
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CASSY ANNE DOS SANTOS RODRIGUES

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CÉREBRO DE
ABELHAS SEM FERRÃO *MELIPONA
SCUTELLARIS* EXPOSTAS AO TIAMETOXAM**

CASSY ANNE DOS SANTOS RODRIGUES

*ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CÉREBRO DE ABELHAS SEM
FERRÃO MELIPONA SCUTELLARIS EXPOSTAS AO TIAMETOXAM*

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-orientador: Dra. Priscila Cintra Socolowski

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

Rio Claro
2015

595.799 Rodrigues, Cassy Anne dos Santos
R696a Análise morfológica do cérebro de abelhas sem ferrão
melipona scutellaris expostas ao timetoxam / Cassy Anne dos
Santos Rodrigues. - Rio Claro, 2015
28 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

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

Orientador: Osmar Malaspina

Coorientador: Priscila Cintra Socolowski

1. Abelha. 2. Inseticida. 3. Neurotoxicidade. 4. Uruçu. 5.
Toxicidade. 6. Neonicotinóide. I. Título.

À minha mãe Aparecida (in memoriam) que me ensinou a sonhar. Toda conquista em minha vida será sempre dedicada a ela, pois ao me cobrir com o seu amor me preparou para cada passo que eu tiver que dar na busca pelos meus sonhos. Nenhuma lição será tão valiosa quanto a que ela me ensinou, a do amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que me concedeu a vida e me permitiu alcançar este objetivo. Ao Dr. Osmar Malaspina, pela oportunidade de trabalho no Centro de Estudos de Insetos Sociais. À Dra. Priscila, pela co-orientação e total apoio na realização deste trabalho, sou muito grata por todo conhecimento transmitido, treinamento, paciência e amizade. Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) e ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, seus professores e funcionários, por permitirem a utilização de suas instalações para a execução deste trabalho. Ao técnico do Biotério, Antônio Sérgio Pascon, pela ajuda nas coletas e ensinamentos com manejo de abelhas. À Itamar e Marcela que tornaram meus dias de trabalho muito mais fáceis estando sempre dispostas a ensinar e ajudar. À querida Mayara que é a definição da palavra parceira, pois se colocou sempre pronta a ajudar em cada etapa deste trabalho, além de ser uma amiga para toda a vida. À equipe do Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas - LECA, especialmente ao Rodrigo e a Clara, que são pessoas excepcionais, generosas, atenciosas e muito profissionais, devo muito a vocês. Agradeço ao meu pai Luiz e aos meus irmãos Marcelo e Dany que são meu esteio, meu Norte, meu dia a dia, meu aconchego, que são lar. Nada teria sentido se não houvesse eles para compartilhar deste momento comigo. À Dany, um agradecimento especial, pois ninguém no mundo acreditou tanto em mim quanto ela e isso foi fundamental para que eu chegasse até aqui. À Regina e ao Guilherme que tem o meu carinho e são família. À minha pequena que já não está mais ao meu lado, mas foi minha grande companheira e alegrou com toda a sua ternura os meus dias, minha Pituka. Ao meu melhor amigo Anderson, que há tantos anos suaviza minha vida com seu jeito doce e afetuoso e hoje se tornou a melodia de paz dos meus dias. À minha querida amiga Cida, que me é tão especial, por todo o carinho, proteção e orientação. A todos os amigos do CBN 2011, que me proporcionaram os momentos mais divertidos, engraçados e emocionantes destes 5 anos de faculdade, vocês são inesquecíveis. A todos os membros do Projeto Tomba-latas, que ajudaram a construir uma das coisas que mais me orgulho na minha trajetória na UNESP, este

projeto foi um sonho que se tornou uma exaustiva, porém gratificante realidade. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

"Felicidade só é real quando compartilhada".
Christopher McCandless

RESUMO

A espécie de abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* apresenta alto potencial como polinizador, significativa produção de mel entre os meliponídeos e é essencial para algumas plantas do gênero Solanaceae, de grande destaque agrícola, pois apresenta “polinização por vibração”. O tiametoxam é amplamente utilizado em culturas agrícolas, ocasionando exposição durante o forrageio ou através do pólen contaminado levado pelas operárias à colônia. Este trabalho teve por objetivos determinar a DL50 de tiametoxam para a espécie *M. scutellaris* e avaliar a morfologia das células presentes nos corpos pedunculados dos cérebros de abelhas dessa espécie expostas a doses subletais do inseticida tiametoxam. Os procedimentos para a determinação da DL50 seguiram o protocolo da OECD. As forrageiras foram coletadas na saída de 3 colmeias diferentes. Os indivíduos (3 grupos de 10) foram anestesiados com CO₂ e receberam 1.0 µL de solução de inseticida no pronoto com doses previamente estabelecidas (0.75, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0ng de tiametoxam/µL de solução) e 1.0 µL de acetona (grupo controle solvente). Após a aplicação foram contabilizadas as abelhas mortas para cada concentração e para os grupos controle e controle solvente, ao final de 24 horas. Para a determinação da DL50 os dados foram analisados através do método Próbit utilizando o programa BioStat. Obteve-se a DL50 no valor de 2.51 ng/abelha. Realizaram-se bioensaios com as doses subletais DL50/10 e DL50/100 para análise morfológica das células dos corpos pedunculados. As dissecções dos cérebros aconteceram 24 e 48 horas após cada tratamento. Os cérebros foram processados através das técnicas histológicas, cortados em micrótomo e ao final foram corados com Hematoxilina-Eosina.. Os cortes evidenciaram aumento nos espaços intercelulares das células de Kenyon nos corpos pedunculados dos cérebros em abelhas expostas ao inseticida, quando comparadas aos grupos controle e controle solvente, sugerindo rompimento do contato celular, o que representa desorganização tecidual que é indicativo de apoptose celular.

