UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

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

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO PARA ABELHAS SEM FERRÃO *Scaptotrigona postica* LATREILLE, 1807 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI).

HELLEN MARIA SOARES

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

Rio Claro
2012

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO PARA ABELHAS SEM FERRÃO *Scaptotrigona postica* LATREILLE, 1807 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI).

HELLEN MARIA SOARES

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

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

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

Rio Claro
2012

543.5
S676a

Soares, Hellen Maria
Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas sem ferrão Scaptotrigona postica Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). / Hellen Maria Soares. - Rio Claro : [s.n.], 2012
87 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Inseticidas. 2. Neonicotinóides. 3. Meliponíneos. 4. Corpos pedunculados. 5. Ventrículo. 6. Túbulos de Malpighi. I. Título.

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

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas sem ferrão Scaptotrigona postica LATREILLE, 1807 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)

AUTORA: HELLEN MARIA SOARES
ORIENTADOR: Prof. Dr. OSMAR MALASPINA
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI

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

Prof. Dr. OSMAR MALASPINA
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Elaine C. M. Silva Zacarin
Profa. Dra. ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN
UFSCar - Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba/SP

Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Data da realização: 25 de abril de 2012.

Dedico à minha mãe Maria Aparecida Lopes Soares, ao meu irmão Willian Augusto José Soares e ao meu namorado Rodrigo dos Santos Lima, pessoas muito importantes para mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina e a Profª. Drª. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, pela orientação, atenção e paciência diante de minhas dúvidas.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo e à FAPESP e CNPQ pelo suporte financeiro à pesquisa realizada.

À Cynthia R. O. Jacob, pela ajuda e incentivo diante das dificuldades. Ter você ao meu lado foi importante para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Clara, Rodrigo, Stephan, Andrigo, Priscila, Thaisa e Rafael pela convivência, amizade, auxílio, discussões e apoio.

Ao Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, ao Centro de Estudos de Insetos Sociais e ao laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica (LBEZ-CEIS) pelo apoio técnico fornecido.

Aos técnicos Sérgio, Gerson, Antônio, Monika, Pablo, Ita e Marcela pela disponibilidade em ajudar e pela gentileza com que atenderam as minhas necessidades.

À toda a minha família, principalmente ao meu irmão, Willian, aos meus pais, Ariovaldo e Maria Aparecida, e aos meus avós maternos Arlindo e Maria de Lourdes, pela confiança e pelo amor incondicional.

Ao Rodrigo, amigo e namorado, por sua constante ajuda e paciência com que acompanhou todas as etapas deste trabalho, por não ter permitido que eu me dobrasse as dificuldades, por dividir comigo os fracassos e os sucessos, pelo jeito bonito com que me vê, pelo amor que compartilhamos.

À Leila M. Stávale, amiga que mesmo distante sempre esteve presente e me encorajou nos nas dificuldades. Saudades de você.

À todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho e me ajudaram a ter sucesso nessa etapa.

Agradeço à Deus.

"O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem."

Guimarães Rosa

RESUMO GERAL

Em todo o mundo o declínio de colônias de *Apis mellifera* é motivo de preocupação, por isso muitos trabalhos tem mostrado os efeitos adversos de inseticidas para esta espécie. Estudos toxicológicos são raros para as abelhas sem ferrão, embora o Brasil possua grande diversidade de meliponíneos. O inseticida imidacloprido é agonista da acetilcolina e age nos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos provocando, em doses subletais, deficiência na aprendizagem e na formação de memória. Este trabalho determinou a toxicidade do imidacloprido para a espécie sem ferrão *Scaptotrigona postica*, através da dose letal média (DL_{50}) tópica e da concentração letal média (CL_{50}) de ingestão. A DL_{50} tópica foi de 25,20 (24 horas) e 24,46 (48 horas) ng i.a./µL/abelha e a CL_{50} de ingestão foi 42,50 (24 horas) e 14,28 (48 horas) ng i.a./µL dieta. A partir dos resultados de CL_{50}, duas concentrações subletais, a concentração letal e uma concentração acima da letal foram escolhidas para realização das análises dos efeitos citotóxicos do imidacloprido sobre os corpos pedunculados, o ventrículo e os túbulos de Malpighi. Sintomas de intoxicação como hiperexcitação, paralisia e desorientação foram notados para as abelhas que tiveram sua dieta contaminada com imidacloprido. Nos corpos pedunculados de abelhas tratadas observou-se dilatação dos espaços intercelulares, marcação significativa de caspase-3 e alterações celulares como condensação cromatínica e degeneração mitocondrial que podem estar relacionados com o processo de morte celular por apoptose. Embora alterações metabólicas não tenham sido notadas no órgão alvo do imidacloprido, o cérebro, os órgãos que participam de sua metabolização e excreção, o ventrículo e os túbulos de Malpighi respectivamente, tiveram seu metabolismo aumentado indicando a tentativa de inativação do composto tóxico presente no organismo. Alterações morfológicas, como a presença de núcleos picnóticos, células eliminadas no lúmen, rompimento celular, entre outras, também foram notadas no ventrículo e nos túbulos de Malpighi de abelhas tratadas com o inseticida.

Palavras chave: neonicotinóides, meliponíneos, corpos pedunculados, ventrículo, túbulos de Malpighi.

EVALUATION OF THE EFFECTS OF THE INSECTICIDE IMIDACLOPRID ON STINGLESS BEES *Scaptotrigona postica* LATREILLE, 1807 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI).

GENERAL ABSTRACT

The decline of *Apis mellifera* colonies has become a concern worldwide. Several studies have shown the negative effects of insecticides on this species. Toxicological studies on stingless bees, on the other hand, are rare despite the great diversity of meliponines in Brazil. The insecticide imidacloprid acts agonistically on nicotinic acetylcholine receptors of insects. In sublethal doses, this compound impairs learning performance and memory formation in insects. This study determined the toxicity of imidacloprid for the stingless bee *Scaptotrigona postica*, based on the median lethal dose (LD_{50}) by topical application and median lethal concentration (LC_{50}) by ingestion. The topical LD_{50} was 25.20 (24 hours) and 24.46 (48 hours) ng i.a./µL/bee and the ingestion LC_{50} was 42.50 (24 hours) and 14.28 (48 hours) ng i.a./µL diet. Based on the results of LC_{50} two sublethal concentrations, the lethal concentration, and a concentration above the lethal concentration were chosen for the analysis of the cytotoxic effects of imidacloprid on the mushroom bodies, midgut, and Malpighian tubules of *Scaptotrigona postica*. Symptoms of intoxication, such as hyperexcitation, paralysis, and disorientation, were observed in bees fed a diet with imidacloprid. The mushroom bodies of treated bees exhibited dilated intercellular spaces, staining for caspase-3, and cellular alterations, such as chromatin condensation and mitochondrial degeneration, that could be associated with the cell death process by apoptosis. Although metabolic changes were not observed in the target organ of imidacloprid, the brain, the organs involved in its metabolization and excretion, the midgut and Malphigian tubules, respectively, exhibited increased metabolism in the attempt to inactivate the toxic compound present in the organism. The morphological alterations, such as the presence of pyknotic nuclei, disposed cells in the lumen, cellular rupture, among others, were also observed in the midgut and Malphigian tubules of bees exposed to this insecticide.

Keywords: neonicotinoids, meliponines, mushroom bodies, midgut, Malphigian tubules.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO GERAL 10

2. OBJETIVOS GERAIS 17

3. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS 18

4. ARTIGO 1 19

Toxicidade do inseticida imidacloprido para as abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).

5. ARTIGO 2 33

Citotoxicidade do imidacloprido para os corpos pedunculados, ventrículo e túbulos de Malpighi de abelhas *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).

6. ARTIGO 3 59

Imunofluorescência e ultraestrutura dos corpos pedunculados de abelhas sem ferrão, *Scaptotrigona postica* (LATREILLE, 1807), tratadas por ingestão com o inseticida imidacloprido.

7. DISCUSSÃO GERAL 76

8. CONCLUSÕES GERAIS 81

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 82

1. INTRODUÇÃO GERAL

A agricultura moderna é cada vez mais dependente do uso de produtos químicos para controlar pragas e assegurar a produtividade (DESNEUX et al., 2007). Segundo a Associação Nacional de Defesa Vegetal/ANDEF (2009), o Brasil ocupa o primeiro lugar mundial em consumo de agrotóxicos. Anualmente são consumidas mais de 300 mil toneladas de produtos formulados, o que representa cerca de 130 mil toneladas de ingredientes ativos (SPADOTTO et al., 2004).

O uso indiscriminado de agrotóxicos associado com agentes patogênicos e urbanização tem aumentado a preocupação dos especialistas com os possíveis efeitos destes fatores sobre as populações de abelhas. Malaspina e Silva-Zacarin (2006) sugeriram que a redução no número de espécies de abelhas é decorrente do aumento da atividade de forrageamento desses insetos em culturas tratadas com pesticidas.

Em todo o mundo tem-se observado o declínio de colônias de abelhas *A. mellifera*. Segundo Neumann e Carreck (2010), nos últimos anos houve um aumento de perdas repentinas de colônias de abelhas nos Estados Unidos da América (EUA). Ellis et al. (2010) relataram que, no outono de 2006, os apicultores dos EUA perderam de 30 a 90% de suas colônias. Estes eventos ainda não foram oficialmente constatados no Brasil (ROCHA, 2008), porém nas regiões Sudeste, Centro-Oeste (WESTIN, 2007) e Sul (SATTLER, 2008; MALASPINA, 2012 informação pessoal) o sumiço das abelhas começa a ser motivo de preocupação.

VanEngelsdorp et al. (2009) caracterizaram o fenômeno do sumiço das abelhas, conhecido como desordem no colapso de colônias (colony collapse disorder). As principais características desse distúrbio levantadas pelos autores foram o desaparecimento de abelhas operárias adultas e uma notável falta de indivíduos mortos dentro ou próximos da colônia afetada. Tais dados corroboram os efeitos subletais dos agrotóxicos que não causam a morte das abelhas, porém, induzem a mudanças no comportamento, reprodução, orientação e comunicação que afetam toda a colônia (THOMPSON, 2003).

Alguns autores atribuem a desordem no colapso de colônias aos inseticidas neonicotinóides, como imidacloprido, tiametoxam e clotianidina (CHAUZAT et al., 2006; CUTLER; SCOTT-DUPREE, 2007; HO; CUMMINS, 2007; OLDROYD, 2007; YANG et al., 2008).

Blacquière et al. (2012) reuniram dados disponíveis na literatura e concluíram que os neonicotinóides são potencialmente perigosos para as abelhas. Os autores avaliaram os riscos dos neonicotinóides para abelhas sociais *Apis mellifera* e *Bombus* sp. e para algumas espécies de abelhas solitárias em relação aos níveis residuais destes inseticidas encontrados no organismo dos insetos, nas plantas e produtos apícolas e aos efeitos negativos de doses letais e subletais.

Os neonicotinóides são agonistas da acetilcolina e ligam-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) localizados nos neurônios pós-sinápticos (BUCKINGHAM et al., 1997; SUCHAIL et al., 2004). Ao contrário da acetilcolina, que é hidrolisada pela acetilcolinesterase, esses compostos não são degradados imediatamente, portanto, os impulsos nervosos são transmitidos de forma contínua e levam a hiperexcitação do sistema nervoso do inseto (GALLO et al., 2002).

Para comprovar a hipótese de que o imidacloprido afeta a orientação e a capacidade das abelhas de retornarem à colônia, Bortolotti et al. (2003) testaram três concentrações subletais do inseticida (100 ppb, 500 ppb e 1000 ppb) em campo e constataram que quase todas as abelhas controle voltaram à colônia e revisitaram o alimentador entre 2 a 5 horas após a primeira visita. As abelhas alimentadas com a concentração de 100 ppb também retornaram a colônia, mas revisitaram o alimentador cerca de 24 horas após o consumo do alimento contaminado. Abelhas alimentadas com 500 ppb e 1000 ppb desapareceram após a alimentação e não foram mais vistas durante o período do experimento.

Em estudo com abelhas *A. mellifera*, Yang et al. (2008) notaram que abelhas tratadas oralmente com o inseticida imidacloprido tiveram atraso no tempo de revisitar uma fonte de alimento. Este atraso foi dependente da concentração de inseticida a qual as abelhas foram expostas, sendo que a partir da concentração de 1200 g/L muitas abelhas não retornaram a fonte de alimento ou a colônia.

O imidacloprido é considerado um inseticida sistêmico, ou seja, pode ser translocado pela seiva de uma parte da planta para outra (MARICONI, 1983; GALLO et al., 2002) sendo detectado em amostras de pólen e néctar (SCHMUCK et al. 2001; BONMATIN et al. 2003).

Rortais et al. (2005) analisaram a quantidade de imidacloprido ingerida por abelhas melíferas em diferentes estágios de desenvolvimento, a partir do consumo de néctar e pólen contaminados, e estimaram que larvas de operárias consomem nos primeiros 5 dias de desenvolvimento cerca de 0.3 ng de imidacloprido, larvas de

zangões consomem 0.5 ng nos primeiros 6 dias, operárias limpadoras consomem 0.2 ng em 10 dias, operárias produtoras de cera 0.5 ng em 6 dias, operárias nutridoras das larvas em desenvolvimento consomem de 1.3 a 1.9 ng em 8 dias, operárias de inverno consomem cerca de 3.8 ng em 3 meses e operárias forrageiras consomem de 0.3 a 0.5 ng por semana.

Os estudos sobre os efeitos adversos de inseticidas para as abelhas sem ferrão, como a *Scaptotrigona postica*, são escassos, enquanto que uma vasta bibliografia é encontrada para a espécie *A. mellifera*.

Os poucos trabalhos realizados, mostram que as abelhas sem ferrão são muito susceptíveis a ação dos pesticidas. Valdovinos Núñes et al. (2009) em estudo comparativo da toxicidade de pesticidas por aplicação tópica para as abelhas sem ferrão *Melipona beecheii, Trigona nigra e Nannotrigona perilampoides* mostraram que para as três espécies, operárias imaturas foram mais sensíveis aos pesticidas que as forrageiras. Os pesquisadores constataram ainda que para a espécie *M. beecheii*, as fêmeas foram comparativamente mais resistentes que os machos, porém, as rainhas foram menos resistentes que as operárias. Este estudo também testou a toxicidade de inseticidas neonicotinóides para a espécie *N. perilampoides* e constatou que o imidacloprido foi mais tóxico do que o tiametoxan e o tiacloprido.

As abelhas nativas, sem ferrão ou meliponíneos são encontradas tipicamente nas regiões tropicais e algumas regiões temperadas subtropicais. Essas abelhas possuem um ferrão atrofiado, o qual não possui função de defesa. A proteção dos ninhos em muitos desses himenópteros, como nos do gênero *Scaptotrigona*, se dá por ataques em massa levando vantagem em número sobre outros organismos. A trilha de cheiro exalada pela glândula mandibular dessas abelhas é o que garante tal estratégia de defesa (MICHENER, 1974; NOGUEIRA- NETO, 1997).

As abelhas sem ferrão estão divididas em duas tribos: Meliponini e Trigonini. A principal diferença entre elas está na construção de células reais. Na tribo Meliponini todas as abelhas se desenvolvem dentro de células de cria do mesmo tamanho, enquanto que na tribo Trigonini quase sempre células reais, maiores que as outras, são construídas para o desenvolvimento das rainhas (NOGUEIRA- NETO, 1997).

Nas espécies sociais de meliponíneos há uma divisão de trabalho entre os indivíduos da colônia. As rainhas e machos possuem função principalmente reprodutiva, enquanto que as operárias realizam tarefas para a manutenção do ninho, entre elas a nutrição da cria. Para a espécie *S. postica* a diferenciação entre as fêmeas, rainhas e

operárias, se dá pela quantidade de alimento ingerido durante o estágio larval (FREE, 1980; SANTOS; CRUZ- LANDIM, 2002).

Segundo Kerr et al. (1999), o Brasil possui a maior diversidade de abelhas sem ferrão do mundo, as quais podem representar até 90% dos polinizadores de um ecossistema. A frequente especialização dessas abelhas no uso da flora nativa tem papel vital na manutenção da vegetação brasileira. Estudos realizados na região de Manaus referentes à associação inseto-planta, especificamente entre meliponíneos e vegetais nativos, verificaram que a extinção de espécies de abelhas implicou na extinção de algumas espécies vegetais (ABSY et al., 1980).

Visto que as abelhas *S. postica* são importantes insetos polinizadores da flora nativa e que pequenas doses dos inseticidas, dentre eles o imidacloprido, levam a alterações comportamentais que comprometem a atividade destes indivíduos no ambiente, este trabalho teve por objetivo determinar a toxicidade do imidacloprido e avaliar seus efeitos sobre os corpos pedunculados, o ventrículo e os túbulos de Malpighi desta abelha sem ferrão.

Mudanças na atividade neuronal refletem a interação entre o organismo e o meio (CHEN et al., 2002), assim, o sistema nervoso foi uma das estruturas de foco deste trabalho.

O sistema nervoso dos insetos é organizado em sistema nervoso central e periférico. Além do cérebro, situado dorsalmente na cabeça, o sistema nervoso central é constituído pela cadeia nervosa ventral e pelo sistema estomogástrico (CHAPMAN, 1998).

O cérebro é constituído por regiões contendo os corpos celulares de neurônios, denominadas de somata, e as regiões que contêm os prolongamentos celulares, chamadas de neurólipas (CHAPMAN, 1998; BRANDT et al., 2005). Em abelhas adultas, o cérebro é formado pela fusão de três gânglios: o protocérebro, o deutocérebro e o tritocérebro.

No protocérebro estão localizados os corpos pedunculados, relacionados com a plasticidade comportamental das abelhas, que são centros de integração multimodal e recebem informações olfativas, visuais, gustatórias e provavelmente mecanossensoriais (KOMISCHKE et al., 2005; KIYA et al., 2007).

Há evidências de que os corpos pedunculados do cérebro dos insetos sejam equivalentes ao hipocampo dos vertebrados em relação à aprendizagem temporal (CAPALDI et al., 1999).

Os corpos pedunculados, também conhecidos como corpos de cogumelo, são estruturas pares constituídas de neurópilas em forma de cálice dos quais partem pedúnculos em direção ao lobo alfa (região que processa toda a informação proveniente das outras regiões do cérebro) (RYBAK; MENZEL, 1993; FARRIS et al.,1999; ROAT, 2008). Os cálices são preenchidos com os corpos celulares de neurônios chamados de células de Kenyon. As células de Kenyon são diferenciadas em compactas internas, não compactas e compactas externas, de acordo com a quantidade de citoplasma em relação ao núcleo (FARRIS; SINAKEVITCH, 2003; FAHRBACH, 2006).

Além da análise dos corpos pedunculados do sistema nervoso central, a toxicidade do imidacloprido também foi avaliada para o ventrículo, que embora não seja o principal alvo deste composto é um dos primeiros tecidos atingido quando o inseticida é administrado via ingestão.

O sistema digestório dos insetos é dividido em três regiões: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. No intestino médio, também designado de mesêntereo ou ventrículo, ocorre a maior parte da digestão e absorção das substâncias ingeridas. (ZERBO, 2003). Nas abelhas, o ventrículo é um tubo cilíndrico, grosso e longo, que se dobra em forma de arco no interior da cavidade abdominal (CRUZ-LANDIM, 2009).

