelhas contaminadas por ingestão

FIGURA 3: Fotomicrografia do corpo pedunculado de operárias de *S. postica* tratadas com as seguintes doses e tempos do inseticida fipronil: 0.0-12horas (**A**), 0.48ng/ μ L de dieta- 30 minutos (**B**), 0.12ng/ μ L de dieta- 6 horas (**C**) e 0.24 ng/ μ L de dieta- 6 horas (**D**) após ingestão de alimento contaminado, evidenciando região dos núcleos picnóticos (seta tracejada). Indicando as regiões do Cálice (**Ca**), células de Kenyon (**CK**), células de Kenyon compactas (**CKc**) e células de Kenyon não-compactas (**CKn**), coradas com hematoxilina e eosina.

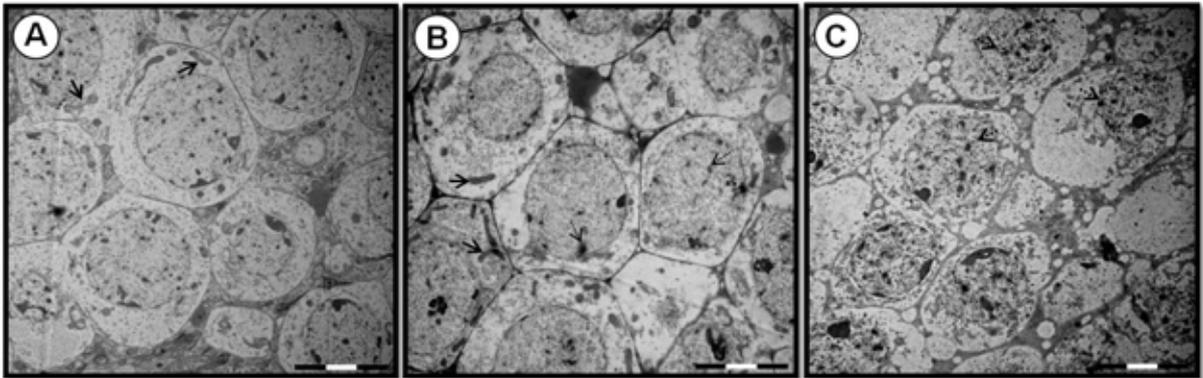
- Microscopia Eletrônica de Transmissão : Abelhas submetidas a contaminação tóxica

FIGURA 4: Fotomicrografia eletrônica de transmissão de células de Kenyon do corpo pedunculado de operárias de *S. postica*, submetidas ao tratamento tóxico com doses de 0.0ng (A), 0.27ng (B) e 1.08ng(C) após 30 minutos de exposição ao inseticida fipronil, evidenciando núcleo com cromatina condensada (seta pontilhada) e mitocôndrias (seta). Aumento de 5µm.

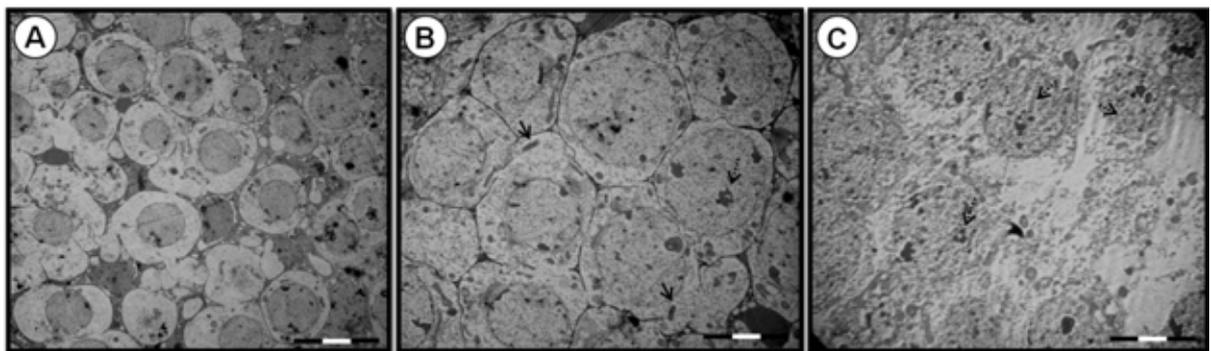


FIGURA 5: Fotomicrografia eletrônica de transmissão de células de Kenyon do corpo pedunculado de operárias de *S. postica*, submetidas ao tratamento tóxico com doses de 0.0ng (A), 0.27ng (B) e 1.08ng (C) após 6 horas de exposição ao inseticida fipronil, evidenciando núcleo com cromatina condensada (seta pontilhada) e mitocôndrias (seta). Aumento de 5µm.

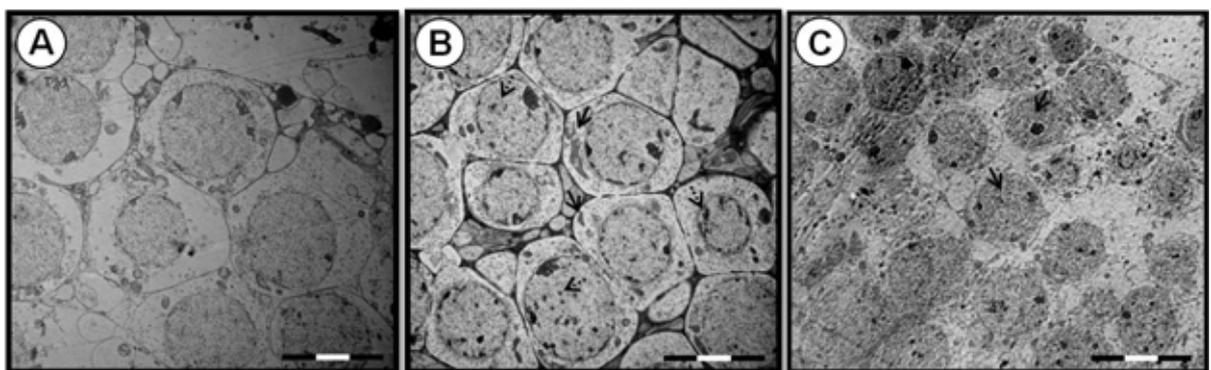


FIGURA 6: Fotomicrografia eletrônica de transmissão de células de Kenyon do corpo pedunculado de operárias de *S. postica*, submetidas ao tratamento tóxico com doses de 0.0ng (A), 0.27ng (B) e 1.08ng(C) após 12 horas de exposição ao inseticida fipronil, evidenciando núcleo com cromatina condensada (seta pontilhada) e mitocôndrias (seta). Aumento de 5µm.

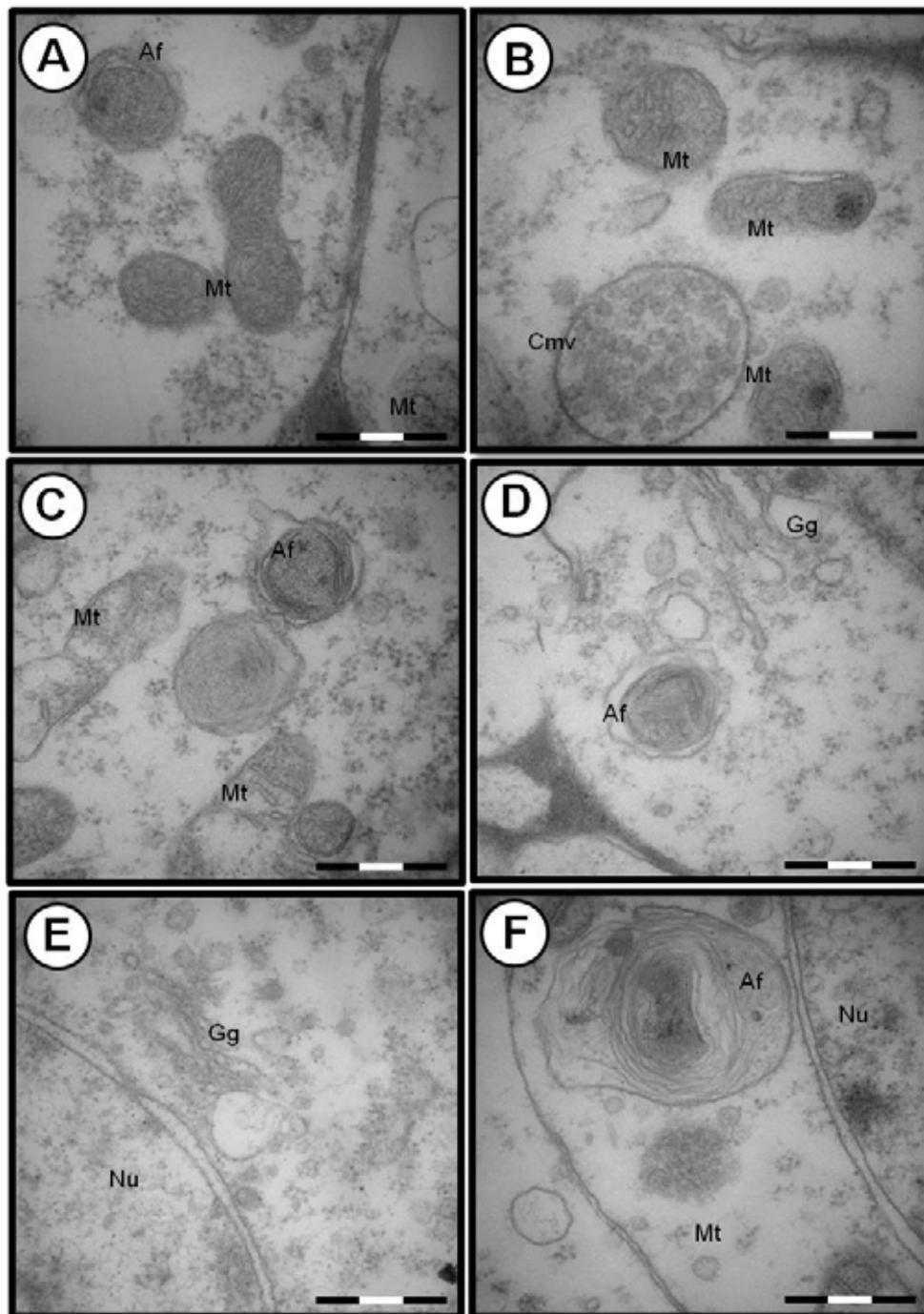


FIGURA 7: Fotomicrografia eletrônica de transmissão das organelas de células de Kenyon do corpo pedunculado de operárias de *S. postica*, submetidas ao tratamento tópico com dose de 0.27ng após 30 minutos (A), 6 horas (B, C e D) e 12 horas (E e F) de exposição ao inseticida fipronil, evidenciando mitocôndrias (Mt), Golgi (Gg), Autofagossomos (Af), Núcleo (Nu) e Corpo multivesicular (Cmv). Aumento de 500nm.

- Abelhas submetidas a contaminação por ingestão

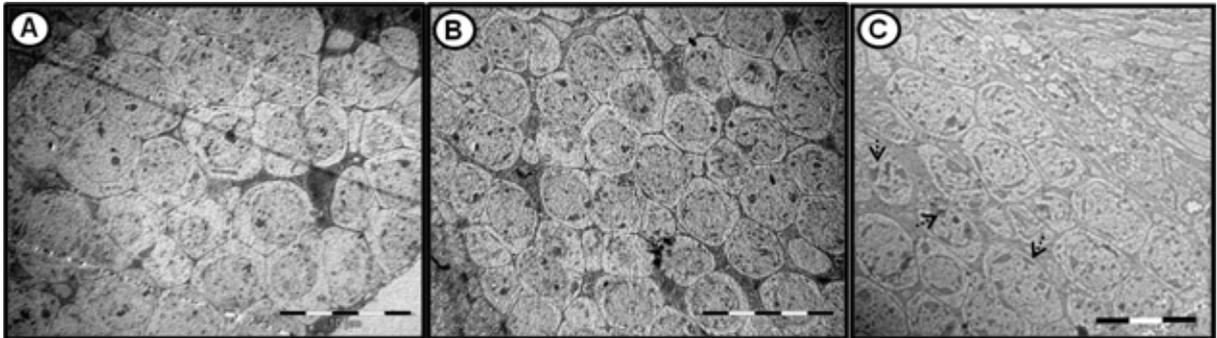


FIGURA 8: Fotomicrografia eletrônica de transmissão das organelas de células de Kenyon do corpo pedunculado de operárias de *S. postica*, submetidas ao tratamento por ingestão com dose de 0,0 ng/μL de dieta (**A**), 0,12 ng/μL de dieta (**B**) e 0,48 ng/μL de dieta (**C**) após 30 minutos de exposição ao inseticida fipronil, evidenciando cromatina condensada (seta pontilhada). Aumento de 10μm.

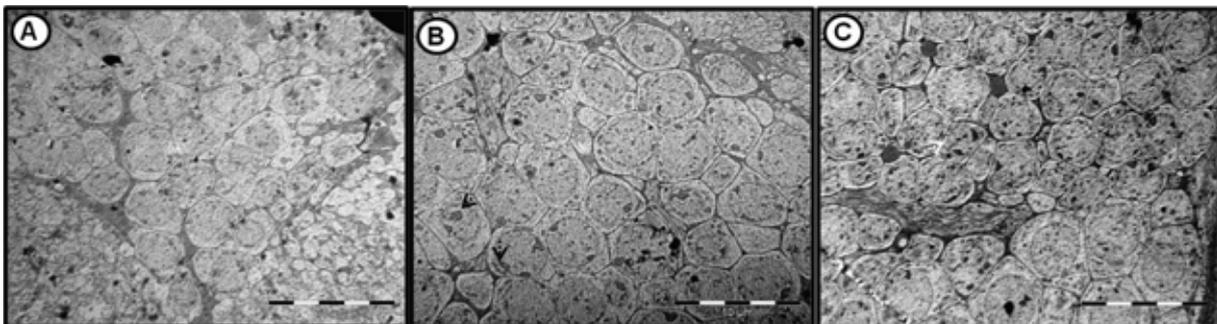


FIGURA 9: Fotomicrografia eletrônica de transmissão das organelas de células de Kenyon do corpo pedunculado de operárias de *S. postica*, submetidas ao tratamento por ingestão com dose de 0,0 ng/μL de dieta (**A**), 0,12 ng/μL de dieta (**B**) e 0,48 ng/μL de dieta (**C**) após 6 horas de exposição ao inseticida fipronil, evidenciando mitocôndrias (seta) e cromatina condensada (seta pontilhada). Aumento de 10μm.