Palavras-chave: urucu, toxicidade, neoniticotinóide.

SUMÁRIO

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 8 |
| 1.1 | Importância ecológica e econômica das abelhas..... | 8 |
| 1.2 | A abelha sem ferrão <i>Melipona scutellaris</i> | 9 |
| 1.3 | Inseticidas e abelhas..... | 11 |
| 2 | OBJETIVO..... | 14 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 15 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 17 |
| 4.1 | Determinação da DL50..... | 17 |
| 4.2 | Análise morfológica..... | 18 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 24 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 25 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância ecológica e econômica das abelhas

As abelhas são os mais importantes agentes polinizadores, destacando-se dentro da ordem Hymenoptera da qual também fazem parte formigas e vespas. Responsáveis pela polinização de 70% das culturas agrícolas e de um terço de todas as angiospermas, as abelhas são fundamentais para o equilíbrio do ecossistema e também para a manutenção da produção agrícola (KEVAN, 1999). Para que as plantas realizem reprodução sexuada, principalmente os vegetais superiores, é essencial que haja polinização. Quando esta é insuficiente ou ausente, ocorre perda de variabilidade genética, redução da produção agrícola, aumento de frutos deformados e em casos mais severos é possível que ocorra extinção de plantas com conseqüente redução de animais dependentes de seus produtos, alterações no solo e nos regimes de água (NOCELLI et al, 2012).

A compreensão da importância ecológica e econômica das abelhas gera a necessidade da aplicação de ações de conservação para esses polinizadores, principalmente através de manejo adequado e uso sustentável. Tais práticas envolvem maior controle sobre o uso de defensores agrícolas nas culturas; evitar o manejo excessivo das colônias; a não introdução de espécies exóticas; cuidado na preparação da terra para o plantio, a fim manter ninhos das abelhas sociais e solitárias que ocorrem no solo e manutenção da vegetação nativa nas bordas dos plantios que possam oferecer recursos aos polinizadores. (JOHNSON,2010; NOCELLI et al,2012).

A não aplicação de algumas dessas práticas tem sido apontada como possível causa para o desaparecimento inexplicado de 80% das colônias de abelhas dos Estados Unidos e da Europa em 2006. O fenômeno conhecido como *Colony Collapse Disorder* – CCD, tem como uma das hipóteses para sua causa a combinação de fatores como uso indiscriminado de defensores agrícolas, deficiência nutricional provocada pela diminuição de fontes alimentares devido principalmente à monocultura, ataque por parasitas e outros fatores geradores de estresse que

comprometem o sistema imunológico dos indivíduos deixando-os mais suscetíveis a CCD (JOHNSON,2010).

Dados para o Brasil apontam que entre 2008 e 2010 mais de cinco mil colmeias de *Apis mellifera* africanizadas foram mortas pelo desaparecimento de abelhas provocado por inseticidas, principalmente na região central do estado de São Paulo (MALASPINA et al.,2010).

Os prejuízos causados pela diminuição do número de abelhas para a produção agrícola mundial foram calculados após a ocorrência da CCD, quando se passou a valorizar monetariamente o serviço de polinização praticado pelo ecossistema, e os valores encontrados mostram que esses prejuízos podem atingir 15 bilhões de dólares/ano (GALLAI,2009)

1.2 A abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*

Dentre as mais de 50 espécies do gênero *Melipona*, destaca-se a espécie *Melipona scutellaris*, popularmente conhecida como “uruçu”.Endêmica do nordeste do Brasil, pertencente à tribo das abelhas sem ferrão, apresenta alto potencial de polinização, significativa produção de mel entre os meliponídeos, é de fácil domesticação e manipulação, e é essencial para a polinização de flores de algumas plantas de grande destaque agrícola do gênero Solanaceae (como berinjela, jiló, pimentão, pimenta e tomate) por realizar “polinização por vibração” (NUNES-SILVA et al., 2010).

As operárias dessa espécie (Figura 1) possuem corpo robusto (marrom e preto), vértice marrom-amarelado, com pelos abundantes amarelo-ruivos, frequentemente com alguns mais claros, cor de ouro. O clipeo, estrutura da cabeça que liga as peças bucais, é levemente convexo, e a face relativamente estreita. Seu tórax é preto no dorso, com pelos densos e amarelo-dourados, e face ventral, com fina penugem acinzentada. O comprimento das operárias é de 10 a 12 mm. A Uruçu possui abdômen escuro, com cinco listras claras (NOGUEIRA-NETO,1997).

Figura 1 - Indivíduos da espécie *Melipona scutellaris*: operária, macho e rainha.



Fonte: Webbee, 2014.

O ninho de *M. scutellaris* tem sua entrada guardada por uma única operária e suas passagens para o interior da colmeia são pegajosas e de odor desagradável, a fim de repelir invasores, já que a defesa da espécie se limita a mandíbulas fortes. O interior do ninho (figura 2) é formado por várias lamelas do invólucro feitas de cerume (mistura de cera com própolis), o mesmo material também é utilizado para a construção de todas as estruturas do ninho. A cria e o alimento são mantidos em estruturas diferentes, os ovos são colocados em células de cria contendo todo o alimento larval necessário para o desenvolvimento da larva. O favo é formado por várias células de cria justapostas, quando a abelha nasce a célula de cria é desmanchada e o cerume reaproveitado em outras construções no ninho. Os potes de alimento medem 4 cm em média e armazenam o pólen e néctar coletado das flores. O pólen e o néctar constituem as fontes de proteínas e de açúcares para a colônia e dão origem ao alimento larval (WEBBE, 2014).