A parede do ventrículo é formada pelo epitélio e por fibras musculares viscerais. As fibras musculares são delicadas e distribuem-se em três camadas formando uma rede fenestrada. Dois tipos celulares constituem a parte básica e funcional do epitélio: as células principais, digestivas ou enterócitos, responsáveis pela secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes, e as células regenerativas, destinadas a substituir as células principais quando estas são eliminadas por desgaste (CRUZ-LANDIM et al., 1996). Além das células descritas acima, células endócrinas e células responsáveis pela síntese da membrana peritrófica são encontradas no epitélio (JIMENEZ; GILLIAM, 1990; CRUZ-LANDIM et al., 1996). A membrana peritrófica consiste numa camada acelular que protege o epitélio contra a ação mecânica do alimento (SNODGRASS, 1935; TERRA; FERREIRA, 1981; CHAPMAN, 1998; TERRA, 2001). Segundo Jimenez e Gilliam (1990) são as células da região anterior do ventrículo que secretam a maior parte da membrana peritrófica.

Jimenez e Gilliam (1990) e Ferreira e Cruz-Landim (2004) discutiram que as diferenças encontradas entre as células epiteliais ao longo do intestino médio de *A. mellifera* sugerem uma regionalização da absorção dos alimentos e da produção de

enzimas. Segundo os autores, as enzimas são sintetizadas na região posterior do intestino médio e a absorção é feita principalmente na região central. No entanto, para *S. postica*, Zerbo (2003) descreve que a síntese e absorção dos alimentos são feitas por todas as células principais do intestino médio, enquanto a absorção de água é feita apenas em determinadas regiões.

Como os túbulos de Malpighi são os responsáveis pela manutenção da homeostase e eliminação de produtos potencialmente tóxicos do organismo (BERRIDGE, 1969), os efeitos adversos do imidacloprido também foram analisados sobre estas estruturas do sistema excretório.

O sistema excretório das abelhas é formado por túbulos de Malpighi de fundo cego, livres na hemolinfa e que desembocam numa região de transição entre o ventrículo e o intestino posterior, o piloro (CHAPMAN, 1998; CRUZ- LANDIM, 2009).

Os túbulos são formados por uma camada de células epiteliais e ao longo de seu comprimento a forma das células e o conteúdo da luz mudam, mas de uma maneira geral, a região apical das células é constituída pelas microvilosidades, enquanto que a região basal apresenta numerosas invaginações (BRADLEY, 1985; CRUZ-LANDIM, 1998).

As substâncias a serem excretadas, acumulam-se inicialmente na porção basal das células dos túbulos de Malpighi formando vesículas que, posteriormente, serão exocitadas na porção apical e eliminadas na luz do túbulo (SNODGRASS, 1935). O produto de excreção produzido pelo túbulo de Malpighi flui para o intestino e acumula-se no reto. Este produto de excreção é constituído de resíduos, como uratos, compostos orgânicos, água e íons. Parte destas substâncias, principalmente a água, é reabsorvida no percurso até o reto e nas papilas retais (DOW, 1981; CRUZ- LANDIM, 2009).

Tanto para os túbulos de Malpighi, como para os corpos pedunculados e o ventrículo, a citotoxicidade do inseticida imidacloprido foi verificada através do uso de biomarcadores.

Segundo Depledge e Fossi (1994) e Depledge et al. (1995), biomarcadores são respostas biológicas aos estressores, como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais. Neste trabalho, os biomarcadores utilizados foram: alterações morfológicas e celulares avaliadas por microscopia de luz e eletrônica de transmissão e marcação das enzimas citocromo c oxidase (CO) e caspase-3 que indicam atividade celular e apoptose, respectivamente.

A CO é um complexo transmembrana que compõe a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. A CO recebe elétrons da citocromo c e os transfere para o oxigênio formando moléculas de água. À medida que os elétrons vão sendo transferidos, prótons são bombeados para o espaço intramembranoso e utilizados pela ATP sintase para a geração de ATP (ALBERTS et al., 2006). Uma vez que a CO faz parte do processo de respiração mitocondrial, sua marcação, princípio da técnica histoquímica utilizada, indica a atividade enzimática das mitocôndrias e, portanto, a atividade metabólica da célula.

Armengaud et al. (2001) evidenciaram que compostos agonistas dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) do cérebro de abelhas *Apis mellifera* induziram a maior marcação de CO nas células nervosas, ativando assim o metabolismo celular, enquanto que antagonistas dos nAChRs provocaram diminuição no metabolismo celular (pouca marcação de CO). Esses autores afirmaram, ainda, que o imidacloprido ativou o metabolismo celular nos corpos pedunculados e não o fez com tanta eficácia nos lobos antenais.

Caspases são proteases que possuem cisteína em seu sítio ativo e podem clivar outras proteínas com resíduos de aspartato. As caspases estão divididas em dois grupos: caspases iniciadoras e caspases efetoras. Caspases iniciadoras, como a caspase-8 e caspase-9, clivam as formas inativas de caspases efetoras, ativando-as, enquanto que as caspases efetoras, como a caspase-3 e caspase-7, clivam outros substratos proteicos da célula resultando no processo apoptótico (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997; GRIVICICH et al., 2007).

A apoptose é um tipo de morte celular geneticamente programada e muito conservada nos organismos multicelulares, na qual células desnecessárias, danificadas ou potencialmente perigosas são eliminadas durante o desenvolvimento e homeostase tecidual ou sob alguma condição atípica do organismo, como doenças (HACKER, 2000; ASHE; BERRY, 2003).

Uma vez que o parâmetro mortalidade é limitado, pois nem sempre a intoxicação leva os indivíduos à morte (WALKER, 1998), os biomarcadores tem se mostrado uma importante ferramenta na avaliação de efeitos de compostos tóxicos em estudos de laboratório (MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006) e dessa forma, constituíram a base metodológica deste trabalho.

2. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve por objetivo:

1- Determinar a toxicidade tópica e oral do imidacloprido para operárias da abelha *S. postica* por meio do estabelecimento da DL_{50} e da CL_{50}, respectivamente.

2- Avaliar os efeitos deste inseticida para abelhas *S. postica*, através de análises morfológicas e histoquímicas (marcação da citocromo c oxidase e concentração crítica de eletrólitos) realizadas sobre as estruturas alvo deste composto, os corpos pedunculados do sistema nervoso, assim como nos órgãos responsáveis pela sua metabolização, o ventrículo, e excreção, os túbulos de Malpighi.

3- Obter dados complementares para melhor compreender e identificar os danos causados pelo imidacloprido para os neurônios, a partir de análises ultraestruturais e de imunofluorescência para caspase-3 dos corpos pedunculados, uma vez que as células de Kenyon são pequenas e sua visualização em microscópio de luz é limitada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

3.1. Material biológico

Favos de cria de abelhas *S. postica* de três colônias diferentes foram coletados no meliponário do Departamento de Biologia - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- Campus de Rio Claro e acondicionados em bandejas plásticas (45 X 28 X 75 cm) em estufa BOD com suprimento de água e alimento, temperatura de 28 ± 1°C e umidade relativa de 70% (condições correspondentes ao interior da colônia de *S. postica*). Nas condições descritas, as abelhas emergiram e cerca de 4 ± 1 dia depois foram utilizadas nos experimentos.

3.2. Metodologias

As metodologias realizadas neste trabalho estão listadas a seguir e os detalhes sobre cada uma delas podem ser encontrados nos respectivos artigos:

3.2.1. Determinação da dose letal média tópica (DL_{50}) (OECD, 1998a)- Artigo 1.

3.2.2. Determinação da concentração média por ingestão (CL_{50}) (OECD, 1998b)- Artigo 1.

3.2.3. Microscopia de luz:

- Hematoxilina de Harris e Eosina (HE) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)- Artigo 2.

- Concentração Crítica de Eletrólitos (Critical eletrolyte concentration – CEC) (MELLO et al., 1993)- Artigo 2.

- Marcação da enzima citocromo oxidase (ARMENGAUD et al., 2001)- Artigo 2.

- Marcação da enzima caspase-3 (CHEN et al., 2010)- Artigo 3.

3.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão (ROAT, 2008)- Artigo 3.

4. ARTIGO 1

TOXICIDADE DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO PARA AS ABELHAS SEM FERRÃO *Scaptotrigona postica* LATREILLE, 1807 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI).

SOARES, H. M; JACOB, C. R. O; CARVALHO, S; NOCELLI, R. C. F; MALASPINA, O.

RESUMO

As abelhas sem ferrão, como a *Scaptotrigona postica*, são importantes agentes polinizadores de plantas nativas e cultivadas. A diminuição desses insetos se dá por ação antrópica, principalmente pelo uso indiscriminado de inseticidas como, por exemplo, o imidacloprido. Este composto é uma neurotoxina que interfere na ação dos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos levando a hiperexcitação e morte. A partir do protocolo oficial da OECD (1998a), este trabalho determinou a toxicidade aguda do imidacloprido medida pela dose letal média (DL_{50}) como uma ferramenta para a avaliação dos efeitos deste inseticida. O inseticida foi administrado topicamente a fim de representar a exposição que ocorre no campo. A DL_{50} registrada foi de 25,21 ng i.a./abelha em 24 horas e de 24,46 ng i.a./abelha em 48 horas. Por ser um inseticida sistêmico, o imidacloprido pode também ser encontrado no pólen e no néctar das plantas, assim, o tegumento não é a única rota de exposição das abelhas aos pesticidas, mas também a ingestão de pólen e néctar contaminados. Neste caso a toxicidade oral do composto foi medida pela concentração média letal (CL_{50}) que em 24 horas foi de 42,50 ng i.a./µL dieta e em 48 horas foi de 14,28 ng i.a./µL dieta.

Palavras-chave: CL_{50}, DL_{50}, neonicotinóides, mortalidade, meliponíneo.

INTRODUÇÃO

As abelhas são os principais agentes polinizadores de plantas silvestres ou cultivadas (CASTRO et al., 2006). A interação entre abelhas e plantas garante as primeiras o desenvolvimento da colônia, pois o pólen e o néctar são as principais fontes de proteínas e carboidratos desses insetos, e aos vegetais sucesso na reprodução cruzada, aumento na variabilidade genética e uma consequente otimização na produção de frutos e sementes (KEARNS; INOUYE, 1997; BRITTAIN; POTTS, 2011).

As abelhas sem ferrão são as responsáveis por 30% da polinização da Caatinga e do Pantanal e por até 90% da polinização de algumas manchas da Mata Atlântica e Amazônia (KERR et al., 1999; KERR et al., 2001). Nas áreas de cultivo, essas abelhas se destacam na polinização de algumas culturas como melancias (*Citrulus lanatus* L.), cebola (*Allium cepa* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), café (*Coffea arabica* L.), entre outras (MACIEIRA; PRONI, 2004).

Embora importantes, as abelhas sem ferrão encontram-se em processo acelerado de desaparecimento devido ao uso de inseticidas que afetam meliponários e colônias silvestres, além da fragmentação das áreas florestais, das queimadas, do desmatamento e outras ações humanas (KERR et al., 2001).

A avaliação da letalidade dos inseticidas em laboratório pode ser feita por meio de testes de dose ou concentração letal (respectivamente DL e CL). DL quando se trabalha com uma quantidade conhecida de inseticida que entra em contato de uma só vez com o inseto e CL quando os insetos são expostos à substância tóxica em uma determinada concentração por um período de tempo (CAMPOS; ANDRADE, 2001). Nesses testes, os inseticidas são administrados tópica ou oralmente sendo o tegumento e o trato digestório as respectivas rotas de entrada do inseticida no organismo (PEREIRA, 2010).

O imidacloprido é um inseticida neurotóxico da família dos neonicotinóides que atuam nas sinapses do sistema nervoso central dos insetos imitando a ação da acetilcolina e competindo com este neurotransmissor pelos receptores nicotínicos. Diferentemente do que acontece com a acetilcolina, a ligação dos neonicotinóides com os receptores de acetilcolina é persistente e causa a hiperexcitabilidade pela transmissão contínua do impulso nervoso (FARIA, 2009).

Embora o Brasil possua uma elevada diversidade de abelhas sem ferrão (mais de 400 espécies identificadas) (PEREIRA, 2012), endêmicas das regiões tropicais, a

espécie *Apis mellifera* é tida como modelo de diversos estudos devido à capacidade de adaptação destas a diferentes habitats, à facilidade de manutenção de colônias em laboratório e ao valor econômico agregado ao mel, cera, propólis e outros subprodutos de uso farmacológico (CAMARGO; STORT, 1973; FREE, 1980).

Na literatura constam diferentes dados de toxicidade do imidaclopido para *A. mellifera*: DL_{50} oral (48h)= 3,70 – 40,90 ng/abelha e DL_{50} tópica (48h)= 59,70 -242,60 ng/ abelha (SCHUMUCK et al., 2001); DL_{50} oral (48h)= 41 – >81 ng/abelha e DL_{50} tópico (48h)= 49 – 102 ng/abelha (NAUEN et al., 2001); DL_{50} oral (48h)= 41 - >81ng/abelha e DL_{50} tópico (48h)= 42 – 104 ng/abelha (SCHUMUCK et al., 2003); DL_{50} oral (24 e 48h)= 5 ng/abelha e DL_{50} tópico (24 e 48h)= 24 ng/abelha (SUCHAIL et al., 2004); DL_{50} tópico= 17.90 ng/abelha (IWASA et al., 2004); DL_{50} oral (24h)= 80,90 ng/ abelha (ROSSI, 2008); entre outros.

Para as abelhas melíferas foi comprovado que pequenas doses de imidacloprido induzem a mudanças no comportamento das abelhas, diminuem a atividade de forrageamento e causam desorientação (MEDRZYCKI et al., 2003; YANG et al., 2008).

Como pouco se sabe sobre a tolerância e o comportamento de abelhas sem ferrão quando expostas aos inseticidas, este trabalho avaliou a sensibilidade da espécie *S. postica* ao inseticida imidacloprido como forma de embasar pesquisas posteriores.

A determinação da toxicidade do inseticida imidacloprido sobre abelhas sem ferrão da espécie *S. postica* foi realizada neste trabalho pelo estabelecimento da DL_{50} tópica e da CL_{50} por ingestão, ambas capazes de levar 50% da população testada à morte.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Favos de cria de abelhas *S. postica* foram coletados no meliponário do Departamento de Biologia - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- Campus de Rio Claro e acondicionados em bandejas plásticas (45 X 28 X 75 cm) em estufa BOD com suprimento de água e alimento, temperatura de 28 °C ± 1°C e umidade relativa de 70% (condições correspondentes ao interior da colônia de *S. postica*). Nas condições descritas, as abelhas emergiram e cerca de 4 ± 1 dia depois passaram pelo tratamento com inseticida.

Determinação da dose letal média tópica

Os procedimentos para a determinação da DL_{50} tópica basearam-se no protocolo da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 1998a, desenvolvido para *A. mellifera*.

O inseticida imidacloprido (grau de pureza 98,1%) foi inicialmente diluído em acetona, sendo realizadas sucessivas diluições no mesmo solvente para atingir as doses a serem aplicadas (1 ng i.a./µL, 5 ng i.a./µL, 20 ng i.a./µL, 40 ng i.a./µL, 60 ng i.a./µL, 100 ng i.a./µL e 150 ng i.a./µL).

As abelhas receberam uma gota de 1 µL da solução de inseticida na região do pronoto com o auxílio de uma micropipeta. Após a aplicação, as abelhas permaneceram por 5 minutos em uma bandeja plástica permitindo a evaporação do solvente. Depois de decorridos 5 minutos, as abelhas foram acondicionadas em potes plásticos descartáveis de 250 mL com suprimento de água e alimento *ad libitum* e permaneceram em estufa BOD, com temperatura a 28 ± 1 °C e umidade relativa de 70%. Foram montadas três repetições para cada dose testada, contendo 20 abelhas em cada repetição. As abelhas do grupo controle receberam uma gota de 1 µL contendo apenas acetona.

O número de abelhas mortas foi anotado 24 e 48 horas após a exposição ao inseticida e submetido à análise estatística do tipo dose-resposta, empregando-se um modelo do pacote drc (Analysis of Dose-Response Curves) (RITZ; STREIBIG, 2005), compilado pelo software R® (2011).

Determinação da concentração letal média por ingestão

Os procedimentos para a determinação da CL_{50} via oral basearam-se no protocolo da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 1998b, desenvolvido para *A. mellifera*.

O alimento oferecido consistiu numa mistura de mel, água, açúcar de confeiteiro, gelatina neutra comercial e suplemento alimentar (Aminomix pet®). Testes piloto foram realizados para confirmar o aceite do alimento pelas abelhas.

O inseticida imidacloprido (grau de pureza 98,1%) foi diluído em acetona e, posteriormente, sucessivas diluições foram realizadas no alimento para atingir as concentrações a serem oferecidas às abelhas (1 ng i.a./µL dieta, 5 ng i.a./µL dieta, 10 ng i.a./µL dieta, 20 ng i.a./µL dieta, 40 ng i.a./µL dieta, 80 ng i.a./µL dieta e 120 ng i.a./µL dieta).

Abelhas com 4 ± 1 dia de idade foram acondicionadas em potes plásticos descartáveis de 100 mL, previamente forrados com papel-filtro, com suprimento de água e permaneceram 2 horas em jejum em estufa BOD, temperatura a 28 ± 1°C e umidade relativa de 70%. Transcorrido o tempo do jejum, o alimento contaminado com imidacloprido foi oferecido *ad libitum* durante todo o período do experimento não sendo substituído por alimento sem contaminação. Foram montadas três repetições para cada dose testada, contendo 20 abelhas em cada repetição. As abelhas do grupo controle passaram pelos mesmos procedimentos que as tratadas, porém receberam alimento sem inseticida.

A mortalidade dos indivíduos foi registrada 24 horas e 48 horas após o oferecimento do alimento contaminado e submetida à análise estatística do tipo dose-resposta, empregando-se um modelo do pacote drc (Analysis of Dose-Response Curves) (RITZ; STREIBIG, 2005), compilado pelo software R® (2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A DL_{50} tópica foi de 25,20 ng imidacloprido/µL/abelha em 24 horas (tabela 1 e figura 1) e de 24,46 ng/µL/abelha em 48 horas (tabela 1 e figura 2).

Os valores de DL_{50} tópica obtidos foram próximos em 24 e 48 horas, uma vez que o inseticida foi aplicado em dose única. Pereira (2010), em trabalho com o neonicotinóide tiametoxam sobre as abelhas melíferas, registrou mortalidade de 2 a 8 horas após a aplicação tópica em dose única do inseticida e depois deste tempo nenhuma abelha morta foi encontrada, sugerindo a metabolização completa do composto tóxico nas primeiras oito horas de experimento.

Nauen et al. (2001) e Schumuck et al. (2003) indicaram que a DL_{50} tópica para abelhas *A. mellifera* variou de 49 a 102 ng/abelha e de 42 a 104 ng/abelha, respectivamente. Dessa forma, nota-se que as abelhas sem ferrão *S. postica* são mais susceptíveis ao imidacloprido do que as abelhas melíferas.