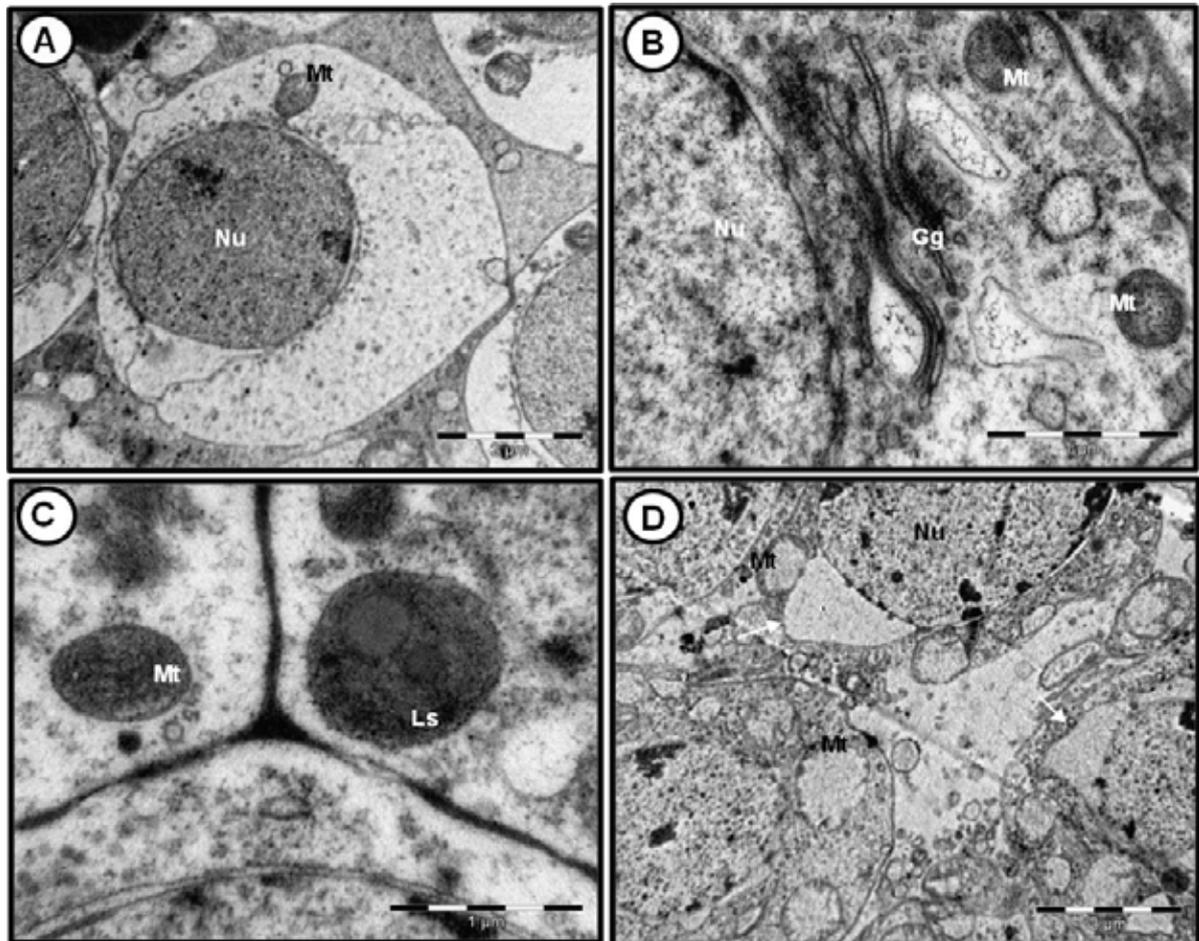


FIGURA 10: Fotomicrografia eletrônica de transmissão das organelas de células de Kenyon do corpo pedunculado de operárias de *S. postica*, submetidas ao tratamento por ingestão com dose de 0.12 ng/μL de dieta após 6 horas (**A** e **C**), 12 horas (**B**) e 0.24ng/μL de dieta após 12 horas (**D**) de exposição ao inseticida fipronil, evidenciando mitocôndrias (**Mt**), Golgi (**Gg**), Lisossomos (**Ls**), Núcleo (**Nu**). Aumento de 1μm (**B** e **C**) e 2μm (**A** e **D**).

5.6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que a contaminação de abelhas sem ferrão *S. postica* com o inseticida fipronil, seja por via tópica ou ingestão, podem provocar a morte de células do sistema nervoso central de acordo com a dose e o tempo de exposição.

A microscopia de luz permitiu a visualização de alterações nucleares, posteriormente comprovadas através da microscopia eletrônica de transmissão. Esta, além de alterações nucleares, também possibilitou a constatação de alterações nas organelas, a presença de autofagossomos e lisossomos sugerindo a ocorrência de morte celular, mostrando a elevada toxicidade do inseticida fipronil, mesmo em doses subletais, sobre estes importantes polinizadores.

5.7 REFERÊNCIAS

AAJOUD,A.; RAVANEL,P.; TISSUT,M.. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v.51, p.1347-1352, jan. 2003

ALIOUANE,Y.; HASSANI,A.K.E.; GARY,V.; ARMENGAUD,C.; LAMBIN,M.; GAUTHIER,M.. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.28, n.1, p.113-122, jul. 2009.

COLIN,M.E.; BONMATIN,J.M.; MOINEAU,I.; GAIMON,C.; BRUN,S.; VERMANDERE,J.P.. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: Relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, Secaucus, vol. 47, p.387–395 .2004.

CONNELLY,P.. Environmental fate of fipronil. p.1-17, dez. 2001. Disponível em: <<http://fluoridealert.org/pesticides/fipronil.ca.epa.2001.pdf>>. Acesso em 29 de jun.2011.

COUTINHO,C.F.B.; TANIMOTO,S.T.; GALLI,A.; GARBELLINI,G.S.; TAKAYAMA,M.; AMARAL,R.B.; MAZO,L.H.; AVACA,L.A.; MACHADO,S.A.S.. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.15, p.65-72, jan. 2005.

DECOURTYE,A.; DEVILLERS,J.; GENECQUE,E.; MENACH,K.L.; BUDZINSKI,H.; CLUZEAU,S.; PHAM-DELEGUE,M.H.. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.48, p.242-250. 2005.

DECOURTYE,A.; LEFORT,S.; DEVILLERS,J.; GAUTHIER,M.; AUPINEL,P.; TISSEUR,M.. Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex maze. **Hazards of pesticides to bees – 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group**. 2009.

DEL SARTO,M.C.L.. **Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. 75f. Tese (Doctor Scientiae do Programa de Pós- Graduação em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

EL HASSANI,A.K.E.; DACHER,M.; GAUTHIER,M.; ARMENGAUD,C.. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Fayrtteville, v.82, p.30-39, ago. 2005.

FARRIS,S.M.; ROBINSON,G.E.; FAHRBACH,S.E.. Experience- and Age-Related Outgrowth of Intrinsic Neurons in the Mushroom Bodies of the Adult Worker Honeybee. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, vol.21, n.16, p.6395–6404, ago. 2001

FREE, J.B. **A organização social das abelhas (*Apis*)**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980. 79p.

HAINZL,D; CASIDA,J.E.. Fipronil insecticide: Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, vol. 93, p.12764–12767, nov. 1996.

IMPERATRIZ-FONSECA,V.L.(a) **Serviços aos ecossistemas, com ênfase nos polinizadores e polinização**. [20-]. Disponível em: http://www.ib.usp.br/vinces/logo/servicos%20aos%20ecossistemas_polinizadores_vera.pdf Acesso em : 22 jan 2012.

IMPERATRIZ-FONSECA,V.L.(b). Polinização: Os desafios de um Brasil biodiverso para o uso dos serviços ambientais prestados pelas abelhas. [20-]. Disponível em: <http://200.144.189.76/bioabelha/images/pdfs/projeto33/nacionais/2009_imperatriz_fonseca.pdf>. Acesso em: 10 out 2009.

JOHNSON,R.M.; EVANS.J.D.; ROBINSON,G.E.; BERENBAUM,M.R.. Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*). **Proceedings of the National Academy of Science**. Washington,vol.106, n.35, p.14790–14795, set, 2009.

KERR, W.E.; G.A. CARVALHO; V.A. NASCIMENTO. . **Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação**. Fundação Acangaú, Belo Horizonte, 1996. 143p.

KIYA,T.; KUNIEDA,T.; KUBO,T.. Increased neural activity of a mushroom body neuron subtype in the brains of forager honeybees. **Plos One**, São Francisco, v.4, p.370-371, abr. 2007.

LING,S.; ZHANG,R.. Effect of fipronil on brain and muscle ultrastructure of *Nilaparvata lugens* (Homoptera:Delphacidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.74, p.1348–1354, abr. 2011.

LOPES.M.; FERREIRA,J.B.; SANTOS,G.. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, v.4, n.4, dez. 2005.

MOBBS,P.G..**Brain Structure**. In:KERKUT,G.A.;GILBERT,L.I..Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology. Perganomon Press Ltda.,1985. cap. 8,v. 6.

MORITZ,R.F.A.; MIRANDA,J.; FRIES,I.; LE CONTE,Y.; NEUMANN,P.; PAXTON,R.J.. Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie*, Versailles, jan, 2010.

NOGUEIRA-NETO, P.. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Nogueirapis, São Paulo, 1997. 446p.

OLESKEVICH,S.; CLEMENTS,J.D.; SRINIVASAN,M.V.. Long-Term Synaptic Plasticity in the Honeybee. **Journal Neurophysiology**, Pike Bethesda, v.78, p.528-532. 1997.

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

POTTS,S.G.; BIESMEIJER,J.C.; KREMEN,C.; NEUMANN,P.; SCHWEIGER,O.; KUNIN,W.E.. Global pollinator declines: trends,impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, vol.25, n.6, p.345-353, fev. 2010.

ROSSI,C.A.. **Efeitos de doses subletais do imidaclopride no cérebro, ventrículo e túbulo de Malpighi de *Apis mellifera* africanizada**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas- Biologia Celular e Molecular), 104f. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro- São Paulo, 2011.

STUCHI,A.L.P.B.. **Toxicidade e expressão gênica em abelhas do gênero *Tetragonista* após a contaminação por agrotóxicos**. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2009.

VALDOVINOS-NUNEZ,G.R.; QUEZADA-EUAN,J.J.G.; ANCONA-XIU,P.; MOO-VALLE,H.; CARMONA,A.; SANCHEZ,E.R..Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.102, n.5, p.1737-1742, out. 2009.

VELTHUIS, H.H.W.. **Biologia das abelhas sem ferrão**. São Paulo, 33p,1997.

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

6. ARTIGO 03

ANÁLISE FISIOLÓGICA DOS CORPOS PEDUNCULADOS DE OPERÁRIAS FORRAGEIRAS DE ABELHA SEM FERRÃO *Scaptotrigona postica* (LATREILLE, 1807) (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI), APÓS CONTAMINAÇÃO COM DOSE SUBLETAL DE FIPRONIL

6.1 RESUMO

O sistema nervoso de insetos sociais desperta interesse devido a sua simplicidade estrutural e a capacidade de apresentar comportamentos complexos. Dentre as regiões estudadas estão os corpos pedunculados, regiões relacionadas com a integração multissensorial, aprendizagem e memória. A espécie mais utilizada nesses estudos é a *Apis mellifera*, devido a sua importância econômica, seja pelos produtos como mel, própolis ou pela atividade de polinização de áreas cultivadas. Devido a um declínio incomum observado nas colmeias de *A. mellifera* estudos sobre os efeitos de doses letais e subletais de inseticidas estão sendo realizados, já que estes são um dos prováveis contribuintes para este colapso. Outro grupo de grande importância para a polinização de áreas cultivadas e na manutenção da vegetação silvestre são os meliponíneos. Estas abelhas também estão expostas aos agrotóxicos e são muito importantes nos trópicos. Com este fato em foco, os objetivos deste trabalho foram analisar alterações fisiológicas na região dos corpos pedunculados, após contaminação de operárias forrageiras de abelhas sem ferrão *S. postica* com doses subletais. Os resultados mostraram através da técnica de marcação para a enzima citocromo oxidase que houve uma alteração observada nos grupos submetidos ao tratamento tópico, sugerindo um aumento na atividade neural com a finalidade de desintoxicação, já os grupos tratados com alimento contaminado não demonstraram marcação evidente para esta enzima, possivelmente devido a metabolização do inseticida durante o processo de digestão. Para caspase-3 observou-se marcação positiva em ambos os grupos de tratamento, indicando que a contaminação pelo inseticida fipronil, causa danos e pode levar à morte de células neurais. A comparação de dados após teste estatístico mostrou que tanto a DL₅₀ como a CL₅₀ apresentaram significância entre as marcações positivas para caspase,

as doses subletais apesar de mostrarem marcação positiva, não foram suficientes para um resultado significativo quando comparado com o grupo controle. No entanto, através deste trabalho foi possível observar as alterações fisiológicas em células neurais provocadas pela contaminação por fipronil, comprovando sua elevada toxicidade para as abelhas *S. postica*.

Palavras- chave: Fenilpirazóis. Sistema nervoso central. *Scaptotrigona postica*. Citocromo oxidase. Caspase-3.

6.2 INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso Central (SNC) de insetos, especificamente o das abelhas, é um importante modelo para estudos neurobiológicos, por apresentar uma organização simples, quando comparados aos dos mamíferos, combinado com um comportamento social complexo (RIBI et al, 2008).

Em 1850, Dujardim descreveu pela primeira vez a região dos corpos pedunculados (CP), o qual estaria envolvido com a “inteligência” dos insetos (MOBBS, 1982). Pesquisas posteriores revelaram que esta região cerebral está associada com o processamento de informações captadas do ambiente, assim como, a capacidade de aprendizagem e memória, sendo sua estrutura anatômica relacionada aos diferentes estilos de vida e comportamento existente entre os diferentes táxons (FARRIS et al, 2001). Os CP são estruturas que apresentam certa plasticidade, passando por mudanças de acordo com a experiência comportamental do inseto, assim, insetos sociais, apresentam esta região mais desenvolvida (HEISENBERG, 1998; GROH, 2004).

Entre os insetos sociais a abelha *A. mellifera* é utilizada como modelo, devido a sua importância econômica, na comercialização de produtos, como o mel, própolis e cera (CRANE, 1996) e por realizar a polinização de variadas espécies de plantas cultivadas (THOMPSON, 2003; RORTAIS et al, 2005). Segundo estudos cerca de 35% das culturas agrícolas utilizadas na dieta humana, dependem direta ou indiretamente dos serviços de polinização prestado por abelhas (DEPLANE; MAYER, 2000; STINDL; STINDL JR., 2010). Porém, esses serviços estão ameaçados, devido a um declínio observado nas colônias dessas abelhas. Tal fenômeno, nomeado por Colony Collapse Disorder (CCD), tem origem desconhecida e já foi notificado em

todos os continentes (JOHNSON et al, 2009; STINDL; STINDL JR., 2010; VanENGELSDORP, 2010). Sem uma origem definida, algumas hipóteses são levantadas como possíveis causas para o CCD, entre elas o uso de inseticidas (VANDAME et al, 2010; ELLIS et al, 2010).

