
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Lucas Miotelo

**PROTEÇÃO DE POLINIZADORES:
TOXICIDADE DO TIAMETOXAM PARA
Melipona scutellaris LATREILLE, 1811
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**



Rio Claro
2017

LUCAS MIOTELO

PROTEÇÃO DE POLINIZADORES: TOXICIDADE DO TIAMETOXAM
PARA *Melipona scutellaris* LATREILLE, 1811 (Hymenoptera, Apidae,
Meliponini)

Orientadora: Thaisa Cristina Roat

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

Rio Claro
2017

595.799 Miotelo, Lucas
M669p Proteção de polinizadores : toxicidade do tiametoxam para *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) / Lucas Miotelo. - Rio Claro, 2017
48 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Thaisa Cristina Roat

1. Abelha. 2. Toxicidade. 3. Inseticida. 4. Neonicotinóide. 5. Abelhas sem ferrão. 6. Cérebro. 7. Ventrículo. I. Título.

À minha mãe Rosa, que desde cedo me ensinou a forma que o olhar e a perspectiva podem influenciar meu estado. Todo valor que eu atribuir a algo sempre terá aquela lembrança das cores simples vistas através de seus olhos... Lembrarei de todos os sacrifícios feito por mim e saiba que tu és Rosa única do meu jardim.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa de estudo concedida (Processo: nº 2013/21833-0) e pelo apoio financeiro aos projetos de pesquisa (Processos: nº. 2012/13370-8 e 2012/50197-2), que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), ao Departamento de Biologia da UNESP – campus Rio Claro, e ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA) localizado na ESALq/USP de Piracicaba, pelo apoio técnico fornecido.

À Dra. Thaisa Cristina Roat, pela orientação desde meu primeiro ano de graduação enquanto eu ainda descobria um novo universo na ciência. Sou muito grato pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação para corrigir meus trabalhos (desculpa pelos textos iniciais mal escritos) e por me guiar no meio acadêmico.

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina, por ter me convidado a conhecer seu grupo de pesquisa (LECA) na primeira semana de graduação. Obrigado por ter alimentado minha curiosidade sobre o fantástico mundo das abelhas através dos livros que me emprestou, pelo incentivo e pelas oportunidades que tive ao longo de todos esses anos.

Aos técnicos Mônica Lamonte, Antônio Yabuki, Pablo Henrique Nunes, Gérson Mello Souza e Renato Barbosa Salaroli pelo auxílio e pelas conversas tranquilizadoras quando parecia que nada ia dar certo, não é que deu tudo certo?! À Necis Miranda de Lima, sempre disposta a ajudar resolver os problemas burocráticos e por me mostrar que geralmente não são um bicho de sete cabeças.

Aos membros do LECA que já partiram, mas que foram essenciais ao meu aprendizado, principalmente pelo auxílio com as técnicas que eu utilizei durante o desenvolvimento da minha iniciação científica, pela indicação de artigos e por compartilharem suas experiências em laboratório e com documentações. Não posso deixar de mencionar seus nomes: Aline Catae, Rodrigo Barbosa, Cassy Rodrigues e Mayara Pereira.

A todos os integrantes atuais do Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA), as discussões, as reuniões e as conversas foram essenciais para o meu aprendizado e para a realização desse projeto. Em especial a Pâmela Decio por ouvir meus desabafos e por ser praticamente uma consultora pessoal. A Ana Luiza

Mendes por ter dividido comigo todas as experiências proporcionadas pela iniciação científica e por todas as vezes que aliviamos a tensão juntos. A Adna Dorigo e Annelise Rosa-Fontana por me aguentarem pedindo artigos, pelas risadas e pelas conversas em laboratório.

Ao meu irmão Marcelo Miotelo por todo apoio e compreensão durante esses cinco anos. Aos amigos, em especial a Mariana Bonaldo que esteve presente comigo nos piores e nos melhores momentos da graduação, sem seu companheirismo não haveria leveza no dia a dia. Agradeço também a Isabel Cruz, Jessika Nunes e Ariane por todas as aventuras, conversas, desabafos e momentos de descontração que tivemos juntos. E por último, mas não menos importante, Igor Otero obrigado por ser inspiração todos os dias, por ser paciente mesmo quando nem eu mesmo estou me aguentando, principalmente quando faço a linha teimoso, só tenho a agradecer a ti por tudo.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e não foram mencionados, mas que se considerem no direito de estarem aqui.

RESUMO

O Brasil apresenta uma diversidade de espécies de abelhas sem ferrão que são consideradas importantíssimas para a conservação da biodiversidade, além de serem visadas como polinizadores em áreas de cultivo. Por intermédio do forrageamento, ato de ir a campo em busca de néctar e pólen, as abelhas são expostas a uma variedade de produtos químicos, como agrotóxicos. Tais químicos podem apresentar efeito imediato e causar a morte, ou apresentar efeitos tardios, nesse caso afetando a colônia toda. Devido ao aumento do uso de inseticidas em áreas de cultivo e sua ação em insetos não alvo, as abelhas da espécie *Melipona scutellaris* se tornam alvos vulneráveis de contaminação. Além disso, o IBAMA divulgou uma nota técnica em 2017 reforçando a necessidade de estudar os efeitos dos agrotóxicos em abelhas sem ferrão e a importância de saber mais sobre a biologia básica desses indivíduos. Portanto, com o intuito de avaliar a influência de doses subletais na sobrevivência, no comportamento e na fisiologia dessas abelhas, o presente estudo observou os efeitos do inseticida tiametoxam no cérebro e ventrículo de *M. scutellaris* através de técnicas ultraestruturais e de coloração Hematoxilina Eosina. O método utilizado para avaliar a toxicidade oral do tiametoxam foi baseado na OECD, e a partir dos bioensaios de exposição, a concentração letal média foi calculada para abelhas campeiras, sendo o valor encontrado de: 0,0543 ng de ingrediente ativo (i.a.)/ μ L de alimento, para 24 horas após contaminação. Como o intuito foi avaliar efeitos subletais do inseticida, calculamos o tempo letal médio (Controle – 192 horas; CL_{50/10} – 96 horas e CL_{50/100} – 264 horas) para determinar os dias de coleta dos órgãos, sendo eles 1, 4 e 8 dias. O cérebro foi analisado devido a ação do inseticida no sistema nervoso central e o ventrículo, pelo fato de ser o primeiro órgão a entrar em contato com o inseticida via oral. Em análises morfológicas utilizando microscopia de luz as células de Kenyon dos corpos pedunculados apresentam-se alteradas na concentração subletal mais alta (CL_{50/10}) quando expostos por 8 dias ao inseticida, no entanto, análises ultraestruturais mostraram que essa mesma concentração altera núcleos e mitocôndrias a partir do 4º dia de exposição. Contudo, a menor concentração (CL_{50/100}) só apresentou essas alterações em 4 dias de exposição ao tiametoxam. No que diz respeito ao ventrículo, ambas as concentrações mostraram alterações para todos os dias observados em microscopia de luz, já em análises ultraestruturais da CL_{50/10} exposta por 4 e 8 dias os núcleos apresentaram alterações estruturais, enquanto que, à CL_{50/100} exposta ao

inseticida por 8 dias mostrou alterações apenas no labirinto basal. Os dados obtidos mostraram que, mesmo em concentrações muito baixas, este inseticida causa danos em órgãos de *M. scutellaris*, de modo que ocorra comprometimento na fisiologia e a longo prazo, pode ser que afete toda a colônia.

Sumário

1 - INTRODUÇÃO	7
1.1 A abelha alvo do estudo: <i>Melipona scutellaris</i>.....	7
1.2 A importância das abelhas na polinização	8
1.3 As abelhas e os agrotóxicos	10
1.4 Cérebro e Ventrículo das abelhas em estudos toxicológicos	13
2 - OBJETIVOS	15
3 - MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Material	16
3.2 Métodos.....	16
3.2.1 Determinação da concentração letal média (CL₅₀)	16
3.2.2 Ensaio de Sobrevivência de abelhas alimentadas com dieta contaminada (Obtenção do Tempo Letal médio -TL₅₀)	19
3.2.3 Análises morfológicas - Coloração com Hematoxilina e Eosina (H.E)	20
3.2.4 Análise Ultraestrutural – Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T)	21
4 - RESULTADOS	22
4.1 Concentração Letal média (CL₅₀) de tiametoxam para abelhas campeiras de <i>M. scutellaris</i>	22
4.2 Tempo letal médio	23
4.3 Controle acetona	24
4.4 Análises morfológicas no cérebro a partir da técnica de coloração por H.E.....	24
4.5 Análises ultraestruturais dos corpos pedunculados (M.E.T)	28
4.6 Análises morfológicas no ventrículo a partir da técnica de coloração por H.E	32
4.7 Análises ultraestruturais no ventrículo (M.E.T)	34
5 - DISCUSSÃO	38
6 – CONCLUSÃO	43
Referências Bibliográficas.....	44

1 – INTRODUÇÃO

1.1 A abelha alvo do estudo: *Melipona scutellaris*

Acredita-se que as abelhas surgiram no período Cretáceo Médio devido o surgimento das Angiospermas (plantas superiores com flores). São então consideradas um grupo monofilético com origem a partir de vespas. Análises fósseis de abelhas do período Eoceno possibilitam dizer que a maior parte dos grupos de abelhas encontradas na atualidade já existiam desde esse período (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; ROUBIK, 2006; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

A superfamília Apoidea é constituída por treze subfamílias, divididas em cinco famílias, onde estão descritas quase 18 mil espécies de abelhas por todo o mundo, contando com aproximadamente 5 mil espécies encontradas no Brasil. Apidae é a família mais comum e diversa, sendo formada por outras três subfamílias: Xylocopinae, Nomadinae e Apidae (MICHENER, 2000; MOURE; URBAN, 2002; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

Em seu modelo sistemático encontra-se a subfamília Apinae abrangendo dezenove tribos, onde localiza-se a tribo Meliponini. Esta tribo engloba as abelhas chamadas de eussociais, ou seja, exibem hábitos sociais avançados, contendo uma rainha incumbida pela reprodução e operárias encarregadas por todas as outras tarefas do ninho, como segurança, limpeza, alimentação da cria, construção de favos ou potes de mel, construção de favos ou discos de cria, e o forrageamento, que é uma das funções mais importantes para a colônia, pois consiste na busca por pólen, néctar e outros materiais necessários para a dinâmica do ninho. Outra característica importante, é a presença de curbícula nas fêmeas, a tíbia das pernas traseiras apresenta uma concavidade onde é possível transportar o pólen e outras substâncias para o ninho (IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010; KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; MICHENER, 2000; NOGUEIRA-NETO, 1997; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

A tribo dos Meliponíneos é conhecida comumente por “abelhas nativas” ou “abelhas sem ferrão”, pois apresentam um ferrão vestigial que não permite que as mesmas ferroem. Costumam nidificar em troncos ocos, galhos de árvores, em buracos no chão, cupinzeiros abandonados e em ninhos de outros animais. Atualmente é comum encontrar ninhos em buracos derivados de construções, como: muros, postes,

paredes etc. No que diz respeito a sua distribuição geográfica, estão situadas na América Neotropical, sendo possível também encontra-las na África, Austrália, Índia, ilhas do Caribe, no sudeste da Ásia e em Taiwan (NOGUEIRA-NETO, 1997; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

Estima-se que existam mais de quatro mil gêneros e cerca de 25 a 30 mil espécies de abelhas distribuídas nas diferentes regiões do mundo (MICHENER, 2000). O Brasil, devido as suas proporções continentais e riqueza de ecossistemas, pode ser considerado privilegiado neste aspecto, por abrigar cerca de cinco mil espécies de abelhas. Apenas no estado de São Paulo existem mais de 720 espécies, sendo que destas, ao menos 400 espécies são representadas por abelhas sem ferrão (PEDRO; CAMARGO, 1999).

1.2 A importância das abelhas na polinização

Aproximadamente 192 espécies descritas e 33 gêneros de abelhas sem ferrão podem ser encontradas no Brasil, sendo de extrema importância para a manutenção da biodiversidade, pois são responsáveis por aproximadamente 40 – 90% da polinização de árvores nativas dependendo do ecossistema considerado, como o Pantanal, Caatinga e Mata Atlântica, conseqüentemente, são responsáveis pela produção de frutos e sementes (KERR et al., 2001; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002). Em áreas agrícolas, os meliponíneos chegam a polinizar cerca de 66% das 1.500 espécies cultivadas no mundo, resultando em uma estimativa de 15 a 30% da produção mundial de alimentos (KREMEN; WILLIAMS; THORP, 2002). Alguns exemplos de abelhas utilizadas no Brasil para fins agrícolas 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).

Uruçu ou uruçu nordestina são nomes populares dados a espécie *Melipona scutellaris*, oriunda do nordeste do Brasil. Esta espécie tem sido visada pelos grandes produtores por apresentar um grande potencial como agente polinizador e produtor de mel. Sua domesticação e manejo é facilitada devido à falta de ferrão, e é uma das três espécies de *Melipona* mais manipuladas pelo homem (NOGUEIRA-NETO, 1997). Dados históricos mostram que sua domesticação se deu através dos índios no Nordeste do Brasil, que extraíam mel e o usavam como fonte de alimento

(EVANGELISTA-RODRIGUES et al., 2008; KERR et al., 2001; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

É ainda considerada uma espécie potencial para reprodução em larga escala para ser utilizada como polinizador em ambiente protegido ou campo aberto, por ser um polinizador eficaz e pela facilidade de se manter colmeias racionais fortes, que podem ser facilmente transportadas e multiplicadas (IMPERATRIZ-FONSECA; SARAIVA; JONG, 2006). Além dessas justificativas para o uso desta espécie, *M. scutellaris* tem a capacidade de fazer a “polinização por vibração”, o ato consiste em vibrar a musculatura torácica para agitar as anteras, o que possibilita a saída do pólen. Esse tipo de polinização é essencial para plantas com anteras poricidas, onde o pólen apenas é liberado por poros apicais (HEARD, 1999; NUNES-SILVA; HRNCIR; IMPERATRIZ-FONSECA, 2010).

A relação entre polinizador e planta é essencial para a existência de ambos. Os agentes polinizadores são atraídos pela cor ou odor liberados pelas flores, assim como, diversos grupos de plantas fornecem recompensas para seus polinizadores, sendo estas consumidas em forma de alimento (BIESMEIJER et al., 2006). Os agentes polinizadores bióticos são visitantes florais obrigatórios porque estão sujeitos a usar esses recursos ao longo de todo seu ciclo de vida em forma de alimento, como o pólen das flores que é rico em proteínas e o néctar que é uma fonte de açúcares (IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010).

Dentre os diversos agentes polinizadores existentes, como pássaros, morcegos, borboletas, besouros, moscas etc., as abelhas destacam-se. São conhecidos cerca de 40 mil insetos polinizadores (FREITAS; PEREIRA, 2004) e dentre esse número, aproximadamente 25 mil estão representados por abelhas (PEDRO; CAMARGO, 1999) as quais, estas são responsáveis por 73% da polinização de culturas agrícolas. Dessa maneira, as abelhas são consideradas os mais importantes agentes polinizadores, fazendo parte da base das cadeias tróficas, pois participam da manutenção do fluxo de energia para outras espécies animais (FREITAS; PEREIRA, 2004; PRONÍ, 2000). Além disso, a polinização possibilita a troca dos gametas, permitindo a fecundação cruzada, o que resulta na manutenção da variabilidade genética e por consequência aumenta a fertilidade e produtividade da maioria das plantas que dependem da polinização, e ainda contribui para a produção de alimentos para humanos (KLEIN et al., 2007; PRONÍ, 2000).