Estes dados corroboram o encontrado por Moraes et al. (2000) para o inseticida malation. Os autores compararam a toxicidade tópica em 48 horas deste inseticida para operárias de abelhas das espécies *Scaptotrigona tubiba* e *A. mellifera* e concluíram que *S. tubiba* foi mais susceptível ao composto que *A. mellifera*.

Trabalhos que compararam a tolerância entre espécies de abelhas sem ferrão e as africanizadas mostraram que as primeiras, geralmente, são mais sensíveis aos inseticidas. (MORAES et al., 2000; DEL SARTO, 2009).

Por ser um inseticida sistêmico, o imidacloprido pode também ser encontrado no pólen e no néctar das plantas, assim, o tegumento não é a única rota de exposição das abelhas aos pesticidas, mas também a ingestão de pólen e néctar contaminados (MARICONI, 1983; SCHMUCK et al. 2001; GALLO et al., 2002; BONMATIN et al. 2003).

A toxicidade oral do inseticida imidacloprido sobre as abelhas foi determinada, na literatura, pela DL_{50} estimando o consumo de dieta dos indivíduos. Nestes testes considera-se que cada abelha se alimentou de quantidades iguais não havendo certeza da quantidade de ingrediente ativo ingerido por cada uma delas. O valor da DL_{50} oral muitas vezes não condiz com a realidade, uma vez que este se baseia em estimativas. Dessa forma, este trabalho analisou a toxicidade do imidacloprido pela CL_{50}, que consiste na concentração presente no alimento capaz de matar metade das abelhas testadas, independente da quantidade ingerida por cada uma delas.

A CL_{50} obtida para *S. postica* foi de 42,50 ng de imidacloprido/µL dieta em 24 horas (tabela 1 e figura 3) e de 14,28 ng/µL em 48 horas (tabela 1 e figura 4). O valor de CL_{50} registrado para 48 horas foi menor do que o de 24 horas, resultado esperado uma vez que o alimento contaminado foi oferecido continuamente, ou seja, quanto mais tempo as abelhas permaneceram expostas ao alimento contaminado menor a dose requerida para causar 50% de mortalidade.

Embora não existam dados na literatura que avaliem a toxicidade oral do imidacloprido para as abelhas através da CL_{50}, trabalhos com outros compostos, utilizando essa ferramenta, mostram que os meliponíneos são mais susceptíveis que as abelhas melíferas. Para o inseticida fipronil a CL_{50} foi de 1,27 ng/µL dieta para *A. mellifera* (ROAT et al., 2010), 0,24 ng/µL para *S. postica* (JACOB, 2012) e 0,011 ng/µL para *Melipona scuttelaris* (LOURENÇO, 2012).

O inseticida imidacloprido é considerado altamente tóxico para as abelhas, pois a presença do grupo funcional nitro confere a este inseticida grande afinidade ao receptor nicotínico de acetilcolina e, portanto, alta toxicidade (TOMIZAWA; CASIDA, 2003).

Os sintomas resultantes da intoxicação por imidacloprido foram semelhantes para os tratamentos tópico e oral e incluem paralisia, tremores e morte. Observou-se que os sintomas apareceram primeiramente nas abelhas tratadas topicamente quando comparadas às abelhas que receberam imidacloprido via oral. Sintomas semelhantes foram observados para a espécie sem ferrão *M. scutellaris* tratada tópica e oralmente com o inseticida fipronil (LOURENÇO, 2012). Medrzycki et al. (2003) descreveram que doses subletais de imidacloprido administradas via oral diminuíram a mobilidade de abelhas *A. mellifera*. Faria (2009) mostra que tremores e morte são sintomas comuns de intoxicação por inseticidas neonicotinóides.

Nota-se que o imidacloprido é mais tóxico para as abelhas *S. postica* quando administrado via tópica, visto que a quantidade do inseticida requerida para matar 50% da população testada em determinado intervalo de tempo foi maior no tratamento oral, mesmo que a exposição ao alimento tenha sido contínua e a exposição tópica tenha sido em dose única.

Quando o tratamento se dá via oral, o inseticida passa por todo o trato digestório do inseto, cai na hemolinfa e só depois chega ao sistema nervoso. No trato digestório o composto pode sofrer diversos processos de metabolização antes de chegar ao alvo

diminuindo sua toxicidade, uma vez que uma gama de enzimas de detoxificação foram encontradas no ventrículo de abelhas (YU et al., 1984).

Tabela 1: Valores de toxicidade aguda do imidacloprido para *S. postica*.

Modo de exposição	Tempo (horas)	DL_{50}	CL_{50}	$IC_{95\%}$	χ^2	G.L.
Tópica	24	25,21	-	20,13 - 30,28	10,964	16
ng i.a./ abelha	48	24,46	-	13,71 - 35,22	0,1457	15
Ingestão	24	-	42,50	36,91 - 48,09	22,047	29
ng i.a./ µL dieta	48	-	14,28	11,87 - 16,68	36,734	28

(DL_{50}) dose letal média; (CL_{50}) concentração letal média; ($IC_{95\%}$) intervalo de confiança 95%; (x^2) qui-quadrado e (G.L.) grau de liberdade.

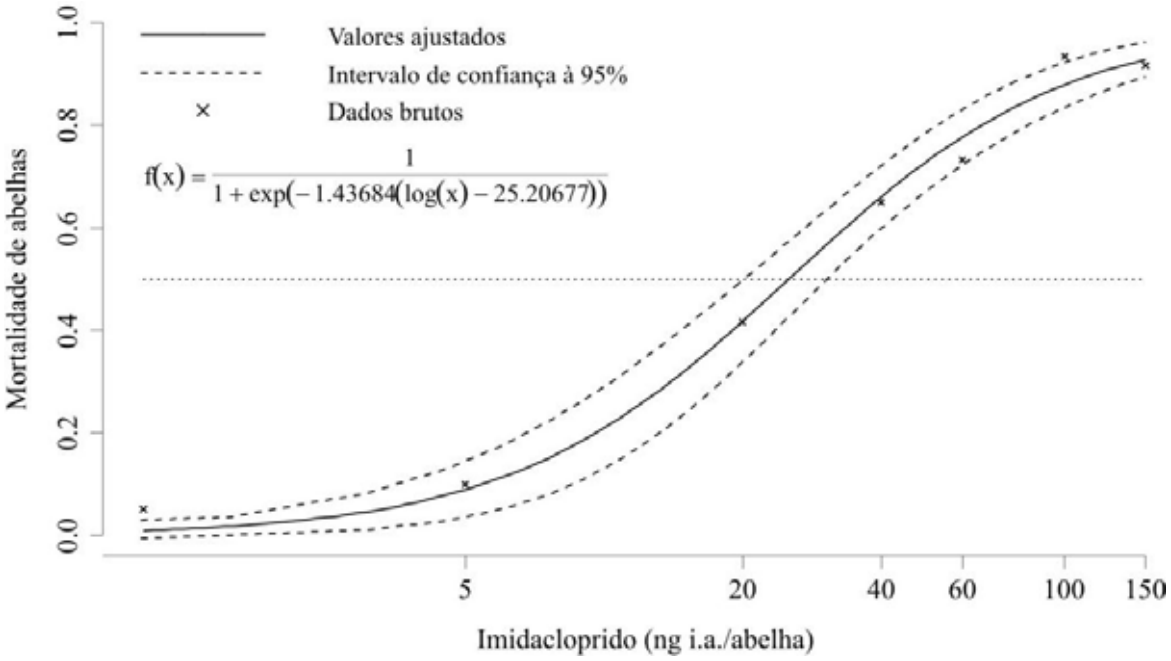

Figura 1: Curva estatística de DL_{50} indicando a mortalidade de abelhas 24 horas após a exposição tópica ao imidacloprido.

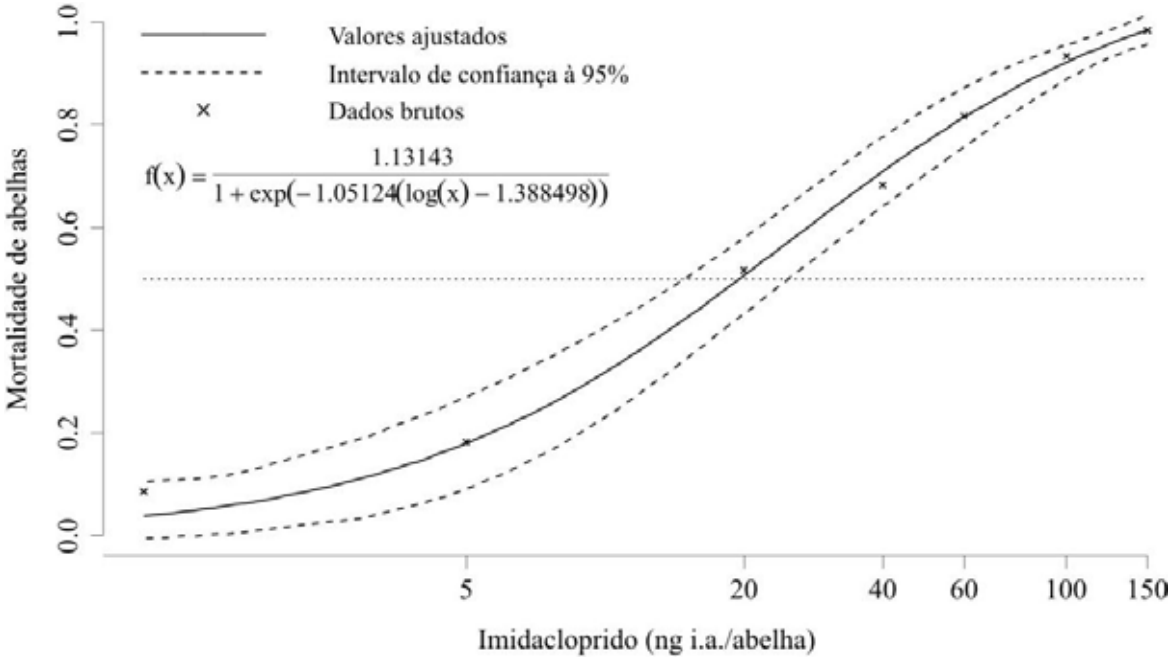

Figura 2: Curva estatística de DL_{50} indicando a mortalidade de abelhas 48 horas após a exposição tópica ao imidacloprido.

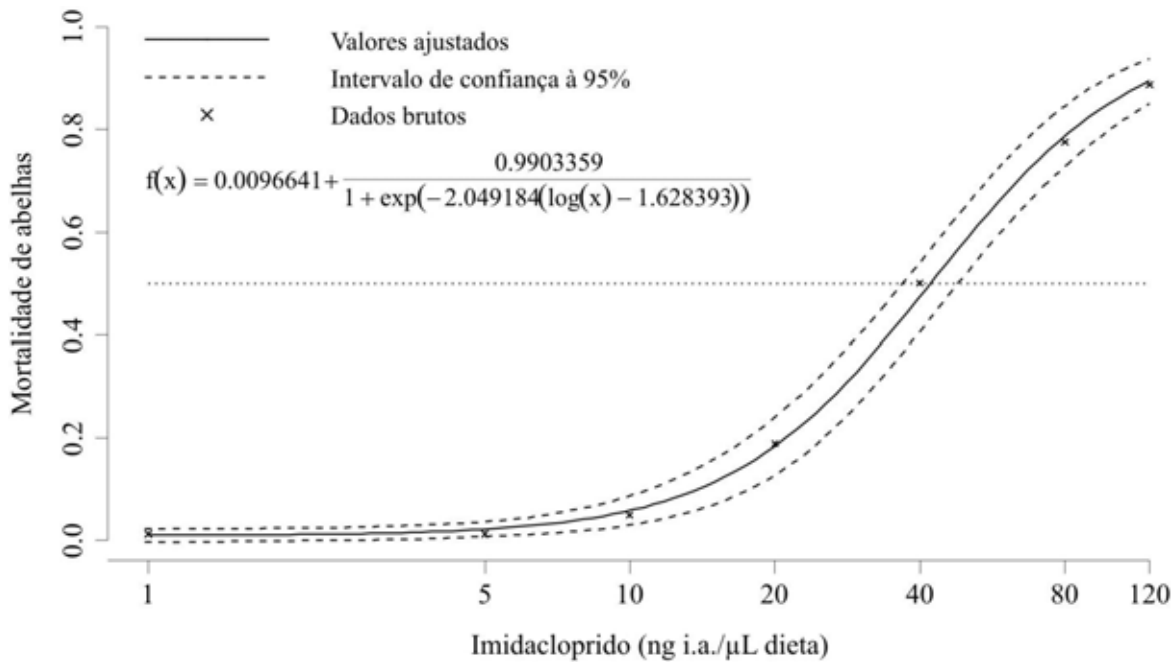

Figura 3: Curva estatística de CL_{50} indicando a mortalidade de abelhas em 24 horas de exposição oral ao imidacloprido.

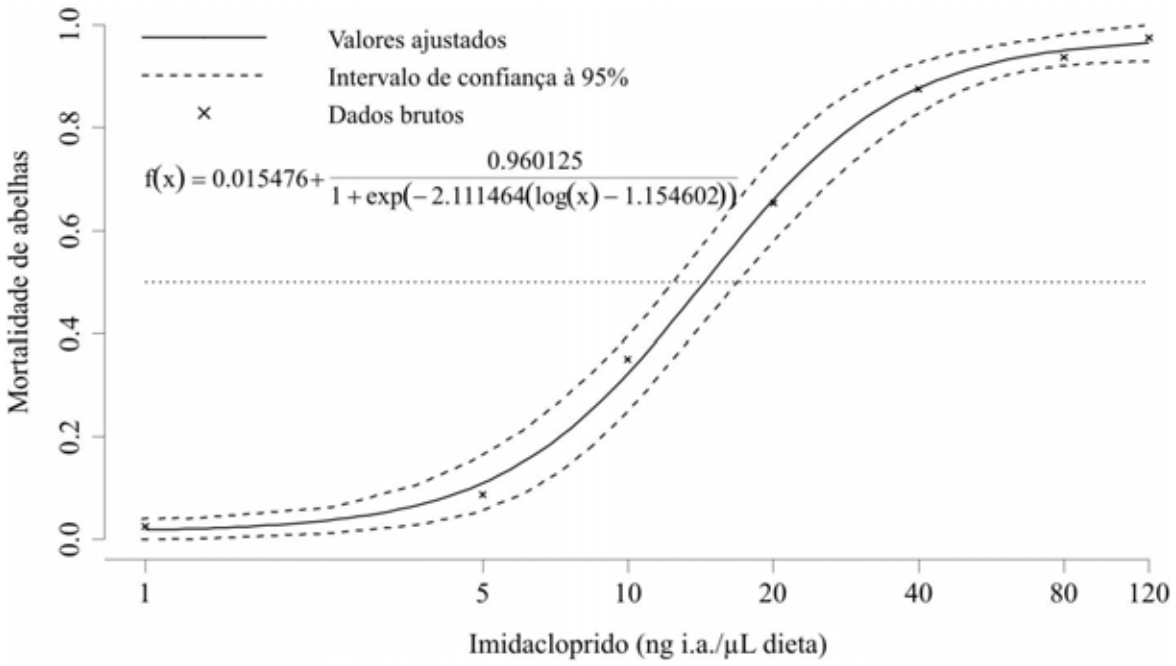

Figura 4: Curva estatística de CL_{50} indicando a mortalidade de abelhas em 48 horas de exposição oral ao imidacloprido.

CONCLUSÃO

A DL_{50} tópica do imidacloprido para *S. postica*, que foi de 25,20 (24 horas) e 24,46 (48 horas) ng i.a./µL/abelha, mostrou que as abelhas desta espécie são mais sensíveis à ação do inseticida do que as abelhas modelo *A. mellifera*.

A CL_{50} de ingestão, que foi de 42,50 (24 horas) e 14,28 (48 horas) ng i.a./µL dieta, apresentou-se como uma ferramenta confiável para avaliação da toxicidade oral do imidacloprido sobre as abelhas.

Os valores de DL_{50} tópica e de CL_{50} ingestão mostram que o imidacloprido é um inseticida tóxico para as abelhas sem ferrão da espécie *S. postica*, apresentando maior toxicidade quando administrado topicamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONMATIN, J. M; MOINEAU, I; CHARVET, R; FLECHE, C; COLIN, M. E; BENGSCH, E. R. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. **Analytical Chemistry**, Washington, v.75, n.9, p.2027-2033, mai. 2003.

BRITTAIN, C; POTTS, S. G; The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v.12, p.321 – 331, 2011.

CAMARGO, J. M. F; STORT, A. C. **A abelha *Apis mellifera* Linnaeus**. 2 ed. São Paulo: EDART, 1973, 79p.

CAMPOS, J; ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.35, n.3, p.232-236, 2001.

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

DEL SARTO, M. C. L. **Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae).** 2009. 64f. Tese de doutorado em Entomologia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

FARIA A. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, Guarapuava, v.5, n.2, p. 345-358, mai/ago. 2009.

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

GALLO, D; NAKANO, O; SILVEIRA NETO, S; CARVALHO, R. P. L; BAPTISTA, G. C; BERTI FILHO, E; PARRA, J. R. P; ZUCCHI, R. A; ALVEZ, S. B; VENDRAMIM, J. D; MARCHINI, L. C; LOPES, J. R. S; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, v.10).

IWASA, T; MOTOYAMA, N; AMBROSE, J. T; ROE, R. M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**, v. 23, p. 371–378. 2004.

JACOB, C. R. O. **Efeitos do inseticida fipronil sobre os corpos pedunculados de operárias de *Scaptotrigona postica* (LATREILLE, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponi)**. 2012. 85f. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

KEARNS, C. A; INOUYE, D. W. Pollinators, flowering plants, and conservation biology. Much remains to be learned about pollinators and plants. **Bioscience**, Washington, v.47, n.5, p. 297–307, 1997.

KERR, W. E; NASCIMENTO, V. A; CARVALHO, G. A. Preservation of native Brazilian bees: a question of historical and ecological conscience. **Ciência e Cultura - Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, São Paulo, v.51, p.390-393, 1999.

KERR, W. E; CARVALHO, G. A; SILVA, A. C; ASSIS, M. G. P. Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias estratégicas**, Brasília, n.12, p. 20 - 41, 2001.

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. 62f. Dissertação de metrado em Agricultura e Ambiente – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012.

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

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas.** 6.ed. São Paulo: Nobel, 1983. 305p. v.1.

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

MORAES, S. S; BAUTISTA, A. R. L; VIANA, B. F. Avaliação da Toxicidade Aguda (DL_{50} e CL_{50}) de Inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): Via de Contato**. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.29, n.1, p.31-37, 2000.

NAUEN, R; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U; SCHMUCK, R. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Pest Management Science,** West Sussex, v.57, p.577-586, jul. 2001.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 2, EFFECTS ON BIOTIC SYSTEMS. Honeybees, Acute Contact Toxicity Test, n.214, set. 1998a. 7p.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 2, EFFECTS ON BIOTIC SYSTEMS. Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, n.213, set. 1998b. 8p.