Figura 2 - Favos de cria tipo horizontal com células em construção, circundadas por poucas lamelas de invólucro e alguns potes de alimento.

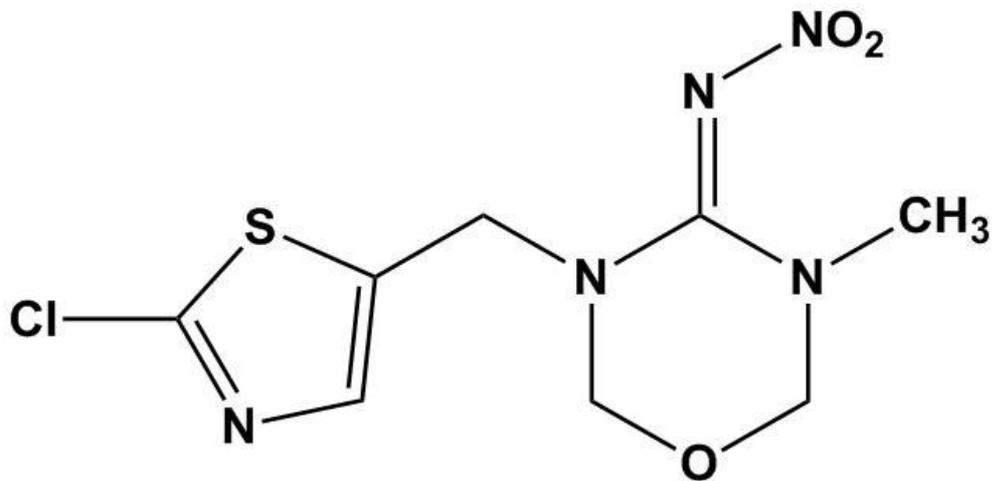


1.3. Inseticidas e abelhas

Ainda que a principal função dos agrotóxicos seja a proteção das culturas agrícolas contra doenças e pragas, seu uso pode levar à contaminação dos solos, das águas e dos alimentos, bem como apresentar efeitos negativos em organismos não-alvos (SPADOTTO et al., 2004). Dentre os organismos não-alvos afetados estão as abelhas. Além do efeito letal, os inseticidas podem apresentar efeitos subletais, dificilmente detectáveis, que podem influenciar tanto a fisiologia quanto o comportamento das abelhas, comprometendo o desenvolvimento e a estrutura social da colônia (NOMINATO, 2012). A redução da movimentação e da mobilidade, diminuição da capacidade de comunicação e de aprendizagem, dificuldades de retorno à colônia, no comportamento de forrageamento e na polinização foram observados em abelhas tratadas com doses subletais de inseticidas (DECOURTYE et al., 2005).

Dentre os vários tipos de inseticidas, os neonicotinoides estão entre os mais utilizados nas últimas três décadas (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014). O Tiametoxam (3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine; figura 3) faz parte deste grupo químico, sendo aplicado via área ou terrestre em diversas culturas, (como citros, café, cana-de-açúcar, arroz, abacaxi). Ele age de modo sistêmico na planta, portanto não só as operárias como toda a colônia pode ser contaminada pelo pólen e néctar levados para dentro da colmeia. É considerado um inseticida de classe III na classificação toxicológica determinada pela ANVISA. Ele interfere nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) na membrana pós-sináptica da junção neural (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014).

Figura 3 - Estrutura química do Tiametoxam.



Um método clássico para avaliar o efeito letal de um inseticida é através da determinação da toxicidade aguda medida pela DL50, ou seja, a dose capaz de ocasionar 50% de mortalidade em animais testados. Johansen e Mayer (1990) consideram inseticidas com uma DL50 < 2,0 µg/abelha como altamente tóxicos para esses insetos.

Diversas técnicas são utilizadas para analisar os efeitos das doses subletais dos inseticidas, abrangendo efeitos comportamentais e alterações morfofisiológicas. As análises morfofisiológicas são fundamentais, pois as moléculas utilizadas nas formulações dos pesticidas, bem como seus metabólitos, são ingeridas e/ou absorvidas pelo organismo das abelhas e podem exercer seus efeitos em diversos órgãos, alterando os processos celulares normais, ativando os mecanismos de detoxificação celular e, em última instância, levar à morte da célula (NOCELLI et al.,2012).

Alterações morfológicas nos cérebros de abelhas provocadas por inseticidas já foram encontradas em diversos estudos, como o de Rossi (2008) que ao analisar os corpos pedunculados de *A. mellifera* expostas ao Imidaclopride notou a presença de conglomerados de células com núcleos apresentando cromatina condensada. Já para abelhas *Scaptotrigona postica* expostas a doses subletais de Fipronil no estudo de Jacob (2012), foi encontrado um aumento dos perfis picnóticos das células de

Kenyon dos corpos pedunculados, o que indica morte celular.

Portanto, estudos que buscam identificar o alcance dos agrotóxicos no ambiente e compreender melhor como os organismos reagem às doses subletais, analisando alterações celulares morfológicas que nos permitam verificar os danos no início do processo de contaminação, são fundamentais para o processo de conservação das abelhas. Os impactos sobre as colônias de abelhas podem acarretar grandes prejuízos, desde a redução no número de polinizadores até a perda de produtividade em culturas agrícolas.