Destacando-se a importância da polinização por abelhas, estima-se que cerca de 352 mil espécies de plantas com flores necessitam dos serviços prestados pelos agentes polinizadores, mas cerca de 308 mil espécies de fato mantem essa relação de dependência com estes agentes, representando 87,5% de todas as plantas (OLLERTON; WINFREE; TARRANT, 2011). Temos ainda, que 70% das culturas agrícolas responsáveis por alimentar praticamente quase todos os países do mundo são polinizadas por abelhas, onde nota-se uma melhor qualidade e maior quantidade de frutos (KLEIN et al., 2007). Porém, mais importante ainda é essa forte relação entre planta e abelha, onde a não-polinização de uma espécie vegetal pode até causar extinção em sua população, atingindo também a fauna dependente, e gerando desequilíbrio ecológico entre as espécies que participam dessa interação ecológica (KERR et al., 2001; KEVAN, PETER G; IMPERATRIZ-FONSECA, 2002).

O serviço ecossistêmico prestado pelas abelhas, assim como, sua valorização como agente polinizador é destacada mais recentemente, pois era considerado um serviço gratuito. Somente nos últimos anos é que a sociedade tem observado que esses serviços ecossistêmicos são limitados e que estão ameaçados pelo próprio homem, em virtude à sua atuação na biosfera, que alterou e ainda altera muito o funcionamento dos ecossistemas, diminuindo sua eficácia em fornecer serviços primordiais para nossa sobrevivência (IMPERATRIZ-FONSECA, 2004). Somente com o desaparecimento inexplicado de cerca de 80% das colônias dos Estados Unidos e da Europa, após 2006, que o serviço ambiental de polinização foi devidamente valorizado, ao mostrar suas consequências econômicas e ecológicas (BIESMEIJER et al., 2006; FIORAVANTI, 2010; GUIMARÃES, 2007).

1.3 As abelhas e os agrotóxicos

Desordem do Colapso das Colônias (CCD- *Colony Collapse Disorder*) foi o nome dado ao desaparecimento inexplicado das abelhas nos Estados Unidos. Este fenômeno foi caracterizado por apresentar a ausência de abelhas mortas nas colônias ou apiário, ninhos intactos, com poucas abelhas, apenas rainha e algumas operárias jovens presentes na colônia, alimento e favos de cria se mantem intactos por algumas semanas após o colapso. A CCD ocorre em abelhas do Gênero *Apis*, no entanto, já existem diversos relatos onde outras espécies de abelhas, como as sem ferrão, também estão desaparecendo (JOHNSON, 2010; OLDROYD, 2007).

As causas da CCD ainda não foram completamente definidas, sendo que, até o presente momento o motivo do desaparecimento das abelhas é baseado em hipóteses. Acredita-se que este fenômeno relacionado com os efeitos do uso de agrotóxicos, um novo patógeno ou parasita, problemas nutricionais derivados da diminuição de fontes de alimentos que poderiam comprometer então o sistema imunológico das abelhas, alterações climáticas, manejo excessivo e inadequado das colmeias, aumento das áreas de monocultura, a introdução de espécies vegetais ou animais causa um aumento na competição de alimento e sobrevivência. As áreas desmatadas para agricultura e pastagem diminuem as possibilidades para encontrar um local para nidificar, acasalar ou até mesmo repousar e forragear. Neste último caso pode acarretar em um déficit nutricional por não ter a disposição uma gama de variedades florais para forrageamento (BIESMEIJER et al., 2006; JOHNSON, 2010; NEUMANN; CARRECK, 2010).

Ao longo desses anos, com o avanço das pesquisas, atribui-se que as causas da CCD não estão relacionadas a uma única condição. No momento os cientistas exploram a possibilidade de existir a interação de diferentes fatores, atuando em sinergia para causar a síndrome (JOHNSON, 2010)

O uso de inseticidas está atrelado ao aumento das áreas voltadas para a agricultura. Scolari (2006), afirma que o percentual da área total existente no mundo utilizado pela agricultura é 38,3%, sendo que ao analisar dados relacionados com a fragmentação dos habitats, estima-se que houve uma redução de 2,37% nas áreas florestais, perdendo então 104,06 milhões de hectares, e de 9,06% em áreas sob outros usos, ou seja, diminuição de 377,99 milhões de hectares (WOOD; STEDMAN-EDWARDS; MANG, 2000). Todos esses fatores causaram uma grande alteração na paisagem, gerando uma diminuição considerável nas regiões de vegetação natural (WILCOCK; NEILAND, 2002). Por consequência do aumento das áreas destinadas a monocultura houve uma maior dependência do uso de produtos químicos para controlar plantas daninhas, fungos e insetos pragas para assegurar a produtividade, causando um aumento no consumo de agrotóxicos.

O Brasil lidera a lista de países com relação ao uso de agrotóxicos. Cerca de 300 mil toneladas de inseticida são consumidas anualmente no Brasil, o que representa um aumento no consumo de inseticidas de 700% com relação aos últimos quarenta anos (SPADOTTO et al., 2004; KUSSAMA, 2012). O uso de agrotóxicos causa riscos à saúde humana e ao meio ambiente através da contaminação do solo,

das águas e dos alimentos que serão produzidos. Vale ressaltar que, os agrotóxicos afetam organismos não alvo, como as abelhas, insetos benéficos para as lavouras e para o meio ambiente que quando saem em busca de pólen se tornam altamente vulneráveis a contaminação (SPADOTTO et al., 2004).

Os neonicotinóides são os inseticidas mais utilizados recentemente, de modo que, pertencentes a esta classe, destacam-se acetamiprido, clotianidina, imidacloprido, tiacloprido e tiametoxam. O tiametoxam, pertence à segunda geração de inseticidas resultantes da molécula de nicotina, cuja fórmula é $C_8H_{10}ClN_5O_3S$ (MAIENFISCH et al., 2001; TOMIZAWA; CASIDA, 2005).

Os neonicotinóides são vistos como uma nova e distinta classe de inseticidas, são imediatamente absorvidos pelas plantas, apresentam notáveis características químicas e biológicas que se mostram bem eficazes contra pragas agrícolas (MAIENFISCH et al., 2001). Quando aplicados nas sementes, solo ou folhagens se deslocam em seu interior promovendo uma proteção a longo prazo contra os insetos-pragas (FORD; CASIDA, 2008; MAIENFISCH et al., 2001; TOMIZAWA; CASIDA, 2005). A absorção dos inseticidas produz resíduos que podem ser encontrados no pólen e néctar das plantas, quando as abelhas saem em busca destes recursos são expostas a estes resíduos. Com isso, toda colônia fica exposta aos agentes tóxicos, pois os demais indivíduos se alimentam do material coletado contaminado (WOLFF; REIS; SANTOS, 2008).

El Hassani e colaboradores (2008), destacam que os neonicotinóides apresentam grande seletividade para atuar nos receptores nicotínicos dos insetos, sendo que seu princípio ativo age diretamente no sistema nervoso que entra em colapso porque os neonicotinóides mimetizam a ação da acetilcolina nos receptores nicotínicos durante as sinapses. Contudo, a acetilcolina é degradada pela acetilcolinesterase, já os compostos oriundos dos inseticidas não são degradados (CHAPMAN, 2003). A hiperexcitabilidade nervosa é causada a partir do momento em que a ativação dos receptores de acetilcolina é prolongada de forma anormal, proporcionando uma transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos, o que futuramente resulta no colapso.

A acetilcolina é um neurotransmissor fundamental no cérebro de insetos. As abelhas apresentam amplos sítios de ligação para este neurotransmissor (BICKER, 1999), englobando áreas relacionadas com processos de aprendizagem e memória, como por exemplo, os cálices dos corpos pedunculados (BICKER, 1999). Sabendo-

se que doses subletais afetam as abelhas, mesmo que seus efeitos sejam sutis, a colônia pode ser afetada a partir dos efeitos nas células, que podem alterar a fisiologia e o comportamento das abelhas (BICKER, 1999; EL HASSANI et al., 2008). Nem sempre o efeito dos inseticidas é rapidamente notado, portanto é necessário analisar doses subletais, onde é possível observar sua influência na sobrevivência, no comportamento e na fisiologia como: paralisia, desorientação ou mudanças comportamentais, que são menos detectáveis mas podem afetar toda população (PHAM-DELEÈGUE et al., 2002; MEDRZYCKI et al., 2003; VANENGELSDORP; MEIXNER, 2010).

1.4 Cérebro e Ventrículo das abelhas em estudos toxicológicos

O cérebro das abelhas é o objeto de estudo para observar os efeitos causados pelos neonicotinóides, já que estes atuam no sistema nervoso. Daly, Doyen e Purcell III, (1998), descreve o cérebro das abelhas contendo três massas ganglionares: protocérebro (maior e mais complexa região, formada por corpos pedunculados, ponte protocerebral, corpo central e lobos acessórios), deutocérebro (composto pelos lobos antenais e axônios motores e sensoriais das antenas) e o tritocérebro (contendo os centros tritocerebrais).

Em insetos com comportamento e aprendizado mais complexos os corpos pedunculados apresentam-se como estruturas volumosas e com maior número de células e sinapses (CRUZ-LANDIM, 2009). Os corpos pedunculados são o centro mais importante de memória, formados por inúmeros neurônios (células de Kenyon) que constituem os cálices com seus dendritos, pedúnculo e os lobos com seus axônios (DALY; DOYEN; PURCELL, 1998; FAHRBACH, 2006; FARRIS, 2005).

Mesmo que o alvo dos neonicotinóides seja o cérebro, não é apenas o sistema nervoso que é afetado durando a exposição ao tiametoxam. Quando o ingrediente ativo entra em contato com alimento contaminado, este atinge o trajeto de metabolização do composto no organismo da abelha. Portanto faz-se necessário analisar o intestino por ser uma das primeiras fontes de contato com o tiametoxam e por ser um órgão de absorção. Os insetos apresentam o canal alimentar dividido em três regiões: estomodeu ou intestino anterior; mesêntero ou intestino médio (ventrículo); e proctodeu ou intestino posterior (CRUZ-LANDIM, 2009).

Grande parte da absorção dos produtos da digestão ocorre no ventrículo, por isso este é classificado como estômago funcional dos insetos. Segundo Cruz-Landim

(2009), o ventrículo é visível como sendo um tubo cilíndrico, longo e grosso, que se dobra em forma de arco, no interior da cavidade abdominal. Uma característica comum entre as células dessa região é a invaginação da membrana basal, proporcionando um aumento na superfície seletiva de troca com a hemolinfa, e microvilosidades. As células dessa região estão sendo regularmente renovadas uma vez que ocorre um desgaste gerado por muita atividade secretora e absorptiva. A função destas células é produzir enzimas digestivas e absorver produtos na luz do ventrículo e na hemolinfa.

O ventrículo apresenta três tipos de células: digestivas (constituem o epitélio ventricular, atuam na síntese de enzimas digestivas e absorção de nutrientes), endócrinas (produzem hormônios e estão espalhadas na parede do órgão) e regenerativas (reestruturam o epitélio e se agrupam em ninhos na região basal do epitélio). O processo de substituição de uma célula morta para recompor o ventrículo se dá através de células regenerativas, que se diferenciam e geram uma nova célula digestiva que ocupará o lugar da célula que foi eliminada na luz do ventrículo (CRUZ-LANDIM, 1999; CRUZ-LANDIM, SILVA-DE-MORAES, SERRÃO, 1996; BOWEN, BOWEN, JONES, 1998).

Assim, conforme exposto, as pesquisas a respeito do impacto de inseticidas agrícolas sobre espécies de abelhas sem ferrão são escassas, já que costuma-se encontrar com maior facilidade dados para a espécie *Apis Mellifera* (Hymenoptera, Apidae). Com isso, mostra-se necessário o desenvolvimento de estudos sob este panorama para que se conheça o efeito destes compostos químicos nestes insetos benéficos, gerando dados que possam contribuir para um melhor entendimento a respeito da ação tóxica do tiametoxam às abelhas sem ferrão, fornecendo argumentos para bioconservação de polinizadores.

2 - OBJETIVOS

Sendo o tiametoxam um inseticida amplamente aplicado em áreas agrícolas no Brasil e seu consumo pode acarretar na intoxicação de abelhas nativas, *M. scutellaris*, o presente trabalho tem por objetivos:

- Determinar a Concentração Letal média (CL₅₀) do inseticida tiametoxam para abelhas campeiras *M. scutellaris*;
- Calcular o tempo de sobrevivência de abelhas alimentadas com dieta contaminada correspondendo as concentrações subletais CL_{50/10} e CL_{50/100};
- Analisar alterações morfológicas nos corpos pedunculados e ventrículo de *M. scutellaris* expostas às concentrações subletais do inseticida tiametoxam, através da técnica de coloração Hematoxilina Eosina (H.E), utilizada para microscopia de luz;
- Analisar alterações ultraestruturais nos corpos pedunculados e ventrículo de *M. scutellaris* expostas à CL_{50/10} e CL_{50/100} do inseticida tiametoxam, utilizando microscopia eletrônica de transmissão (M.E.T);

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Exemplares de abelhas da espécie *M. scutellaris* foram coletadas a partir de três colônias localizadas no meliponário do instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) campus Rio Claro. As colônias estão sob os cuidados dos alunos do CEIS- Centro de Estudos de Insetos Sociais, instaladas em uma sala fechada, porém com livre acesso ao meio externo através de um tubo plástico que passa por um orifício na parede, permitindo a saída das abelhas para o campo.

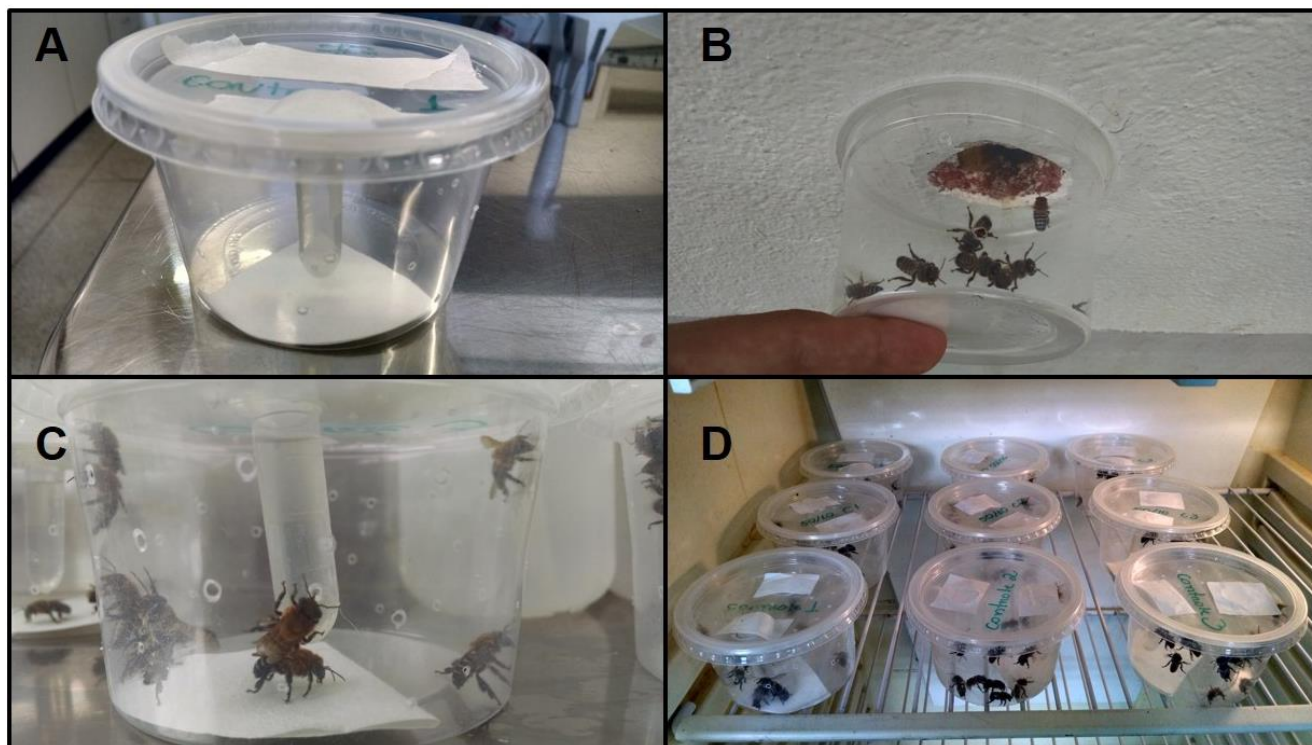
3.2 Métodos

3.2.1 Determinação da concentração letal média (CL50)

Todos os bioensaios foram realizados nos laboratórios do LECA- Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas, localizado no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) seguindo os padrões da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1998a, 1998b) para avaliação de agrotóxicos em abelhas *A. mellifera*, com adaptações para abelhas sem ferrão. Cada grupo experimental foi formado por três repetições, composta por dez abelhas provenientes de cada uma das três colônias, totalizando 30 abelhas por grupo experimental.