O fipronil é um dos inseticidas incluídos como possíveis causadores da morte de abelhas. Ele foi o primeiro fenilpirazol introduzido no controle de pragas, apresentando modo de ação diferente dos inseticidas mais antigos. Tem como alvo de ação os receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), resultando na ausência de inibição sináptica das células neurais e conseqüentemente na hiperexcitação, paralisia e posterior morte do organismo (CONNELLY, 2001).

Inúmeras pesquisas vem sendo realizadas a fim de avaliar os efeitos de doses subletais do inseticida fipronil em abelhas melíferas. Autores como Menzel (1993), Thompson (2003), Colin (2004), El Hassani (2005), Del Sarto (2009), Aliouane (2009) e outros, relataram que tais doses podem comprometer a atividade de forrageamento, por interferir em funções como navegação, comunicação e diversas outras respostas flexíveis, além de comprometer a memória, a capacidade de aprendizado, fisiologia celular e o sistema imunológico, alterações essas que a longo prazo podem prejudicar a colônia como um todo (FRAZIER, 2008; DESNEUX, 2007).

Sendo o Brasil um país extremamente agrícola, um dos maiores consumidores de agrotóxicos mundiais e apresentar grande diversidade de polinizadores, tendo 720 espécies de abelhas só no Estado de São Paulo (PEDRO, 2008; IMPERATRIZ-FONSECA, [20-]_{a;b}), é importante a realização de estudos com meliponíneos.

Estas abelhas, também conhecidas como abelhas sem ferrão, são encontradas em regiões Neotropicais e embora pouco estudadas são as principais polinizadores de diversas espécies de fanerógamas, sendo de extrema importância na manutenção da biodiversidade de ecossistemas como a Caatinga, Pantanal, Mata Atlântica e partes da Amazônia, contribuindo com cerca de 30-90% da formação de frutos e sementes dessas regiões (KERR, 1996; 2001; CASTRO et al, 2006; SANTOS et al, 2008). Sendo assim, são importantes os estudos com essas abelhas a fim de avaliar os efeitos que os inseticidas provocam não apenas em seu comportamento, mas aqueles que podem resultar de alterações fisiológicas nas células cerebrais. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações causadas pelo

inseticida fipronil administrado via tópica e ingestão, sobre as células dos corpos pedunculados de operárias forrageiras da abelha sem ferrão *S. postica*.

6.3 METODOLOGIA

6.3.1. Material e Métodos

Material Biológico

Foram utilizados exemplares de operárias forrageiras de *S. postica*, coletados no meliponário do Departamento de Biologia – Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP - *Campus* de Rio Claro. Foram utilizadas 12 operárias forrageiras de *S.postica*, para cada dose e tempo testados, sendo estas coletadas diretamente da entrada do ninho.

O inseticida utilizado nos experimentos foi uma formulação técnica do Fipronil 95%, fornecido pela Bayer CropScience Ltda.

6.3.2 Contaminação tópica

O inseticida fipronil foi diluído em 1mL do solvente acetona, sendo preparadas uma solução de concentração inicial de 1µg/abelha e realizada sucessivas diluições até as concentrações de $DL_{50}/2$, DL_{50} e $DL_{50} \times 2$, 0.27, 0.54 e 1.08 ng/ abelha respectivamente, doses estas estabelecidas a partir da dose letal obtida por JACOB (2012). Para cada abelha foi aplicado 1µL da solução correspondente na região do pronoto com o auxílio de uma microseringa. As abelhas foram coletadas para dissecação 30 minutos, 6, 12, 24 e 48 horas após cada tratamento. Neste experimento foi utilizado um grupo controle com aplicação apenas do solvente acetona.

6.3.3 Contaminação por ingestão

O inseticida fipronil foi diluído em 1mL do solvente acetona, sendo preparadas uma solução de concentração inicial de 1µg/abelha e realizadas sucessivas diluições em alimento (cândi e gelatina) até as concentrações de $CL_{50}/2$, CL_{50} e $CL_{50} \times 2$, 0.12, 0.24 e 0.48 ng/ µL de dieta respectivamente, doses estas estabelecidas a partir da concentração letal obtida por JACOB (2012). As abelhas foram mantidas em jejum durante 1 hora e 30 minutos e posteriormente fornecido o alimento contaminado com

as diferentes doses. As abelhas foram coletadas para dissecação 30 minutos, 6, 12 e 24 e 48 horas após cada tratamento. Neste experimento foi utilizado um grupo controle, o qual recebeu alimento sem contaminação.

6.3.4 Análise da atividade neural

Histoquímica para marcação da enzima citocromo oxidase

Esta técnica foi realizada segundo procedimento metodológico descrito por Wong-Riley (1979) e Armengaud et al (2000). Os cérebros foram dissecados e fixados em solução contendo paraformaldeído a 4% e tampão fosfato de sódio 0.1M, por 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, o fixador foi substituído por solução de tampão fosfato de sódio contendo 25% de sacarose, onde os cérebros permaneceram durante 12 horas. Preparou-se um meio de incubação contendo 0.02% de citocromo c, 0.06% de diaminobenzidina (DAB), 4.5% de sacarose em tampão fosfato 0.1M, onde o material foi incubado por 30 minutos. Decorrido este tempo, o material foi então desidratado em uma série crescente de alcoóis (15% a 95%) e, posteriormente, transferidos para a resina de embebição (overnight). Após a embebição, os cérebros foram incluídos em historesina. As secções histológicas de 6µm de espessura obtidas, foram estendidas sobre lâminas de vidro e secas em temperatura ambiente e, posteriormente preparadas para análise sob microscópio de luz.

6.3.5 Análise de morte celular

Imunoistoquímica para marcação da enzima proteolítica Caspase 3

As abelhas foram dissecadas e seus cérebros fixados em paraformaldeído a 4% e posteriormente lavados em tampão fosfato de sódio 0.1M (pH 7.4). O material biológico foi desidratado em série crescente de alcoóis (15% - 100% e de álcool butírico), transferidos para dois banhos de 2 horas, cada, em paraplast Merck e posteriormente incluídos para corte. Foram realizados cortes com 6µm de espessura e colocados sobre lâminas pré-tratadas com polilisina. Para a desparafinização foram utilizados soluções de xilol e álcool com concentrações decrescentes e deixados em estufa para secagem.

Os cortes foram, então, tratados com 0.3% de peróxido de hidrogênio em solução tampão de fosfato de potássio (KPBS) + 0.3% de Triton, por cerca de 10

minutos, sendo em seguida, incubados em soro normal de cabra para bloqueio de sítios inespecíficos. Decorrido o tempo necessário, os cortes foram incubados, por 48 horas, com o anticorpo primário policlonal anti-Caspase 3 (Calbiochem) feito em coelho e 3% de soro normal de cabra em KPBS + 3% de Triton X-100, em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em KPBS e incubados, por 1 hora, em anticorpo secundário biotinilado conjugado com FITC (1:1000), feito em cabra contra coelho. Após esses procedimentos as lâminas histológicas foram preparadas para observação sob microscópio de fluorescência.

Para identificação de marcação de *background*, uma lâmina do grupo que recebeu a maior concentração passou pelo mesmo procedimento metodológico, porém não foi exposta ao anticorpo anti-caspase 3.

Para a análise da atividade neural e marcação para caspase as fotomicrografias foram adquiridas por meio de uma câmera digital, Olympus DP-71, adaptada a um microscópio, Olympus BX51, e a um computador Dell. Para a aquisição foi utilizado o software DP Controller.

Ao menos 3 fotomicrografias foram utilizadas para a contagem de células marcadas com caspase-3, em aumento de 40 vezes, zoom de 25% e área tecidual de 505 μm X 505 μm . A contagem de células foi realizada através do programa Image Pró Plus 6.3 e posteriormente realizado uma análise de variância através do teste Kruskal-Wallis (Teste H), quando a estatística H obteve valor de p significativo, ou seja, $p < 0,05$, foi realizado o teste de Dunn para verificar qual tratamento apresentava diferença significativa em relação ao grupo controle (AYRES et al., 2007), utilizando o programa BioEstat 5.3 (2012).

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a avaliação de atividade neural foi utilizada a técnica de histoquímica da citocromo oxidase (CO), esta técnica é geralmente utilizada em mamíferos como marcador metabólico de atividade neural para monitorar modificações patológicas, revelar efeitos crônicos de cirurgias e consequências de tratamentos farmacológicos (ARMENGAUD et al, 2001).

Após tratamento com o inseticida fipronil foram observados resultados positivos para a marcação da enzima CO nas células de Kenyon internas dos corpos pedunculados, estando em maior evidência nos grupos tratados quando

comparados com o grupo controle submetidos ao tratamento tópico, (**FIGURAS 4 A**) (**TABELA 1**).

Ao analisar os resultados obtidos, nota-se que para a dose de 0.27ng/abelha a presença da CO (**FIGURA 4 B**) é mais evidente (**FIGURA 3 B**) nos grupos com exposição de 12, 24 e 48 horas após aplicação do fipronil, diferentemente dos grupos contaminados com 0.54 (**FIGURAS 4 C**) e 1.08ng/abelha (**FIGURAS 4 D**) que apresentaram marcação 30 minutos após aplicação, aumentando o número de células positivas à CO de acordo com o tempo de exposição. Neste caso para a dose de 1.08ng/abelha quando coletada após 12 horas a presença de marcação apresentou uma diminuição, este fato pode estar relacionado ao início de morte celular.

Nos grupos submetidos ao tratamento por ingestão as marcações positivas não foram muito evidentes (**TABELA 2**). Os grupos tratados com a dose de 0.12, 0.24 e 0.48 ng/ μ L de dieta apresentaram marcação semelhante aos grupos controle, com marcação basal para CO (**FIGURA 3 A**) em todos os tempos testados, apesar de ser possível observar alguns sintomas de intoxicação, como paralisia, tremores do corpo e asas, nos grupos de 6 horas tratados com dose de 0.48ng/ μ L dieta e 12 horas nas doses 0.24 e 0.48 ng/ μ L dieta. Nenhum dos grupos tratados sobreviveu aos períodos de 24 e 48 horas de exposição, impossibilitando a coleta do material biológico.

No trabalho de Roat (2010) abelhas recém- emergidas e forrageiras, da espécie *A. mellifera*, foram submetidas ao tratamento crônico com inseticida fipronil na dose de 0.01ng (DL₅₀/100), durante 3, 5 e 8 dias, sendo posteriormente submetida a técnica de histoquímica da citocromo oxidase para avaliação de atividade neural. Os resultados mostraram uma marcação basal nos grupos de recém-emergidas tratadas durante 3 dias semelhante ao grupo controle, sugerindo que a atividade neural em abelhas nesta idade não é alterada pela presença do inseticida, embora tenham sido notados sintomas de intoxicação e alterações na sobrevivência destes indivíduos. Uma marcação positiva, mais evidente, foi observado apenas nos grupos de forrageiras tratados durante 3 e 5 dias, demonstrando alterações no metabolismo celular.

Pridgeon et al (2009) utilizaram a técnica de PCR para verificar a expressão da subunidade III da CO, identificada por ser especialmente induzida pela presença de xenobióticos, para tal, submeteram mosquitos *Aedes aegypti* à contaminação por

permetrina e fipronil. Os dados obtidos demonstraram que a DL_{10} de permetrina induziu um pico de expressão de CO III, após 4 horas de exposição, diferentemente dos tratamentos com DL_{50} de permetrina e DL_{10} e DL_{50} de fipronil que induziram diversos pequenos picos de expressão. Ao tratar os insetos com DL_{100} de permetrina verificou-se que os níveis transcricionais induzidos para a CO III não foram significativos, inferindo que doses elevadas podem causar baixa expressão da citocromo oxidase, devido a alta taxa de mortalidade causada pelo rápido modo de ação do inseticida.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que o inseticida fipronil afeta o sistema nervoso central, mais especificamente a região dos corpos pedunculados, provocando alterações no metabolismo celular através do aumento na atividade respiratória e conseqüentemente da atividade enzimática das mitocôndrias.

Os grupos controle demonstraram uma marcação basal para a CO em todos os casos testados, assim como nos grupos submetidos ao tratamento por ingestão, já aqueles submetidos ao tratamento tópico apresentaram marcação positiva para a enzima, de acordo com a dose e o tempo de exposição.

No tratamento tópico as doses mais elevadas apresentaram nos primeiros tempos uma maior marcação para a enzima CO, indicando assim, uma intoxicação aguda, levando à morte dos indivíduos tratados após 24 horas, devido à impossibilidade de detoxificação do organismo. Na dose subletal pode-se observar a ocorrência de intoxicação após um período maior de exposição, apresentando tanto o processo de recuperação como de morte celular.

No tratamento de ingestão os grupos tratados com as três diferentes doses ($CL_{50}/2$, CL_{50} e $CL_{50} \times 2$) apresentaram marcação semelhante à basal em todos os tempos testados, demonstrando que a atividade neural não sofreu alteração evidente após contaminação pelo inseticida fipronil, embora sinais de intoxicação fossem observados. No entanto, isso não significa que o inseticida fipronil não seja tóxico às mesmas por essa via de entrada, uma vez que neste método de tratamento, as abelhas não sobreviveram para a coleta de 24 e 48 horas, sugerindo uma dificuldade na metabolização e detoxificação do organismo.

A marcação basal para a enzima citocromo oxidase nos grupos submetidos ao tratamento por ingestão deve-se, possivelmente, ao processo de digestão que transformaria as moléculas de inseticida em metabólitos sem toxicidade ou em

metabólitos menos tóxicos ao organismo, ou em substâncias mais propensas à excreção, resultando numa marcação positiva de menor intensidade à enzima CO na região dos CP.

Tanto vertebrados como invertebrados apresentam sistemas de detoxificação, ou seja, mecanismos de proteção contra dietas e ambientes tóxicos (DENISON; WHITLOCK JR, 1995). Duas das principais enzimas que agem com esta função no organismo de insetos são a citocromo P450 (P450s) e a glutadiona-S-transferase (GST) (JOHNSON et al, 2006), estas enzimas são encontradas principalmente no intestino, corpo gorduroso e túbulos de Malpighi uma vez que estes são os principais órgãos responsáveis, respectivamente, pela digestão, metabolização, osmorregulação e excreção do inseto (KRANTHI, 2005; DIAO et al, 2006; FEYEREISEN, 1999; SHAH et al, 2011).