PEREIRA, A. M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas**. 2010. 124f. Tese de doutorado em Ciências Biológicas- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

PEREIRA, F. M. **Abelhas sem ferrão, a importância da preservação**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA, 2005. Disponível em: < http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2005/artigo.2005-12-29.3499364899/>. Acesso em: 10 mar. 2012.

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

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

ROAT, T. C; CARVALHO, S. M; NOCELLI, R. C. F; SILVA-ZACARIN, E. C. M; MALASPINA, O. Acute toxicity of fipronil to newly-emerged honeybee *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) Africanized. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 9, 2010, Ribeirão Preto. **Anais…** Ribeirão Preto: FFCLRP-USP, 2010.

SCHMUCK, R; SCHONING, R; STORK, A; SCHRAMEL, O. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers**. Pest Management Science,** West Sussex, v.57, p.225-238, set. 2001.

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

SUCHAIL, S; DEBRAUWER, L; BELZUNCES, L. P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science,** West Sussex, v.60, n.3, p. 291-296, mar. 2004.

TOMIZAWA, M; CASIDA, J. E. Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.48, p.339-364, 2003.

YANG, E. C; CHUANG, Y. C; CHEN Y. L; CHANG, L. H. Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, Lahan, v.101, n.6, p.1743-1748, 2008.

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

5. ARTIGO 2

CITOTOXICIDADE DO IMIDACLOPRIDO PARA OS CORPOS PEDUNCULADOS, VENTRÍCULO E TÚBULOS DE MALPIGHI DE ABELHAS *Scaptotrigona postica* LATREILLE, 1807 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI).

SOARES, H. M; JACOB, C. R. O; NOCELLI, R. C. F; MALASPINA, O.

RESUMO

Devido a atividade de forrageamento, as abelhas estão em contato direto com o ambiente e podem sofrer com os efeitos tóxicos do uso excessivo de pesticidas. Através de análises morfológicas e histoquímicas, este trabalho avaliou os efeitos citotóxicos do imidacloprido, inseticida muito utilizado desde 1991, sobre os corpos pedunculados, o ventrículo e os túbulos de Malpighi de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica.* Foi identificada entre as células dos corpos pedunculados do sistema nervoso central uma dilatação dos espaços intercelulares. Alterações metabólicas não apareceram nas células de Kenyon, embora sintomas de intoxicação como hiperexcitação, paralisia e desorientação tenham sido registrados para as abelhas que tiveram sua dieta contaminada com imidacloprido. Os órgãos que participam da metabolização e excreção deste inseticida, ventrículo e túbulos de Malpighi, sofreram com seu efeito tóxico. No ventrículo de abelhas tratadas foi observado maior incidência de núcleos picnóticos e halos pericromatínicos e desorganização do epitélio, assim, conclui-se que o imidacloprido leva a danos no sistema digestório das abelhas. Nos túbulos de Malpighi o inseticida levou a perda do bordo em escova, inchaço celular e o aumento na incidência de núcleos picnóticos. Houve maior marcação de citocromo oxidase para o ventrículo e túbulos de Malpighi de abelhas tratadas indicando a tentativa de combater os efeitos tóxicos provocados pelo imidacloprido.

Palavras-chave: cérebro, sistema excretório, intestino, abelhas sem ferrão, neonicotinóide.

INTRODUÇÃO

A espécie *S. postica* (LATREILLE, 1807), popularmente conhecida como mandaguari, pertence à família Apidae e tribo Meliponini. Podem ser encontradas em todas as áreas de clima tropical e subtropical, estendendo-se desde o México até o Rio Grande do Sul (NOGUEIRA- NETO, 1997).

A importância dos estudos com os meliponíneos ou abelhas sem ferrão, como também são conhecidas, se dá pela especialização destas abelhas na polinização das fanerógamas brasileiras. De 30 a 80% destas plantas são polinizadas por uma ou mais espécies de abelhas sem ferrão, dependendo do bioma onde se encontram (KERR et al., 2001).

Por viverem em contato íntimo com a natureza pela coleta de pólen, néctar, água e resina para a colônia, as abelhas são continuamente expostas ao uso intensivo de agrotóxicos (WOLFF et al., 2008).

Os neonicotinóides são inseticidas sistêmicos, análogos da nicotina, que tiveram uma rápida expansão a partir do lançamento do imidacloprido (1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-nitro-2-imidazolidinimine), em 1991 (ELBERT et al., 2008). Esses compostos são seletivos aos receptores nicotínicos de acetilcolina do sistema nervoso dos insetos (nAChRs), apresentando baixa toxicidade para mamíferos (MATSUDA et al., 1998). Ao contrário da acetilcolina, o imidacloprido não é degradado pela acetilcolinesterase o que causa a hiperexcitação e morte do inseto.

Para detectar a ação de compostos tóxicos sobre as células de vários órgãos em labotarório, o uso de marcadores celulares (MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006), como a proteína citocromo c oxidase (CO), vem sendo utilizada (ARMENGAUD et al., 2001).

A CO é uma enzima terminal da cadeia transportadora de elétrons do processo de respiração mitocondrial formada, em eucariotos, por três subunidades codificadas pelo DNA mitocondrial (PRIDGEON et al., 2009). O princípio da técnica histoquímica para CO é baseado na atividade metabólica das células. Alterações na atividade celular induzem ao aumento na atividade respiratória e, consequentemente, ao aumento da atividade enzimática das mitocôndrias.

Neste trabalho, a atividade celular foi acompanhada nos corpos pedunculados, ventrículo e túbulos de Malpighi de abelhas sem ferrão da espécie *S. postica* tratadas oralmente com o inseticida imidacloprido.

Os corpos pedunculados, estruturas cerebrais responsáveis pela plasticidade comportamental das abelhas e pelo processamento de informações olfativas, visuais, gustatórias e mecanosensoriais, são constituídos pelas regiões do cálice, formada por corpos celulares de neurônios de associação, e do pedúnculo, formado pelos prolongamentos celulares. Os cálices são preenchidos com as células de Kenyon que consistem em pequenas células nervosas intrínsecas divididas em três grupos: as células de Kenyon compactas internas e externas e as células de Kenyon não compactas (FAHRBACH, 2006).

O envenamento das abelhas pode se dar por contato e/ou ingestão durante o forrageamento (MALASPINA; STORT, 1985) e principalmente por ingestão no interior da colônia. Dessa forma, o ventrículo, parte do sistema digestório considerada como estômago funcional dos insetos, constitui importante rota de entrada do inseticida no organismo.

O ventrículo das abelhas possui epitélio constituído principalmente de células prismáticas que se abrem na luz do órgão e apresentam microvilosidades na porção apical. Ao longo da porção apical do epitélio, junto às microvilosidades, existe uma camada protetora denominada membrana peritrófica. Além das células prismáticas, o epitélio é constituído de células regenerativas que se apresentam em conjunto formando os ninhos regenerativos (CRUZ-LANDIM, 2009).

Os túbulos de Malpighi são os responsáveis pela eliminação dos produtos tóxicos do organismo dos insetos e apresentam numerosas invaginações na porção basal que aumentam a superfície de contato dos túbulos com a hemolinfa do inseto, bordo em escova bem desenvolvido na porção apical e núcleos grandes e com nucléolos (BRADLEY, 1985).

O objetivo desta pesquisa foi identificar os possíveis danos causados pelo imidacloprido sobre as estruturas responsáveis pela cognição do inseto, corpos pedunculados, metabolização, ventrículo, e manutenção da homeostase, túbulos de Malpighi, através de análises morfológicas, detecção de nucléolos e ribonucleoproteínas e marcação da enzima CO.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico

Favos de cria de abelhas *S. postica* foram coletados no meliponário do Departamento de Biologia - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus de Rio Claro e acondicionados em bandejas plásticas (45 X 28 X 75 cm) em estufa BOD com suprimento de água e alimento, temperatura de 28 ± 1°C e umidade relativa de 70% (condições correspondentes ao interior da colônia de *S. postica*). Nas condições descritas as abelhas emergiram e cerca de 4 ± 1 dia depois passaram pelo tratamento com inseticida.

Tratamento e dissecção das abelhas

O inseticida imidacloprido (grau de pureza 98,1%) foi diluído em acetona e, posteriormente, sucessivas diluições foram realizadas no alimento para atingir as concentrações a serem oferecidas às abelhas (4,25 ng i.a./µL dieta, 21,25 ng i.a./µL dieta, 42,50 ng i.a./µL dieta e 85 ng i.a./µL dieta).

Antes do tratamento, as abelhas permaneceram 2 horas em jejum em estufa BOD, com temperatura a 28 ± 1°C e umidade relativa de 70%. Transcorrido o tempo do jejum, alimento contendo imidacloprido (nas doses descritas acima) foi oferecido às abelhas e ficou disponível até a dissecção. As abelhas permaneceram acondicionadas (20 abelhas por pote) com suprimento de água e alimento contaminado com imidacloprido *ad libitum* e coletadas para dissecção 1 hora, 4 horas, 24 horas e 48 horas.

As abelhas do grupo controle passaram pelos mesmos procedimentos que as tratadas, porém receberam alimento sem inseticida.

Parte do material coletado, após a fixação, foi incubado em meio de citocromo oxidase e parte seguiu direto para inclusão em historresina.

Marcação da enzima citocromo oxidase

Esta técnica foi realizada segundo procedimento metodológico descrito por Armengaud et al. (2001). Os materiais obtidos, a partir dos indivíduos coletados, foram dissecados e fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.1 M, por 1 hora. O fixador foi, então, substituído por tampão contendo 25% de sacarose e os materiais permaneceram nesta solução por 12 horas. Foi preparado um meio de incubação contendo citocromo c, diaminobenzidina e sacarose em tampão fosfato 0.1 M, no qual o

material foi incubado por 30 minutos. Decorrido este tempo, o material foi processado para microtomia e documentação fotográfica.

Microtomia e documentação fotográfica

Após fixação em paraformaldeído 4%, os materiais foram desidratados em uma série crescente de álcoois (15% a 95%). Posteriormente, o material foi transferido para a resina de embebição (overnight) e incluídos em historresina.

Os cortes foram realizados em micrótomo (Leica), com espessura de 6 µm, e colocados sobre lâminas histológicas. As lâminas pertencentes ao material que passou pela técnica histoquímica para citocromo oxidase foram fotografadas sem montagem, enquanto que as demais passaram pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE) ou de Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) foram montadas em DPX para a aquisição das imagens.

As fotomicrografias foram adquiridas no Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica do Centro de Estudos de Insetos Sociais da UNESP de Rio Claro-SP por meio de uma câmara digital, Olympus DP-71, adaptada a um microscópio, Olympus BX51, e a um computador Dell. Para a aquisição das imagens foi utilizado o software DP Controller. As imagens mais significativas foram escolhidas para representação no presente trabalho.

Hematoxilina de Harris e Eosina (HE) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris (10 minutos), lavadas em água corrente por 5 minutos e, a seguir, foram submetidas a uma solução aquosa de Eosina (5 minutos). Após uma nova lavagem em água corrente, as lâminas foram preparadas para a documentação fotográfica.

Concentração Crítica de Eletrólitos (Critical eletrolyte concentration – CEC) (MELLO et al., 1993).

Os cortes foram hidratados por 10 minutos em água destilada e corados por 20 minutos com azul de toluidina (pH=4,0). Posteriormente, as lâminas permaneceram por 7 minutos em solução de cloreto de magnésio 0,05M, foram lavadas em água destilada, secas e montadas para a documentação fotográfica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha das concentrações para os tratamentos das abelhas e posterior dissecção do cérebro, intestino e túbulos de Malpighi baseou-se na concentração letal (CL_{50}) estabelecida em 24 horas por Soares (2012). Foram escolhidas duas concentrações subletais (CL_{50}/10= 4,25 ng i.a./µL dieta e CL_{50}/2= 21,25 ng i.a./µL dieta), a concentração letal (CL_{50}= 42,50 ng i.a./µL dieta) e uma concentração acima da letal para controle positivo (CL_{50}X2= 85 ng i.a./µL dieta). A morfologia do cérebro, intestino e túbulos de Malpighi das abelhas tratadas foi comparada com a morfologia do cérebro, intestino e túbulos de Malpighi de abelhas do grupo controle que passaram pelos mesmos procedimentos laboratoriais, porém receberam alimento sem inseticida.

As estruturas cerebrais de foco deste estudo foram os corpos pedunculados (figura 1), nos quais foram evidenciados nucléolos periféricos no núcleo das células de Kenyon, sendo que as compactas internas apresentam essas estruturas em maior quantidade do que as não compactas mostrando que a atividade sintética nas primeiras é maior (figura 1B).

Dilatação dos espaços intercelulares apareceram nos corpos pedunculados dos tratamentos de 4,25 ng/µL (tabela 1 e figuras 1C e 2B) e 21,25 ng/µL (tabela 1 e figuras 1D e 2C), a partir de 4 horas de exposição, e de 42,50 ng/µL (tabela 1 e figuras 1E e 2D) e 85 ng/µL (tabela 1 e figuras 1F), a partir da primeira hora de exposição, em relação ao controle (tabela 1 e figuras 1A e 2A). Esses espaços dilatados podem representar uma perda de contato celular que indicaria a ocorrência de desorganização tecidual. Segundo Hacker (2000), as mudanças mais marcantes durante a apoptose são a reorganização dos limites externos da célula, a mudança de forma e o rompimento do contato com as células vizinhas no tecido.

A técnica de CEC foi realizada com intuito de verificar se além de nucléolos, cromatina condensada apareceria no núcleo dos neurônios. A coloração não mostrou condensação do material genético, mas confirmou a localização periférica dos nucléolos (figura 3).

Diferentemente do observado no presente estudo para a técnica de CEC, Stuchi (2009) detectou células nervosas com indícios de apoptose (condensação cromatínica), utilizando a mesma técnica, para duas espécies de abelhas sem ferrão, *Tetragonisca fiebrigi* e *Tetragonisca angustula*, tratadas por ingestão com o inseticida malation.

Não foi identificada uma marcação diferenciada de CO para os grupos tratados em relação ao controle (tabela 1), ou seja, o imidacloprido parece não ter alterado a atividade metabólica das células dos corpos pedunculados. A figura 4 mostra como a marcação para CO apareceu nas células de Kenyon.

Jacob (2012) comparou os efeitos do inseticida fipronil sobre os corpos pedunculados de abelhas sem ferrão e notou que abelhas tratadas topicamente com fipronil apresentaram corpos pedunculados com maior marcação de CO, porém, quando as abelhas foram tratadas por via oral os resultados se mostraram semelhantes aos deste trabalho, ou seja, a marcação permaneceu próxima a basal.

Quando o tratamento se dá via oral, o inseticida passa por todo o trato digestório do inseto, onde sofre metabolização, cai na hemolinfa, podendo ser excretado pelos túbulos de Malpighi, e só depois chega ao sistema nervoso. Dessa forma, pode ser que quantidades muito pequenas do composto chegaram ao sistema nervoso no tempo analisado e não causaram alterações que pudessem ser verificadas por microscopia de luz. Outro fato importante é a presença da barreira neuroglial no cérebro que possui função seletiva para a manutenção iônica do fluido neural e pode protegê-lo da entrada de substâncias potencialmente nocivas (HAWKINS; DAVIS, 2005; BANERJEE; BHAT, 2007).

Suchail et al. (2004) realizaram o tratamento oral de abelhas com imidacloprido em dose única e próxima a letal e acompanharam sua distribuição e metabolização em 72 horas. Os autores identificaram que a semi-vida do imidacloprido no organismo das abelhas foi de 5 horas, sendo o composto distribuído e metabolizado em todos os compartimentos avaliados (reto, intestino médio, cabeça, tórax e abdômen). Na cabeça o nível de imidacloprido foi cerca de 5% da dose ingerida durante as primeiras 4 horas, 2% entre 6 e 24 horas e quase não detectado em 24 horas. Os metabólitos, derivados de olefinas e 4-5-hidroxiimidacloprido, surgiram entre 24 e 30 horas após o tratamento.

Embora alterações metabólicas não tenham sido verificadas nos corpos pedunculados, sintomas comportamentais mostram a intoxicação das abelhas. Logo na primeira hora de exposição, as abelhas de todos os tratamentos apresentaram-se mais lentas, algumas com paralisia e desorientação.

Tais sintomas podem ter sido causados pelo imidacloprido e seus metabólitos ao atingirem o cordão nervoso ventral e não necessariamente o cérebro. Kostromytska et al. (2011) mostraram que o imidacloprido e outros inseticidas provocaram efeitos

neuroexcitatórios significativos no cordão nervoso de grilos da espécie *Scapteriscus vicinus*.

Os primeiros sintomas de agitação e tremores apareceram com 4 horas de exposição ao alimento e se acentuaram com 24 horas. As mortes das abelhas expostas às concentrações mais altas (42,50 ng/µL e 85 ng/µL) começaram a aparecer com 4 horas de exposição e chegaram a aproximadamente 50% para 42,50 ng/µL e 100% para 85 ng/µL em 24 horas. As abelhas tratadas com concentrações subletais e que permaneceram vivas em 48 horas apresentam-se desorientadas e agitadas.

Sintomas de paralisia e hiperexcitação foram descritos por Lambin et al. (2001) em estudo com *A. mellifera*. Eles aplicaram doses subletais de imidacloprido no tórax das abelhas e observaram que a atividade motora foi prejudicada nas doses de 2.5, 5, 10 e 20 ng/abelha (efeito maximizado 60 minutos após a aplicação) e favorecida pela dose de 1.25 ng/abelha (independentemente do tempo).

Kakamand et al. (2008) indicaram que os inseticidas deltrametrina, malation e tiametoxam quando ministrados via oral para abelhas melíferas começaram a provocar a morte dos indivíduos depois de 4 horas, com exceção da deltametrina que na dose de 10 ppm começou a matar as abelhas por volta de 2 horas após o tratamento. Para os autores a explicação da morte depois de horas de intoxicação está na dificuldade de alimentação e hidratação das abelhas pela paralisia do sistema digestório ou pelos danos provocados pelos inseticidas ao intestino.

O ventrículo das abelhas apresentou morfologia semelhante da descrita na literatura (CRUZ-LANDIM, 2009) (figuras 5A, 5B e 6A). Frequentemente, nas células digestivas foram identificadas projeções citoplasmáticas referentes à secreção apócrina, assim como grânulos de secreção com diferentes eletrondensidades (figuras 5C).

No intestino médio das abelhas do grupo controle e das abelhas tratadas, núcleos picnóticos (tabela 2 e figura 5D), halos pericromatínicos (tabela 2 figuras 5C e 6B) e eliminação de células para o lúmen (figuras 5E e 6C) foram observados como indícios de morte celular, uma vez que, as células digestivas possuem curto período de vida e constantemente são substituídas pela diferenciação de células regenerativas.

A incidência de núcleos picnóticos e halos pericromatínicos foi intensificada nos tecidos digestivos de abelhas tratadas em relação aos tecidos controle, principalmente após 4 horas de exposição ao inseticida (tabela 2).

Houve uma tendência à desorganização do epitélio digestivo conforme o aumento no tempo de exposição ao inseticida e a concentração à qual o inseto foi

submetido (tabela 2 e figura 5E). Essa desorganização é notada pelo desprendimento das células da membrana basal, pelo rompimento celular, pelo aumento do número de células eliminadas no lúmen e pela dificuldade de delimitação celular.