No período da manhã, por volta das oito horas, as abelhas campeiras foram coletadas em potes plásticos descartáveis (Figura 1 – A) na saída de cada uma das colônias para realização do experimento (Figura 1 – B). As abelhas foram mantidas nessas gaiolas plásticas descartáveis de 250 mL com um alimentador do tipo eppendorf de 1,5 mL, com um orifício central e dois laterais contendo solução de sacarose a 50%, com ou sem contaminação com o tiametoxam (Figura 1 – C). As gaiolas foram mantidas em estufas do tipo B.O.D, com temperatura ajustada em 29^o C $\pm$ 1^o C e umidade relativa de 70% $\pm$ 5% (Figura 1 – D).

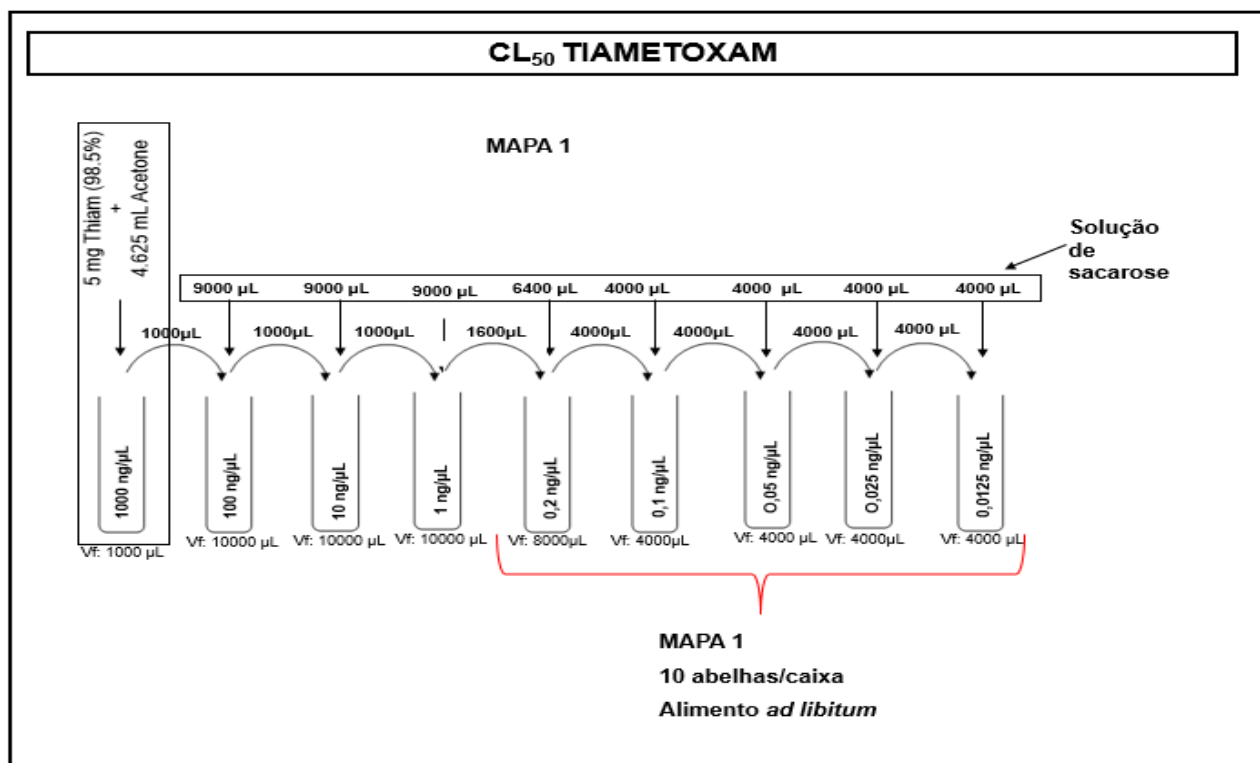
Figura 1 - Procedimentos para realização do experimento. A – Gaiola plástica descartável com alimentador do tipo *ependorf*. B – Coleta de *M. scutellaris* na saída da colônia. C – Alimento contaminado fornecido para abelhas campeiras de *M. scutellaris* evidenciando o furo no *ependorf* e a abelha se alimentando. D – Gaiolas plásticas acondicionadas em estufa do tipo B.O.D. a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\% \pm 5\%$.



Fonte: elaborado pelo autor

Durante os ensaios de intoxicação os grupos tratados receberam uma alimentação contaminada que continha a formulação técnica do inseticida tiametoxam em sua composição. Inicialmente o inseticida foi diluído em acetona (concentração final 1000 ng), sendo esta denominada de solução mãe, mantida em um vidro escuro e armazenada em uma câmara fria. A partir dessa solução foram realizadas diluições em cascata, sendo as soluções diluídas em solução de sacarose em água destilada 1:1, para obtenção das concentrações desejadas (Figura 2).

Figura 2 – Mapa para diluição em cascata usado para obtenção da Concentração Letal Média.



Fonte: elaborado pelo autor

Para a determinação da CL₅₀ oral do inseticida tiametoxam para campeiras de *M. scutellaris* foram utilizadas cinco concentrações: 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 e 0,0125 ng de tiametoxam/ μL de solução. Tais concentrações foram baseadas na DL₅₀ do tiametoxam estabelecida para *A. Mellifera* africanizada, onde o valor encontrado por Reis, A.L.M (2013 – Processo Fapesp 2013/21832-4) foi de 2,27 ng/abelha.

Os grupos que foram expostos ao inseticida receberam soluções de sacarose contaminada com as concentrações determinadas, de forma que o único contato com a dieta contaminada foi através da alimentação.

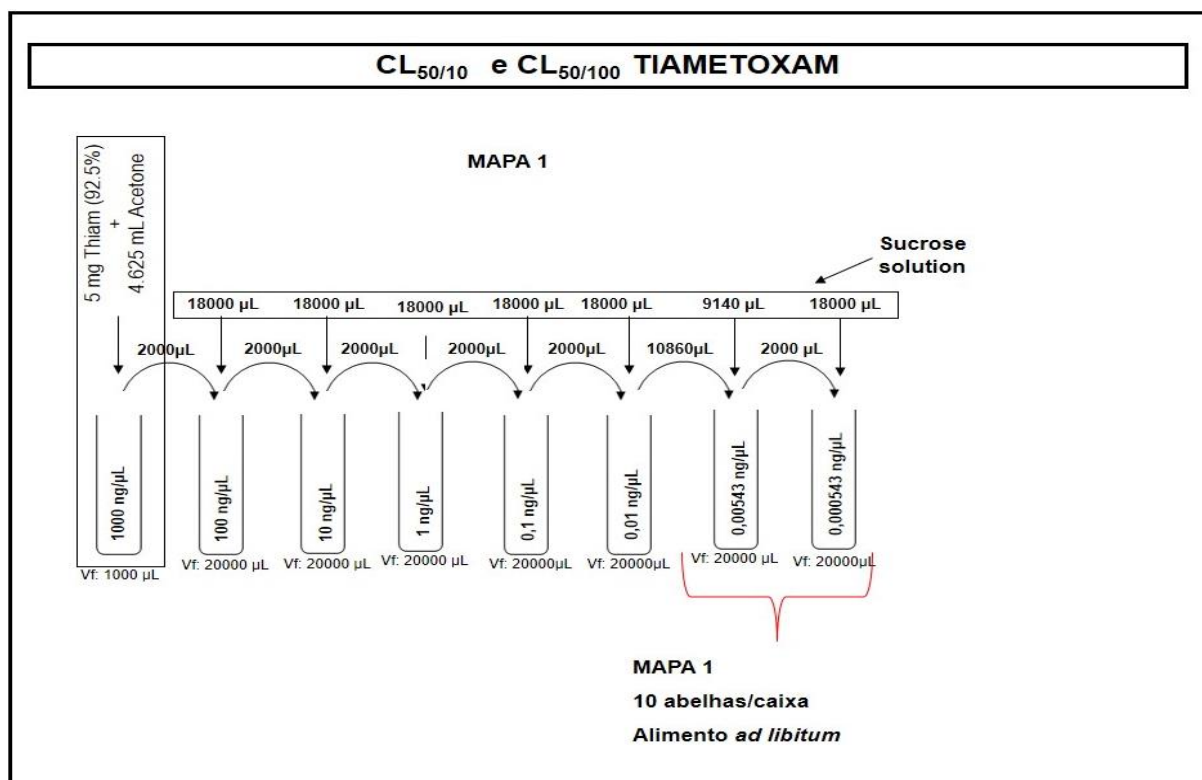
Os bioensaios apresentaram dois grupos controles: controle com sacarose contendo acetona e um grupo controle com alimento normal. O grupo controle com acetona recebeu solução sacarose a 2% de acetona (valor máximo da concentração de acetona presente nas dietas contaminadas para determinação da CL₅₀). O grupo controle não recebeu nenhum tratamento contaminado, e permaneceu por todo o experimento recebendo alimento puro. O alimento tanto para grupos expostos quanto controles foi oferecido dieta *ad libitum*.

Após 24 horas o número de abelhas mortas foi contabilizado e para determinar a CL_{50} esses dados foram submetidos à análise estatística do tipo dose-resposta, empregando-se o modelo *log-logistic* do programa BioStat 2008 Professional.

3.2.2 Ensaio de Sobrevivência de abelhas alimentadas com dieta contaminada (Obtenção do Tempo Letal médio - TL_{50})

Nesse ensaio, foi estipulado o período de tempo em que 50% das abelhas morreram, quando alimentadas com dietas contaminadas contendo concentrações subletais de tiametoxam. Este bioensaio foi realizado para a determinação e padronização de um período de exposição ao inseticida, o qual serviu de referência nos experimentos seguintes (análises morfológicas e ultraestruturais). Os grupos experimentais foram alimentados *ad libitum* com uma dieta contaminada com tiametoxam nas doses equivalentes à $CL_{50/10}$ e $CL_{50/100}$ (Figura 3), exceto o grupo controle que recebeu apenas dieta sem contaminação. Os grupos experimentais e controle tiveram 10 abelhas por gaiola, mantendo-se três repetições por grupo. Assim que se deu início a ingestão do alimento, as abelhas foram avaliadas nos períodos de 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 42, 48, 54, 60, e 72 horas (Baptista et al., 2009). Após este período, se ainda é constatada a presença de abelhas sobreviventes nos tratamentos com doses subletais, são realizadas avaliações a cada 12 horas. O experimento continuou até atingir 100% da mortalidade do grupo experimental e/ou 50% +1 da mortalidade do grupo controle.

Figura 3 – Mapa para diluição em cascata usado para obtenção das Concentrações Letal Média $CL_{50/10}$ e $CL_{50/100}$.



Fonte: elaborado pelo autor

3.2.3 Análises morfológicas - Coloração com Hematoxilina e Eosina (H.E)

Para análises das possíveis alterações morfológicas causadas pelo inseticida tiametoxam no cérebro e ventrículo de *M. Scutellaris*, para cada grupo experimental, foram coletadas 5 abelhas e dissecadas sob estereomicroscópio EZ4 (Leica) em placas de Petri contendo Paraformaldeído. Os órgãos foram mantidos na mesma solução fixadora por 2 dias em câmara fria, após esse período foram transferidos para a solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH = 7,4) e desidratados em graduações crescentes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 90%, 95% e 100%) a 4 °C, segundo Silva-Zacarin et al. (2012). Em seguida, os órgãos foram embebidos em historesina (Leica) e polimerizados em historesina com adição do endurecedor catalítico, a 37 °C. Os blocos de resina contendo os cérebros foram seccionados no micrótomo RM2255 (Leica) obtendo-se secções histológicas de 5 µm de espessura. As secções histológicas foram colocadas sobre lâminas de vidro e secas em estufa a 37 °C. Lâminas contendo as secções do cérebro e ventrículo dos indivíduos de cada grupo experimental foram submetidas à coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) (TIMM, 2005).

3.2.4 Análise Ultraestrutural – Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T)

Seis abelhas representantes de cada grupo experimental – Controle, CL_{50/10} e CL_{50/100} – foram dissecadas nos dias 1, 4 e 8 em placas de Petri, contendo solução fixadora, com o auxílio de um estereomicroscópio EZ4 (Leica) para a retirada dos cérebros e ventrículos. Os órgãos obtidos foram dispostos em solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH = 7,4), lavados em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH = 7,4) e pós fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. Na sequência os órgãos são novamente lavados na mesma solução tampão, contrastados em acetato de uranila 1% dissolvido em álcool 10%, durante 2 horas e desidratados em álcool 70% e 100%, respectivamente. Depois de desidratados, os órgãos foram embebidos em resina Epon-Araldite e polimerizados em resina mais catalizador, a 60 °C. Após uma semana na estufa os blocos de resina contendo os órgãos estavam prontos para serem seccionados no ultra micrótomo Supernova (Reichert) em cortes ultrafinos, posicionados em grades de cobre e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo. Os corpos pedunculados e os ventrículos foram analisados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão (JOEL-JEM1011), no NAP/MEPA – Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Piracicaba.

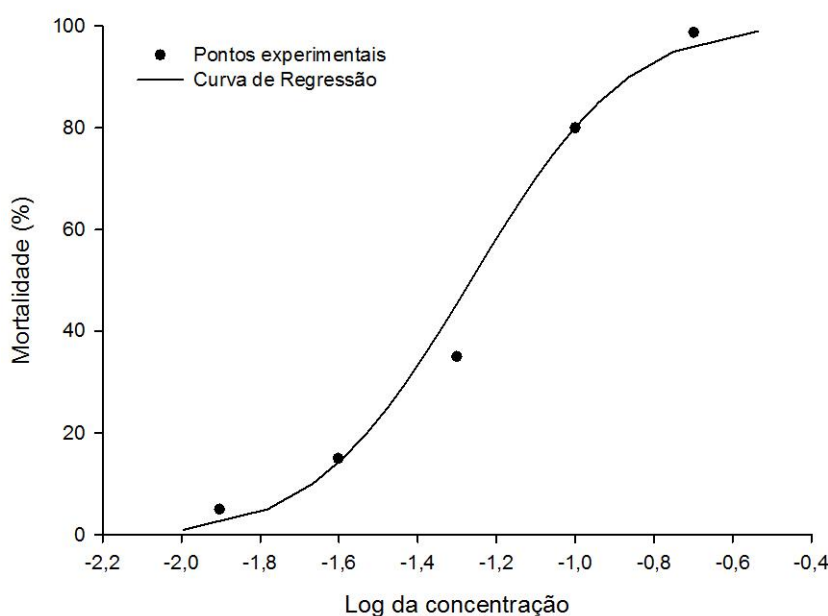
4 - RESULTADOS

4.1 Concentração Letal média (CL₅₀) de tiametoxam para abelhas campeiras de *M. scutellaris*

O valor da CL₅₀ para o inseticida tiametoxam obtido para operárias campeiras da espécie *M. scutellaris* foi de: 0,0543 ng de ingrediente ativo (i.a)./μL de alimento, para 24 horas (Figura 4 e tabela 1).