A citocromo P450 catalisa a fase inicial da detoxificação do organismo (DENISON; WHITLOCK JR, 1995). Segundo a literatura, esta enzima possui a função de metabolizar hormônios, feromônios e lipídios, porém, o metabolismo de xenobióticos é a função estudada em maior detalhe, devido a sua associação com a resistência de insetos praga aos inseticidas utilizados atualmente na agricultura (SNYDER et al, 1995; SCOTT; WEN, 2001). Estudos avaliaram uma elevada expressão de genes da superfamília P450 associada à resistência metabólica de inseticidas piretróides em mosquitos *Anopheles gambiae* (DAVID et al, 2006), *Musca domestica*, *Drosophila melanogaster* (CARINO et al, 1994) e *A. mellifera* (PILLING et al, 1995).

Johnson et al (2006) tratou abelhas com três inseticidas piretróides diferentes (cyfluthrin, lambda-cialotrina e tau-fluvalinate), sendo que um grupo foi tratado com um inibidor da enzima P450. Os resultados demonstraram que a toxicidade destes inseticidas foram mais significantes com o pré-tratamento, sugerindo que esta enzima é importante na tolerância das abelhas aos inseticidas piretróides. Resistência aos inseticidas neonicotinóides, organofosforados, reguladores de crescimento e ao DDT também foram relacionados a P450, sendo ela capaz de metabolizar diversos inseticidas de estruturas diferentes, sugerindo uma ampla resistência associada a genes desta superfamília (SHAH et al, 2011).

Além da citocromo P450 a enzima GST também apresenta importante função neste processo, participando a fase II do sistema de detoxificação envolvendo reações de conjugação (PAPADOPOULOS et al, 2004; DIAO et al, 2006). Este

sistema é responsável pela resistência a inseticidas organofosforados e piretróides. Segundo um estudo sobre a distribuição da enzima GST no organismo de duas espécies diferentes de abelhas, realizado por Diao et al (2006), a abelha *A. mellifera* apresenta cerca de 35% da atividade enzimática na região do intestino, enquanto *A. cerana* possui 51%, sendo encontrada em maior quantidade em operárias, demonstrando importante função enzimática nos adultos.

Diferentemente do tratamento tópico, que após atravessar a cutícula chega diretamente a hemolinfa, atingindo os órgãos de maneira aguda, a contaminação através do alimento permite que o organismo ative sistemas de detoxificação, provocando uma resposta à intoxicação de modo menos intenso e mais tardio como demonstrado no presente estudo.

Além de alterações na atividade neural foram observadas através da técnica de marcação para enzima proteolítica caspase-3, a presença de morte celular, sendo esta uma das principais enzimas com função central na execução de morte, presentes em células apoptóticas.

A morte celular programada ou apoptose é um processo fisiológico normal controlado geneticamente, ocorrendo durante respostas inflamatórias, eliminação de células danificadas, metamorfose, homeostase do tecido, envelhecimento e outros (JOZA et al, 2001; GRIVICICH et al, 2007; FAN, 2005). Um papel importante na iniciação e progressão de apoptose tem sido atribuída aos membros da família de caspase, entre elas a caspase-3. Esta é um dos principais efetores de apoptose, geralmente ativado pelas caspases -8 e -9 (caspases iniciadoras). A caspase-8 é ativada quando ocorre diminuição da expressão de receptores da membrana plasmática e a caspase-9 quando ocorre uma sinalização mitocondrial com lançamento de moléculas pró-apoptóticas no interior celular (KERN; KEHRER, 2002).

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam alterações na marcação de caspase-3 após tratamento de operárias de abelhas sem ferrão com o inseticida fipronil, tanto para a contaminação tópica (**TABELA 1**) como por ingestão (**TABELA 2**).

Ao comparar os dados com o grupo controle (**FIGURA 5 A**), nota-se que as células de Kenyon dos CP de abelhas do grupo intoxicado com as maiores doses durante o tratamento tópico, 0.54 (**FIGURA 5 C**) e 1.08ng (**FIGURA 5 D**) (DL_{50} e $DL_{50} \times 2$, respectivamente), apresentaram uma marcação positiva evidente após 30 minutos do início dos testes, diferentemente da dose subletal de 0.27ng ($DL_{50}/2$)

(**FIGURA 5 B**), onde a marcação positiva pode ser observada 12 horas após o tratamento. Sugerindo uma relação para o aumento de morte celular, por apoptose, entre dose e tempo de exposição. Para a dose de 1.08ng foi observado uma queda nesta marcação após o tempo de 12 horas o que, possivelmente, estaria relacionado com um estágio avançado de morte celular como mencionado anteriormente.

No tratamento por ingestão ao se comparar os resultados obtidos para o grupo controle (**FIGURA 6 A**) com os tratados, verificou-se que a dose subletal de 0.12ng/ μ L de dieta ($CL_{50}/2$) (**FIGURA 6 B**) apresentou marcação positiva para caspase-3, 12 horas após o tratamento e as maiores doses 0.24 (**FIGURA 6 C**) e 0.48ng/ μ L de dieta (**FIGURA 6 D**) (CL_{50} e $CL_{50} \times 2$, respectivamente), mostraram tal resposta no primeiro tempo testado, com maior evidência conforme a dose ministrada e/ou tempo de exposição ao inseticida era aumentada, assim como observado para o tratamento tópico.

Os resultados observados para a marcação de caspase-3, no tratamento tópico, foram semelhantes aos obtidos para a marcação da enzima citocromo oxidase, sugerindo que as mitocôndrias, possivelmente, estão relacionadas com tal resultado.

Os resultados obtidos com a contagem de células reativas à capase-3 para as duas formas de contaminação pelo inseticida fipronil foram comparadas através da análise estatística utilizando o teste de Kruskal-Wallis. A comparação foi realizada entre o grupo controle e as diferentes doses utilizadas sendo 0.27, 0.54 e 1.08ng no tratamento tópico ($H=16.3216$; G.L.=4; $p=0.0026$ - dados brutos e $H=10.7125$; G.L.=3; $p=0.0134$ - dados sem a marcação inespecífica) (**FIGURA 1**) e 0.12, 0.24, 0.48ng/ μ L de dieta para o tratamento por ingestão ($H=12.2976$; G.L.=4; $p=0.0153$ - dados brutos e $H=8.5151$; G.L.=3; $p=0.0365$ - dados sem a marcação inespecífica) (**FIGURA 2**).

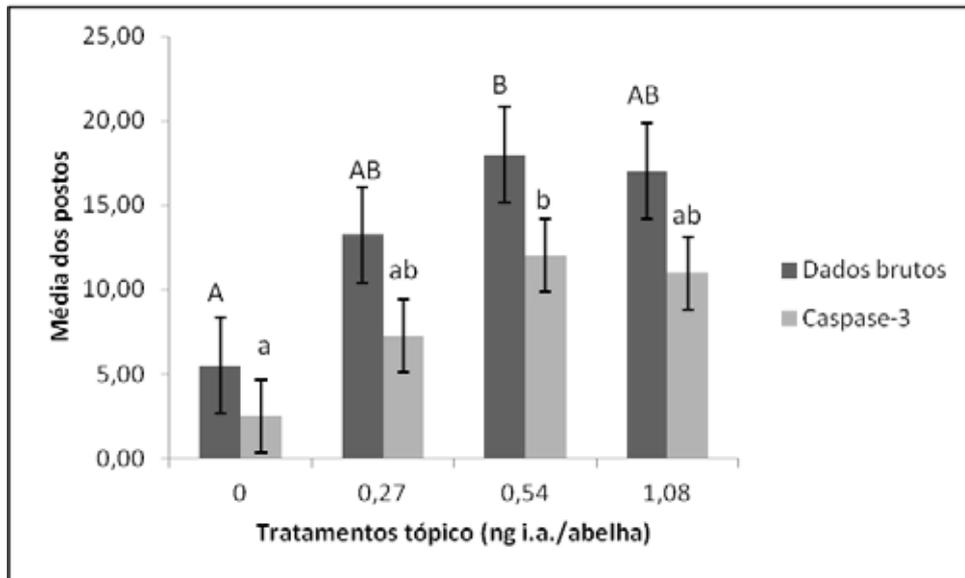


FIGURA 1: Marcação de caspase-3 das células de Kenyon dos corpos pedunculados de abelhas operárias *S. postica*, após tratamento tópico com inseticida fipronil. Letras maiúsculas representam a comparação entre os dados brutos e as minúsculas entre dados sem a marcação inespecífica de caspase, letras diferentes indicam significância ($p < 0.05$) entre a marcação controle- dose e dose-dose. Bioestat 5.3, teste: Kruskal-Wallis, Dunn.

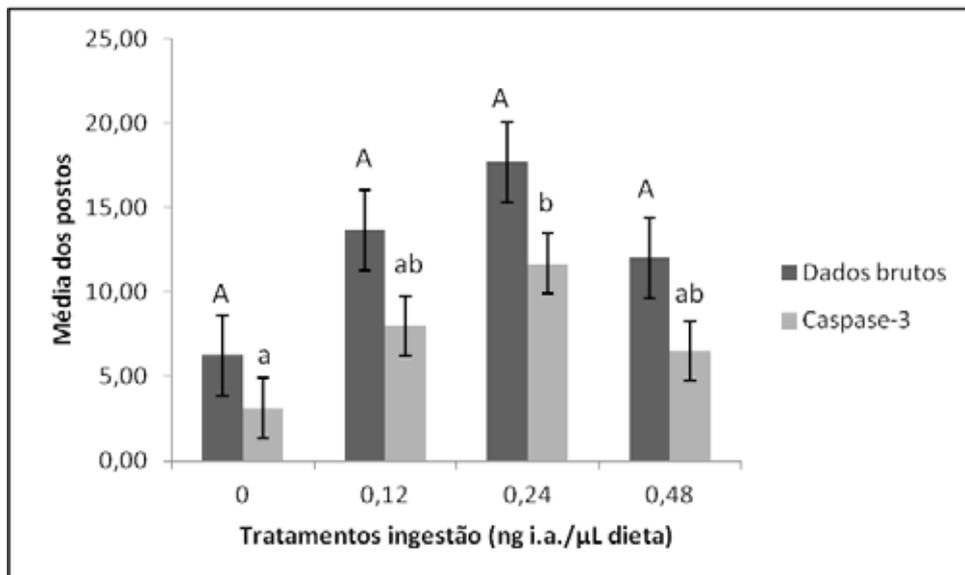


FIGURA 2: Marcação de caspase-3 das células de Kenyon dos corpos pedunculados de abelhas operárias *S. postica*, após tratamento de ingestão com inseticida fipronil. Letras maiúsculas representam a comparação entre os dados brutos e as minúsculas entre dados sem a marcação inespecífica de caspase, letras diferentes indicam significância ($p < 0.05$) entre a marcação controle- dose e dose-dose. Bioestat 5.3, teste: Kruskal-Wallis, Dunn

Resultados significativos ocorreram entre o grupo controle e o grupo que recebeu as doses de 0.54ng no tratamento tópico ($p < 0.05$) e 0.24ng/ μL de dieta no tratamento por ingestão ($p < 0.05$), demonstrando que a DL_{50} e CL_{50} foram mais tóxicas para as abelhas durante as 24 horas de duração do experimento.

Estudos apontam que as mitocôndrias sejam as principais mediadoras de morte celular, estas organelas seriam sensíveis a diferentes sinais indutores de morte, o que resultaria no desacoplamento da cadeia respiratória e consequentemente na liberação de proteínas ativadoras de morte no citoplasma celular, desencadeando uma cascata proteolítica formada por caspases (GRIVICICH et al, 2007).

Estudos com neuroblastos humanos e fipronil, demonstrou que este inseticida induz a neurotoxicidade através do estresse oxidativo, onde as espécies reativas de oxigênio seriam os causadores da toxicidade e morte nesta linhagem celular (SLOTKIN et al, 2010; LEE et al, 2011), além de demonstrar que o fipronil está envolvido com a ativação de caspase-3 por meio da liberação de citocromo c mitocondrial (LEE et al, 2011).

Segundo Vidau et al (2011) o fipronil quando no organismo é rapidamente distribuído entre os compartimentos lipofílicos, como a membrana mitocondrial, onde sua atividade provoca o desacoplamento da cadeia respiratória interrompendo a produção de energia e consequentemente o aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) iniciando a sinalização para morte celular. Ao expor durante 3 horas neuroblastos humanos ao inseticida fipronil estes pesquisadores observaram rápido colapso mitocondrial, associando a citotoxicidade deste inseticida com sua capacidade de impedir a produção de ATP por desacoplamento, o que levaria a liberação de citocromo c no citoplasma contribuindo para a ativação das caspases de iniciação e execução de morte celular, caspase-9 e -3, respectivamente.

Resultados semelhantes foram obtidos por Jia e Misra (2007) ao expor a mesma linhagem celular aos inseticidas endosulfan e zineb, observando uma relação entre a produção de EROs e a citotoxicidade dos compostos, além do nível de enzimas antioxidantes diminuírem após os tratamentos. Foram observados que ambos inseticidas testados causaram morte celular por apoptose e necrose, onde doses elevadas ($>100\mu\text{L}$) ou a mistura dos dois produtos levou à predominância de necrose. Além deste foram analisados a presença da enzima caspase-3, sendo observado um aumento significativo na atividade de caspase-3, 16 horas após os

tratamentos, porém uma mistura de endosulfan e zineb provocou a queda na atividade de caspase-3, sugerindo uma substituição do processo de apoptose pelo de necrose.

Tais resultados corroboram com os obtidos neste trabalho, mostrando que a substituição da morte celular por apoptose pela necrose, estaria relacionada com a diminuição da marcação para caspase-3 quando ministrado as maiores doses tanto na contaminação tópica como por ingestão, após 12 horas de exposição.

6.5 FIGURAS E TABELAS

TABELA 1: Alterações fisiológicas de células da região dos corpos pedunculados de operárias forrageiras de abelha sem ferrão *S. postica* após tratamento tópico.

TEMPOS	DOSES	CITOCROMO OXIDASE	CASPASE-3
30 minutos	0,0	X	X
	0,27	X	XX
	0,54	XX	XXX
	1,08	XX	XXX
6 horas	0,0	X	X
	0,27	XX	XX
	0,54	XX	XXX
	1,08	XX	XXX
12 horas	0,0	X	X
	0,27	XX	XXX
	0,54	XX	XXX
	1,08	XX	XX
24 horas	0,0	X	X
	0,27	XX	XXX
	0,54	Ø	Ø
	1,08	Ø	Ø
48 horas	0,0	X	X
	0,27	XX	XXX
	0,54	Ø	Ø
	1,08	Ø	Ø

Marcação positiva, basal para a citocromo oxidase (X), marcação positiva de maior intensidade (XX), marcação positiva para caspase-3 (X), aumento no número de células com marcação positiva para caspase-3 (XX e XXX) e ausência de exemplares para coleta (Ø).