Dados semelhantes foram mostrados por Jesus (2007), Kakamand et al. (2008) e Rossi (2010) para operárias adultas de *A. mellifera* e por Cruz et al. (2010) para larvas desta mesma espécie. Os autores avaliaram a citotoxicidade de inseticidas, como imidacloprido, deltametrina, malation, tiametoxam, ácido bórico e fipronil sobre o trato digestório e descreveram que houve aumento de halos pericromatícos, núcleos picnóticos (JESUS, 2007; KAKAMAND et al., 2008; ROSSI, 2010; CRUZ et al., 2010), células eliminadas no lúmen, vacuolização citoplasmática (JESUS, 2007; KAKAMAND et al., 2008; ROSSI, 2010) e secreção apócrina aumentada (ROSSI, 2010) no ventrículo das abelhas tratadas quando comparado ao ventrículo das abelhas controle.

As células mais afetadas pelo tratamento com imidacloprido foram as prismáticas que estão em contato direto com o lúmen, porém, no tratamento com a concentração de 85 ng/µL por 4 horas, os ninhos de regeneração não aparecem corados, como os demais (tabela 2 e figuras 5F e 6D), podendo indicar que em altas concentrações de imidacloprido o intestino perde a capacidade de se recuperar dos desgastes sofridos.

Em pequenas concentrações as células danificadas pelos inseticidas podem se desintoxicar ou ser substituídas pelas células em regeneração, porém em altas concentrações de inseticidas as células não conseguem se desintoxicar com eficiência e as células regenerativas encontram-se alteradas impossibilitando a recuperação do epitélio (KAKAMAND et al., 2008).

A marcação para a enzima CO foi dependente da concentração aplicada, ou seja, quanto maior a concentração de imidacloprido à qual as abelhas foram expostas mais marcação apareceu nos tecidos digestivos (tabela 2). Porém, comparando as marcações no intestino de abelhas de mesmo grupo, diferenças significativas não foram notadas entre os tempos de exposição. A figura 7 mostra as marcações positivas para CO nas células do epitélio ventricular, evidenciadas principalmente próxima à porção basal, uma vez que os grânulos de secreção acumulados na porção apical interferem na identificação das marcações.

Por agirem ativamente na eliminação de substâncias não metabolizadas e/ou em excesso no organismo, os túbulos de Malpighi possuem um importante papel no processo de desintoxicação.

Os túbulos de Malpighi do grupo controle apresentaram características morfológicas típicas (figura 8A). Nas concentrações subletais (4,25 ng/µL e 21,25 ng/µL), as alterações morfológicas mais evidentes nos túbulos de Malpighi foram a presença de núcleos picnóticos (tabela 3 e figuras 8C) e certo grau de inchaço celular (tabela 3 e figuras 8B e 8C). Nas concentrações mais altas foi observado a perda do bordo em escova (tabela 3 e figuras 8D e 8F), aumento do volume citoplasmático e rompimento celular (tabela 3 e figura 8F). Notou-se o aparecimento de protuberâncias citoplasmáticas na porção basal e obstrução do lúmen decorrentes do inchaço nas células. O inchaço nas células e o rompimento celular são características descritas por Grivicich et al. (2007) para necrose. Tanto nas pequenas como nas maiores concentrações foram encontradas células eliminadas no lúmen (figuras 8B e 8E). As alterações morfológicas encontradas foram mais sutis nos tratamentos por uma hora com o imidacloprido do que naqueles que se estenderam por 4, 24 e 48 horas (tabela 3).

Alterações celulares como aumento na quantidade de núcleos picnóticos, eliminação de célula para o lúmen, homogeneização da coloração citoplasmática, vacuolização citoplasmática, obstrução do lúmen pelo inchaço celular, halos pericromatínicos e acúmulo de material amorfo, foram descritas para túbulos de Malpighi de *A. mellifera* tratadas oralmente com o inseticida imidacloprido (ROSSI, 2010), ácido bórico e fipronil (JESUS, 2007; CRUZ et al., 2010) e de *S. postica* tratadas via oral com ácido bórico e fipronil (FERREIRA, 2010).

Para os túbulos de Malpighi, a técnica de CEC não foi levada em consideração, uma vez que o órgão apareceu pouco corado não permitindo a avaliação das estruturas celulares.

A figura 9 mostra a marcação da enzima CO nos túbulos de Malpighi, que nas concentrações subletais permaneceu próxima ao controle. Porém, na concentração letal média e na concentração acima da letal o imidacloprido parece ter provocado alterações metabólicas nas células dos túbulos, evidenciadas pela maior marcação de CO em relação ao controle (tabela 3). Semelhante ao observado no ventrículo, os diferentes tempos de exposição ao inseticida não interferiram na quantidade de marcação para CO.

Para o ventrículo e os túbulos de Malpighi a marcação para CO aumentou depois que alterações morfológicas como condensação cromatínica, inchaço celular e

degeneração tecidual já haviam sido identificadas indicando atividade metabólica aumentada devido à tentativa de combater os efeitos citotóxicos do imidacloprido e/ou potencializar a neutralização do composto químico pelo aumento nas atividades de metabolização e excreção.

Diferente do observado para o ventrículo, a compactação do material genético diminuiu nos túbulos de Malpighi para as concentrações mais altas, nas quais houve maior marcação para CO, sugerindo uma possível recuperação da homeostase celular para este órgão.

Tabela 1: Resultados das análises morfológicas e histoquímica dos corpos pedunculados de abelhas *S. postica*.

Concentração (ng/µL)	**Tempo (horas)**	**Dilatação dos espaços intercelulares**	**CO**
Controle	1	-	X
	4	-	X
	24	-	X
	48	-	X
4,25	1	-	X
	4	X	X
	24	X	X
	48	X	X
21,25	1	-	X
	4	XX	X
	24	XX	X
	48	XX	X
42,50	1	XX	X
	4	XXX	X
	24	XXX	X
	48	0	0
85	1	XXX	X
	4	XXX	X
	24	0	0
	48	0	0

(-) Ausência; (X) Pouco presente; (XX) Moderadamente presente; (XXX) Muito presente; (XXXX) Intensamente presente; (0) morte dos indivíduos impossibilitando a realização das técnicas; (CO) marcação para a enzima citocromo oxidase.

Tabela 2: Resultados das análises morfológicas e histoquímicas do ventrículo de abelhas *S. postica*.

Concentração (ng/µL)	**Tempo (horas)**	**NP**	**HP**	**DE**	**NRA**	**CO**
Controle	1	X	X	-	-	X
	4	X	X	-	-	X
	24	X	X	-	-	X
	48	X	X	-	-	X
4,25	1	X	X	-	-	X
	4	XXX	XXX	XX	-	X
	24	XXX	XXX	XX	-	X
	48	XXX	XXX	XX	-	X
21,25	1	XXX	X	XX	-	XX
	4	XXX	XXX	XXX	-	XX
	24	XXX	XXX	XX	-	XX
	48	XXX	XXX	XX	-	XX
42,50	1	X	XXX	XX	-	XXX
	4	XXX	XXX	XXX	-	XXX
	24	XXX	XXX	XXX	-	XXX
	48	0	0	0	0	0
85	1	XX	X	XXX	-	XXXX
	4	XXX	XXX	XXX	XXX	XXXX
	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0

(-) Ausência; (X) Pouco presente; (XX) Moderadamente presente; (XXX) Muito presente; (XXXX) Intensamente presente; (0) morte dos indivíduos impossibilitando a realização das técnicas; (NP) núcleo picnóticos; (HP) halo pericromatínico; (DE) degeneração do epitélio; (NRA) ninhos de células regenerativas alterados; (CO) marcação para a enzima citocromo oxidase.

Tabela 3: Resultados das análises morfológicas e histoquímicas dos túbulos de Malpighi de abelhas *S. postica*.

Concentração (ng/µL)	**Tempo (horas)**	**NP**	**IC**	**PBE**	**RC**	**CO**
Controle	1	-	-	-	-	X
	4	-	-	-	-	X
	24	-	-	-	-	X
	48	-	-	-	-	X
4,25	1	X	XX	-	-	X
	4	XXX	XX	-	-	X
	24	XXX	XX	-	-	X
	48	XXX	XX	-	-	X
21,25	1	X	XX	-	-	X
	4	XXX	XX	-	-	X
	24	XXX	XX	-	-	X
	48	XXX	XX	-	-	X
42,50	1	X	XX	XXX	X	XX
	4	XX	XX	XXX	X	XX
	24	XX	XX	XXX	X	XX
	48	0	0	0	0	0
85	1	XX	X	XXX	XX	XX
	4	XX	X	XXX	XXX	XXX
	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0

(-) Ausência; (X) Pouco presente; (XX) Moderadamente presente; (XXX) Muito presente; (XXXX) Intensamente presente; (0) morte dos indivíduos impossibilitando a realização da técnica; (NP) núcleo picnóticos; (IC) inchaço celular; (PBE) perda do bordo em escova; (RC) rompimento celular; (CO) marcação para a enzima citocromo oxidase.

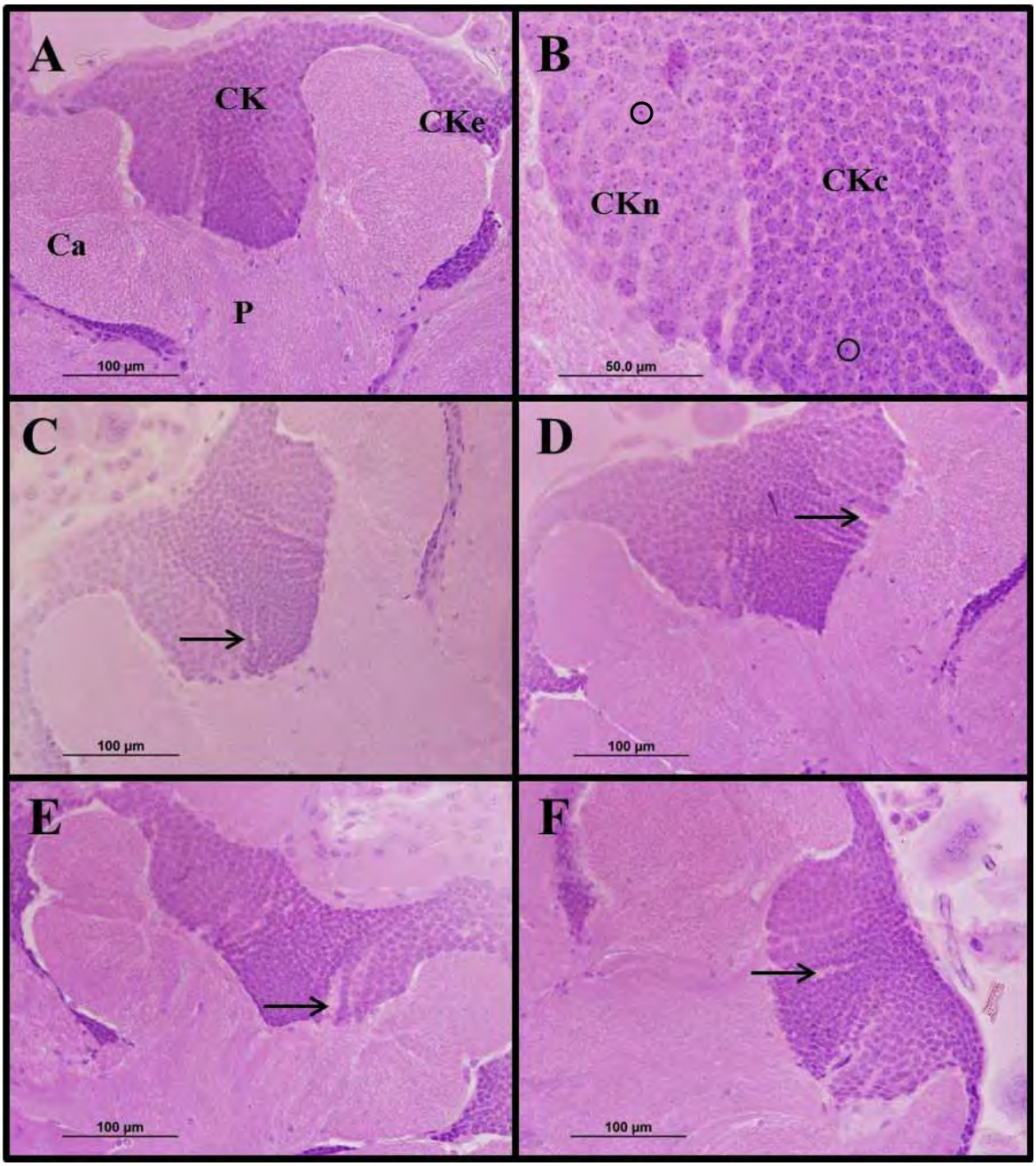

Figura 1: Corpos pedunculados de *S. postica* nas condições experimentais controle 24 horas (A) e 1 hora (B) e tratados com imidacloprido nas concentrações de 4,25 ng/µL por 4 horas (C), 21,25 ng/µL por 4 horas (D), 42,50 ng/µL por 4 horas (E) e 85 ng/µL por 1h (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. (Ca) Cálice, (CK) Células de Kenyon, (CKc) Células de Kenyon compactas internas, (CKe) Células de Kenyon compactas externas, (CKn) Células de Kenyon não compactas e (P) Pedúnculo. Os círculos indicam nucléolos e as setas indicam dilatação dos espaços entre células.

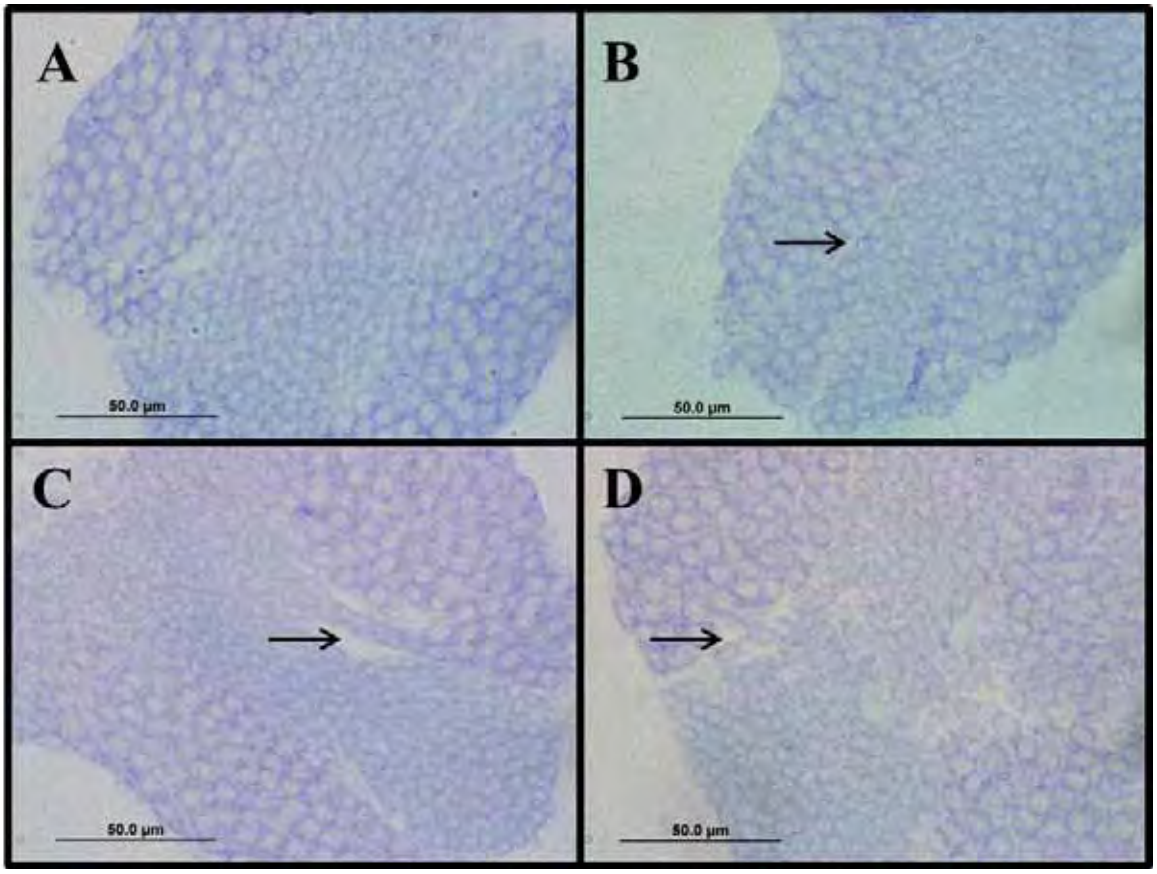

Figura 2: Corpos pedunculados de *S. postica* nas condições experimentais controle 1 hora (A), tratados com imidacloprido nas concentrações de 4,25 ng/µL por 4 horas (B), 21,25 ng/µL por 48 horas (C) e 42,50 ng/µL por 24 horas (D). Concentração Crítica de Eletrólitos. As setas indicam dilatação dos espaços entre células.

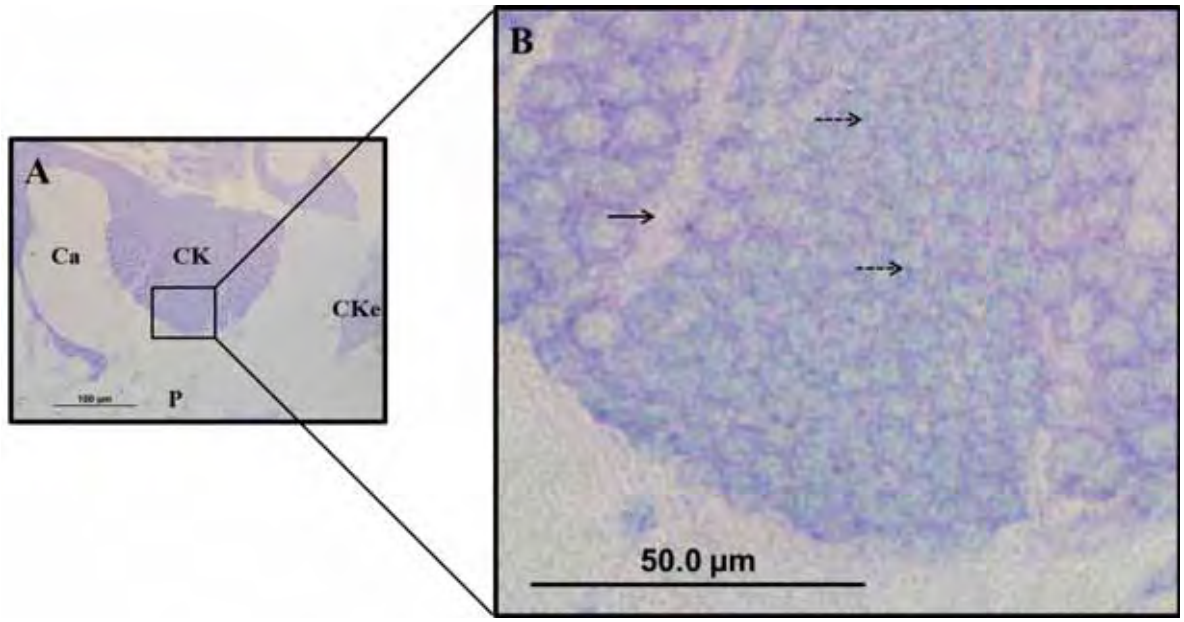

Figura 3: Corpo pedunculado (A) e detalhe mostrando as células de Kenyon internas (B) de *S. postica* tratada com imidacloprido na concentração de 21,25 ng/µL por 1 hora. Concentração Crítica de Eletrólitos. (Ca) Cálice, (CK) Células de Kenyon, (CKe) Células de Kenyon compactas externas e (P) Pedúnculo. A seta preenchida indica dilatação dos espaços entre células e as setas tracejadas indicam nucléolos.