A partir desse dado, foram estabelecidas as concentrações subletais de 0,00543 ng de ingrediente ativo (i.a)./μL de alimento (CL_{50/10}) e 0,000543 ng de ingrediente ativo (i.a)./μL de alimento (CL_{50/100}) , para serem utilizadas nos experimentos posteriores (análises morfológicas e ultraestruturais).

Figura 4: Concentração Letal Média (CL₅₀) do inseticida tiametoxam para campeiras de *M. scutellaris* indicando a mortalidade de abelhas 24 horas após a exposição oral.



Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 1: Resultado da análise estatística pra obtenção da concentração letal média (CL₅₀) do tiametoxam para campeiras de *M. scutellaris*.

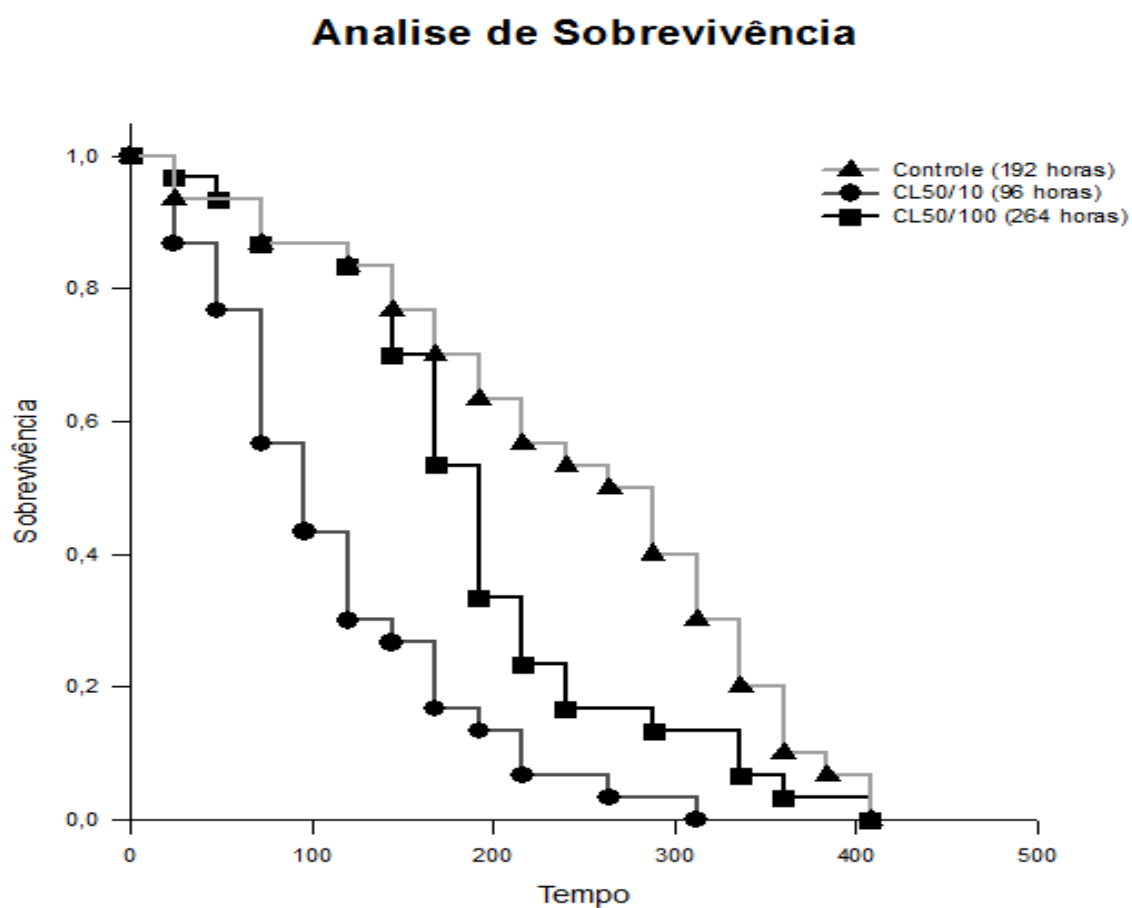
N	A	B	χ^2	DF	LC ₅₀	Intervalo de Confiança	
						lower	upper
10	9,0374	3,1914	1,3148	3	0.0543	0.0425	0.696

N: Número de Indivíduos; α : Coeficiente de Regressão; β : Declínio; χ^2 Qui - Quadrado; DF: Graus de Liberdade; LC₅₀, Intervalo de Confiança: Inferior e Superior: ng/ant.

4.2 Tempo letal médio

Os valores obtidos do tempo letal (Figura 5) são: Controle – 192 horas; CL_{50/10} (0,00543 ng de ingrediente ativo (i.a)./μL de alimento) – 96 horas e CL_{50/100} (0,000543 ng de ingrediente ativo (i.a)./μL de alimento) – 264 horas. A partir destes valores ficou estabelecido que o tempo de exposição dos indivíduos para posteriores análises seria de 1, 4 e 8 dias.

Figura 5. Tempo Letal Médio (TL₅₀) do inseticida tiametoxam para campeiras de *M. scutellaris* indicando a sobrevivência de abelhas após a exposição oral.



Fonte: elaborado pelo autor

4.3 Controle acetona

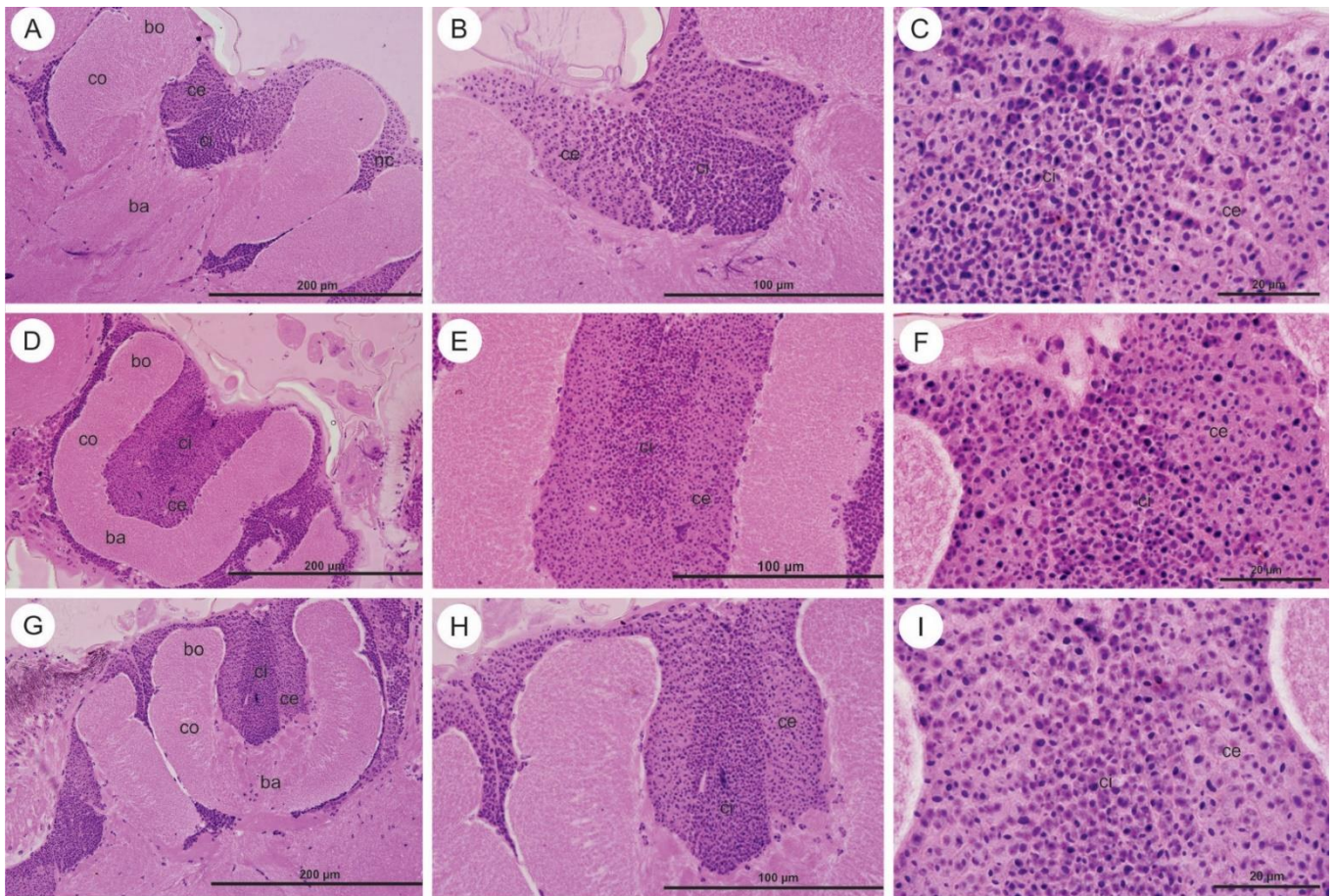
Em todos os bioensaios realizados com os grupos controle acetona não houveram diferenças em seus resultados quando comparados aos grupos controle, evidenciando que a acetona não foi tóxica para forrageiras de abelhas *M. scutellaris* durante o período testado, de forma que o solvente não interfere nos resultados obtidos.

4.4 Análises morfológicas no cérebro a partir da técnica de coloração por H.E

As análises morfológicas realizadas através da técnica de coloração por H.E mostraram que os grupos controle 1 dia (Figura 6A-C), 4 dias (Figura 7A-C) e 8 dias (Figura 8C) apresentaram corpos pedunculados sem alterações morfológicas, com células de Kenyon íntegras e com coloração normal.

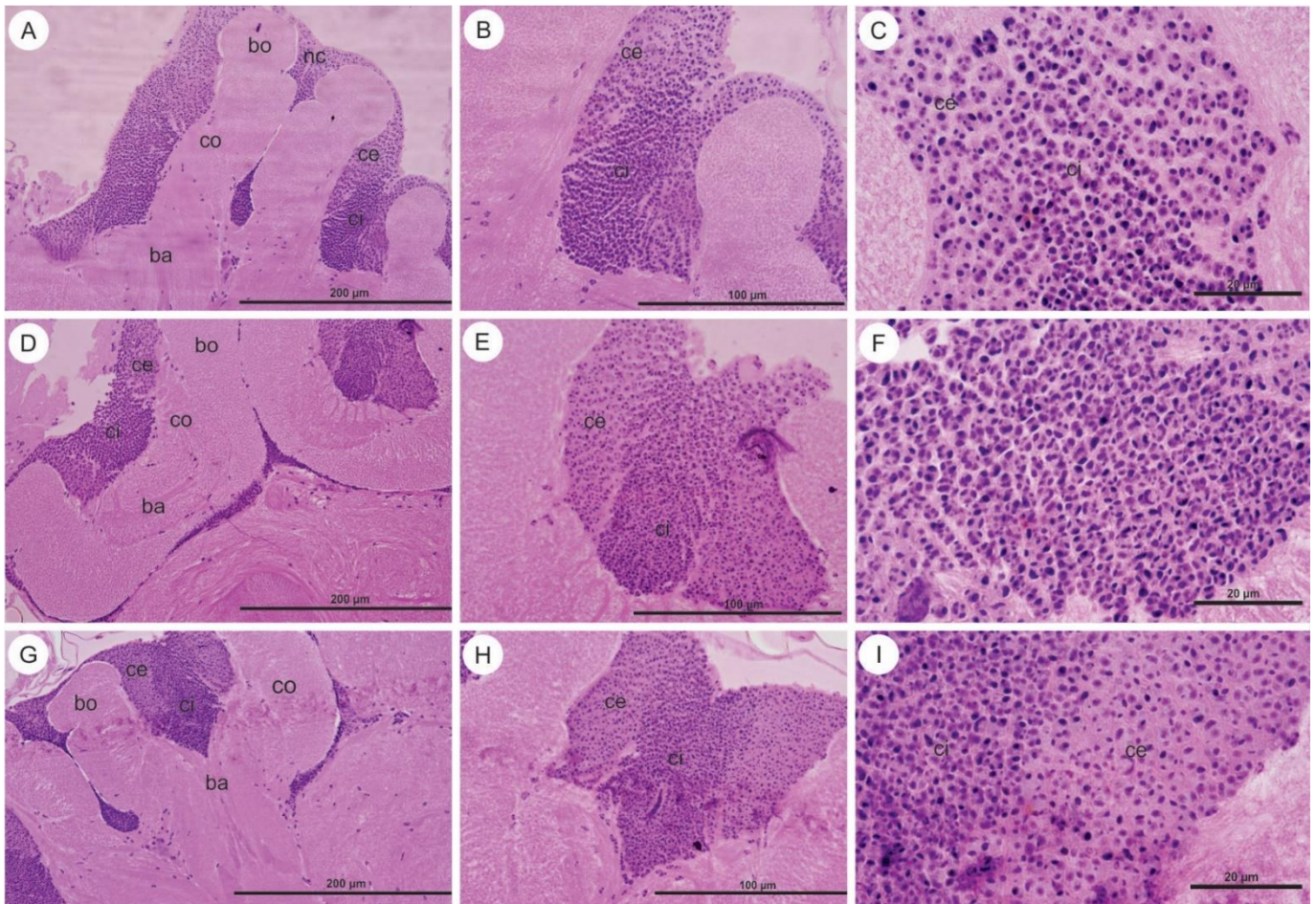
A análise dos resultados morfológicos realizados no cérebro dos grupos expostos ao inseticida por 1 dia, tanto CL_{50/100} (Figura 6D-F) quanto CL_{50/10} (Figura 6G-I) e por 4 (Figura 7D-I) e 8 dias (Figura 8D-F) expostas à CL_{50/100}, não mostraram alterações evidentes nos corpos pedunculados. Já os grupos expostos por 4 e 8 dias, à CL_{50/10} (Figura 8G-I), apresentaram espaçamento entre as células de Kenyon compactas do corpo pedunculado.

Figura 6 – Fotomicrografias do corpo pedunculado, corado com H.E, de *M. scutellaris* submetidas ou não ao tiametoxam. A, B e C - visão geral e detalhe do corpo pedunculado do grupo controle sem alterações morfológicas, expostas ao inseticida por 1 dia; D, E e F – visão geral e detalhe do corpo pedunculado de abelha exposta a $CL_{50/100}$ por 1 dia, sem alterações morfológicas significativas. G, H e I – visão geral e detalhe do corpo pedunculado de abelhas expostas à $CL_{50/10}$ por 1 dia, sem alterações morfológicas significativas. Ba = base; Bo = borda; Ce = compactas externas; Ci = compactas internas; Co = colar; Nc = não compactas.