2 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivos determinar a DL50 de tiametoxam para a espécie *M. scutellaris* e avaliar a morfologia das células presentes nos corpos pedunculados dos cérebros de abelhas dessa espécie expostas a doses subletais do inseticida tiametoxam.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para as análises propostas, foram coletados exemplares de abelhas da espécie *M. scutellaris* nos ninhos com condições fisiológicas adequadas e livre de doenças, mantidos pelo CEIS- Centro de Estudos de Insetos Sociais, Departamento de Biologia - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista - UNESP - Campus de Rio Claro. As coletas ocorreram somente durante a estação quente, entre setembro e maio. Os procedimentos para a determinação da DL50 seguiram o protocolo da OECD (1998). As forrageiras foram coletadas na saída de três colmeias diferentes, consistindo para cada concentração de inseticida e para os grupos controle e controle solvente três repetições formadas por dez abelhas. Os indivíduos transferidos para potes plásticos contendo dieta *ad libitum*, passaram por anestesia com CO₂ e receberam 1.0 µL de solução de inseticida no pronoto com doses previamente estabelecidas (0.75, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0ng de tiametoxam/µL de solução) e 1.0 µL de acetona (para o grupo controle solvente) aplicadas com uma micropipeta automática repetitiva. As abelhas foram mantidas em estufas bacteriológicas (B.O.D.) com temperatura de 32,5 °C ± 1,0 e com 70% ± 5 de umidade relativa, durante 24 horas após a aplicação, transcorrido esse período foram contabilizadas as abelhas mortas para cada concentração e para os grupos controle e controle solvente. Para a determinação da DL50 os dados foram analisados através do método próbit utilizando o programa BioStat (AnalysSoft, 2009).

A partir do valor da DL50 estabelecido foram conduzidos os bioensaios com as doses subletais. O inseticida tiametoxam foi diluído em acetona, sendo realizadas sucessivas diluições em cascata para atingir as concentrações subletais de DL50/10 e DL50/100. As abelhas dos grupos experimentais receberam 1 µL de solução nos pronotos, já as abelhas do grupo controle receberam 1 µL de acetona. Para cada grupo experimental e para os grupos controle e controle solvente foram realizadas 3 repetições com 10 abelhas cada. Todos os testes foram conduzidos em estufas bacteriológicas (B.O.D.) com temperatura de 32,5 °C ± 1,0 e com 70% ± 5 de umidade relativa. As disseções dos cérebros ocorreram 24 e 48 horas após cada tratamento e foram realizadas com as abelhas sobre placas de Petri contendo solução salina (Na₂HPO₄ 20 mM /KH₂PO₄ [pH 7,4] e NaCl 130 mM) sob um estereomicroscópio Zeiss, utilizando pinças de disseção. Os órgãos foram fixados

em paraformaldeído a 4% . Subsequentemente, o material foi desidratado numa série de etanol a 4 ° C, soluções de concentrações que se seguem:15, 30,50, 70, 85, 90, 95, e 100% .Cada passo da desidratação durou 2 h. Após a desidratação, as amostras permaneceram imersas em resina de embebição durante 7 dias e então processadas em micrótomo Leica do laboratório de Histologia do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro, originando cortes 6µm de espessura. Os cortes depositados em lâminas foram corados com Hematoxilina-Eosina. Posteriormente, obtiveram-se as fotomicrografias dos corpos pedunculados dos cérebros de *M. scutellaris* no Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica do Centro de Estudos Sociais da UNESP de Rio Claro-SP por meio de uma câmera digital, Olympus DP-71, adaptada a um microscópio Olympus BX51, e a um computador Dell. Para a aquisição das imagens utilizou-se o software DP Controller.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da DL₅₀

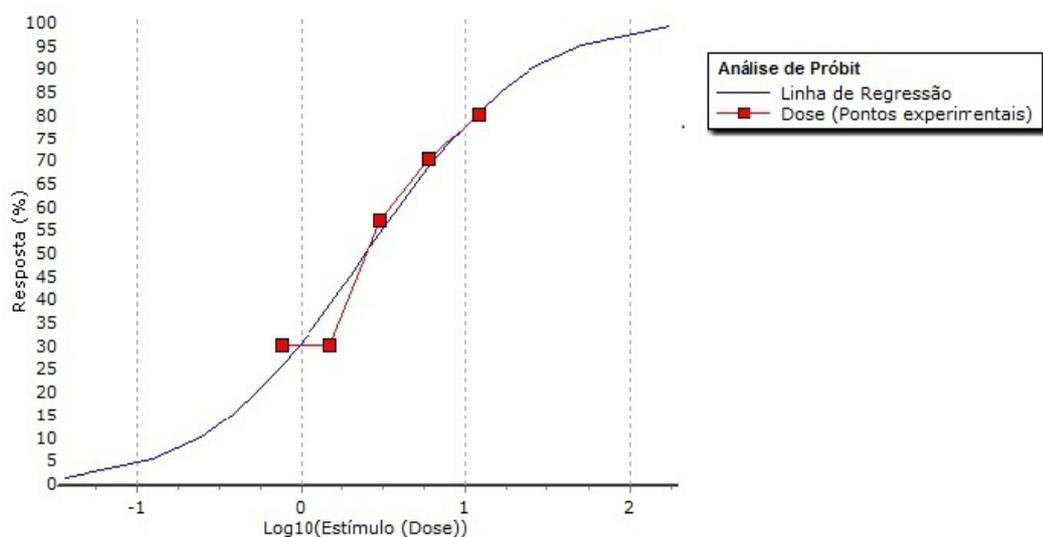
Os dados de mortalidade observados no bioensaio, após 24 horas, para cada uma das doses testadas foram submetidos à análise Próbit, obtendo-se uma DL₅₀ no valor de 2,51 ng/abelha com um intervalo de confiança de 1,59 a 3,75 ng/abelha (tabela 1 e figura 4).