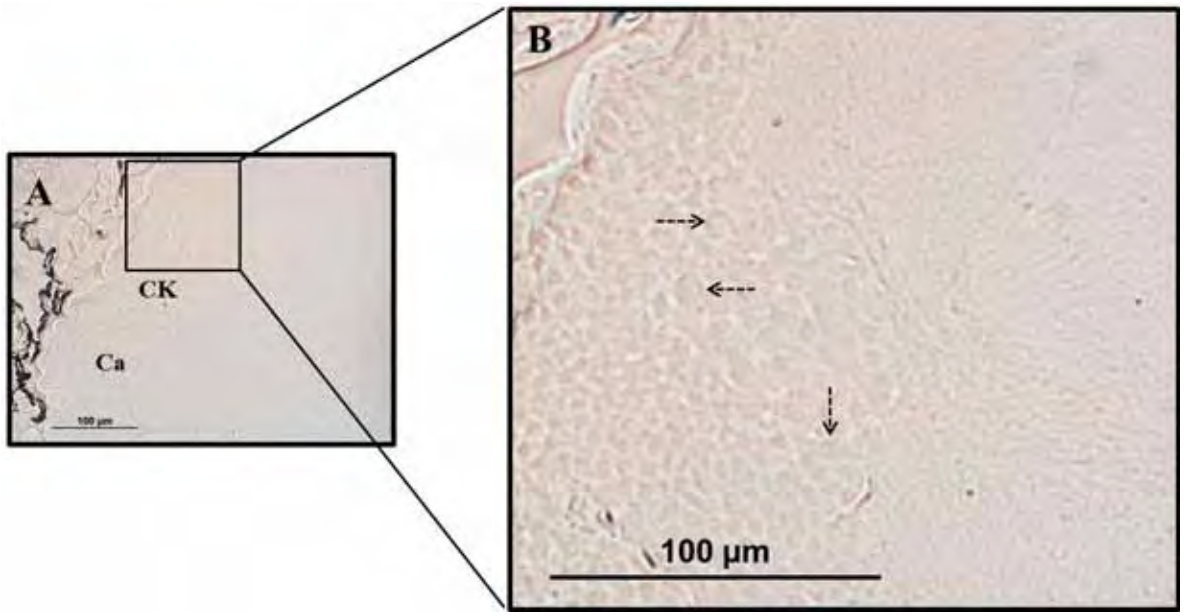

Figura 4: Corpo pedunculado (A) e detalhe mostrando as células de Kenyon internas (B) de *S. postica* tratada com imidacloprido na concentração de 21,25 ng/µL por 48 horas. Histoquímica para citocromo oxidase. (Ca) Cálice e (CK) Células de Kenyon. As setas tracejadas indicam marcação positiva para citocromo oxidase.

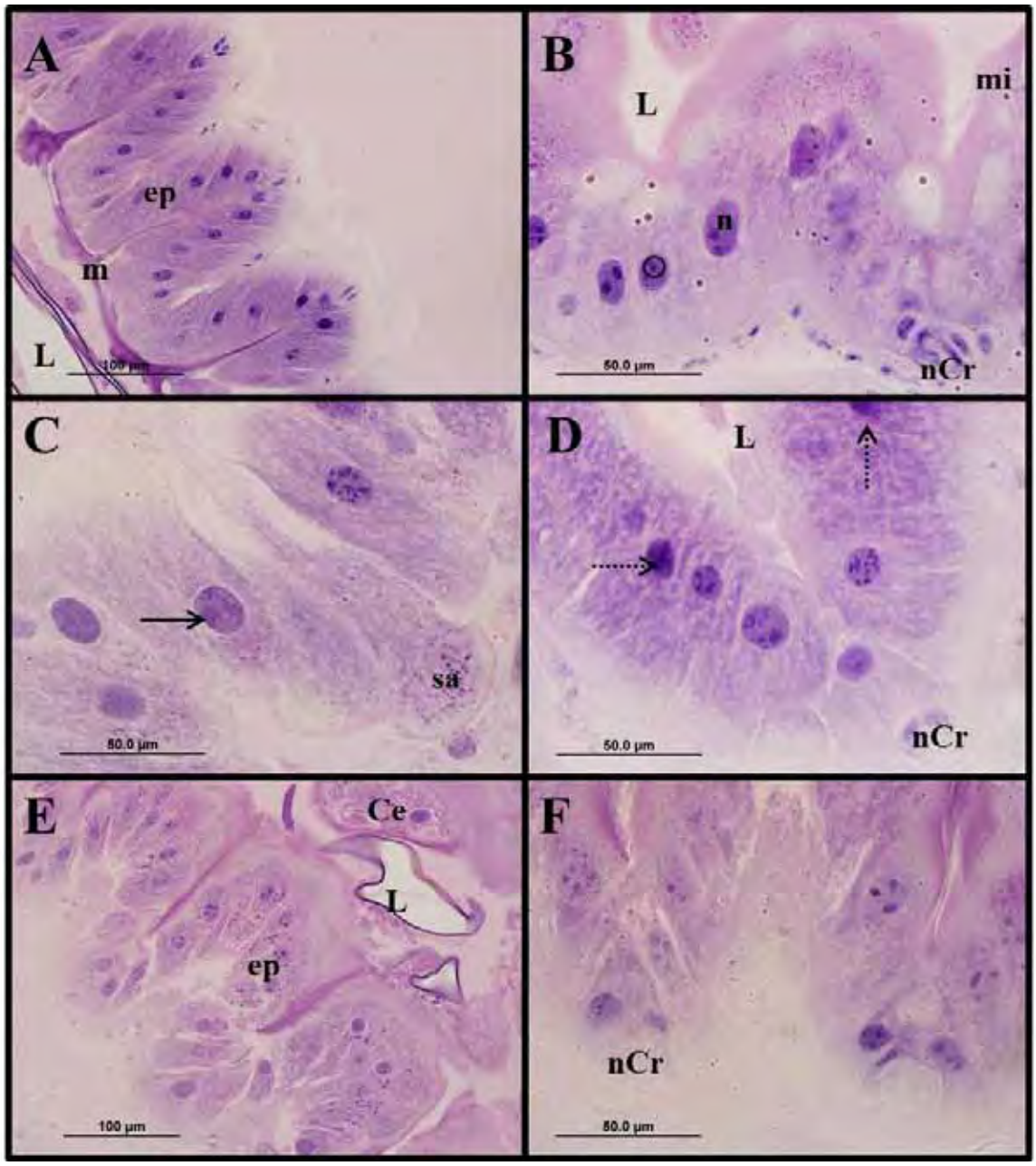

Figura 5: Ventrículos de *S. postica* nas condições experimentais tratado com imidacloprido na concentração de 4,25 ng/µL por 24 horas (A), controle 24 horas (B), 4,25 ng/µL por 48 horas (C), 21,25 ng/µL por 48 horas (D), 42,50 ng/µL por 1 hora (E) e 85 ng/µL por 4 horas (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. (Ce) Célula eliminada, (ep) epitélio, (L) Lúmen, (m) membrana peritrófica, (mi) microvilosidades, (n) núcleo, (nCr) ninho de Células regenerativas e (sa) secreção apócrina. O círculo indica nucléolo, a seta preenchida indica halo pericromatínico e as setas tracejadas indicam núcleos picnóticos.

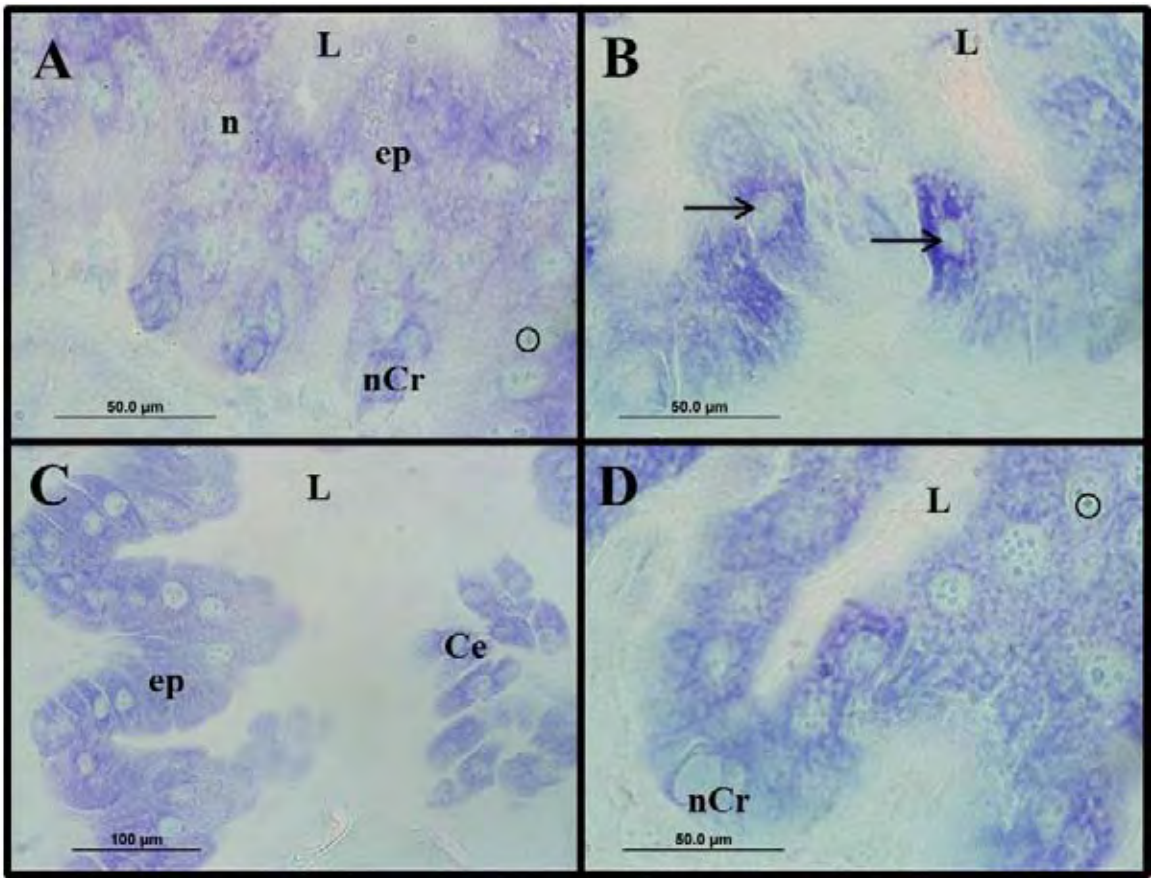

Figura 6: Ventrículos de *S. postica* nas condições experimentais controle 24 horas (A) e tratados com imidacloprido nas concentrações de 4,25 ng/µL por 24 horas (B), 85 ng/µL por 1 hora (C) e 85 ng/µL por 4 horas (D). Concentração Crítica de Eletrólitos. (Ce) Células eliminadas, (ep) epitélio, (L) Lúmen, (n) núcleo e (nCr) ninho de Células regenerativas. O círculo indica nucléolo e as setas indicam halos pericromatínicos.

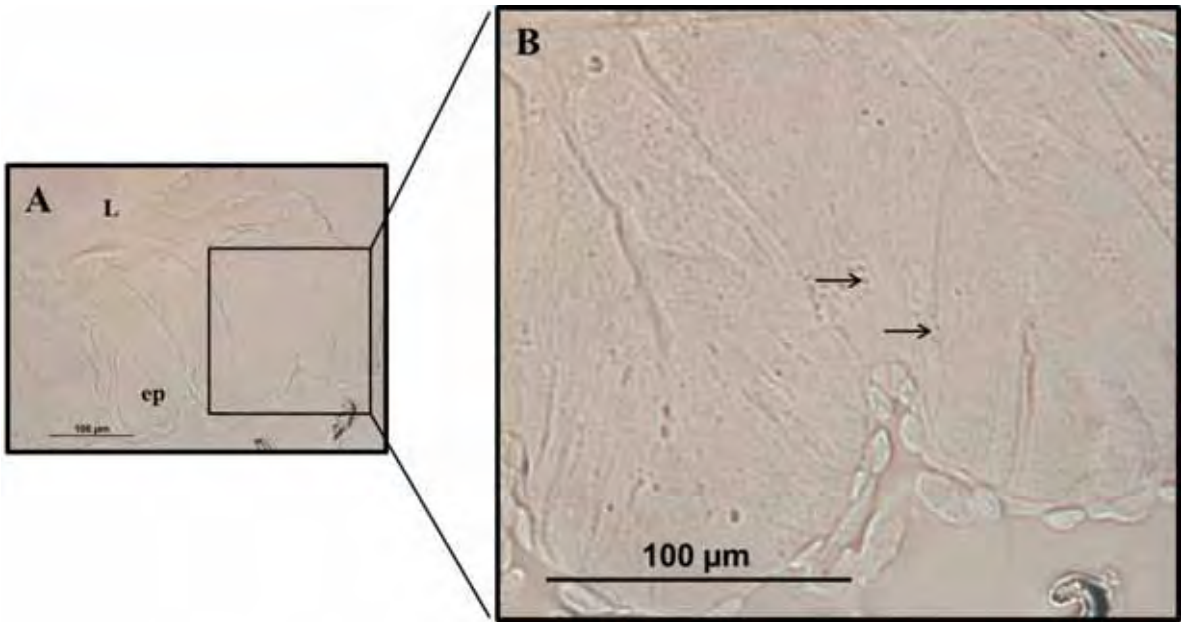

Figura 7: Ventrículo (A) e detalhe do epitélio ventricular (B) de *S. postica* tratada com imidacloprido na concentração de 4,25 ng/µL por 48 horas. Histoquímica para citocromo oxidase. (ep) epitélio e (L) Lúmen. As setas indicam marcação positiva para citocromo oxidase.

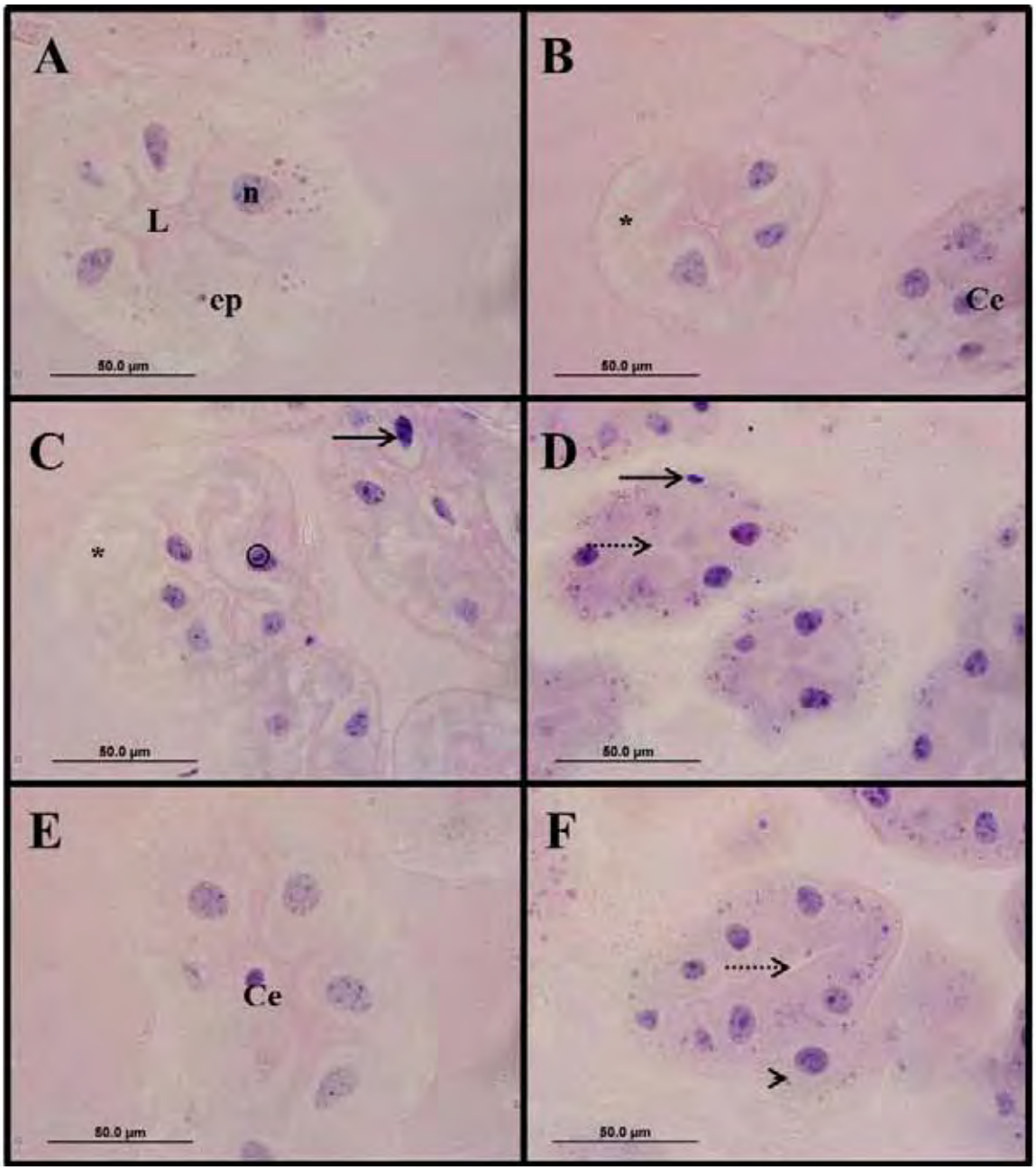

Figura 8: Túbulos de Malpighi de *S. postica* nas condições experimentais controle 24 horas (A), tratados com imidacloprido nas concentrações de 4,25 ng/µL por 1 hora (B), 21,25 ng/µL por 4 horas (C), 42,50 ng/µL por 1 hora (D) e por 24 horas (E) e 85 ng/µL por 4 horas (F). Coloração Hematoxilina e eosina. (Ce) Célula eliminada, (ep) epitélio e (L) Lúmen. O círculo indica nucléolo, os asteriscos indicam inchaço celular, as setas preenchidas indicam núcleos picnóticos, as setas tracejadas indicam perda do bordo em escova e a cabeça de seta indica rompimento celular.