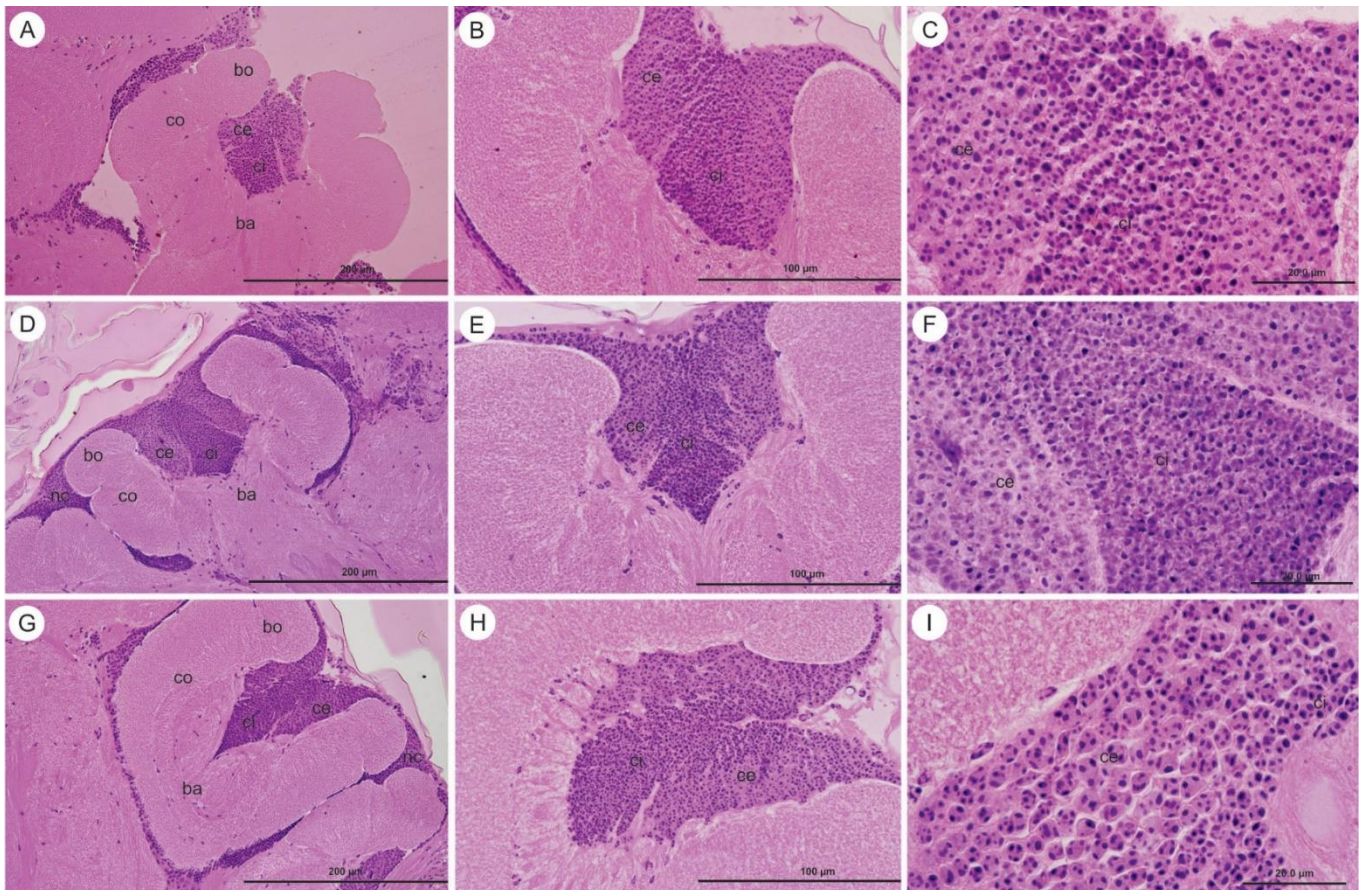
Fonte: elaborado pelo autor

Figura 7 – Fotomicrografias do corpo pedunculado, corado com H.E, de *M. scutellaris* submetidas ou não ao tiametoxam. A, B e C - visão geral e detalhe do corpo pedunculado do grupo controle sem alterações morfológicas, expostas ao inseticida por 4 dias; D, E e F – visão geral e detalhe do corpo pedunculado de abelha exposta a CL_{50/100} por 4 dias, com dilatação entre os espaços intercelulares. G, H e I – visão geral e detalhe do corpo pedunculado de abelhas expostas à CL_{50/10} por 4 dias, com dilatação entre os espaços intercelulares. Ba = base; Bo = borda; Ce = compactas externas; Ci = compactas internas; Co = colar; Nc = não compactas.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 8 – Fotomicrografias do corpo pedunculado, corado com H.E, de *M. scutellaris* submetidas ou não ao tiametoxam. A, B e C - visão geral e detalhe do corpo pedunculado do grupo controle sem alterações morfológicas, expostas ao inseticida por 8 dias; D, E e F – visão geral e detalhe do corpo pedunculado de abelha exposta a CL_{50/100} por 8 dias, sem alterações morfológicas significativas. G, H e I – visão geral e detalhe do corpo pedunculado de abelhas expostas à CL_{50/10} por 8 dias, com dilatações bem evidentes entre os espaços celulares. Ba = base; Bo = borda; Ce = compactas externas; Ci = compactas internas; Co = colar; Nc = não compactas.



Fonte: elaborado pelo autor

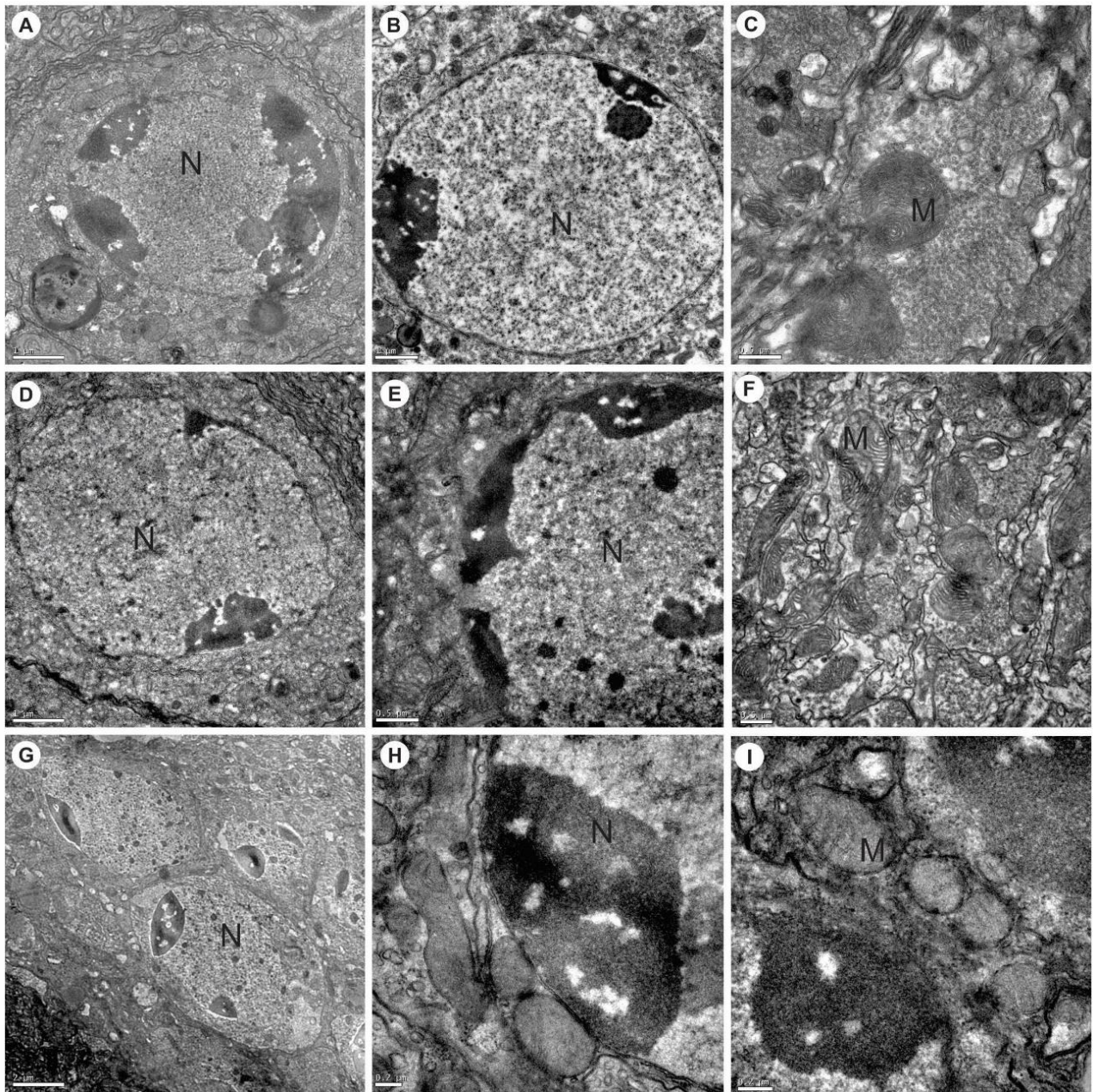
4.5 Análises ultraestruturais dos corpos pedunculados (M.E.T)

No presente estudo foi possível observar que no grupo controle não houve alterações morfológicas no cérebro, mais especificamente no corpo pedunculado de abelhas campeiras de *M. scutellaris*. Assim, neste grupo foram evidenciadas características ultraestruturais típicas de células de Kenyon, tanto no grupo com 1 dia (Figura 9A – C), 4 dias (Figura 10A– C), como 8 dias (Figura 11A – C), tais como núcleos com formato esférico, com presença de cromatina descondensada e com regiões de heterocromatina ocupando a periferia dos núcleos (Figuras 9A-B; 10A-B; 11A-B), citoplasma contendo mitocôndrias de formato alongado, sendo observadas por todo o citoplasma, com cristas visíveis, mantendo-se íntegras (Figuras 9C, 10C e 11C). Esta mesma morfologia foi observada nas células de Kenyon de abelhas expostas à CL_{50/10} (Figura 9D– F) e CL_{50/100} do tiametoxam, por 1 dia (Figura 9G– I).

No entanto no grupo exposto à CL_{50/10} por 4 e 8 dias foi possível observar algumas alterações nas mitocôndrias como: perda de crista e presença de regiões eletrolúcida na matriz. Já os núcleos apresentavam formato irregular e um aumento da presença de heterocromatina (Figura 10 – D, E e F), principalmente após 8 dias de exposição ao inseticida.

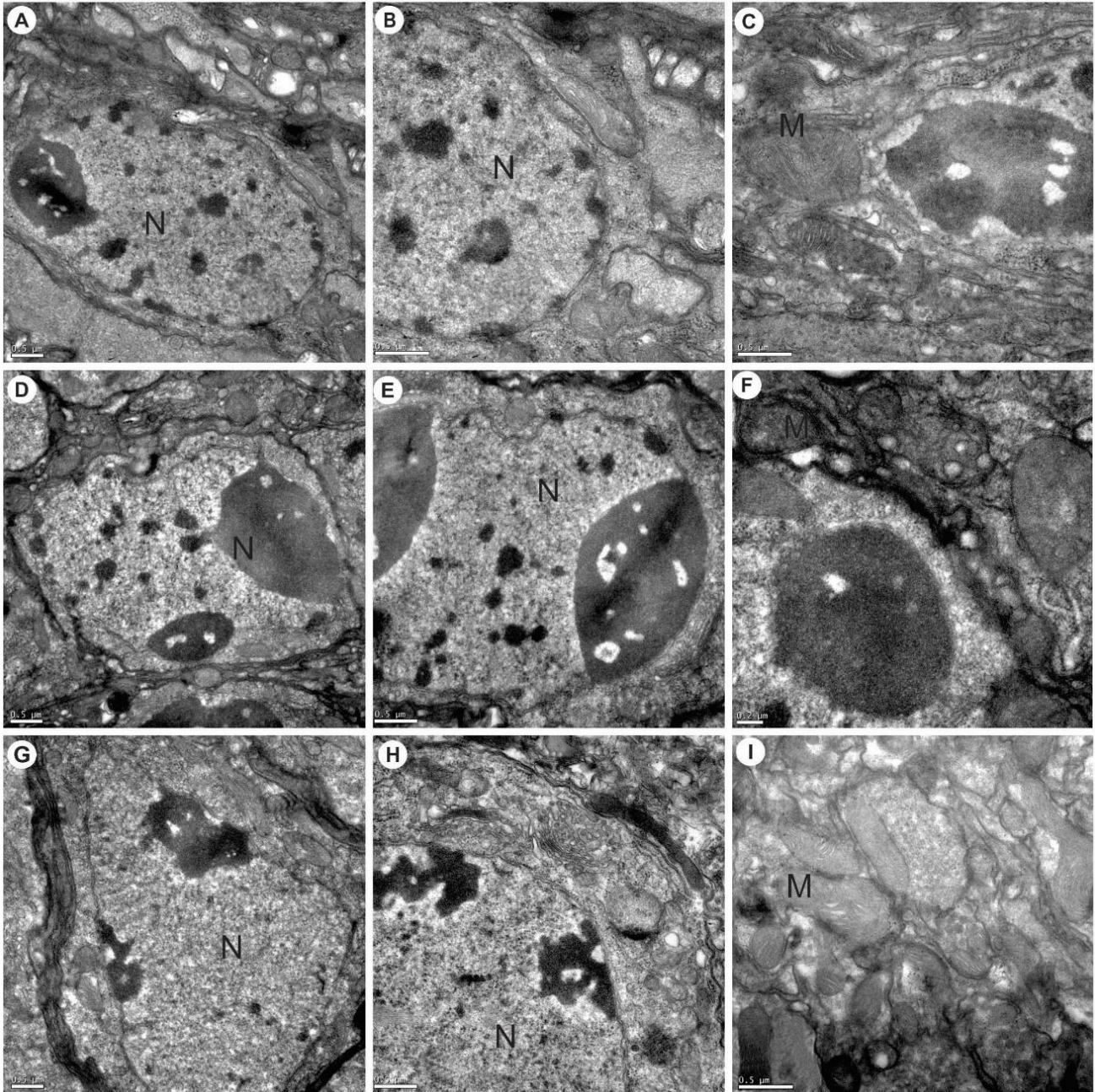
O grupo exposto à CL_{50/100} não apresentou alterações ultraestruturais nas células de Kenyon (Figura 11 – G, H e I).

FIGURA 9 – Eletromicrografias de transmissão das células do cérebro de abelhas campeiras de *M. scutellaris*, submetidas ou não ao tiametoxam. A, B e C – Respectivamente: visão geral, núcleo e mitocôndria do grupo controle, não exposto ao inseticida. D, E e F – Respectivamente: visão geral, núcleo e mitocôndria do grupo CL_{50/10} expostas ao inseticida por 1 dia, sem alterações morfológicas. G, H e I – Respectivamente: visão geral, núcleo e mitocôndria do grupo CL_{50/100} expostas ao inseticida por 1 dia, sem alterações morfológicas. N = núcleo e M = mitocôndria.