TABELA 2: Alterações fisiológicas de células da região dos corpos pedunculados de operárias forrageiras de abelha sem ferrão *S. postica* após tratamento por ingestão.

TEMPOS	DOSES	CITOCROMO OXIDASE	CASPASE-3
30 minutos	0,0	X	X
	0,12	X	XX
	0,24	X	XXX
	0,48	X	XXX
6 horas	0,0	X	X
	0,12	X	XX
	0,24	X	XXX
	0,48	Ø	Ø
12 horas	0,0	X	X
	0,12	X	XXX
	0,24	X	XX
	0,48	Ø	Ø
24 horas	0,0	X	X
	0,12	X	XX
	0,24	Ø	Ø
	0,48	Ø	Ø

Marcação positiva, basal para a citocromo oxidase (X), marcação positiva para caspase-3 (X), aumento no número de células com marcação positiva para caspase-3 (XX e XXX) e ausência de exemplares para coleta (Ø).

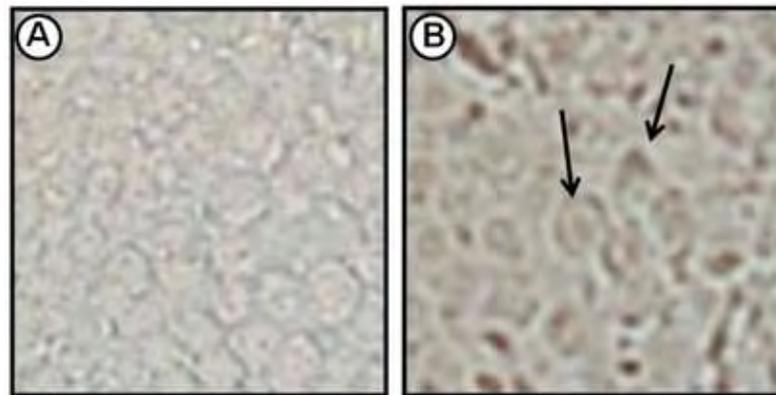


FIGURA 3: Fotomicrografia das células de Kenyon em detalhe, mostrando marcação basal (A) e marcação positiva evidente (B)(seta) para enzima citocromo oxidase

- Atividade Neural: Abelhas submetidas a contaminação tóxica

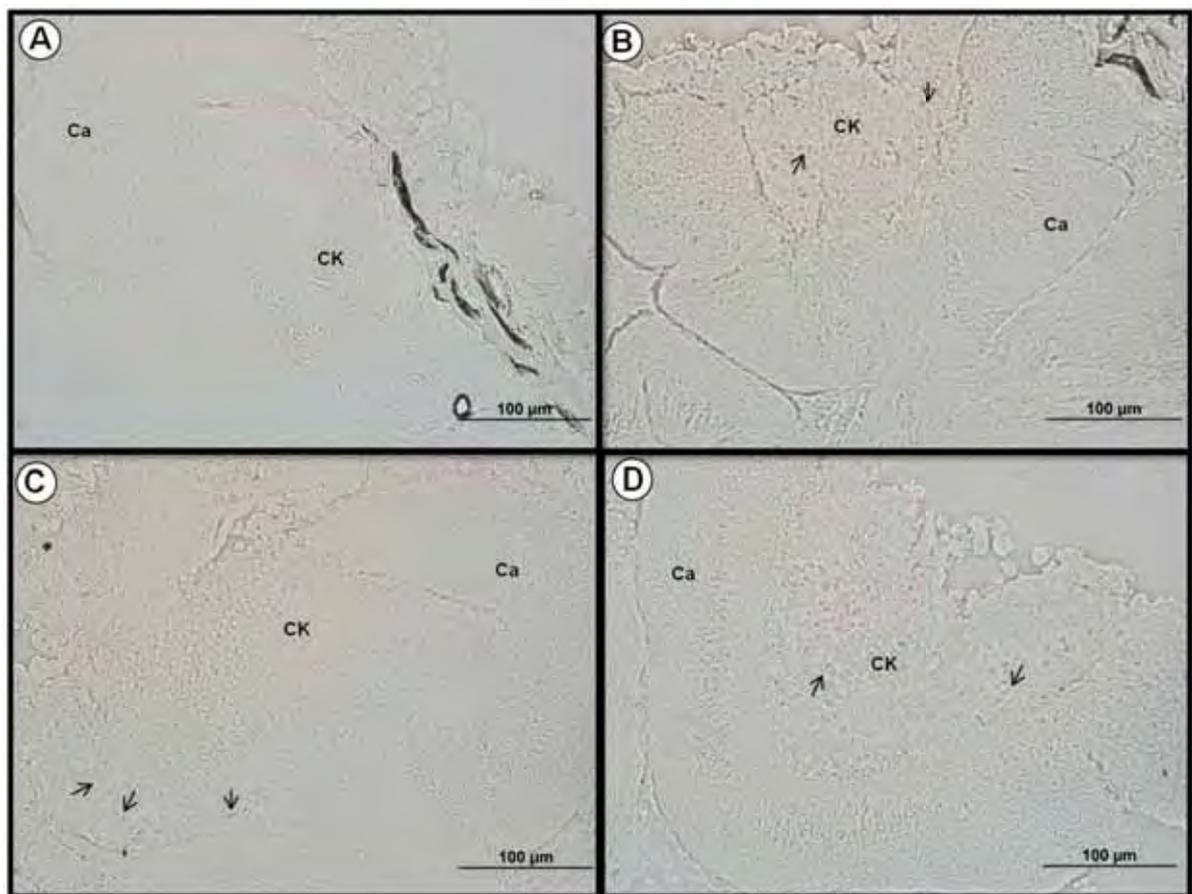


FIGURA 4: Fotomicrografia do corpo pedunculado de operárias de *S. postica* tratadas com as seguintes doses e tempos do inseticida fipronil: 0.0-24 horas (A), 0.27ng- 12 horas (B), 0.54ng-30 minutos (C) e 1.08ng- 6 horas (D), mostrando região com marcação positiva para técnica de atividade neural destacadas pelas setas. Demonstrando as regiões de Cálice (Ca), células de Kenyon compactas- internas (Ckc), células de Kenyon compactas-externas (Cke) e células de Kenyon não-compactas (Ckn).

- Morte celular: Abelhas submetidas a contaminação tóxica

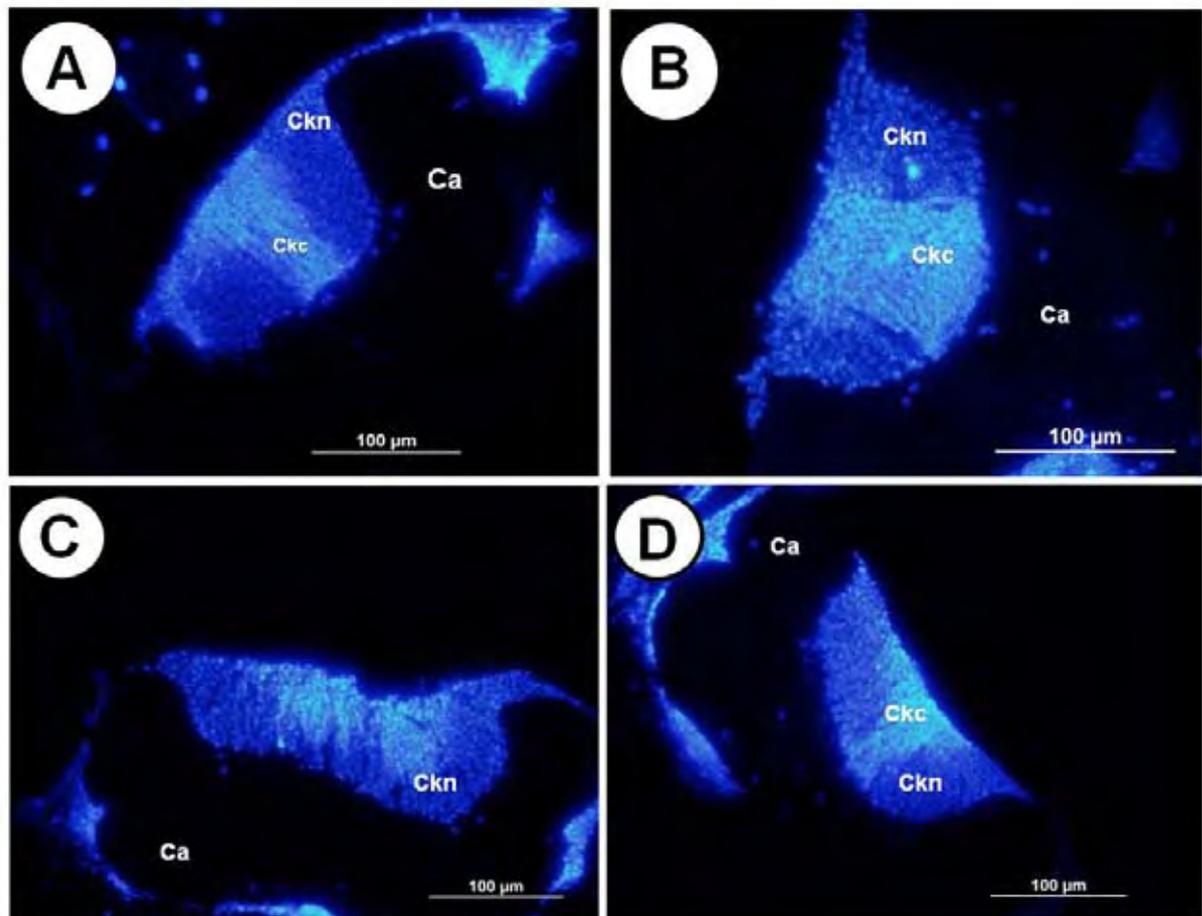


FIGURA 5: Fotomicrografia do corpo pedunculado de operárias de *S. postica* tratadas com as seguintes doses e tempos do inseticida fipronil: 0.0-30 minutos (**A**), 0.27ng-24 horas (**B**), 0.54ng- 12 horas (**C**) e 1.08ng- 6 horas (**D**), após contaminação tóxica mostrando marcação para técnica de caspase-3 sob microscópio de fluorescência. Sendo as regiões do Cálice (**Ca**), células de Kenyon compactas (**CKc**) e células de Kenyon não-compactas (**CKn**).

- Morte celular: Abelhas submetidas a contaminação por ingestão

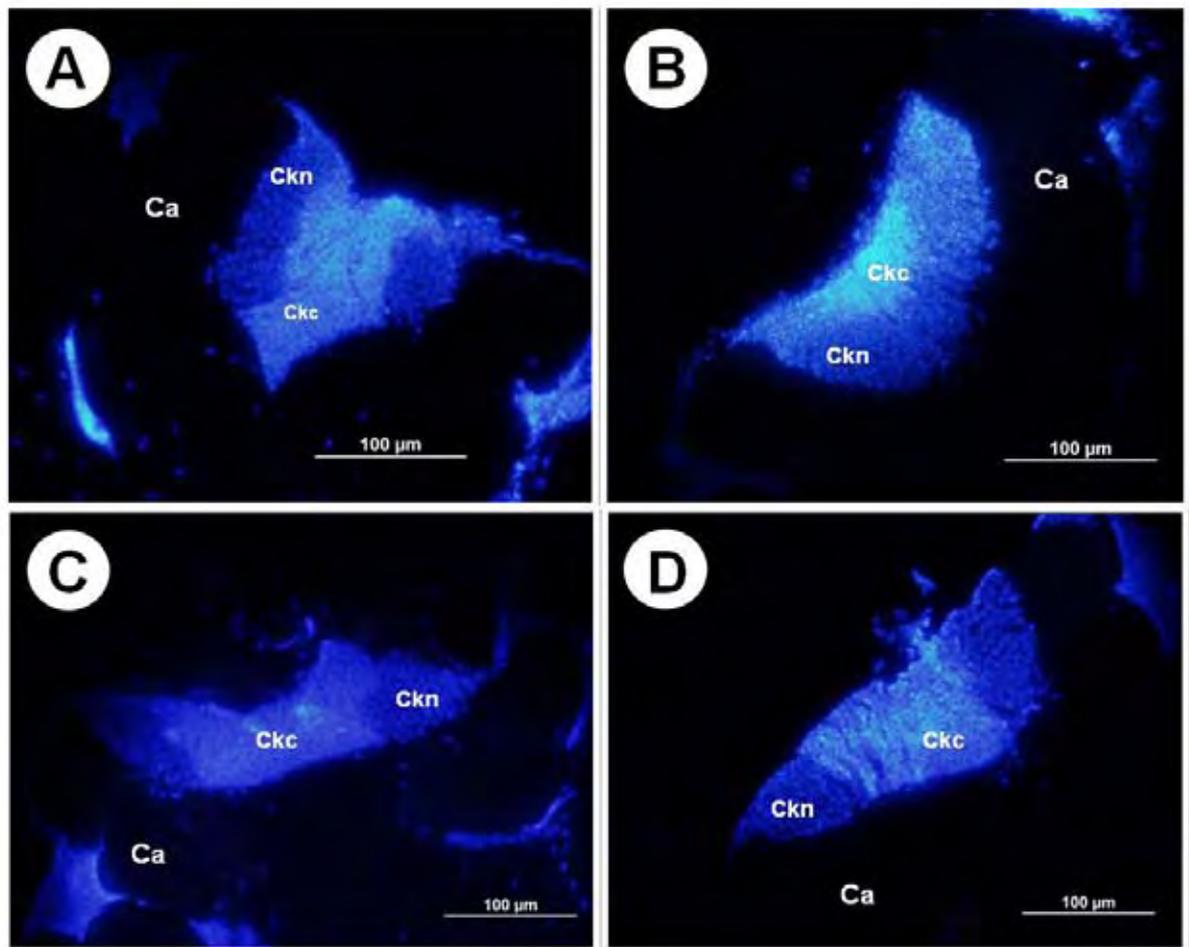


FIGURA 6: Fotomicrografia do corpo pedunculado de operárias de *S. postica* tratadas com as seguintes doses e tempos do inseticida fipronil: 0.0- 24horas (**A**), 0.12ng/ μ L de dieta- 12 horas (**B**), 0.24ng/ μ L de dieta- 6 horas (**C**) e 0.48ng/ μ L de dieta- 30 minutos (**D**), após contaminação por ingestão de alimento contaminado, mostrando marcação para técnica de caspase-3 sob microscópio de fluorescência. Sendo as regiões do Cálice (**Ca**), células de Kenyon compactas (**CKc**) e células de Kenyon não-compactas (**CKn**).