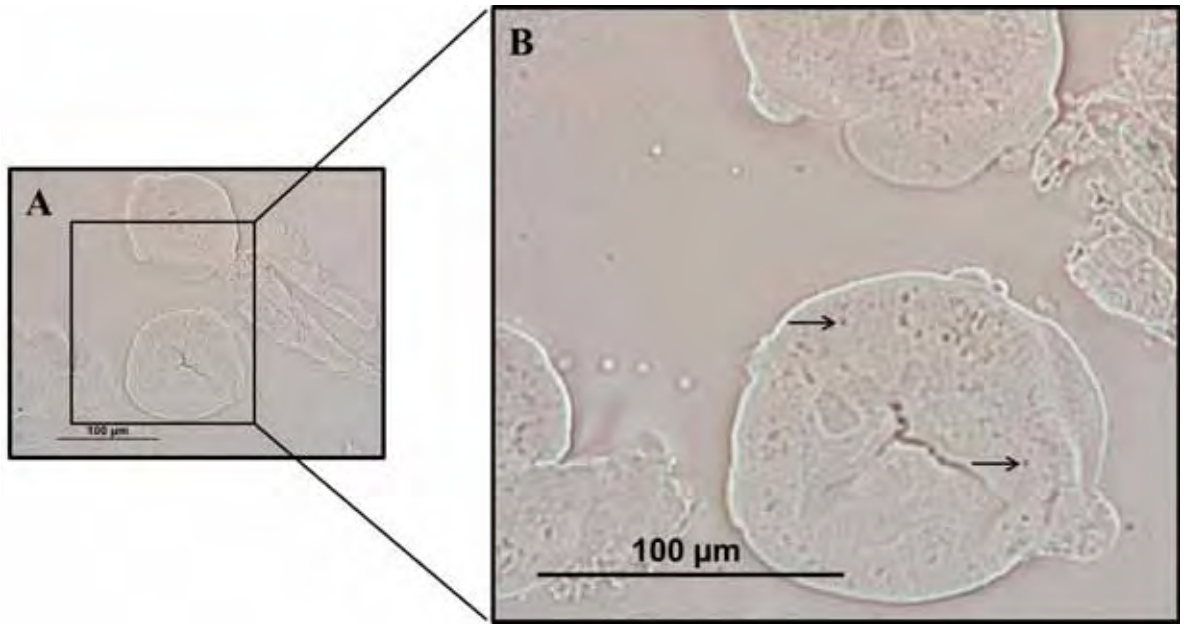

Figura 9: Túbulos de Malpighi (A) e detalhes (B) de *S. postica* tratada com imidacloprido na concentração de 42,50 ng/µL por 24 horas. Histoquímica para citocromo oxidase. As setas indicam marcação positiva para citocromo oxidase.

CONCLUSÃO

Para as células de Kenyon, a dilatação dos espaços intercelulares foi indicador dos efeitos causados pelo inseticida imidacloprido.

Embora sintomas de intoxicação, como desorientação, hiperexcitação e paralisia, tenham sido notados, alterações morfológicas e metabólicas não foram tão evidentes nos corpos pedunculados, estruturas alvo do imidacloprido, o que provavelmente está relacionado à metabolização e excreção do inseticida.

Os órgãos que participam da metabolização e excreção de substâncias no organismo, ventrículo e túbulos de Malpighi respectivamente, sofreram com o efeito tóxico do imidacloprido. Houve uma tendência na desorganização do epitélio digestivo conforme o aumento no tempo e na dose de exposição ao inseticida mostrando que o imidacloprido leva a danos no sistema digestório.

Tanto nos ventrículos como nos túbulos de Malpighi de abelhas tratadas, o aumento no metabolismo celular indica a tentativa de combater os efeitos citotóxicos ou metabolizar e eliminar o composto tóxico do organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMENGAUD, C; AIT-OUBAH, J; CAUSSE, N; GAUTHIER, M. Nicotinic acetylcholine receptor ligands differently affect cytochrome oxidase in the honeybee brain. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v.304, p.97-101, mai. 2001.

BANERJEE, S; BHAT, M. A. Neuron-Glial Interactions in Blood-Brain Barrier Formation. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v.30, p.235-258, 2007.

BRADLEY, T. J. The excretory system: structure and physiology. In: KERKUT, G. A; GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemestry and pharmacology**. London: Pergamon. 1985. p. 421-465. v.4.

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

CRUZ, A. S; SILVA- ZACARIN, E. C. M; BUENO, O. C; MALASPINA, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biology and Toxicology**, Dordrecht, v.26, p. 165-179, 2010.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Ed. UNESP, 2009. 416p.

ELBERT, A; HAAS, M; SPRINGER, B; THIELERT, W; NAUEN, R. Mini-review. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Science**, West Sussex, n.64, p.1099–1105, 2008.

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

FERREIRA, R. A. C. **Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de malpighi de operárias adultas de S*captotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico**. 2010. 83f. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

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

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

HAWKINS, B. T; DAVIS, T. P. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v.57, n.2, p.173-185, 2005.

JACOB, C. R. O. **Efeitos do inseticida fipronil sobre os corpos pedunculados de operárias de *Scaptotrigona postica* (LATREILLE, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponi)**. 2012. 85f. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

JESUS, D. **Análise morfológica dos túbulos de Malpighi e dos ventrículos de operárias recém-emergidas de *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apinae) tratadas com fipronil e ácido bórico**. 2007. 101f. Trabalho de conclusão do curso (Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

JUNQUEIRA, L. C. U; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia.** São Paulo: Editora Santos, p.48-81, 1983.

KAKAMAND, F. A. K. H; MAHMOUD, T. T; AMIN, A. B. M. The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers. **Journal of Duhok University**, v. 11, n.1, p.144-151, 2008.

KERR, W. E; CARVALHO, G. A; SILVA, A. C; ASSIS, M. G. P. Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias estratégicas**, Brasília, n.12, p. 20 – 41, 2001.

KOSTROMYTSKA, O. S; BUSS, E. A; SCARF, M. E. Toxicity and neurophysiological effects of selected insecticides on the mole cricket, *Scapteriscus vicinus* (Orthoptera: Gryllotalpidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.100, p. 27–34, 2011.

LAMBIN, M; ARMENGAUD, C; RAYMOND, S; GAUTHIER, M. Imidacloprid-Induced Facilitation of the Proboscis Extension Reflex Habituation in the Honeybee. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.48, p.129-134, 2001.

MALASPINA, O; STORT, A. C. As abelhas e os pesticidas. **Apicultura no Brasil**, v.2, n.10, p.42-45, 1985.

MALASPINA, O; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell makers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v.23, n.3/4, p.303-309, 2006.

MATSUDA, K; BUCKINGHAM, S. D; FREEMAN, J. C; SQUIRE, M. D; BAYLES, H. A; SATTELLE, D. B. Effects of the α subunit on imidacloprid sensitivity of recombinant nicotinic acetylcholine receptors. **British Journal of Pharmacology**, London, v.123, p.518 -524, 1998.

MELLO, M. L. S; VIDAL, B. C; DANTAS, M. M; MONTEIRO, A. L. P. Discrimination of the nucleolus by a critical eletrolyte concentration method. **Acta Histochemical Cytochemica**l, v.26, p.1-3, 1993.

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

PEREIRA, C; FALLON, P. G; CORNETTE, J; CAPRON, A; DOENHOFF, M. J; PIERCE, R. J. Alterations in cytochrome-c oxidase expression between praziquantel-resistant and susceptible strains of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, Cambridge, v.117, p.63-73, 1998.

PRIDGEON, J. W; BECNEL, J. J.; CLARK, G. G.; LINTHICUM, K. J. Permethrin induces overexpression of multiple genes in *Aedes aegypti*. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.46, p.580-587, 2009.

ROSSI, C. A. **Efeitos de doses subletais do imidaclopride no cérebro, ventrículo e túbulo de Malpighi de *Apis mellifera* africanizada**. 2010. 101f. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

STUCHI, A. L. P. B. **Toxicidade e expressão gênica em abelhas do gênero *Tetragonisca* após a contaminação com agrotóxicos**. 2009. 102f. Tese de doutorado em Zootecnia – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

SUCHAIL, S; DEBRAUWER, L; BELZUNCES, L. P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science,** West Sussex, v.60, n.3, p.291-296, mar. 2004.

SUMIDA, S; ZACARIN, E. C. M. S; DECIO, P; MALASPINA, O; BUENO, F.C; BUENO, O. C. Toxicological and histopathological effects of boric acid on *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 3, p. 676-690, 2010.

WOLFF, L. F; REIS, V. D. A; SANTOS, R. S. S. **Abelhas melíferas: bioindicadores e qualidade ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 38p. (Documento 244).

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

6. ARTIGO 3

IMUNOFLUORESCÊNCIA E ULTRAESTRUTURA DOS CORPOS PEDUNCULADOS DE ABELHAS SEM FERRÃO, *Scaptotrigona postica* (LATREILLE, 1807), TRATADAS POR INGESTÃO COM O INSETICIDA IMIDACLOPRIDO.

SOARES, H. M; JACOB, C. R. O; NOCELLI, R. C. F; MALASPINA, O.

RESUMO

As abelhas sociais são consideradas importantes modelos neurobiológicos devido à complexidade de comportamento e estrutura cerebral relativamente simples. Muitos trabalhos têm sido realizados para elucidar a ação de inseticidas neurotóxicos sobre o sistema nervoso das abelhas. Este estudo visou analisar os corpos pedunculados de abelhas sem ferrão, *Scaptotrigona postica*, espécie amplamente encontrada no Brasil, tratadas por ingestão com o inseticida imidacloprido. Como as estruturas cerebrais de foco deste trabalho, os corpos pedunculados, possuem células pequenas limitando a visualização destas em microscopia de luz, as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e de imunofluorescência para caspase-3 foram utilizadas para melhor identificação dos danos provocados pelo inseticida sobre as células de Kenyon. Os resultados obtidos mostram que até mesmo concentrações subletais do inseticida são capazes de induzir a apoptose nas células de Kenyon. Houve expressão significativamente maior de caspase-3 nos corpos pedunculados de abelhas tratadas nas concentrações de 21,25 ng i.a/µL dieta, 42,50 ng i.a/µL dieta e 85 ng i.a/µL dieta em relação ao grupo controle. A ultraestrutura mostrou compactação cromatínica, rompimento mitocondrial e perda de eletrondensidade a partir da concentração de 21,25 ng i.a/µL dieta, indicando que a alta toxicidade do imidacloprido ao sistema nervoso causa alterações graves às células culminando até mesmo na morte dessas.

Palavras-chave: meliponíneos, sistema nervoso, neonicotinóide, morte celular, apoptose.

INTRODUÇÃO

Cerca de 300 espécies de meliponíneos são encontradas na América Latina, sendo que na Floresta Amazônica mais de 100 espécies dessas abelhas já foram identificadas (KERR et al., 2001). Devido à diversidade de abelhas sem ferrão encontradas no Brasil e sua eficácia na polinização de plantas selvagens ou cultivadas, é imprescindível que os estudos a respeito de toxicidade de inseticidas realizados no país foquem essas espécies (LOURENÇO et al., 2010).

Com comportamento complexo, capacidade de aprendizagem, formação de memória, habilidades cognitivas e sistema nervoso relativamente simples em termos de estrutura e número de células nervosas, as abelhas são consideradas importantes modelos neurobiológicos.

O sistema nervoso das abelhas tem sido utilizado para melhor compreender os efeitos de agrotóxicos utilizados no controle de pragas sobre os insetos benéficos ou não alvo destes compostos (ARMENGAUD et al., 2001; ROSSI, 2008; SOARES, 2009; SOUZA, 2009; ROSSI, 2010).

O imidacloprido (conhecido comercialmente como Gaucho, Confidor, Galeão, Premier, Evidence, Provado, Connect, Cropstar, Winner, Kohinor,Warrant, entre outros) é um inseticida pertencente a família dos neonicotinóides com fortes efeitos neurotóxicos. Este inseticida atua ligando-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos, agindo mais especificamente nas subunidades α do receptor (BUCKINGHAM et al., 1997). Esses receptores são encontrados em muitas regiões do cérebro das abelhas, incluindo as áreas responsáveis pela plasticidade comportamental, os corpos pedunculados (BICKER, 1999). Os corpos pedunculados são formados pelo cálice que são constituídos dos prolongamentos das células de Kenyon, cujos corpos celulares encontram-se preenchendo-o.

As observações de modificações morfológicas do sistema nervoso provocadas pela ação tóxica do imidacloprido muitas vezes não são visíveis em microscopia de luz, como relatado no trabalho de Rossi (2008). Dessa forma, este trabalho analisou as estruturas cerebrais por meio de microscopia eletrônica de transmissão, além do uso da técnica específica de imunofluorescência para morte celular, marcação da caspase-3.

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células desnecessárias ou defeituosas. Estímulos como infecções, mutações, presença de

vírus, agressões tóxicas, choque térmico, baixa quantidade de nutrientes, radiação ionizante, entre outros, foram descritos como desencadeadores deste processo de morte. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características como retração, perda de aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas, condensação da cromatina e formação dos corpos apoptóticos (WOO et al., 1998; EARNSHAW et al., 1999; GRIVICICH et al., 2007).

A apoptose é realizada nas células animais por uma família de proteases, as caspases, produzidas na forma de precursores inativos, denominados pro-caspases, que são ativados por clivagem proteolítica em resposta a sinais que induzem a morte celular. As caspases ativadas clivam e ativam outros membros da família, resultando em uma cascata proteolítica, e clivam também outras proteínas de importância celular, como a lamina que forma a lâmina nuclear (ALBERTS et al., 2006; LODISH et al., 2007).

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca ou pela via intrínseca. A via extrínseca é mediada por receptores da membrana plasmática que têm a capacidade de recrutar a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte celular. A via intrínseca, também chamada de mitocondrial, ocorre a partir de sinalizações mitocondriais que levam à liberação de citocromo c, posteriormente a ativação da caspase-9 e por fim a ativação da caspase-3, enzima esta efetora da apoptose (LOEFFLER; KROEMER, 2000; KERN; KEHRER, 2002; GUPTA, 2003).

Dessa forma, em estudos toxicológicos, a técnica para marcação de caspase-3 consiste numa valiosa ferramenta para verificar se o produto estudado leva as células, no caso as de Kenyon, à morte.

O objetivo desta pesquisa foi compreender e identificar os danos causados pelo imidacloprido sobre os neurônios dos corpos pedunculados, alvos deste composto neonicotinóide.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico

Favos de cria de abelhas *S. postica* foram coletados no meliponário do Departamento de Biologia - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus de Rio Claro e acondicionados em bandejas (45 X 28 X 75 cm) em estufa BOD com suprimento de água e alimento, temperatura de 28 ± 1°C e umidade relativa de 70% (condições correspondentes ao interior da colônia de *S. postica*). Nas condições descritas, as abelhas emergiram e cerca de 4 ± 1 dia depois passaram pelo tratamento com inseticida.

Tratamento e dissecção das abelhas

O inseticida imidacloprido (grau de pureza 98,1%) foi diluído em acetona e, posteriormente, sucessivas diluições foram realizadas no alimento para atingir as concentrações a serem oferecidas às abelhas (4,25 ng i.a /µL dieta, 21,25 ng i.a /µL dieta, 42,50 ng i.a/µL dieta e 85 ng i.a/µL dieta).

Antes do tratamento, as abelhas permaneceram 2 horas em jejum em estufa BOD, com temperatura a 28 ± 1°C e umidade relativa de 70%. Transcorrido o tempo do jejum, alimento contendo imidacloprido (nas doses descritas acima) foi oferecido às abelhas e ficou disponível até a dissecção. As abelhas permaneceram acondicionadas (20 abelhas por pote) com suprimento de água e alimento contaminado com imidacloprido *ad libitum* e coletadas para dissecção 1 hora, 4 horas, 24 horas e 48 horas após o oferecimento do alimento.

As abelhas do grupo controle passaram pelos mesmos procedimentos que as tratadas, porém receberam alimento sem contaminação.

Parte do material coletado passou pela técnica de imunofluorescência para marcação da enzima caspase-3 e parte seguiu para microscopia eletrônica de transmissão.

Imunofluorescência para marcação da enzima proteolítica caspase-3 (modificada de CHEN et al., 2010).

Os cérebros dissecados foram fixados em formalina neutra tamponada e desidratados em banhos de soluções de álcool com concentrações crescentes e de álcool

butílico 100%. Depois do último banho, os cérebros foram imersos em paraplast Merck (60ºC em estufa) por 4 horas e incluídos para corte.

Os cortes foram realizados em micrótomo (Leica) com espessura aproximada de 6 µm, e colocados sobre lâminas histológicas pré-tratadas com polilisina. As lâminas permaneceram por uma noite em temperatura ambiente para secagem e, posteriormente, foram desparafinizadas com banhos de 20 minutos em soluções de xilol e álcool e novamente secas à temperatura ambiente.

Os cortes foram, então, tratados com 0,3% de peróxido de hidrogênio em solução tampão de fosfato de potássio (KPBS) + 0,3% de Triton, por cerca de 10 minutos, e em seguida, incubados em soro normal de cabra para bloqueio. Decorrido o tempo necessário, os cortes foram incubados, por 48 horas, com o anticorpo primário policlonal anti-caspase-3 (BioVision) feito em coelho e 3% de soro normal de cabra em KPBS + 3% de Triton X-100, em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em KPBS e incubados, por 1 hora, em anticorpo secundário biotinilado conjugado com o fluoróforo FITC (Chemicon International), feito em cabra contra coelho.

Após esses procedimentos as lâminas histológicas foram montadas com citifluor e analisadas em microscópio óptico. As fotomicrografias foram adquiridas por meio de uma câmara digital, Olympus DP-71, adaptada a um microscópio, Olympus BX51, e a um computador Dell. Para a aquisição foi utilizado o software DP Controller.

Para análise quantitativa de células em processo de apoptose foram escolhidas pelo menos 3 fotomicrografias, aumento de 40X, de cada região de interesse. Em cada uma das imagens, o número de células com marcação para caspase-3 foram contadas em duas regiões diferentes, área tecidual de 501 µm X 501 µm e zoom de 25%, pelo programa Image - Pro Plus 6.3.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Bioestat 5.3 e testes de Friedman e Kruskal-Wallis; Dunn, sendo que para ambos $p<0,05$ indicou significância.

Três lâminas de diferentes tratamentos foram incubadas apenas com o anticorpo secundário biotinilado conjugado com FITC, sem o anticorpo anti-caspase-3, para identificação de marcação inespecífica.

Microscopia eletrônica de transmissão (ROAT, 2008).

Os cérebros dissecados foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M e posteriormente pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em cacodilato de sódio 0,2M, por 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, o material

foi lavado em tampão cacodilato, desidratado em uma série de soluções com concentração crescente de álcool e óxido de propileno 100% e embebido e incluído em resina Spurr.

O material incluído foi seccionado e os cortes semi-finos, com aproximadamente 0,5 μm de espessura, foram corados com mistura de azul de metileno 1% e azur II 1% em solução de borax 1%, para seleção dos melhores blocos. As secções ultrafinas desses blocos foram recolhidas em grades de cobre e contrastadas com solução saturada de acetato de uranila 2% em álcool e citrato de chumbo 0,4%. As observações foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Campus de Botucatu.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram obtidos com operárias de *S. postica* com cerca de 4 dias de idade tratadas ou não via oral com o inseticida neurotóxico imidacloprido em concentrações escolhidas a partir da concentração letal média de ingestão (CL_{50}) estabelecida em 24 horas no trabalho de Soares (2012) (CL_{50}/10= 4,25 ng i.a./µL dieta, CL_{50}/2= 21,25 ng i.a./µL dieta, CL_{50}= 42,50 ng i.a./µL dieta e CL_{50}X2= 85 ng i.a./µL dieta).