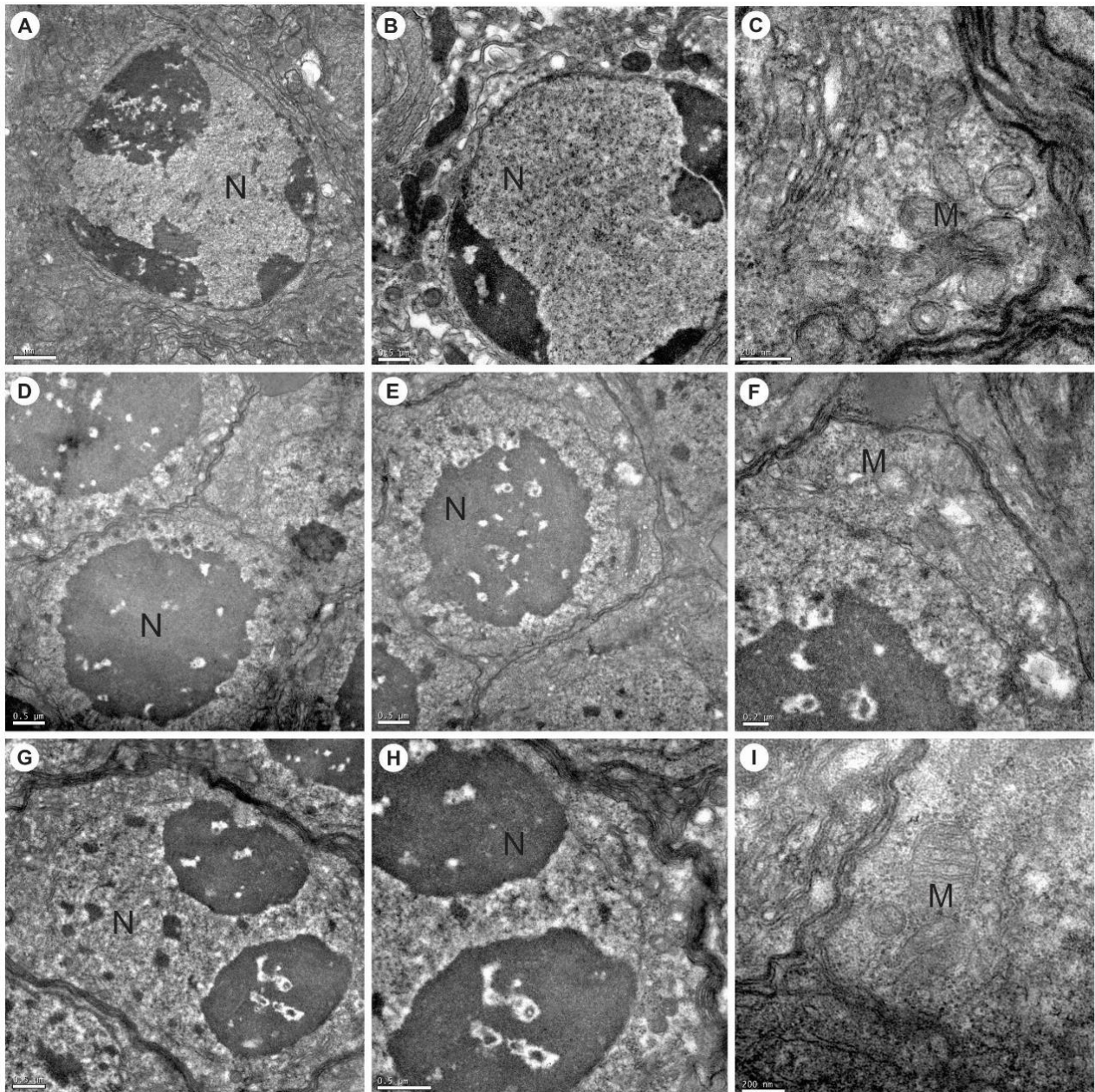
Fonte: elaborado pelo autor

FIGURA 10 – Eletromicrografias de transmissão das células do cérebro de abelhas campeiras de *M. scutellaris*, submetidas ou não ao tiametoxam. A, B e C – Respectivamente: visão geral, núcleo e mitocôndria do grupo controle, não exposto ao inseticida. D, E e F – Respectivamente: visão geral, núcleo e mitocôndria do grupo CL_{50/10} expostas ao inseticida por 4 dia, com núcleos e mitocôndrias alterados. G, H e I – Respectivamente: visão geral, núcleo e mitocôndria do grupo CL_{50/100} expostas ao inseticida por 4 dia, sem alterações morfológicas. N = núcleo e M = mitocôndria.



Fonte: elaborado pelo autor

FIGURA 11 – Eletromicrografias de transmissão das células do cérebro de abelhas campeiras de *M. scutellaris*, submetidas ou não ao tiametoxam. A, B e C – Respectivamente: visão geral, núcleo e mitocôndria do grupo controle, não exposto ao inseticida. D, E e F – Respectivamente: visão geral, núcleo e mitocôndria do grupo CL_{50/10} expostas ao inseticida por 8 dia, com núcleos e mitocôndrias alterados. G, H e I – Respectivamente: visão geral, núcleo e mitocôndria do grupo CL_{50/100} expostas ao inseticida por 8 dia, sem alterações na mitocôndria, mas início de condensação cromatinica no núcleo. N = núcleo e M = mitocôndria.



Fonte: elaborado pelo autor

4.6 Análises morfológicas no ventrículo a partir da técnica de coloração por H.E

Em abelhas dos grupos controle, os ventrículos apresentaram morfologia típica; epitélio composto por células digestivas com núcleos elípticos ou esféricos com cromatina geralmente descondensada. Além disso, foram observadas projeções citoplasmáticas, que se tratam de eliminação apócrina de secreção, núcleos picnóticos e halos pericromatínicos, que são indicativos de morte celular. Uma leve vacuolização citoplasmática pôde ser visualizada em células saudáveis do epitélio, podendo ser resultado de fusões entre vesículas secretoras que ainda não secretaram seu conteúdo no lúmen. Na base do epitélio ventricular estão dispostos os ninhos, células regenerativas, com citoplasma fortemente corado e com núcleo apresentando cromatina descondensada. Tais características descritas para os grupos controles podem ser visualizadas, em maior ou menor grau, em todos os grupos, expostos ou não ao tiametoxam.

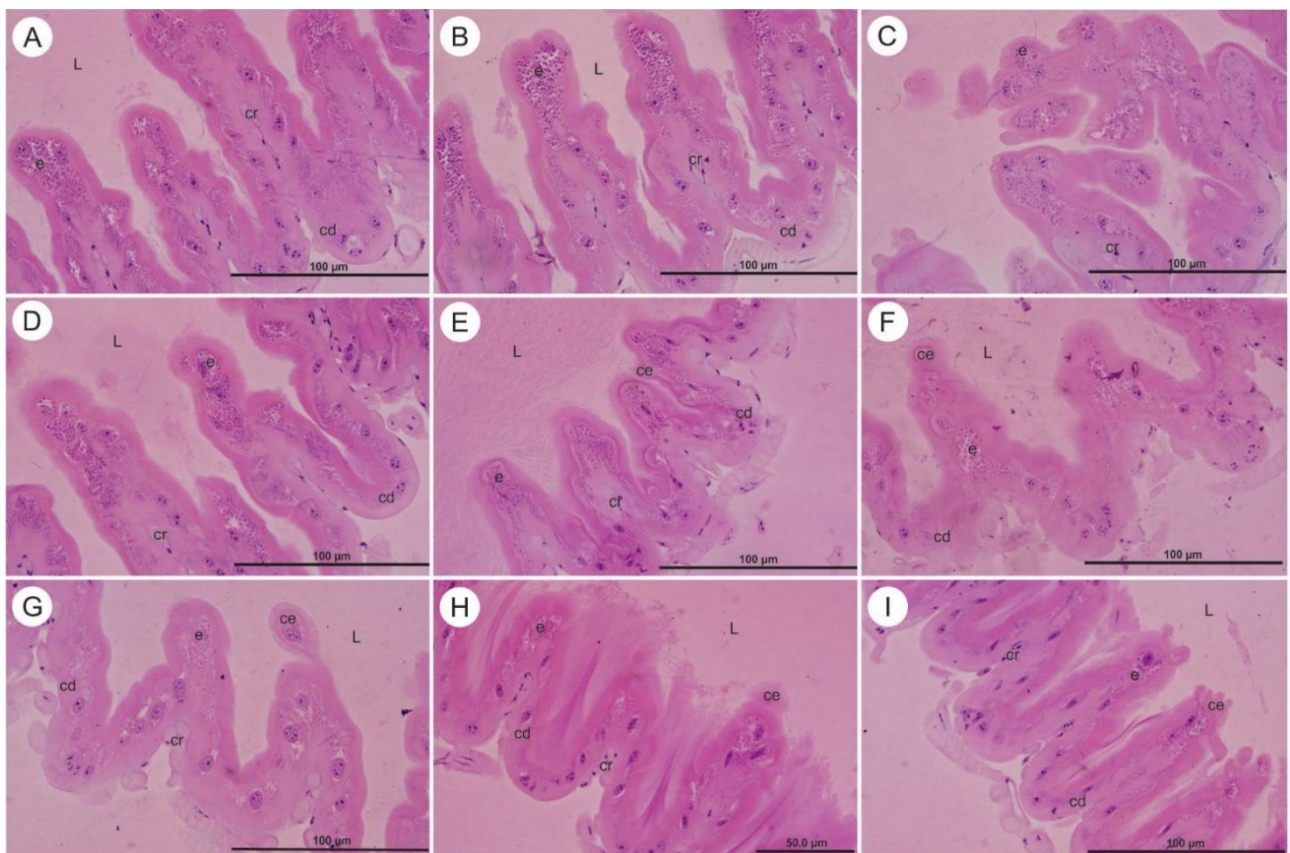
Além das características descritas acima as análises morfológicas realizadas nos grupos controle de 1, 4 e 8 dias – (Figuras 12A, D, G – respectivamente) mostraram a presença de esferocristais e, vilosidades intactas que apresentam microvilosidades formando um bordo em escova bastante evidente nas células digestivas do ventrículo.

Com 1 dia de exposição ao inseticida, é perceptível um aumento de esferocristais no grupo exposto à CL_{50/100} (Figura 12B), enquanto nos grupos expostos à CL_{50/10}, percebeu-se uma diminuição do bordo em escova, e desestruturação das vilosidades (Figura 12C).

No quarto dia de exposição ao inseticida, comparando-se os grupos expostos com o controle, no grupo CL_{50/100} (Figura 12E) as células digestivas apresentam vilosidade com formato disforme, assim como, espaços entre ninhos e núcleos compactados (Figura 12E). As vilosidades do ventrículo das abelhas dos grupos expostos à CL_{50/10}, aparentam-se desestruturadas, com perda de acidofilia citoplasmática das células digestivas, além de maiores espaços entre ninhos (Figura 12F).

No oitavo dia de exposição, os grupos expostos tanto à CL_{50/100} (Figuras 12H) quanto à CL_{50/10} (Figura 12I), além das alterações já descritas, apresentaram também aumento de secreção apócrina e presença de núcleos compactados.

Figura 12 – Fotomicrografias do ventrículo corado com H.E de *M. scutellaris* submetidas ou não ao tiametoxam. A, D e G - visão geral do ventrículo do grupo controle, nos dias 1, 4 e 8 respectivamente, mostrando morfologia típica deste órgão; B – visão geral do ventrículo de abelha exposta a CL_{50/100} por 1 dia, mostrando um aumento de esferocristais; C – visão geral do ventrículo de abelhas expostas a CL_{50/10} por 1 dia, mostrando diminuição do Bordo em Escova com as vilosidades desestruturadas; E – visão geral do ventrículo de abelhas expostas à CL_{50/100} por 4 dias, mostrando redução do tamanho da vilosidade e longos espaços entre ninhos com núcleos compactados nas células digestivas; F – visão geral do ventrículo de abelhas expostas à CL_{50/10} por 4 dias, mostrando diminuição do tamanho das vilosidades e maiores espaçamentos entre os ninhos; H e I – visão geral do ventrículo de abelhas expostas à CL_{50/100} e CL_{50/10} por 8 dias, mostrando um aumento de secreções e de núcleos compactados. Cd = célula digestiva; Ce = célula eliminada; Cr = célula regenerativa; L = lúmen; e = esferocristais.



Fonte: elaborado pelo autor

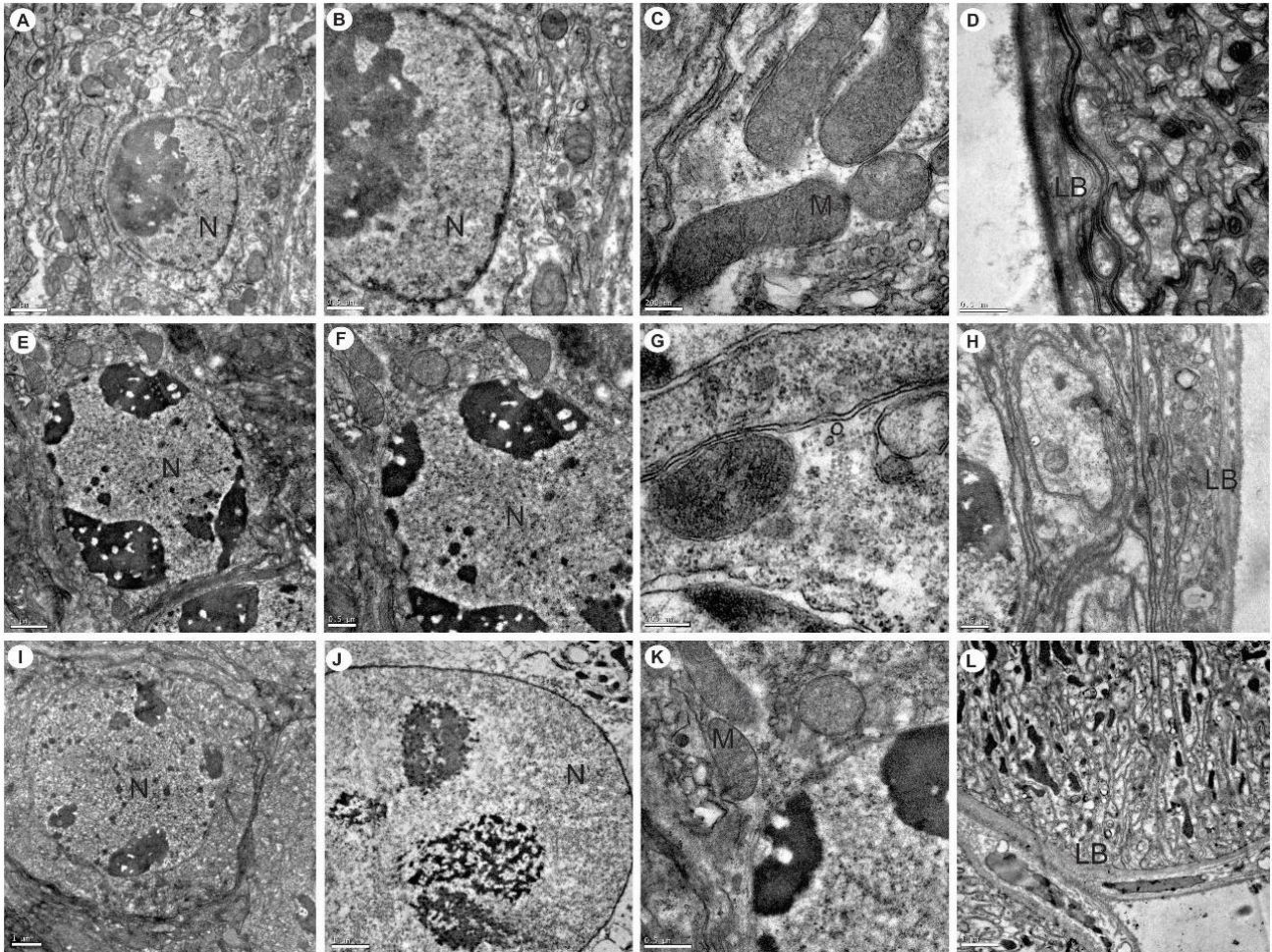
4.7 Análises ultraestruturais no ventrículo (M.E.T)

A análise realizada através de microscopia eletrônica de transmissão permitiu observar detalhes ultraestruturais dos ventrículos de *M. scutellaris*. Assim foi possível visualizar que os grupos não expostos ao tiametoxam – Controle 1 (Figura 13 A – D), 4 (Figura 14 A– D) e 8 (Figura 15 A – D) dias – apresentaram células digestivas preservadas, com núcleos regulares, sem dilatações na região perinuclear e envoltórios pouco sinuosos. As mitocôndrias puderam ser observadas com membranas duplas, cristas conservadas e matriz homogênea, ou seja, as mitocôndrias se mantiveram preservadas.