6.6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com a contaminação de operárias de abelha sem ferrão *S. postica* pelo inseticida fipronil, indicam que tanto doses e concentrações letais (DL_{50} e CL_{50}) como subletais causam alterações nas células que compõem a região dos corpos pedunculados, sendo a contaminação tópica a via de contaminação mais tóxica para estes insetos.

Alterações como aumento da atividade neural e a ocorrência de morte celular foram evidentes quando ministrados por via tópica, diferentemente do tratamento por ingestão que provocou alterações de menor intensidade, quando observado pela marcação da enzima citocromo oxidase.

Nesse caso foi possível verificar valores significativos para morte celular por apoptose, que foi demonstrado pela atividade da caspase-3. Tais alterações fisiológicas estão relacionadas com a toxicidade deste fenilpirazol, que demonstra efeitos prejudiciais para insetos não alvo com grande rapidez e potencialidade.

6.7 REFERENCIAS

ALIOUANE, Y.; HASSANI, A.K.E.; GARY, V.; ARMENGAUD, C.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M.. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.28, n.1, p.113-122, jul. 2009.

ARMENGAUD, C.; CAUSSE, N.; AIT-OUBAH, J.; GINOLHAC, A.; GAUTHIER, M.. Functional cytochrome oxidase histochemistry in the honeybee brain. **Brain Research**, Amsterdam, v.859, p.390–393, jan. 2000.

AYRES, M. et al. **BioEstat**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. 5 ed. Belém, 2007, 380 p. Disponível em: <<http://www.mamiraua.org.br/>>. Acesso em 07 mar. 2011.

CARINO, F.A.; KOENER, J.F.; PLAPP JR., F.W.; FEYEREISEN, R.. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene *CYP6A1* in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.24, n.4, p.411-418. 1994.

CASTRO, M.S.; KOEDAM, D.; CONTRERA, F.A.L.; VENTURIERI, G.C.; PARRA, G.N.; MALAGODI-BRAGA, K.S.; CAMPOS, L.O.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; NOGUEIRA-NETO, P.; PERUQUETTI, R.C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.. **Stingless bee** In: **Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices**. Ribeirão Preto: Holos, 2006. 75-83p.

COLIN,M.E.; BONMATIN,J.M.; MOINEAU,I.; GAIMON,C.; BRUN,S.; VERMANDERE,J.P.. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: Relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, Secaucus, v.47, p.387–395, mar. 2004.

CONNELLY,P.. Environmental fate of fipronil. p.1-17, dez. 2001. Disponível em: <<http://fluoridealert.org/pesticides/fipronil.ca.epa.2001.pdf>>. Acesso em 29 de jun.2011.

CRANE, E. **Bee Products: Properties, applications and Apitherapy**. Edited by Avshalom Mizrahi and Yaacov Lensky. Plenum Press, New York,1-13, 1996.

DAVID,J.P.; STRODE,C.; VONTAS,J.; NIKOU,D.; VAUGHAN,A.; PIGNATELLI, P.M.; LOUIS,C.; HEMINGWAY,J.; RANSON,H.. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, Washington, v.102, n.11, p.4080-4084, mar. 2005

DEL SARTO,M.C.L.. **Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. 75f. Tese (Doctor Scientiae do Programa de Pós- Graduação em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

DENISON,M.S.; WHITLOCK JR.,J.P.. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.270, n.31, p.18175-18178. 1995.

DEPLANE,K.S.; MAYER,D.F.. **Crop pollination by bees**. Wallingford: CABI Publishing. 2000.

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

DIAO,Q. ; YUAN,K. ; LIANG,P. ; GAO,X.. Tissue distribution and properties of glutathione S-transferases in *Apis cerana cerana* Fabricius and *Apis mellifera ligustica* Spinola. **Journal of Apicultural Research**, London, v.45, n.3, p.145-152, out. 2006.

EL HASSANI,A.K.E.; DACHER,M.; GAUTHIER,M.; ARMENGAUD,C.. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Fayrtteville, v.82, p.30-39, ago. 2005.

ELLIS, J.D.; EVANS,J.D.; PETTIS,J.. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. **Journal of Apicultural Research**, London, v.49, n.1, p.134-136. 2010.

FAN,T.J.; HAN,L.H.; CONG,R.S.; LIANG,J.. Caspase family proteases and apoptosis. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shangai, v.37, n.11, p.719–727, set. 2005.

FARRIS,S.M.; ROBINSON,G.E.; FAHRBACH,S.E.. Experience- and Age-Related Outgrowth of Intrinsic Neurons in the Mushroom Bodies of the Adult Worker Honeybee. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, vol.21, n.16, p.6395–6404, ago. 2001

FEYEREISEN,R.. Insect P450 enzymes. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.44, p.507-533. 1999.

FRAZIER,M.. **Protecting honey bees from chemical pesticides**. [20-]. Disponível em:<<http://www.pastatebeekeepers.org/pdf/ProtectingBees.pdf>>. Acesso em: 22 jun 2011.
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, jan. 2007.

GREGGERS,U.; MENZEL,R.. Memory dynamics and foraging strategies of honeybees. **Behaviour Ecology and Sociobiology**, Heidelberg, v.32,p.17-29, jul. 1993.

GROH,C.; TAUTZ,J.; ROSSLER,W.. Synaptic organization in the adult honey bee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development. **Proceedings of National Academy Science**, Washington, v.101, n. 12, p.4268–4273, mar. 2004.

HEISENBERG,M.. What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. **Learning & Memory**, Yorks, v.5:1-10.1998.

HEVNER,R.F.; WONG-RILEY,M.T.T.. Brain cytochrome oxidase: purification, antibody production, and immunohistochemical/histochemical correlations in the CNS, **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v.9, n.11, p.3884-3898, nov. 1989.

IMPERATRIZ-FONSECA,V.L.(a) **Serviços aos ecossistemas, com ênfase nos polinizadores e polinização**. [20-]. Disponível em: http://www.ib.usp.br/vinces/logo/servicos%20aos%20ecossistemas_polinizadores_vera.pdf Acesso em : 22 jan 2012.

IMPERATRIZ-FONSECA,V.L.(b). Polinização: Os desafios de um Brasil biodiverso para o uso dos serviços ambientais prestados pelas abelhas. [20-]. Disponível em: <http://200.144.189.76/bioabelha/images/pdfs/projeto33/nacionais/2009_imperatriz_fonseca.pdf>. Acesso em: 10 out 2009.

JIA,Z.; MISRA,H.P.. Reactive oxygen species in in vitro pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: Role of NFκB and caspase-3. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 42, p. 288–298, out. 2007.

JOHNSON,R.M.; WEN,Z.; SCHULER,M.A.; BERENBAUM,M.R.. Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. **Journal Economic Entomology**, Lanham, v.99, n.4, p1046-1050. 2006.

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

JOZA,N.; SUSIN,S.A.; DAUGAS,E.; STANFORDK,W.L.; CHO,S.K.; LIK,C.Y.J.; SASAKI,T.; ELIA,A.J.; CHENG,H.Y.M.; RAVAGNAN,L.; FERRI,K.F.; ZAMZAMI,N.; WAKEHAM,A.; HAKEM,R.; YOSHIDA,H.; KONG,Y.Y.; MAK,T.W.; ZÚÑIGA-PFLÜCKER,J.C.; KROEMER,G.; PENNINGER,J.M.. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, London, v.410. p.549-554, mar. 2001.

KERN,J.C.; KEHRER,J.P.. Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v.139, p.79–95, nov. 2002.

KERR, W.E.; G.A. CARVALHO; V.A. NASCIMENTO. . **Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação**. Fundação Acangaú, Belo Horizonte, 1996. 143p.

KERR,W.E.; CARVALHO,G.A.; SILVA, A.C.; ASSIS, M.G.P.. Aspectos pouco mencionaods da biodiversidade amazônica. *Parcerias estratégicas*, n.12, p.22 set.2001.

KRANTHI,K.R.. Insecticide resistance- Monitoring, mechanisms and management manual. **Central Institute for Cotton Research**, Shankarnagar India, 2005, p.156.

LEE,J.E.; KANG,J.S.; KI,Y.W.; LEE,S.H.; LEE,S.J.; LEE,K.S.; KOH,H.C.. Akt/GSK3 signaling is involved in fipronil-induced apoptotic cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 202, p.133–141, jan. 2011.

MENZEL,R; MANZ,G.. Neural plasticity of mushroom body-extrinsic neurons in the honeybee brain. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v.208, p.4317-4332, set. 2005.

MOBBS,P.G..**Brain Structure**. In:KERKUT,G.A.;GILBERT,L.I..Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology. Perganomon Press Ltda.,1985. cap. 8,v. 6.

PAPADOPOULOS,A.I.; POLEMITOU,I.; LAIFI,P.;YIANGOU,A.; TANANAKI,C.. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera macedonica* kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 139, p.93-97, set. 2004.

PEDRO,J. **Características, modos de ação e efeitos do inseticida fipronil sobre o ambiente e os organismos expostos**. Exame de Qualificação, Universidade Estadual Paulista, Campus Rio Claro. 32p, 2008.

PILLING,E.D.; BROMLEY-CHALLENGOR,K.A.C.; WALKER,C.H.; JEPSON,P.C.. Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and theimidazole fungicide prochloraz, in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Pesticide, Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v.51, p.1-11. 1995.

PRIDGEON,J.W.; BECNEL,J.J.; CLARK,G.G.; LINTHICUM,K.J.. Permethrin induces overexpression of cytochrome c oxidase subunit 3 in *Aedes aegypti*. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v.46, n.4, p.810-819, jul. 2009.

RIBI,W.; SENDEN,T.; SAKELLARIOU,A.; LIMAYE,A.; ZHANG,S.. Imaging honey bee brain anatomy with micro-X-ray-computed tomography. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v.171, p.93-97, fev. 2008.

RIELD,S.J.; SHI,Y.. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Molecular Cell Biology**. v.5, p.897-907, nov. 2004.

ROAT,T.C.. **Diferenciação do cérebro de *Apis mellifera* (HYMENOPTERA, APIDAE) durante a metamorfose: estudo comparativo entre castas e sexos.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas- Biologia Celular e Molecular), 164f. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro- São Paulo, 2008 .

RORTAIS,A.; ARNOLD,G.; HALM,M.P.; TOUFFET-BRIENS,F.. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, Versailles, v.36, p.71-83. 2005.

SANTOS,S.A.B.; ROSELINO,A.C.; BEGO,L.R.. Pollination of cucumber, *Cucumis sativus* L. (Cucurbitales: Cucurbitaceae), by the stingless bees *Scaptotrigona* aff. *depilis* Moure and *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier (Hymenoptera: Meliponini) in greenhouses. **Neotropical Entomology**, Londrina, n. 3, n.5, p.506-512, out. 2008.

SCOTT,J.G.; WEN,Z.. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. **Pest Management Science**, Sussex, v.57, p.958-967, abr. 2001.

SHAH,S.; YARROW,C.; DUNNING,R.; CHEEK,B.; VASS,S.; WINDASS,J.; HADFIELD,S.. Insecticide detoxification indicator strains as tools for enhancing chemical discovery screens. **Pest Management Science**, Sussex, v.68, n.1, p.38-48, abr. 2011.

SLOTKIN,T.A.; SEIDLER,F.J.. Oxidative stress from diverse developmental neurotoxicants: Antioxidants protect against lipid peroxidation without preventing cell loss. **Neurotoxicology and Teratology**, Oxford, v.32, p.124–131, dez. 2010.

SNYDER,M.J.; STEVENS,J.L.; ANDERSEN,J.F.; FEYEREISEN,R.. Expression of cytochrome P450 genes of the CYP4 family in midgut and fat body of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.321,n.1, p.13-20, ago. 1995.

STINDL,R.; STINDL JR,W.. Vanishing honey bees: Is the dying of adult worker bees a consequence of short telomeres and premature aging?. **Medical Hypotheses**, Kidlington, v.75, p. 387–390, abr. 2010.

THOMPSON,H.M.. Behavioural effects of pesticides in bees- Their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, New York, v.12, p.317-330. 2003.

VANDAME,R.; PALACIO,M.A.. Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping?. **Apidologie**, Versailles, v.41, p.243-255. 2010.

VanENGELSDORP,D.; MEIXNER,M.D.. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.103, p.S80–S95, nov. 2010.

VIDAU,C.; GONZALEZ-POLO,R.A.; NISO-SANTANO,M.; GOMEZ-SANCHEZ,R.; PEDRO,J.M.B.S.; PIZARRO-ESTRELLA,E.; BLASCO,R.; BRUNET,J.L.; BELZUNCES,L.; FUENTES,J.M.. Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. **NeuroToxicology**, Little Rock, v. 32, p. 935–943, mai. 2011.

7. DISCUSSÃO GERAL

O desenvolvimento deste trabalho permitiu a observação dos efeitos do inseticida fipronil em uma espécie (*S. postica*) de abelha sem ferrão. Este composto se mostrou altamente tóxico com DL_{50} tópica de 0.54 ng/abelha e CL_{50} de 0.24 ng/ μ L de dieta para o tratamento por ingestão, ambos com 24 horas de exposição. Tais valores comprovam a diferença de sensibilidade entre as abelhas melíferas e as abelhas nativas brasileiras diante de um dos agrotóxicos mais utilizados em áreas de cultivo (TINGLE et al, 2003; ROAT et al, 2010).

Após intoxicação dos grupos com diferentes concentrações de fipronil, alterações morfológicas foram observadas, tanto na microscopia de luz como na ultraestrutura, para ambos os métodos de entrada do inseticida no organismo. Foi possível observar alterações nucleares como dilatações de membrana, picnose e condensação de cromatina, bem como modificações mitocondriais, no aparelho de Golgi além de autofagossomos e lisossomos, sugerindo que tais células estavam em processo de morte celular. Tais resultados foram observados por Ling e Zhang (2011) após intoxicação de cigarrinhas pelo mesmo inseticida, demonstrando uma relação entre dose e tempo de exposição, assim como o presente estudo. Além de alterações morfológicas, alterações fisiológicas também foram observadas nas células de Kenyon do interior dos corpos pedunculados.

A técnica de marcação para CO, possibilitou observar um aumento na atividade neural para os indivíduos tratados por via tópica, sugerindo uma tentativa para a detoxificação do organismo. As marcações positivas evidentes foram observadas para as maiores doses 30 minutos após a intoxicação e 12 horas para aqueles que receberam a dose subletal. No tratamento por ingestão os resultados demonstraram uma resposta diferente ao tratamento, com ausência de marcação para todos as doses e tempos testados, isso possivelmente deve-se ao processo de metabolização do fipronil ao passar pelo trato digestório, o que transformaria as moléculas de inseticida em compostos de menor toxicidade.