Tabela 1 - Resultados da análise de próbit para determinação da DL₅₀ do inseticida Tiametoxam aplicado em operárias de *Melipona scutellaris*.

| n | χ^2 | G.L. | LD ₅₀ (ng/abelha) | Intervalo de confiança | |
|----|----------|------|---------------------------------|------------------------|-------|
| | | | | menor | maior |
| 50 | 0.915 | 3 | 2.51 | 1.59 | 3.75 |

n: número de indivíduos; χ^2 qui-quadrado; G.L.: graus de liberdade; DL₅₀, Intervalo de Confiança: menor e maior.

Figura 4 - Regressão realizada pela análise próbit a partir da mortalidade registrada para a determinação da DL₅₀ 24 horas após a aplicação tópica do Tiametoxam.



Quando comparado esse resultado à DL₅₀ para *Apis mellifera* (7.85 ng/abelha - NOMINATO, 2012) e (17ng/abelha – PEREIRA, 2010) as abelhas da espécie *M. scutellaris* se mostraram mais sensíveis ao tiametoxam. Essa diferença, segundo Ahmad e Johansen (2010) pode estar associada a diversos fatores que podem

diferir entre os grupos e assim alterar a estabilidade do ingrediente ativo no organismo. São estes os fatores: tamanho corporal, níveis de gordura corporal e pH da hemolinfa e desenvolvimento de enzimas de desintoxicação.

Já comparado à DL₅₀ de Fipronil para *M. scutellaris* (0,41ng/abelha – LOURENÇO, 2012) o tiametoxam mostrou uma toxicidade 6,12 vezes menor. Essa menor toxicidade do tiametoxam em relação ao Fipronil corrobora com os resultados obtidos para *A. mellifera* por Pereira (2010), que encontrou uma toxicidade para este inseticida 8,9 vezes menor que a do Fipronil.

No Brasil ambos os inseticidas são amplamente utilizados em culturas agrícolas. O Tiametoxam é empregado através da aplicação direta no solo, em sementes e diretamente nas folhas (ANVISA, 2008b). A aplicação de inseticidas na maioria das vezes é realizada através da pulverização, o que leva a uma maior dispersão do princípio ativo e acaba por atingir organismos não alvos. Dependendo do tipo de cultivo e da diluição dos produtos, as concentrações das aplicações podem atingir valores que variam entre 500 e 1000 µg/ml (PEREIRA, 2010), que excedem o valor da DL₅₀ para *M. scutellaris*, encontrado neste estudo, em 199,2 e 398,4 vezes, respectivamente.

Por tanto, testes de avaliação de efeitos de tais produtos em organismos não alvos, como as abelhas, apontam-se como de grande importância, uma vez que oferecem base para discussões acerca da comercialização e das normas de uso destes produtos.

4.2. Análise morfológica

O órgão escolhido para análise neste estudo foi o cérebro, mais especificamente os corpos pedunculados, estruturas presentes no cérebro das abelhas que são sítios relacionados a memória e ao aprendizado e são neles que ocorrem mais células e sinapses neurais nos insetos. Nos corpos pedunculados estão estruturas constituídas de numerosos neurônios, denominadas células de Kenyon, que formam os cálices com os seus dendritos e o pedúnculo, e o lobo com seus axônios (SOUZA, 2009).

Os cortes observados com microscopia de luz apresentaram maior ocorrência de dilatação dos espaços intercelulares das células de Kenyon nos tratamentos com DL50/100 e DL50/10 após 24 e 48 horas, quando comparados aos cortes dos grupos controle e controle solvente (tabela 2 e figuras 5 e 6). Essa dilatação pode indicar rompimento do contato celular, o que representa desorganização tecidual. Hacker (2000) aponta a reorganização dos limites externos da célula e a perda de contato com as células vizinhas dentro do tecido como as mudanças mais marcantes durante a morte celular por apoptose.

Tabela 2 - Resultados das análises morfológicas dos corpos pedunculados de abelhas *M. scutellaris*.

| Grupos | Tempo (horas) | Dilatação dos espaços intercelulares |
|-------------------|---------------|--------------------------------------|
| Controle | 24 | X |
| | 48 | X |
| Controle solvente | 24 | – |
| | 48 | X |
| DL50/100 | 24 | XXXX |
| | 48 | XXXX |
| DL50/10 | 24 | XXXX |
| | 48 | XX |

– Ausente; (X) Pouco presente; (XX) Moderadamente presente; (XXX) Muito presente; (XXXX) Intensamente presente.

Figura 5 - Fotomicrografias dos corpos pedunculados do cérebro de *M. scutellaris* em aumento de 400x: A) Controle 24 horas; B) Controle solvente 24 horas; C) Tratamento com DL50/100; D) Tratamento com DL50/10; As setas indicam dilatação dos espaços entre células.