A análise ultra estrutural do grupo exposto à CL_{50/100} tiametoxam por 1 (Figuras 13 I-L) e 4 dias (Figuras 14 I-L) não apresentaram alterações morfológicas. No entanto, grupo exposto à CL_{50/10} do inseticida por 4 dias (Figuras 14 E-F) apresentou células digestivas contendo núcleo com formato irregular e presença de cromatina condensada na periferia.

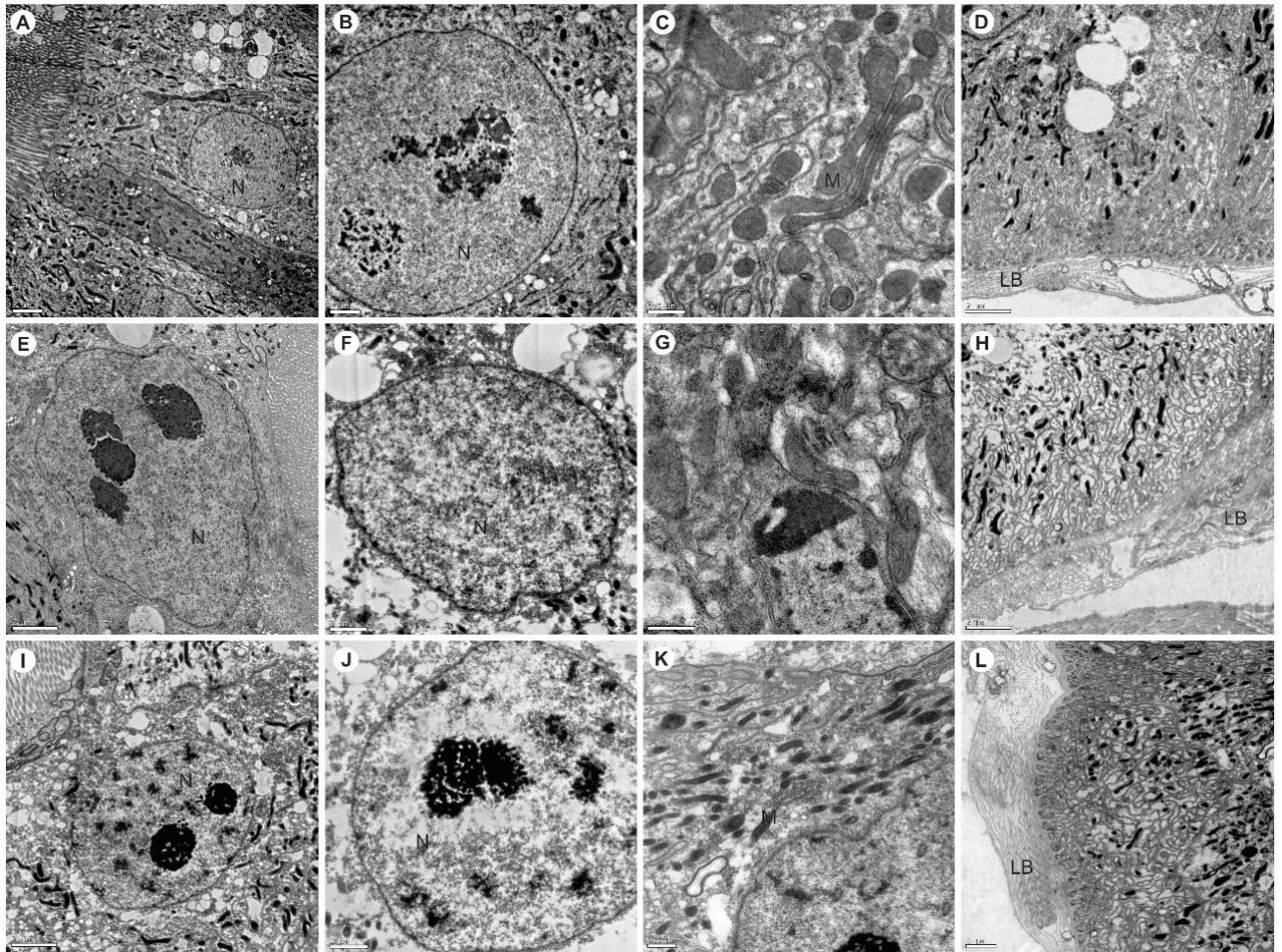
Os indivíduos expostos por 8 dias à CL_{50/10} do inseticida apresentaram núcleos com alterações no formato e condensação da cromatina (Figuras 15 E-F). Já o grupo CL_{50/100} (Figura 15 I-K) não apresentou alterações nas mitocôndrias e nem em seus núcleos, porém é possível perceber que o labirinto basal está desorganizado (Figura 15L).

FIGURA 13 – Eletromicrografias de transmissão das células do intestino de abelhas campeiras de *M. scutellaris*, submetidas ou não ao tiametoxam. A, B, C e D – Respectivamente: visão geral, núcleo, mitocôndria e labirinto basal do grupo controle, não exposto ao inseticida. E, F, G e H – Respectivamente: visão geral, núcleo, mitocôndria e labirinto basal do grupo CL_{50/10} expostas ao inseticida por 1 dia, sem alterações morfológicas. I, J, K e L – Respectivamente: visão geral, núcleo, mitocôndria e labirinto basal do grupo CL_{50/100} expostas ao inseticida por 1 dia, sem alterações na mitocôndria e núcleo. N = núcleo, M = mitocôndria e LB = labirinto basal.



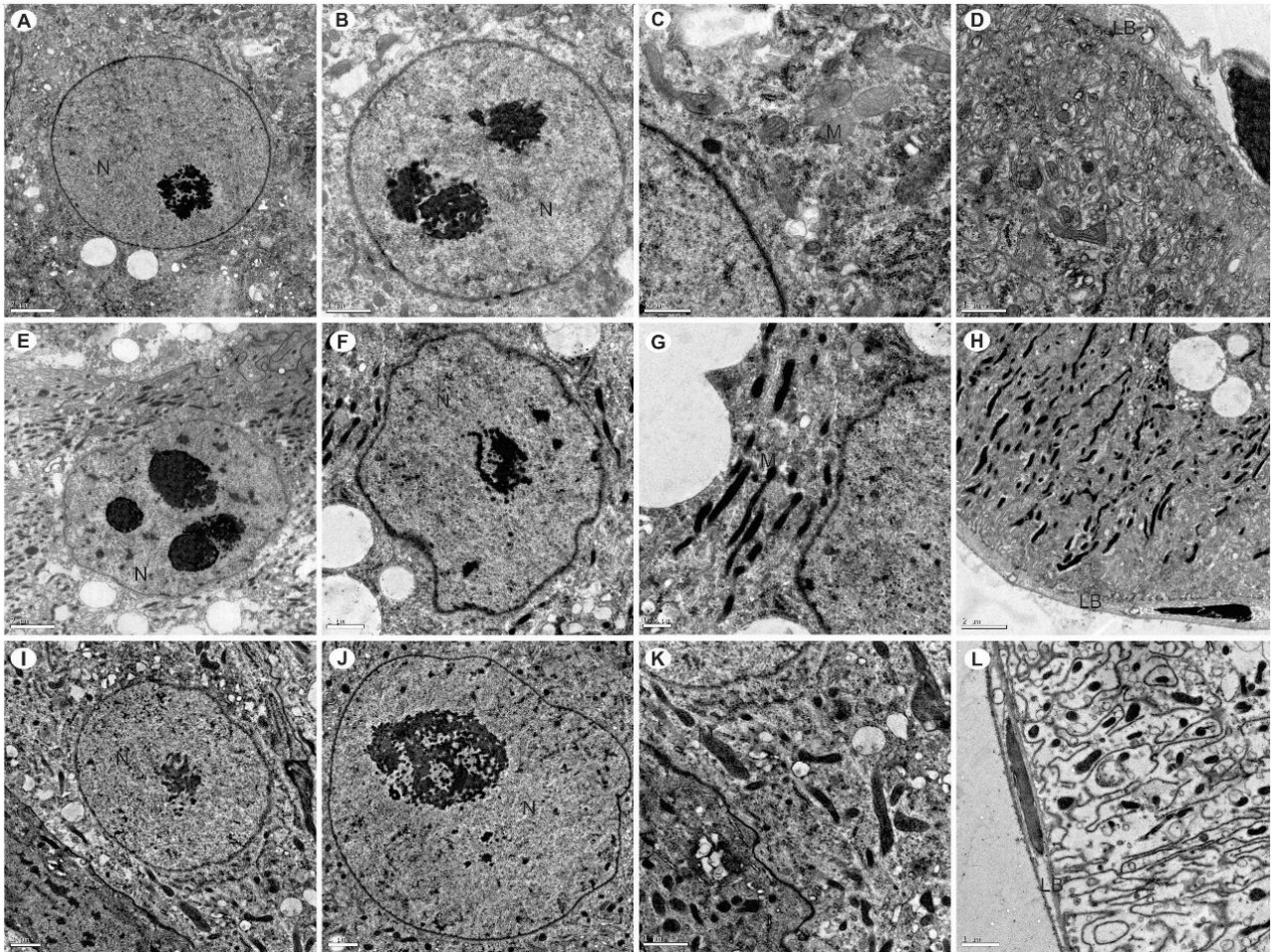
Fonte: elaborado pelo autor

FIGURA 14 – Eletromicrografias de transmissão das células do intestino de abelhas campeiras de *M. scutellaris*, submetidas ou não ao tiametoxam. A, B, C e D – Respectivamente: visão geral, núcleo, mitocôndria e labirinto basal do grupo controle, não exposto ao inseticida. E, F, G e H – Respectivamente: visão geral, núcleo, mitocôndria e labirinto basal do grupo CL_{50/10} expostas ao inseticida por 4 dias, com núcleos alterados. I, J, K e L – Respectivamente: visão geral, núcleo, mitocôndria e labirinto basal do grupo CL_{50/100} expostas ao inseticida por 4 dias, sem alterações na mitocôndria e núcleo. N = núcleo, M = mitocôndria e LB = labirinto basal.



Fonte: elaborado pelo autor

FIGURA 15 – Eletromicrografias de transmissão das células do intestino de abelhas campeiras de *M. scutellaris*, submetidas ou não ao tiametoxam. A, B, C e D – Respectivamente: visão geral, núcleo, mitocôndria e labirinto basal do grupo controle, não exposto ao inseticida. E, F, G e H – Respectivamente: visão geral, núcleo, mitocôndria e labirinto basal do grupo CL_{50/10} expostas ao inseticida por 8 dias, com núcleos alterados. I, J, K e L – Respectivamente: visão geral, núcleo, mitocôndria e labirinto basal do grupo CL_{50/100} expostas ao inseticida por 8 dias, sem alterações na mitocôndria e núcleo, mas com labirinto basal desorganizado. N = núcleo, M = mitocôndria e LB = labirinto basal.



Fonte: elaborado pelo autor

5 - DISCUSSÃO

Uma das formas de se avaliar os efeitos tóxicos de agrotóxicos nos organismos é por meio da realização de testes de toxicidade aguda que são utilizados para determinar a concentração de uma determinada substância que produz efeitos deletérios em um grupo de organismos sob condições controladas em um curto período de exposição em relação ao período de vida do organismo (WALKER et al., 2006). Assim uma abordagem interessante envolvendo as abelhas e os agrotóxicos é estabelecer limites de substâncias tóxicas que sirvam de guia para as entidades reguladoras para a tomada de decisões.

Estudos da toxicidade e riscos dos pesticidas para abelhas em laboratório, condições de campo e semi-campo envolvem métodos que seguem as orientações de organizações como a OECD – Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico (GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 1998). A maneira clássica para avaliar o efeito letal de um inseticida para insetos não alvo, é através da determinação da dose letal média (DL₅₀) ou a concentração letal média (CL₅₀). A DL₅₀ corresponde a única dose do inseticida, administrada por ingestão ou contato que provoca a morte de 50% de abelhas do grupo exposto por 24 ou 48 horas e é expressa em peso de ingredientes ativo por abelha. Já a concentração letal média corresponde a concentração de inseticida presente no ambiente ou alimento que provoca a morte de 50% da população em 24 ou 48 horas, sendo impossível estabelecer a quantidade absorvida pelo organismo (RORTAIS et al., 2005).

O presente estudo constatou que a CL₅₀ do tiametoxam para abelhas da espécie *M. scutellaris* é de 0.0543 ng tiametoxam/μL de dieta. Estudos de toxicidade em abelhas sem ferrão são imprescindíveis, uma vez que atualmente é utilizada apenas *A. mellifera* como organismo teste para estudos ecotoxicológicos em abelhas, sendo que os agrotóxicos ainda não tiveram seus valores máximos permitidos estabelecidos para as diversas espécies de abelhas, incluindo abelhas sem ferrão e solitárias.

Oliveira e colaboradores (2012) obtiveram a concentração letal para operárias recém emergidas de *A. mellifera* africanizada no valor de 4,28 ng i.a./μL dieta. Comparando-se esse dado com o valor obtido no presente estudo para campeiras de *M. scutellaris* verifica-se que a CL₅₀ para esta espécie é aproximadamente 100 vezes mais baixa, mostrando que *M. scutellaris* é mais sensível a este inseticida que a abelha africanizada. A alta toxicidade do tiametoxam para abelhas pode ser explicada

levando-se em consideração que este inseticida pertence à classe dos neonicotinóides que apresentam agrupamento nitro em sua composição. Segundo El Hassani (2008), os neonicotinóides são divididos em 2 grupos de acordo com o grau de toxicidade que apresentam. Esta classificação é baseada na presença do agrupamento nitro ou do agrupamento ciano. Deste modo, os neonicotinóides com agrupamento nitro são os mais tóxicos, sendo eles o imidacloprido, clotianidina e tiametoxam. Já os neonicotinóides que apresentam o agrupamento ciano apresentam uma toxicidade menor sendo eles: acetamiprido e o tiacloprido.

Em um estudo de meta-análise, Arena e Sgolastra (2014), compararam a vulnerabilidade de *A. mellifera* com outras espécies de abelhas e, quando comparados os dados de neonicotinóides, todas as outras espécies foram mais sensíveis do que *A. mellifera*. Brittain e Potts (2011) complementam que a vulnerabilidade entre as diferentes espécies de abelhas a inseticidas dependerá de alguns elementos, tendo como exemplo, o tamanho do corpo, a idade, a especialização floral, o período de voo, a socialidade e o comportamento do ninho.

A toxicidade de muitos compostos está relacionada com o tempo de exposição, fato observado nos agrotóxicos, que também seguem esse padrão de dependência com o tempo de exposição. Os inseticidas continuam por algum tempo presentes no organismo do indivíduo, mesmo que em doses subletais e em graus capazes de promover efeitos tóxicos (CHASIN E AZEVEDO, 2003). As moléculas que apresentam um tempo letal médio alto podem causar maiores riscos ao animal já que, apesar de não matar a abelha imediatamente, permite seu retorno para a colônia, aumentando a contaminação. Assim sendo, o presente estudo mostrou que abelhas submetidas à $CL_{50/10}$ apresentam diminuição do tempo de vida em relação ao grupo controle, enquanto a concentração referente à $CL_{50/100}$ não altera o tempo de sobrevivência das abelhas. Os efeitos subletais podem incluir alterações na sobrevivência, no comportamento e na fisiologia (MEDRZYCKI et al., 2003).