Duas das principais enzimas que agem com a função de detoxificação no organismo de insetos são a citocromo P450 (P450s) e a glutadiona-S-transferase (GST) (JOHNSON et al, 2006; DENISON; WHITLOCK JR, 1995), estas enzimas são encontradas principalmente no intestino, corpo gorduroso e túbulos de Malpighi (KRANTHI, 2005; DIAO et al, 2006; FEYEREISEN, 1999; SHAH et al, 2011).

No entanto, ao analisar o material submetido a marcação de morte celular, através de caspase-3, foi observado que apesar do processo de digestão este inseticida não só chegou até as células neurais, mas também provocou danos que levaram a desencadear a sinalização para morte celular. Segundo os resultados do teste estatístico, Kruskal-Wallis, Dunn, os dois meios de intoxicação apresentaram uma aumento significativo na ocorrência de morte quando comparado ao grupo controle. Estudos apontam que a toxicidade do fipronil estaria relacionada com sua capacidade de provocar estresse oxidativo, através da formação de espécies reativas de oxigênio, que quando em grande quantidade na célula pode provocar a morte. Além de sugerir que o fipronil está, possivelmente, envolvido com a ativação de caspase-3 através da liberação de citocromo c mitocondrial (LEE et al, 2011; VIDAU et al, 2011). A diminuição na marcação de caspase-3 quando ministrada as maiores doses de inseticida, sugere uma substituição entre morte celular por apoptose, uma via dependente de caspase, pela morte por necrose, independente de caspase.

Os resultados aqui obtidos podem ser utilizados como alerta quanto a necessidade de preservação e de alterações relacionadas ao uso de agrotóxicos. Foi demonstrado que este inseticida neurotóxico além de alterações comportamentais, como relatado na literatura (DEL SARTO, 2009; EL HASSANI et al, 2005; DECOURTYE et al, 2005;2009) pode também causar danos que modificariam o funcionamento em nível celular. O aumento de atividade neural, assim como a eliminação de células danificadas, podem apresentar tais proporções que, possivelmente levariam o organismo à morte. Comprometendo não apenas as interações existentes no interior da colônia, mas também a diversidade biológica dos diferentes ecossistemas conhecidos.

8. CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho possibilitou estabelecer o valor de dose e concentração letal aguda do inseticida fipronil para operárias recém-emergidas de abelhas sem ferrão *S. postica* em 0.54ng/abelha e 0.24ng i.a./ μ L de dieta, indicando que as mesmas são altamente sensíveis a este inseticida.

A exposição tópica e por ingestão de operárias forrageiras ao inseticida fipronil mostrou alterações morfológicas nos corpos pedunculados, com modificações nucleares, nas organelas e a presença de autofagossomos, características estas de morte celular.

Alterações metabólicas significativas foram observadas para o tratamento tópico, possivelmente, uma resposta à intoxicação aguda do organismo pelo inseticida fipronil que induziriam um aumento na atividade enzimática das mitocôndrias e conseqüentemente na atividade neural. Na exposição por ingestão não foi observado alterações significativas na atividade neural, possivelmente devido ao processos de digestão e detoxificação que levam a degradação do composto em produtos menos tóxicos resultando em efeitos de menor intensidade.

Os resultados para a atividade da enzima proteolítica caspase-3, mostraram que tanto para a intoxicação tópica como por ingestão houveram quantidades significativas de morte celular, com uma relação entre dose-tempo de exposição, indicando que além de tóxico o fipronil chega rapidamente até as células cerebrais provocando danos irreversíveis às mesmas.

Como os corpos pedunculados estão associados aos processos de memória e aprendizagem, os danos nessas estruturas podem provocar desorientação e prejudicar a atividade de forrageamento das abelhas, comprometendo temporariamente ou permanentemente toda a colônia, bem como a reprodução dos vegetais que são polinizados por essa espécie.

9. REFERÊNCIAS

- AAJOUD,A.; RAVANEL,P.; TISSUT,M.. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v.51, p.1347-1352, jan. 2003.
- ABD AL-FATTAH,M.A.; EL-SHEMY,A.A.M.. Eight methods for ventilating confined honeybee colonies during the application of insecticides. **Journal of Apicultural Research**, Londres, v.29, n.4, p.214-220. 1990.
- ABDALLA,F.C.; CRUZ-LANDIM,C..Estudo comparativo da área ocupada pelos corpos pedunculados no cérebro de duas espécies de abelhas (Hymenoptera, Apoidea). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v.13, n.4, p.955-962, dez. 1996.
- ABRAMSON,C.I.; AQUINO,I.S.; RAMALHO,F.S.; PRICEL,J.M.. The effect of insecticides on learning in the africanized honey Bee (*Apis mellifera* L.). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, Rostock, v.37, p.529-535, mai. 1999.
- AL-FATTAH,M.A.; EL-SHEMY,A.A.M.. Eight methods for ventilating confined honeybee colonies during the application of insecticides. **Journal of Apicultural Research**, Cardiff, v.29, n.4, p.214-220, set. 1990.
- ALBERTS,B.; BRAY,D.; HOPKIN,K.; JOHNSON,A.; LEWIS,J.; RAFF,M.; ROBERTS,K.; WALTER,P.. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2º. ed. Artmed, 2006. 806 p.
- ALI,A.; NAYR,J.K., GU,W.D.. Toxicity of a phenyl pyrazole insecticide, fipronil, to mosquito and chironomid midge larvae in the laboratory. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Washington DC, v.14, n.2, p.216-218. 1998.
- ALIOUANE,Y.; HASSANI,A.K.E.; GARY,V.; ARMENGAUD,C.; LAMBIN,M.; GAUTHIER,M.. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.28, n.1, p.113-122, jul. 2009.
- ALIX,A.; BROWN,M.; CARPENTIER,P.; CHABERT-RIBIERE,M.; CHAUZAT,M.P.; DELORME,R.; FAUCON,J.P.; GAUTHIER,L.; HAUBRUGE,E.; JACOBS,F.; LE CONTE,Y.; MOUTOU,F.; NGUYEN,B.K.; RERAT,A.; SAEGERMAN,C.. Composition of the working group on "bee colony mortality, collapse and weakening": **França: Agence Francaise de securite sanitaire des aliments**. 2008.
- ARMENGAUD,C.; CAUSSE,N.; AIT-OUBAH,J.; GINOLHAC,A.; GAUTHIER,M.. Functional cytochrome oxidase histochemistry in the honeybee brain. **Brain Research**, Amsterdam, v.859, p.390–393, jan. 2000.
- ARMENGAUD,C.; AIT-OUBAH,J.; CAUSSE,N.; GAUTHIER,M.. Nicotinic acetylcholine receptor ligands differently affect cytochrome oxidase in the honeybee brain. **Neuroscience Letters**, Limerick, v.304, p.97-101, mar. 2001.

AYRES, M. et al. **BioEstat**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. 5 ed. Belém, 2007, 380 p. Disponível em: <<http://www.mamiraua.org.br/>>. Acesso em 07 mar. 2011.

BARNETT,E.A.; CHARLTON,A.J.; FLETCHER,M.R.. Incidents of bee poisoning with pesticides in the United Kingdom, 1994-2003. **Pest Management Science**, West Sussex, v.63, p.1051-1057. 2007.

BORTOLOTTI,L.; MONTANARI,R.; MARCELINO,J.; MEDRZYCKI,P.; MAINI,S.; PORRINI,C.. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v.56, n.1, p.63-67. 2003.

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**, Hoboken, v.492, p.1-19, abr. 2005.

BREDSSEN,D.E.; RAO,R.V.; MEHLEN,P.. Cell death in the nervous system. **Nature**, Londres, v. 443, n.19, p.796-802, out. 2006.

CARNEIRO,F.F.; ALMEIDA,V.E.S.. **O Brasil é o país que mais usa agrotóxicos no mundo**. Agrosoft Brasil, 2010. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/214789.htm>>. Acesso em: 21 jun. 2011.

CARINO,F.A.; KOENER,J.F.; PLAPP JR.,F.W.; FEYEREISEN,R.. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene *CYP6A1* in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.24, n.4, p.411-418. 1994

CARVALHO,S.M.; CARVALHO,G.A.; CARVALHO,C.F.; BUENO FILHO,J.S.S.; BAPTISTA,A.P.M.. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para abelha africanizada *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.4, p.597-606, out./dez. 2009.

CASTRO,M.S.; KOEDAM,D.; CONTRERA,F.A.L.; VENTURIERI,G.C.; PARRA,G.N.; MALAGODI-BRAGA,K.S.; CAMPOS,L.O; CORTOPASSI-LAURINO,M.; NOGUEIRA-NETO,P.; PERUQUETTI,R.C.; IMPERATRIZ-FONSECA,V.L..**Stingless bee** In: **Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices**. Ribeirão Preto: Holos, 2006. 75-83p.

CELLI,G.; MACCAGNANI,B.. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v.56, n.1:, p.137-139. 2003.

CHAMBÓ, E.D; GARCIA,R.C.; OLIVEIRA,N.T.E.; DUARTE-JÚNIOR,J.B.. Aplicação de inseticida e seus impactos sobre a visitação de abelhas (*Apis mellifera* L.) no girassol (*Helianthus annuus* L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.5, n.1, p.37-42. 2010.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 5°.ed. Elsevier Publishing, 1998. 789p.

CHAUZAT,M.P.; FAUCON, J.P.; MARTEL,A.C.; LACHAIZE,J.; COUGOULE,N.; AUBERT,M.. A Survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.99, n.2, p. 253-262, dez. 2006.

CONNELLY,P.. **Environmental fate of fipronil**. p.1-17, dez. 2001. Disponível em: <<http://fluoridealert.org/pesticides/fipronil.ca.epa.2001.pdf>>. Acesso em 29 de jun.2011.

COUTINHO,C.F.B.; TANIMOTO,S.T.; GALLI,A.; GARBELLINI,G.S.; TAKAYAMA,M.; AMARAL,R.B.; MAZO,L.H.; AVACA,L.A.; MACHADO,S.A.S.. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.15, p.65-72, jan. 2005.

CRANE, E. **Bee Products: Properties, applications and Apitherapy**. Edited by Avshalom Mizrahi and Yaacov Lensky. Plenum Press, New York,1-13, 1996.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas - Morfologia e Função de Sistemas**. Editora UNESP. São Paulo, 2009, p.407.

DAVID,J.P.; STRODE,C.; VONTAS,J.; NIKOU,D.; VAUGHAN,A.; PIGNATELLI, P.M.; LOUIS,C.; HEMINGWAY,J.; RANSON,H.. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, Washington, v.102, n.11, p.4080-4084, mar. 2005.

DECOURTYE,A.; DEVILLERS,J.; GENECQUE,E.; MENACH,K.L.; BUDZINSKI,H.; CLUZEAU,S.; PHAM-DELEGUE,M.H.. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.48, p.242-250. 2005.

DECOURTYE,A.; LEFORT,S.; DEVILLERS,J.; GAUTHIER,M.; AUPINEL,P.; TISSEUR,M.. Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex maze. **Hazards of pesticides to bees – 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group**. 2009.

DÉGLISE,P.; NEWALD,B.G.; GAUTHIER,M.. The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. **Neuroscience Letters**, Limerick, v.321, p.13–16, out. 2002.

DÉGLISE,P.; DACHER,M.; DION,E.; GAUTHIER,M.; ARMENGAUD,C.. Regional brain variations of cytochrome oxidase staining during olfactory learning in the honeybee (*Apis mellifera*), **Behavioral Neuroscience**, Washington, v.117, n.3, p.540-547. 2003.

DEL SARTO,M.C.L.. **Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. 75f. Tese (Doctor

Scientiae do Programa de Pós- Graduação em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

DENISON,M.S.; WHITLOCK JR.,J.P.. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.270, n.31, p.18175-18178. 1995.

DEPLANE,K.S.; MAYER,D.F.. **Crop pollination by bees**. Wallingford: CABI Publishing. 2000.

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

DEVILLERS,J.. **The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology. Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals**. Taylor & Francis, London and New York, 2002.

DIAO,Q. ; YUAN,K. ; LIANG,P. ; GAO,X.. Tissue distribution and properties of glutathione S-transferases in *Apis cerana cerana* Fabricius and *Apis mellifera ligustica* Spinola. **Journal of Apicultural Research**, London, v.45, n.3, p.145-152, out. 2006.

EARNSHAW,W.C.; MARTINS,L.M.; KAUFMANN,S.H.. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.68, p.383–424, 1999.

EL HASSANI,A.K.E.; DACHER,M.; GAUTHIER,M.; ARMENGAUD,C.. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Fayrteville, v.82, p.30-39, ago. 2005.

ELLIS, J.D.; EVANS,J.D.; PETTIS,J.. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. **Journal of Apicultural Research**, London, v.49, n.1, p.134-136. 2010.

FAHRBACH,S.E.; MOORE,D.; CAPALDI,E.A.; FARRIS,S.M.; ROBINSON,G.. Experience-Expectant Plasticity in the Mushroom Bodies of the Honeybee. **Learning & Memory**, Yorks, v.5, p.115–123. 1998.

FAHRBACH,S.E.. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual Review Entomology**, Palo Alto CA, v.51, p.209-232. 2006.

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**. Imprensa Universitária, Fortaleza, 2004. p.19-22.

FARRIS,S.M.. Structural, functional and developmental convergence of the insect mushroom bodies with higher brain centers of vertebrates. **Brain, Behavior and Evolution**, Basel, v.72, p.1-15, jun. 2008.

FARRIS,S.M.; SINAKEVITCH,I.. Development and evolution of the insect mushroom bodies: towards the understanding of conserved developmental mechanisms in a higher brain center. **Arthropod Structure e Development**, Oxford, v.32, p.79-101. 2003.

FERREIRA,R.A.C.. **Análise morfológica e histoquímicos de Malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas -Biologia Celular e Molecular), 83f. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro- São Paulo, 2010.

FEYEREISEN,R.. Insect P450 enzymes. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.44, p.507-533. 1999.

FLETCHER,M.; BARNETT,L.. Bee pesticide poisoning incidents in the United Kingdom. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v.56, n.1., p.141-145. 2003.

FREE, J.B. **A organização social das abelhas (*Apis*)**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980. 79p.

GHINI,S.; FERNÁNDEZ,M.; PICO,Y.; MARÍN,R.; FINI,F.; MAÑES,J.; GIROTTI,S.. Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v.47, p.479-488. 2004.