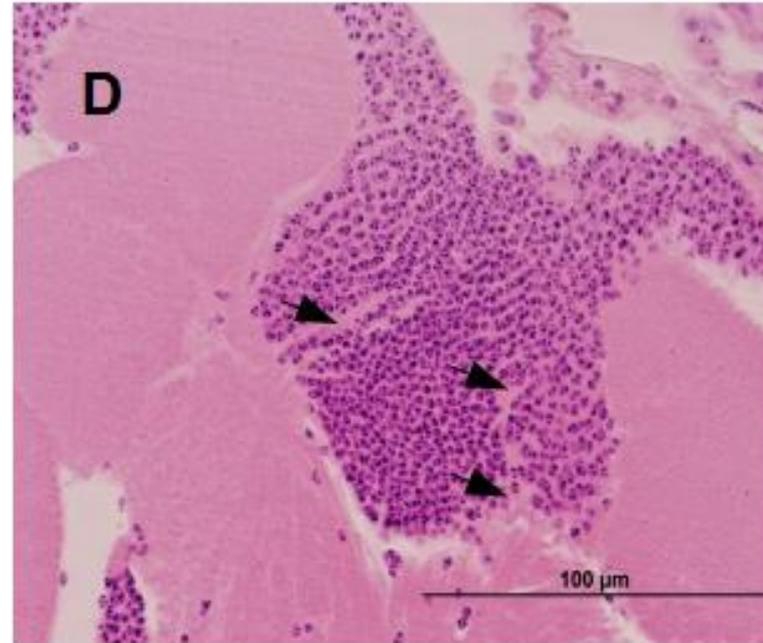
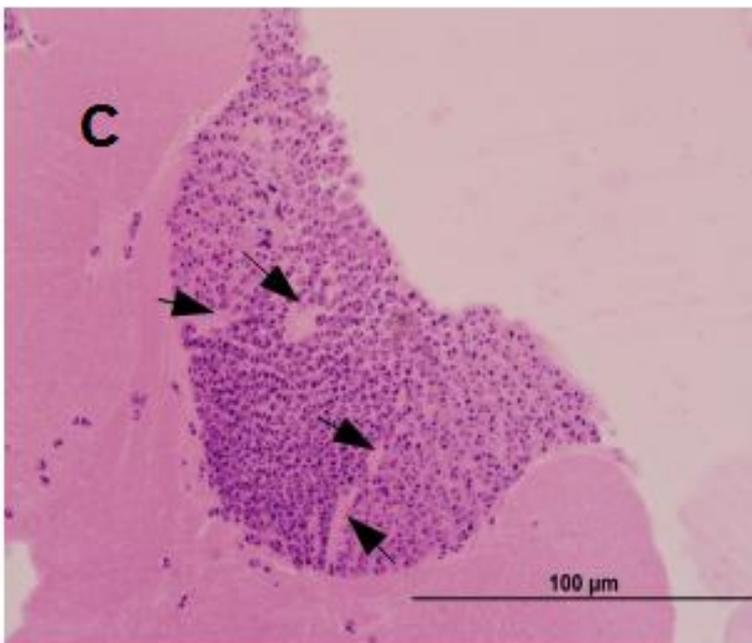
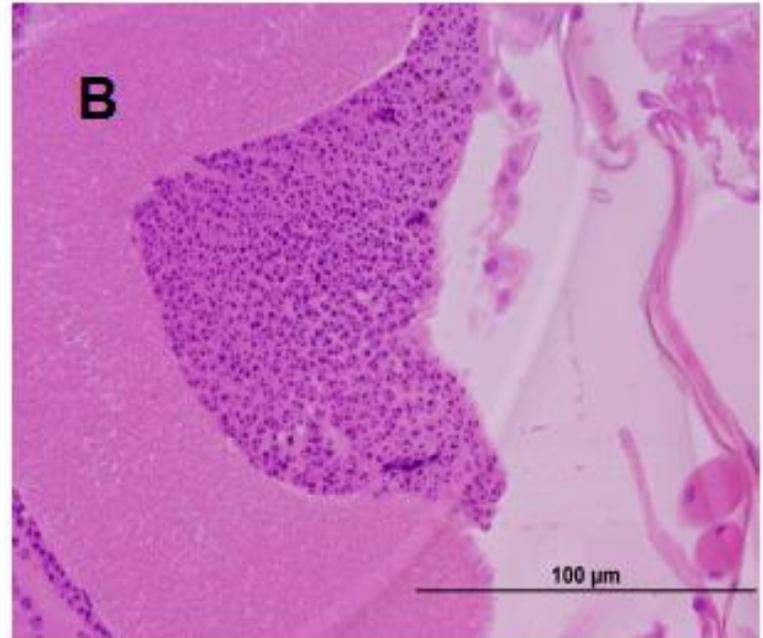