Assim, as análises morfológicas utilizando a técnica de coloração por H.E foram realizadas com o intuito de observar a nível celular os efeitos das concentrações subletais. A partir dos resultados obtidos pode-se verificar que não ocorreram alterações morfológicas nos corpos pedunculados das abelhas expostas ao tiametoxam, por 1 e 4 dias, quando comparadas as do grupo controle.

Nos corpos pedunculados das abelhas expostas por 8 dias à $CL_{50/10}$ do tiametoxam, foi possível observar espaçamento entre as células de Kenyon

compactas internas no interior dos corpos pedunculados. Essa dilatação dos espaços intercelulares pode representar uma perda de contato celular que indicaria a ocorrência de desorganização tecidual. De acordo com Hacker (2000), durante a apoptose as mudanças mais marcantes estão relacionadas com reorganização dos limites externos da célula, mudanças na forma e rompimento do contato com as células vizinhas do tecido. Resultados similares foram observados por Soares (2013) ao analisar o efeito do imidacloprido em corpos pedunculados de operarias de *Scaptotrigona postica* (Latreille 1807 – Hymenoptera, Apidae, Meliponini).

Além disso, o presente estudo verificou que ocorrem alterações ultraestruturais nas células de Kenyon dos corpos pedunculados de abelhas expostas ao tiametoxam. No cérebro das abelhas expostas à $CL_{50/10}$, verificou-se presença de núcleos com condensação cromatínica e alterações mitocondriais nas células de Kenyon de abelhas submetidas a 4 e 8 dias de exposição ao inseticida. Foi possível observar também células apresentando núcleos com compactação da cromatina. Alterações na morfologia nuclear são consideradas uma característica comum de morte celular programada e são associadas com diminuição das atividades das células que irão sofrer degeneração (SILVA-ZACARIN; GREGORC; DEMORAES, 2006).

Nas células de Kenyon as mitocôndrias também apresentam importantes sinais de degradação, como perda de matriz e cristas mitocondriais. É importante lembrar que o tiametoxam é pertencente a classe dos neonicotinóides e que atua diretamente no sistema nervoso central; portanto os dados obtidos nesse estudo, principalmente as alterações mitocondriais, evidenciam que a classe dos neonicotinóides altera a atividade neural. A liberação de neurotransmissores a partir de sinapses requer grandes quantidades de energia, por este motivo, é essencial que as mitocôndrias estejam funcionando normalmente (CHEN; CHAN, 2006). Nicodemo e colaboradores (2014), mostaram que para abelhas africanizadas o fipronil e imidacloprido atuam como inibidores da bioenergia mitocondrial, minimizando a eficiência da respiração celular, além de afetar a produção de ATP dos neurônios. Dessa forma, como há uma relação de dependência entre neurônios e suas mitocôndrias, as alterações mitocondriais observadas no presente estudo podem indicar comprometimento da função desempenhada por estes neurônios.

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, o que pode comprometer

temporariamente toda colônia. Estudos realizados por Decourtye e colaboradores (2004 a.b) comprovam, a partir do método de REP, que as abelhas submetidas a uma dieta contendo dose subletal de imidacloprido apresentam uma diminuição no desempenho do aprendizado olfatório.

Apesar de o tiametoxam ser um inseticida neurotóxico, atuando principalmente no cérebro, vale ressaltar a importância da análise de seus efeitos no ventrículo das abelhas, já que esse órgão representa uma das primeiras vias de contato com o inseticida, por meio da contaminação através do alimento. Entre as células presentes no epitélio do ventrículo, a que foi afetada pela exposição a doses subletais do tiametoxam, foi a célula digestiva. Isso porque elas estão em maior contato com o lúmen e seu conteúdo, além de possuírem uma zona de contato com a hemolinfa constituída por invaginações da membrana plasmática basal que, segundo Caetano e colaboradores (1994), apresentam função adicional de absorver substâncias da hemolinfa.

Os ventrículos de abelhas expostas ao tiametoxam apresentaram diversas alterações morfológicas e ultraestruturais desde o primeiro dia de exposição, inclusive no grupo exposto à uma concentração extremamente baixa, como a $CL_{50/100}$. Com relação as análises, houve uma tendência à uma maior desorganização do epitélio digestivo conforme aumento no tempo de exposição ao inseticida e a concentração à qual o inseto foi submetido. Essa desorganização é notada pela desestruturação das vilosidades do ventrículo, além da perda do bordo em escova, aumento de secreção apócrina e presença de núcleos condensados nas células digestivas. Os núcleos das células digestivas também mostraram alterações ultraestruturais.

Estudos que visam encontrar características de morte celular programada podem usar diferentes técnicas para comprovar a morte propriamente dita. Em microscopia de luz conseguimos observar aspectos morfológicos que corroborem com o indicativo de apoptose, como por exemplo: núcleos reduzidos com aparente condensação da cromatina, alterações no volume celular, desaparecimento de regiões especializadas da membrana plasmática, principalmente microvilosidades e complexos juncionais que provocam mudanças no formato da célula (ALBERTS et al., 2010). As análises ultraestruturais confirmam a presença de células digestivas com núcleos em formato irregular e condensação cromatínica.

As células digestivas são ricas em microvilosidades, que tem como função aumentar a superfície de contato com o lúmen, facilitando a absorção (CRUZ-

LANDIN, 2009). Logo, alterações nas microvilosidades, como as observadas no presente estudo, podem comprometer além da absorção, o bom funcionamento das células digestivas, alterando a fisiologia de todo o órgão.

O aparecimento de secreções apócrinas pode estar relacionado com a liberação de enzimas digestivas para o lúmen e o aumento dessas secreções pode significar tentativa de desintoxicação, já que as células empacotam e eliminam substâncias prejudiciais como agrotóxicos.

Alterações ultraestruturais nas células digestivas também foram encontradas em estudos realizados por Catae e colaboradores (2014), porém a espécie de abelha utilizada para o estudo foi a *A. mellifera* africanizada. A concentração do tiametoxam utilizada foi 10 vezes mais baixa do que a concentração letal média e já em 1 dia de exposição os núcleos foram observados em formato irregular.

Dessa maneira, através dos resultados obtidos é possível dizer que o tiametoxam é citotóxico para as células digestivas do ventrículo e para as células de Kenyon dos corpos pedunculados das abelhas. As alterações ultraestruturais observadas nas células de ambos órgãos dos grupos expostos a este inseticida podem desencadear alterações fisiológicas neste órgão e afetar a saúde das abelhas e da colônia e comprometer a viabilidade da mesma.

6 – CONCLUSÃO

O tiametoxam causa alterações morfológicas no cérebro, órgão alvo da ação deste inseticida, em abelhas campeiras de *M. scutellaris*. As células de Kenyon dos corpos pedunculados tiveram a morfologia alterada somente na concentração mais alta e durante o maior período de exposição avaliado.

O ventrículo, órgão responsável pela digestão e metabolização de compostos ingeridos, sofreu diretamente com a ação do tiametoxam. Foi possível observar uma tendência na desorganização do epitélio digestivo conforme o aumento no tempo de exposição às concentrações subletais de tiametoxam. Além disso, teve morfologia alterada apenas dos núcleos expostos a concentração mais alta e durante o maior período de exposição, mostrando que este inseticida é citotóxico para o sistema digestório de campeiras *M. scutellaris*.

Referências Bibliográficas

- BICKER, G. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. **Microscopy Research and Technique**, v. 45, n. 3, p. 174–183, 1999.
- BIESMEIJER, J. C. et al. Parallel Declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 351–354, 2006.
- BOWEN, I. D.; BOWEN, S. M.; JONES, A. H. **Mitosis and Apoptosis**: matters of life and death. London: Chapman & Hall, 1998.
- CASTRO, M. S. DE et al. **Stingless bees. In: Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices**. Ribeirão Preto: Holos, 2006.
- CHAPMAN, R. F. **The insects**: structure and function. 5th ed. New York: Cambridge University Press, 1998.
- CHEN, H.; CHAN, D. C. Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, n. 4, p. 453–459, 2006.
- CRUZ-LANDIM, C.; SILVA-DE-MORAES, R. L. M.; SERRÃO, E. Ultraestrutural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). **Journal of comparative biology**, São Paulo, v.1, p.29-40, 1996.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas**: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Editora UNESP, 2009.
- DAILY, G. C. Nature services: societal dependence on natural ecosystems. **Island Press**, n. January 1997, p. 6027, 1997.
- DALY, H. V.; DOYEN, J. T.; PURCELL, A. H. Introduction to insect biology and diversity. **Introduction to insect biology and diversity**, v. 82, n. 1, p. 680, 1998.
- DECOURTYE, A.; ARMENGAUD, M.; RENOU, M.; DEVILLERS, J.; CLUSEAU, S.; GAUTHIER, M.; PHAM-DELEGUE, M. H. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 78, n. 2, p. 83-92, 2004a.
- DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; CLUSEAU, S.; CHARRETON, M.; PHAMDELEGUE, M. H. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 57, n. 3, p. 410-419, 2004b.
- EL HASSANI, A. K. et al. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 4, p. 653–661, 2008.
- EVANGELISTA-RODRIGUES, A. et al. Desenvolvimento produtivo de colmeias de abelhas *Melipona scutellaris*. **Biotemas**, v. 21, n. 1, p. 59–64, 2008.

FAHRBACH, S. E. Structure of the Mushroom Bodies of the Insect Brain. **Annual Review of Entomology**, v. 51, n. 1, p. 209–232, 2006.

FARRIS, S. M. Evolution of insect mushroom bodies: Old clues, new insights. **Arthropod Structure and Development**, v. 34, n. 3, p. 211–234, 2005.

FIORAVANTI, C. As asas dos alimentos. **Pesquisa FAPESP**, v. 171, p. 52–55, 2010.

FORD, K. A.; CASIDA, J. E. Comparative metabolism and pharmacokinetics of seven neonicotinoid insecticides in spinach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10168–10175, 2008.

FREITAS, B. M.; PEREIRA, J. O. P. Solitary Bees Conservation, Rearing and Management for Pollination. In: **Imprensa Universitária**. Fortaleza: p.19-22, 2004. p. 282.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

GUIMARÃES, M. Colmeia às moscas: síndrome misteriosa causa sumiço de abelhas na América e na Europa. **Revista FAPESP**, p. 50–51, 2007.

HEARD, T. A. the Role of Stingless Bees in Crop Pollination. **Annu. Rev. Entomol**, v. 44, n. 131, p. 183–206, 1999.

IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, P. As abelhas , os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 59–62, 2010.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Serviços aos ecossistemas, com ênfase nos polinizadores e polinização. p. 10, 2004.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M.; JONG, D. DE. Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices. In: **HOLOS**. Ribeirão Preto: Holos, 2006. p. 96.

JOHNSON, R. Honey Bee Colony Collapse Disorder. **Congressional Research Service**, v. 2, p. 20, 2010.

JOZA, N. et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 549–554, 2001.

KERR, W. E. et al. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias estratégicas**, v. 80, p. 45–60, 2001.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu - Biologia, Manejo E Conservação**. 2. ed. Belo Horizonte, Minas Gerais: Fundação Acangaú, 1996.

KEVAN, PETER G; IMPERATRIZ-FONSECA. POLLINATING BEES THE CONSERVATION LINK BETWEEN AGRICULTURE AND NATURE. **Ministério do Meio Ambiente**, p. 313, 2002.

KIYA, T.; KUNIEDA, T.; KUBO, T. Increased neural activity of a mushroom body neuron subtype in the brains of forager honeybees. **PLoS ONE**, v. 2, n. 4, 2007.

KLEIN, A.-M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 274, n. 1608, p. 66, 95–96, 191, 2007.

KOMISCHKE, B. et al. Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 477–485, 2005.

KREMEN, C.; WILLIAMS, N. M.; THORP, R. W. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 26, p. 16812–16816, 2002.

LOEFFLER, M.; KROEMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Experimental cell research**, v. 256, p. 19–26, 2000.

MAIENFISCH, P. et al. The discovery of thiamethoxam: A second-generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, v. 57, n. 2, p. 165–176, 2001.

MEDRZYCKI, P. et al. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. **Bulletin of Insectology**, v. 56, n. 1, p. 59–62, 2003.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. 2. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2000. v. 85.

MOURE, J. S.; URBAN, D. Catálogo de Apoidea da Região Neotropical (Hymenoptera, Colletidae). V. Xeromelissinae. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, n. 1989, p. 1–25, 2002.

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

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997.

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

OECD. Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, n. September, p. 1–8, 1998a.

OECD. Test No. 214: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, n. September, p. 1–7, 1998b.

OLDROYD, B. P. What's killing American honey bees? **PLoS Biology**, v. 5, n. 6, p. 1195–1199, 2007.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, n. 3, p. 321–326, 2011.

PEDRO, S. R. M.; CAMARGO, J. M. F. Reino Animália: Apoidea Apiformes. **Biodiversidade do Estado de São Paulo**, v. 5, p. 194–211, 1999.

PHAM-DELÈGUE, M.-H. et al. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. **Apidologie**, v. 33, p. 425–432, 2002.

PRONÍ, E. A. Biodiversidade de abelhas indígenas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) na bacia do Rio Tibagi, estado do Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 3, n. 2, p. 145–150, 2000.

RORTAIS, A. et al. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, p. 71–83, 2005.

ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, v. 37, p. 124–143, 2006.

SILVA-ZACARIN, E. C. M.; GREGORC, A.; DEMORAES, R. L. M. S. In situ localization of heat-shock proteins and cell death labelling in the salivary gland of acaricide-treated honeybee larvae. **Apidologie**, v. 37, p. 1–10, 2006.

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

SILVEIRA, F. A; MELO, G. A R.; ALMEIDA, E. A B. **ABELHAS BRASILEIRAS Sistemática e Identificação**. 1ª edição ed. Belo Horizonte, Minas Gerais: Fundação Araucária, 2002

SPADOTTO, C. A. et al. Monitoramento do risco ambiental do agrotóxicos: princípios e recomendações. **Embrapa Meio Ambiente**, v. 42, p. 29, 2004.

TIMM, L. D. L. Técnicas Rotineiras De Preparação E Análise De Lâminas Histológicas. **Caderno La Salle XI, Canoas**, v. 2, n. 1, p. 231–239, 2005.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Mechanisms of Selective Action. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 45, p. 247–68, 2005.

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**, v. 103, n. SUPPL. 1, p. S80–S95, 2010.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M. PEAKALL, D. B. **Principles of ecotoxicology**, Third Edition ed. CRC. 2006.

WANG, L.-S. et al. Effect of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on the wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. **Environmental toxicology**, v. 24, n. 3, p. 296–303, 2009.

WILCOCK, C.; NEILAND, R. Pollination failure in plants: Why it happens and when it matters. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 6, p. 270–277, 2002.

WOLFF, L. F.; REIS, V. D. A; SANTOS, R. S. S. Abelhas melíferas: bioindicadores de qualidade ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica. p. 38, 2008.

WOOD, A.; STEDMAN-EDWARDS, P.; MANG, J. The Root Causes of Biodiversity Loss. In: CLEMENT, C. R. (Ed.). . **The Root Causes of Biodiversity Loss**. [s.l.] The New York Botanical Garden, 2000. v. 56p. 399.

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