GRACIOLI-VITTI,L.F.; ABDALLA,F.C.; CRUZ-LANDIM,C.. Caracterização das glândulas mandibulares nas diferentes classes de adultos de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.33, n.6, dez. 2004.

GUNASEKARA,A.S.; TRUONG,T.; GOH,K.S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R.S.. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v.32, n.3, p.189–199, fev. 2007.

HAYNES,K.F.. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Annual Review Entomology**, Palo Alto CA, v.33, p.149-168. 1988.

HEISENBERG,M.. What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. **Learning & Memory**, Yorks, v.5:1-10.1998.

HEVNER,R.F.; WONG-RILEY,M.T.T.. Brain cytochrome oxidase: purification, antibody production, and immunohistochemical/histochemical correlations in the CNS, **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v.9, n.11, p.3884-3898, nov. 1989.

IMPERATRIZ-FONSECA,V.L..(a) **Serviços aos ecossistemas, com ênfase nos polinizadores e polinização**. [20-]. Disponível em: http://www.ib.usp.br/vinces/logo/servicos%20aos%20ecossistemas_polinizadores_vera.pdf Acesso em : 22 jan 2012.

IMPERATRIZ-FONSECA,V.L.(b). Polinização: Os desafios de um Brasil biodiverso para o uso dos serviços ambientais prestados pelas abelhas. [20-]. Disponível em: < http://200.144.189.76/bioabelha/images/pdfs/projeto33/nacionais/2009_imperatriz_fonseca.pdf>. Acesso em: 10 out 2009.

ISHAAYA,I.. Biochemical processes related to insecticide action: an overview. **Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance**, Berlin. 2001.

JOHNSON,R.M.; WEN,Z.; SCHULER,M.A.; BERENBAUM,M.R.. Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. **Journal Economic Entomology**, Lanham, v.99, n.4, p1046-1050. 2006.

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

LING,S.; ZHANG,R.. Effect of fipronil on brain and muscle ultrastructure of *Nilaparvata lugens* (Homoptera:Delphacidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.74, p.1348–1354, abr. 2011.

KERR,W.E.; CUNHA,R.A.. Sex determination in bees: XXVI. Masculinism of workers in the Apidae. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.13, n.3, p.479-489. 1990.

KERR, W.E.; G.A. CARVALHO; V.A. NASCIMENTO. . **Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação**. Fundação Acangaú, Belo Horizonte, 1996. 143p.

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

KIYA,T.; KUNIEDA,T.; KUBO,T.. Increased neural activity of a mushroom body neuron subtype in the brains of forager honeybees. **Plos One**, São Francisco, v.4, p.370-371, abr. 2007.

KRANTHI,K.R.. Insecticide resistance- Monitoring, mechanisms and management manual. **Central Institute for Cotton Research**, Shankarnagar India, 2005, p.156.

KREMEN,C.; WILLIAMS,N.M.; THORP,R.W.. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v.99, n.26, p.16812-16816, dez. 2002.

KRETZSCHMAR,D.; PFLUGFELDER,G.O.. Glia in development, function, and neurodegeneration of the adult insect brain. **Brain Research Bulletin**, New York, v.57, p.121-131. 2002.

LEE,J.E.; KANG,J.S.; KI,Y.W.; LEE,S.H.; LEE,S.J.; LEE,K.S.; KOH,H.C.. Akt/GSK3_β signaling is involved in fipronil-induced apoptotic cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 202, p.133–141, jan. 2011.

LI, X. Q. et al. Toxicities of fipronil enantiomers to the honeybee *Apis mellifera* L. and enantiomeric compositions of fipronil in honey plant flowers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 29, n. 1, p. 127-132, 2010.

LING,S.; ZHANG,R.. Effect of fipronil on brain and muscle ultrastructure of *Nilaparvata lugens* (Homoptera:Delphacidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.74, p.1348–1354, abr. 2011.

LOPES.M.; FERREIRA,J.B.; SANTOS,G.. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, v.4, n.4, dez. 2005.

LOURENÇO,C.T.; NOCELLI,R.C.F.. Effects of Insecticides on Bees: Status in Brazil, **Neotropical Entomology**, Londrina, p.20, 2011. No prelo.

MACHADO,A.B.M.. **Neuroanatomia Funcional**. 2°.ed. Atheneu, São Paulo, 2006. 359p.

MACIEIRA,O.J.D.; PRONI,E.A.. Capacidade de resistência a altas e baixas temperaturas em operárias de *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae) durante os períodos de verão e inverno. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 21, n.4, p.893–896, dez. 2004.

MALASPINA,O.; STORT, A.C..DDT tolerance of africanized bees, Italian bees (*Apis mellifera ligustica*) and their F1 hybrids (Hymenoptera: Apidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, Manhattan, v.56, n.1, p.74-79. 1983.

MALASPINA,O.; SOUZA,T.F.. Pólen toxico e defensivo agrícola: riscos e conseqüências. In: **16° Congresso Brasileiro de Apicultura**, Aracaju: Anais do Congresso Brasileiro de Apicultura. 2006.

MEDRZYCKI,P.; MONTANARI,R.; BORTOLOTTI,L.; SABATINI,A.G.; MAINI,S.; PORRINI,C.. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v.56, n.1, p.59-62. 2003.

MENZEL,R; MANZ,G.. Neural plasticity of mushroom body-extrinsic neurons in the honeybee brain. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v.208, p.4317-4332, set. 2005.

MICHAELIS,T.; WATANABE,T.; NATT,O.; BORETIUS,S.; FRAHM,J.; UTZ,S.; SCHACHTNER,J.. In vivo 3D MRI of insect brain: cerebral development during metamorphosis of *Manduca sexta*. **NeuroImage**, Orlando, v.24, p.596-602. 2005.

MOBBS,P.G.. **Brain Structure**. In:KERKUT,G.A.; GILBERT,L.I.. **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Perganomon Press Ltda.,1985. cap. 8,v. 6.

MORAES,S.S; BAUTISTA,A.R.L.; VIANA,B.F. Avaliação da toxicidade aguda (DL₅₀ e CL₅₀) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): via de

contato. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. Jaboticabal- São Paulo, v.29, n.1, p.32- 37, mar. 2000.

NARAHASHI,T.; ZHAO,X.; IKEDA,T.; NAGATA,K.; YEH,J.Z.. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. **Human & Experimental Toxicology**, Hampshire, v.26, n.4, p.361-366, abr. 2007.

NEUMANN,P.; CARRECK,N.L.. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, London, v.49, n.1, p.1-6, dez. 2010.

NICHOLSON,D.W.. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death and Differentiation**, Londres, v.6, p.1028-1042. 1999.

NOGUEIRA-NETO, P.. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Nogueirapis, São Paulo, 1997. 446p.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, p.1-8, set. 1998.

OLESKEVICH,S.; CLEMENTS,J.D.; SRINIVASAN,M.V.. Long-Term Synaptic Plasticity in the Honeybee. **Journal Neurophysiology**, Pike Bethesda, v.78, p.528-532. 1997.

OLIVEIRA,P.R.; BECHARA,G.H.; MORALES,M.A.M.; CAMARGO MATHIAS, M.I.. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.47, p.1255–1264, jul. 2009.

PAPADOPOULOS,A.I.; POLEMITOU,I.; LAIFI,P.;YIANGOU,A.; TANANAKI,C.. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera* macedonica kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 139, p.93-97, set. 2004.

PEDRO,J. **Características, modos de ação e efeitos do inseticida fipronil sobre o ambiente e os organismos expostos**. 32p. Exame de Qualificação - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro- São Paulo, 2008.

PEI,Z.; YITONG,L.; BAOFENG,L.; GAN,J.J.. Dynamics of fipronil residue in vegetable-field ecosystem. **Chemosphere**, Oxford, v.57, p.1691–1696. 2004.

PEREIRA,C.P.M.; OLIVEIRA,P.R.; FURQUIM,K.C.S.; BECHARA,G.H.; CAMARGO-MATHIAS,M.I.. Effects of fipronil (active ingredient of Frontline1) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.166, p.124–130. 2009.

PETTMANN,B.; HENDERSON,C.E.. Neuronal cell death. **Neuron**, Cambridge, v.20, p.633-647, abr. 1998.

PHAM-DELÈGUE,M.H.; DECOURTYE,A.; KAISER,L.; DEVILLERS,L.. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. **Apidologie**, Versailles, v.33, p.425-432. 2002.

PILLING,E.D.; BROMLEY-CHALLENGER,K.A.C.; WALKER,C.H.; JEPSON,P.C.. Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz, in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Pesticide, Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v.51, p.1-11. 1995.

PORRINI,C.; SABATINI,A.G.; GIROTTI,S.; GHINI,S.; MEDRZYCHI,P.; GRILLENZONI,F.; BORTOLOTTI,L.; GATTAVECCHIA,E.; CELLI,G.. Honey bees and products as monitors of the environmental contamination. **Apiacta**, Bucarest, v.38, p. 63-70. 2003.

PRIDGEON,J.W.; BECNEL,J.J.; CLARK,G.G.; LINTHICUM,K.J.. Permethrin induces overexpression of cytochrome c oxidase subunit 3 in *Aedes aegypti*. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v.46, n.4, p.810-819, jul. 2009.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 20 jun. 2011.

RAMALHO, F.S.; WANDERLEY,P.A.; SANTOS,T.M. **Natural enemies and programs of biological control of cotton boll weevil in Brazil**. In: Workshop proceedings: Integrated pest management of the cotton boll weevil in Argentina, Brazil, and Paraguay, Buenos Aires, p.142–148. 1996.

RIBI,W.; SENDEN,T.; SAKELLARIOU,A.; LIMAYE,A.; ZHANG,S.. Imaging honey bee brain anatomy with micro-X-ray-computed tomography. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v.171, p.93-97, fev. 2008.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, Los Angeles, v.12, n.5, p.1-22, jan. 2005.

ROAT,T.C.. **Diferenciação do cérebro de *Apis mellifera* (HYMENOPTERA, APIDAE) durante a metamorfose: estudo comparativo entre castas e sexos**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas- Biologia Celular e Molecular), 164f. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro- São Paulo, 2008 .

ROAT,T.C., Carvalho,S.M., NOCELLI,R.C.F., SILVA-ZACARIN,E. C. M., MALASPINA,O.. Acute toxicity of fopronil to newly-emerged honeybee *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) africanized In: **IX Encontro sobre abelhas**, 2010, Ribeirão Preto.

RORTAIS,A.; ARNOLD,G.; HALM,M.P.; TOUFFET-BRIENS,F.. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, Versailles, v.36, p.71-83. 2005.

ROSSI,C.A.. **Efeitos de doses subletais do imidaclopride no cérebro, ventrículo e túbulo de Malpighi de *Apis mellifera* africanizada**. Dissertação (Mestrado em

Ciências Biológicas- Biologia Celular e Molecular), 104f. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro- São Paulo, 2011.

SANTOS,A.B.. Abelhas nativas: polinizadores em declínio. **Natureza on line**, Santa Tereza- ES, v.8, n.3, p.103-106, 2010.

SHAH,S.; YARROW,C.; DUNNING,R.; CHEEK,B.; VASS,S.; WINDASS,J.; HADFIELD,S.. Insecticide detoxification indicator strains as tools for enhancing chemical discovery screens. **Pest Management Science**, Sussex, v.68, n.1, p.38-48, abr. 2011.

SARAN,R.K.; RUST,M.K.. Toxicity, uptake and transfer efficiency of fipronil in western subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.100, n.2, p.495-508. 2007.

SCHARF,M.E.; SIEGFRIED,B.D.. Toxicity and neurophysiological effects of fipronil and fipronil sulfone on the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.40, p.150–156,fev. 1999.

SCHMUCK, R; NAUEN, R; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U. Effects of imidacloprid and common plant metabolites of imidacloprid in the honeybee: toxicological and biochemical considerations. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v.56, n.1, p.27-34. 2003.

SCOTT,J.G.; WEN,Z.. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. **Pest Management Science**, Sussex, v.57, p.958-967, ab., 2001.

SISTEMAS de produção. EMBRAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Disponível em: <<http://www.sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 21 jun. 2011.

SLAA,E.J.; SANCHEZ-CHAVES,L.A.; MALAGODI-BRAGA,K.S.; HOFSTEDE, F.S.. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, Versailles, v.37, p.293–315, fev. 2006.

SNYDER,M.J.; STEVENS,J.L.; ANDERSEN,J.F.; FEYEREISEN,R.. Expression of cytochrome P450 genes of the *CYP4* family in midgut and fat body of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.321, n.1, p.13-20, ago. 1995.

STUCHI,A.L.P.B.. **Toxicidade e expressão gênica em abelhas do gênero *Tetragonista* após a contaminação por agrotóxicos**. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2009.

SOUZA,T.F.. **Efeitos de doses subletais do fipronil para as abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), por meio de análises morfológicas e comportamentais**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas- Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

SUCHAIL, S.; DEBRAUWER, L.; BELZUNCES, L.P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science**, West Sussex, v.60, p.291-296. 2003.

THOMPSON,H.M.. Behavioural effects of pesticides in bees- Their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, New York, v.12, p.317-330. 2003.

TINGLE,C.C.; ROTHER,J.A.; DEWHURST,C.F.; LAUER,S.; KING,W.J.. Fipronil environmental fate, ecotoxicology and human health concerns. **Reviews Environmental Contamination & Toxicology**, New York, v.176, p.1-66. 2003.

VALDOVINOS-NUNEZ,G.R.; QUEZADA-EUAN,J.J.G.; ANCONA-XIU,P.; MOO-VALLE,H.; CARMONA,A.; SANCHEZ,E.R..Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.102, n.5, p.1737-1742, out. 2009.

VANDAME,R.; PALACIO,M.A.. Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping?. **Apidologie**, Versailles, v.41, p.243-255. 2010.

VELTHUIS, H.H.W.. **Biologia das abelhas sem ferrão**. São Paulo, 33p,1997.

VIDAU,C.; GONZALEZ-POLO,R.A.; NISO-SANTANO,M.; GOMEZ-SANCHEZ,R.; PEDRO,J.M.B.S.; PIZARRO-ESTRELLA,E.; BLASCO,R.; BRUNET,J.L.; BELZUNCES,L.; FUENTES,J.M.. Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. **NeuroToxicology**, Little Rock, v. 32, p. 935–943, mai. 2011.

WONG-RILEY, M.. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. **Brain Research**, Amsterdam, v.171, p.11-28. 1979.

WOO,M.; HAKEM,R.; SOENGAS,M.S.. Essential contribution of caspase 3/ CPP32 to apoptosis and its associated nuclear? Changes.. **Genes & Development**, Woodbury, v.12, p.806–819. 1998.

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