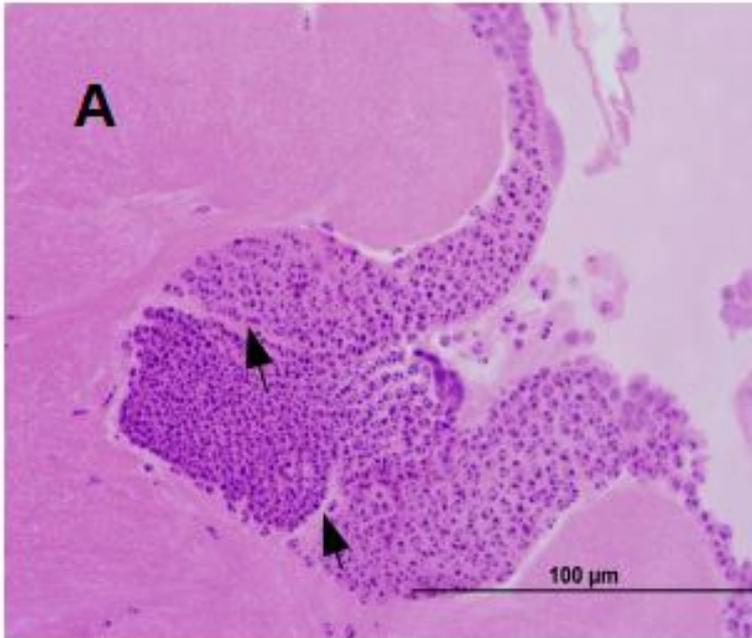
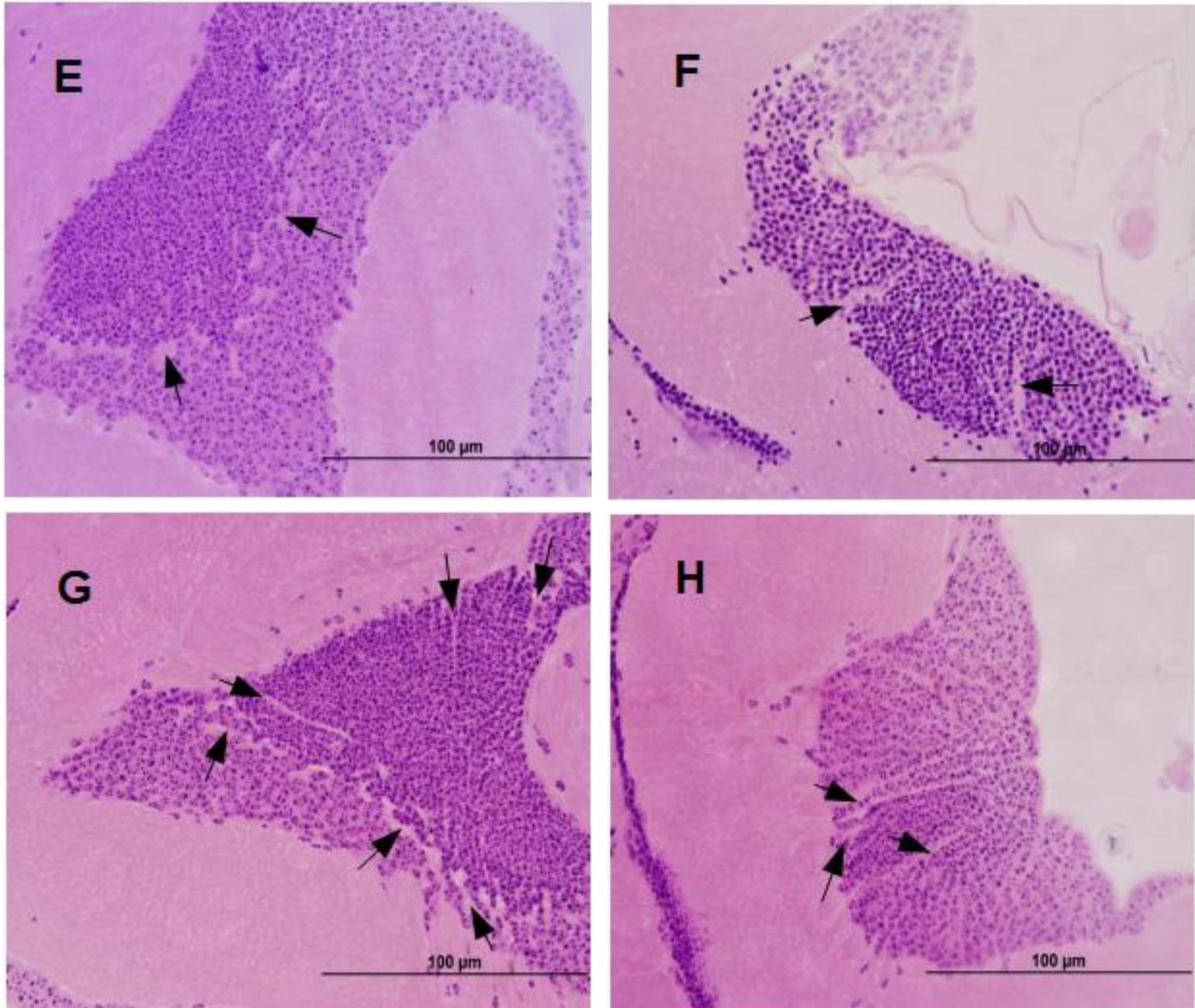


Figura 6 - Fotomicrografias dos corpos pedunculados do cérebro de *M. scutellaris* em aumento de 400x: E) Controle 48 horas; F) Controle solvente 24 horas; G) Tratamento com DL50/100 48 horas; H) Tratamento com DL50/10 48 horas. As setas indicam dilatação dos espaços entre células.



Os resultados corroboram os de estudos realizados por Soares (2012) com o inseticida imidaclopride sobre o sistema nervoso de abelhas *Scaptotrigona postica*, nos quais encontrou para as concentrações mais elevadas das doses subletais testadas (21.25, 42.50 e 85 ng/ μ L) dilatação dos espaços intercelulares das células de Kenyon. Técnicas complementares utilizadas por Soares, imunofluorescência e microscopia eletrônica, reforçaram os resultados obtidos na análise morfológica. Para tais concentrações houve expressão diferenciada da enzima caspase e alterações celulares observadas em ultraestrutura, como condensação do material genético e degeneração mitocondrial. Todos indicativos de alta toxicidade do imidaclopride ao sistema nervoso, o que pode levar a alterações celulares graves e até a morte dos neurônios. Rossi (2012) em seus estudos, também com cérebro de *S. postica* e o inseticida imidaclopride, observou a presença de condensado de células nos lobos ópticos e nos corpos pedunculados, que também apresentaram inchaço das células, nas abelhas expostas a doses subletais e a reação de Feulgen evidenciou a presença de células com núcleos picnóticos, ambos indícios de morte celular, que foi confirmada através da técnica de imunocitoquímica. Jacob (2014) também encontrou células de Kenyon com perfis picnóticos em abelhas *S. postica* expostas a diferentes concentrações de fipronil, além de dilatação da membrana nuclear, perda das cristas com posterior ruptura da membrana mitocondrial, vesículas de Golgi atípicas e a presença de autofagossomas no grupo tratado por via tópica e lisossomas no grupo tratado por via oral. No entanto, no presente estudo, as análises revelaram núcleos preservados nas células, coloração uniforme por Hematoxilina-Eosina, ausência de células condensadas e quaisquer indicações de inchaço celular tanto para os grupos tratados quanto para os controles.

O estudo de Benzidane et al. (2011), também com imidaclopride, utilizando culturas de células de Kenyon de *Periplaneta americana* concluíram que o inseticida inviabiliza as células e pode contribuir para que ocorra a morte celular por necrose ou apoptose.

A morte das células de Kenyon pode implicar em prejuízos para as colônias de abelhas, que teriam seu funcionamento e manutenção afetados. Isso porque os corpos pedunculados, onde estas células estão localizadas, são estruturas relacionadas com a formação de memória, aprendizagem e distinção olfativa, assim danos a eles estão associados a desorientação e anormalidades nas atividades de

forrageamento das abelhas.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo determinou o valor de 2,51 ng/abelha para a DL₅₀ de tiametoxam para a abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*.

O inseticida tiametoxam provoca aumento da dilatação dos espaços intercelulares nas células de Kenyon dos corpos pedunculados de *M. scutellaris* expostas a ele topicamente. O que sugere processo de morte celular por apoptose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Índice monográfico T48: Tiametoxam. 2008b. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/t048.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Tiametoxam. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[8682-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[8682-1-0].PDF). Acesso em: 30 março. 2014.

AHMAD Z. ; JOHANSEN C. Selective toxicity of carbophenotion and thricloroform to the honey bee and the alfalfa leaf cutting bee. **Environ Entomol** n. 2, 1973, p. 27-30.

ANALYSTSOFT BioStat 2009: programa de análise estatística. [S. I.]: AnalystSoft, 2009. Disponível em: <<http://www.analystsoft.com/pt/>>. Acesso em: 14 maio. 2014.

BENZIDANE Y.; LAPIED B.; THANY S. H. Neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin affect differently neural Kenyon cell death in the cockroach *Periplaneta americana* . **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Angers, n.101, 2011, p.192-195.

DECOURTYE, A. et al. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, n. 48, 2005, p. 242-250.

GALLAI, N. et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 68, 2009, p. 810-821.

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

JACOB, C. R. O. **Efeitos do inseticida fipronil sobre os corpos pedunculados de operárias de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2012, 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2012.

JACOB, C. R. et al. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee

Scaptotrigona postica. **Pest. Management Science**, v. 71, 2015, p. 114-122.

JOHANSEN, C. A.; MAYER, D. F. Pollinator protection: a bee and pesticide. **Cheshire: Wicwas Pr**, USA, 1990, p. 212.

JOHNSON, R. Honey bee colony collapse disorder. **Congressional Research Service**, Washington, 2010, p. 20.

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

LOURENÇO, C. T. **Determinação da toxicidade tópica e oral do inseticida fipronil e efeitos de suas doses subletais no comportamento de abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811)**. 2012, 64f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” , Rio Claro, 2012.

MALASPINA, O. et al. **Defesa de apiários e meliponários contra agrotóxicos**. In: CONGRESSO DE APICULTURA, 18, CONGRESSO DE MELIPONICULTURA, 4, Cuiabá, Anais. Cuiabá, CD-ROM, 2010.

NOCELLI, R. C. et al. **Riscos de pesticidas sobre as abelhas**. In: SEMANA DOS POLINIZADORES, 3., 2012, Petrolina. Palestras e resumos...Petrolina: Embrapa Semiárido, 2012. (Embrapa Semiárido. Documentos, 249).

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997, p.445.

NOMINATO, F. C. **Estudo da ação do inseticida tiametoxam na sobrevivência e no comportamento de operárias de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) em diferentes idades**. 2012, 43f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” , Rio Claro, 2012.

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

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. Honeybees, acute contact toxicity test. OECD guidelines for the testing of chemicals 214, 1998a, p.8.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT –OECD. Honeybees, acute oral toxicity test. OECD guidelines for the testing of chemicals 213, 1998b, p. 81 .

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

ROSSI, C. A. **Efeitos das doses subletais do inseticida imidaclopride no cérebro de abelha *Apis mellifera* africanizada**. 2008, 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

ROSSI C. A. et al. Brain morphophysiology of Africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. **Arch Environ Contam Toxicol** n. 65, New York, 2013, p.234-243.

SOUZA, T. F. **Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) por meio de análises morfológicas e comportamentais**. 2009. 38 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

SOARES, H. M. **Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2012, 87f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” , Rio Claro, 2012.

SPADOTTO, C.A et al. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Documentos 42, Jaguariúna: Embrapa, 2004, p.29.

WEBBEE. A Abelha Uruçu. Disponível em: <http://www.webbee.org.br/urucu/>. Acesso em: 28 março.2014.