De maneira geral, houve marcação positiva para caspase-3 em núcleos de neurônios dos corpos pedunculados dos grupos controle e tratados, principalmente nas células de Kenyon compactas internas e naquelas situadas nas proximidades do cálice. Parte desta marcação considerada inespecífica, identificada em cortes que não passaram por incubação com o anticorpo primário anti-caspase-3 (figura 1A), foi quantificada e subtraída dos dados obtidos para todos os tratamentos, inclusive o controle.

A marcação inespecífica era esperada já que o anticorpo anti-caspase-3 não foi desenvolvido para células de insetos, embora tenha sido utilizado, pois as caspases são enzimas bastante conservadas (KAM; FERCH, 2000) e identificadas em muitos organismos tais como metazoários (CIKALA et al., 1999), nematóides (ELLIS; HORVITZ, 1986), insetos (WHITE et al., 1994; DORSTYN et al.,1999) e mamíferos (YUAN et al.,1993).

Quando o tempo de exposição ao alimento com imidacloprido foi levado em consideração, não houve diferença significativa entre grupos de mesmo tratamento ou de tratamentos distintos, exceto entre os grupos controle 48h e 85 ng/µL 1h, $p<0,05$ (Teste de Friedman; Fr=46,9150; G.L.=16 e $p<0,0001$).

Os tratamentos de 21,25 ng/µL, 42,50 ng/µL e 85 ng/µL tiveram uma expressão significativamente maior de caspase-3 do que o grupo controle, enquanto que a concentração de 4,25 ng/µL foi não significativa quando comparada ao controle. A marcação para caspase-3 foi estatisticamente menor na concentração de 4,25 ng/µL do que nos tratamentos de 42,5 e 85 ng/µL, desconsiderando o tempo de exposição ao inseticida (figuras 1 B-F e 2).

A apoptose é dependente da ativação das caspases que acontece por duas diferentes vias: a extrínseca, mediada por receptores de membrana e a intrínseca, mediada pelas mitocôndrias (GRIVICICH et al., 2007). A escolha da caspase-3 nesse trabalho se deve ao fato de que esta é comum às duas vias apoptóticas, além de fazer

parte do grupo das Capases efetoras, ou seja, uma vez ativada não há como a morte celular ser interrompida.

Em insetos, a apoptose está relacionada com a reorganização tecidual que ocorre durante a metamorfose ou com a involução natural de algum órgão na fase adulta (GREGORC et al., 2004). A morte celular tem sido associada também à agentes estressores ambientais, como os inseticidas (MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006).

Benzidane et al. (2011) em estudo com culturas de células de Kenyon de *Periplaneta americana* concluíram que o imidacloprido inviabiliza as células de forma dependentemente da dose e do tempo e pode contribuir para a ocorrência de morte celular por necrose ou apoptose, embora os autores desconheçam os mecanismos intracelulares que levam estes neurônios à morte.

Gregorc e Ellis (2011) detectaram a partir da técnica de TUNEL, que identifica fragmentação do DNA, que as células do intestino médio de larvas de *Apis mellifera* que tiveram a dieta contaminada com imidacloprido apresentaram cerca de 61% a mais de morte do que as do grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Gregorc et al. (2004) que tratou larvas com ácido oxálico ou fórmico.

Corroborando o encontrado para a técnica de imunofluorescência para caspase-3, os resultados da microscopia eletrônica de transmissão mostram dilatação do espaço perinuclear, a partir da concentração de 21,25 ng/µL, e compactação cromatínica, principalmente na concentração de 85 ng/µL, nas células de Kenyon das abelhas tratadas quando comparadas ao controle (figuras 3 A-F). A compactação cromatínica na periferia do núcleo ou em um ou mais pontos dispersos é uma das primeiras modificações celulares que ocorrem durante a apoptose (WYLLIE et al., 1980; EARNSHAW et al., 1995; KAM e FERCH, 2000). Os tempos aos quais as abelhas ficaram expostas ao alimento contaminado com inseticida não interferiram nas modificações ultraestruturais observadas.

Alterações estruturais não foram notadas para as células de glia (figura 4 A) e para o complexo de Golgi (figura 4 B), porém as mitocôndrias dos grupos tratados apareceram rompidas ou com matriz não eletrondensa (figura 4 B-F) indicando, segundo Abdelwahid et al. (2007), inchaço.

Hacker (2000) descreve que o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático tendem a apresentar morfologia normal durante as primeiras fases da apoptose e que dependendo do contexto que leva a morte celular as mitocôndrias podem sofrer condensação ou inchaço.

Quando sinais indutores de apoptose chegam às mitocôndrias ocorre uma alteração no potencial da membrana mitocondrial interna e na permeabilidade mitocondrial culminando na passagem de água do espaço entre membranas para a matriz e, consequentemente, inchaço e rompimento da organela. Essas alterações mitocondriais levam a liberação de proteínas ativadoras de apoptose e de citocromo c para o citoplasma, interrupção da síntese de ATP e acúmulo de espécies reativas ao oxigênio na célula (LOEFFLER; KROEMER, 2000; GRIVICICH et al., 2007).

A citocromo c, liberada pelas mitocôndrias, forma um complexo chamado de apoptossomo que promove a ativação da caspase-9 que por sua vez ativa a caspase-3 levando á apoptose. O aumento nos níveis de espécies reativas ao oxigênio também induzem a ativação na cascata de caspases (JOZA et al., 2001; WANG et al., 2001; GRIVICICH et al., 2007).

No citoplasma das células de Kenyon de abelhas tratadas com o inseticida imidacloprido foram encontrados autofagossomos que, comumente, se encontravam em fase de formação. Autofagossomos são vesículas de membrana dupla que englobam parte do citoplasma ou organelas inteiras durante a autofagia, processo considerado importante na renovação das organelas celulares, em condições de falta de nutrientes ou, ainda, como mecanismo de morte celular (DENTON et al., 2012). A presença dos autofagossomos englobando principalmente mitocôndrias sugere que o inseticida inviabiliza estas organelas (figura 4E).

Ling e Zhang (2011) em estudo com a espécie *Nilaparvata lugens* indicou nas células de indivíduos tratados com o inseticida fipronil a presença de vacúolos e de autofagossomos no citoplasma, além de modificações celulares como dilatações atípicas nas vesículas do Complexo de Golgi e ausência de cristas, inchaço, distorção e ruptura de membranas das mitocôndrias.

Tanto a expressão diferenciada de caspase para as concentrações de 21,25, 42,50 e 85 ng/µL, utilizadas nos bioensaios, quanto as alterações celulares observadas por ultraestrutura, como condensação do material genético e degeneração mitocondrial, comprovam que o imidacloprido é citotóxico até mesmo em concentrações subletais e leva à morte os neurônios dos corpos pedunculados.

A morte das células de Kenyon alteram a estrutura dos corpos pedunculados e culminam em efeitos prejudiciais no comportamento, aprendizagem, memória e distinção olfativa das abelhas, pois estas regiões cerebrais são centros de integração multimodal dos insetos e responsáveis por receber e interpretar as informações olfativas,

gustatórias, visuais e mecanosensoriais (ZARS, 2000; KOMISCHKE et al., 2005; KIYA et al., 2007).

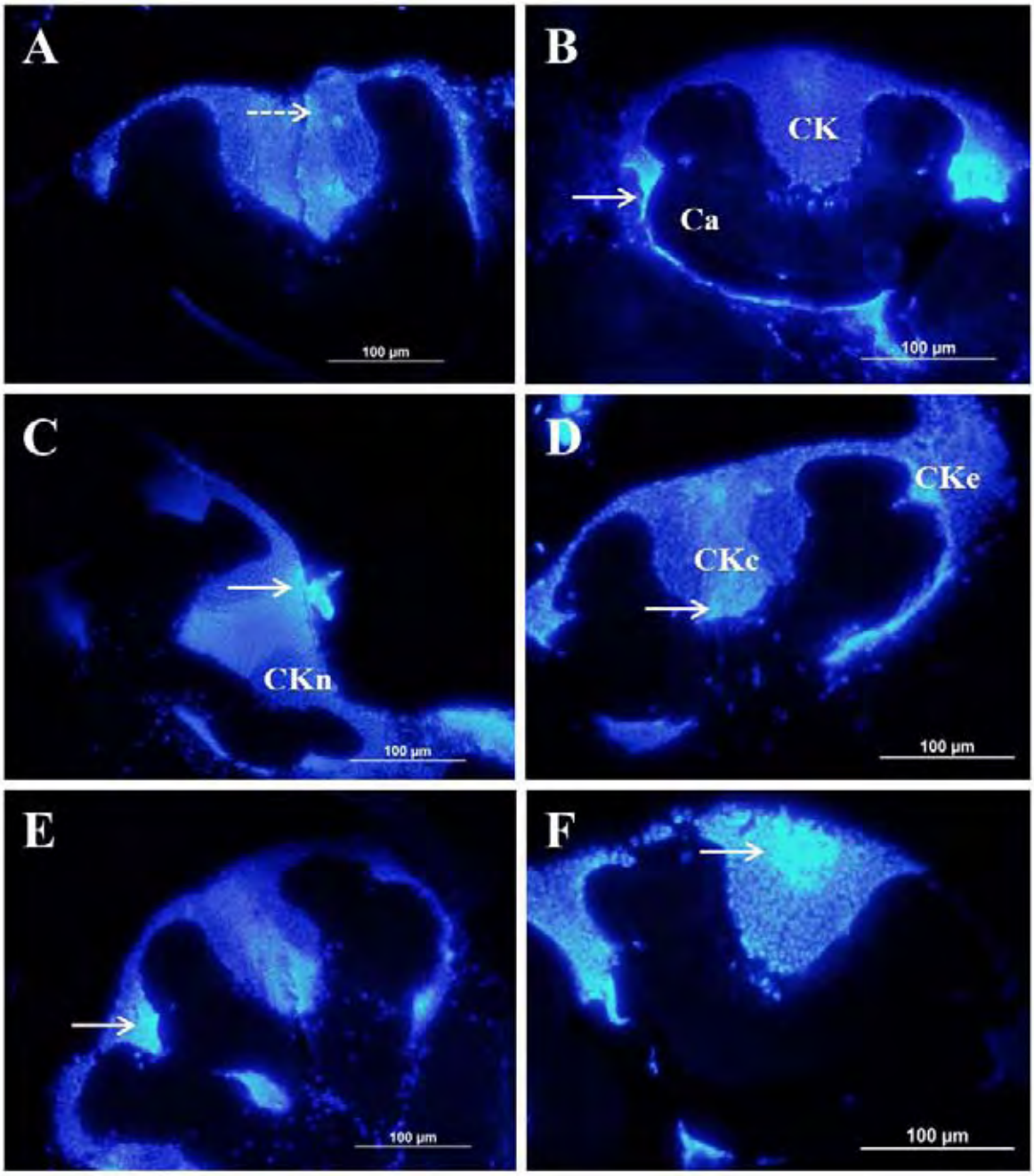

Figura 1: Imunofluorescência dos corpos pedunculados de *S. postica* sem incubação com anticorpo anti-caspase-3 (A) e com incubação no anticorpo nas condições experimentais controle 1 hora (B) e tratados com imidacloprido nas concentrações de 4,25 ng/µL por 4 horas (C), 21,25 ng/µL por 24 horas (D), 42,50 ng/µL por 4 horas (E) e 85 ng/µL por 1hora (F). (Ca) Cálice, (CK) Células de Kenyon, (CKc) Células de Kenyon compactas internas, (CKe) Células de Kenyon compactas externas, (CKn) Células de Kenyon não compactas. A seta tracejada indica marcação inespecífica e as setas preenchidas indicam marcação positiva para caspase-3 + marcação inespecífica.

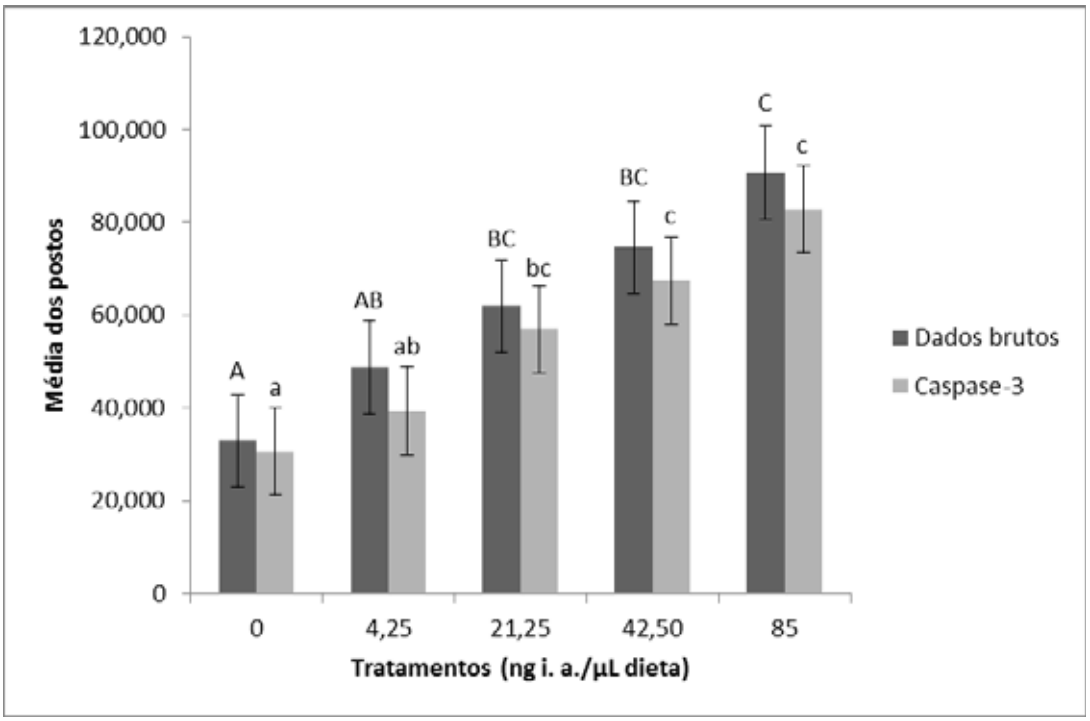

Figura 2: Resultado da análise estatística para a técnica de imunofluorescência para caspase-3 dos corpos pedunculados de abelhas *S. postica*. Letras maiúsculas: comparação estatística entre dados brutos (marcação inespecífica + marcação para caspase-3), sendo que letras diferentes indicam significância $p<0,05$ (Teste Kruskal-Wallis; Dunn; H= 40,9725; G.L.=5 e $p<0,0001$). Letras minúsculas: comparação estatística entre dados de marcação para caspase-3, sendo que letras diferentes indicam significância $p<0,05$ (Teste Kruskal- Wallis; Dunn; H=35,5622; G.L.= 4 e $p<0,0001$).

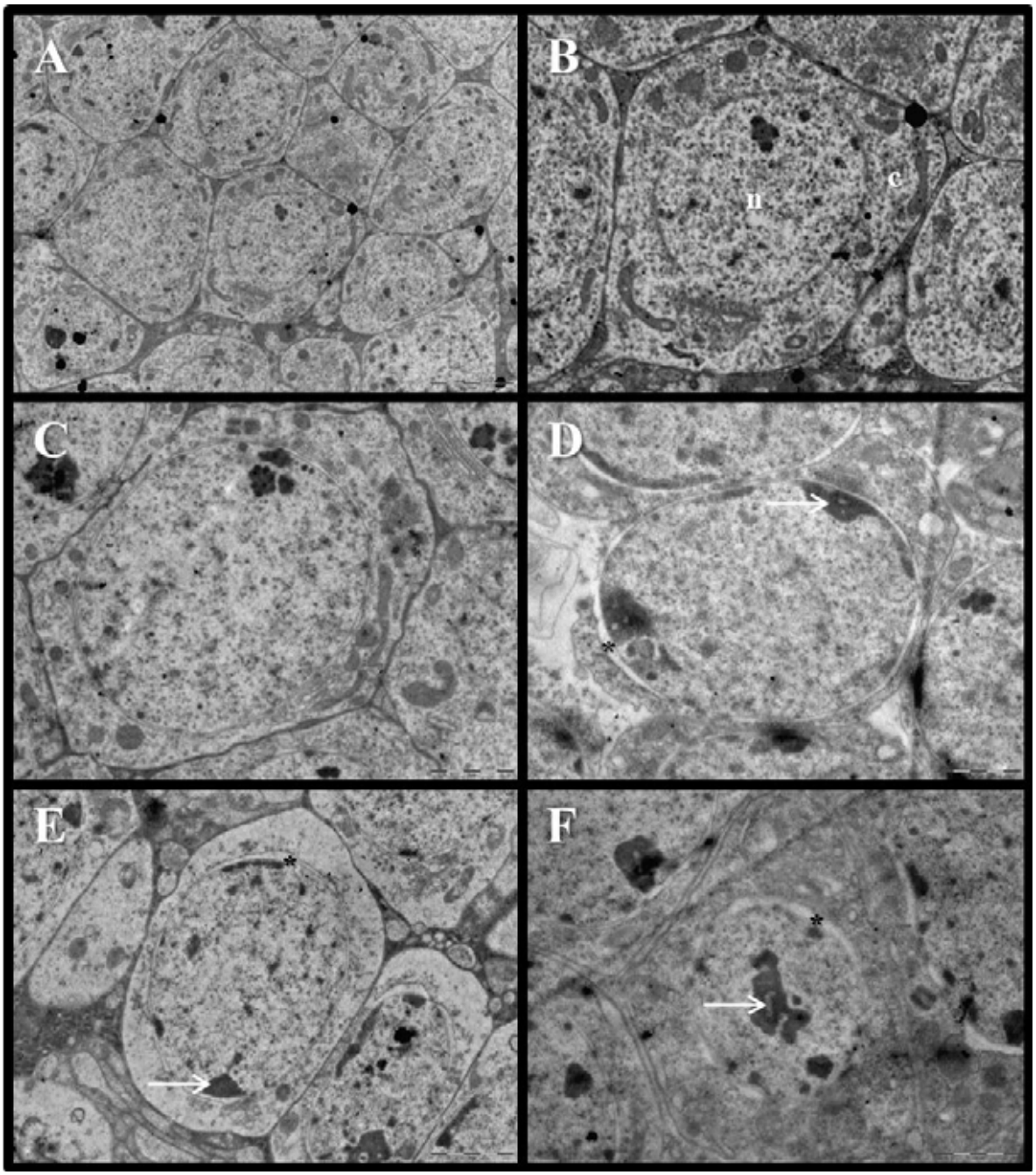

Figura 3: Ultraestrutura das células dos corpos pedunculados de *S. postica* nas condições experimentais controle 1 hora (A e B) e tratadas com imidacloprido nas concentrações de 4,25 ng/µL por 24 horas (C), 21,25 ng/µL por 4 horas (D), 42,50 ng/µL por 24 horas (E) e 85 ng/µL por 4 horas (F). (c) citoplasma das células de Kenyon, (n) núcleo das células de Kenyon. Os asteriscos indicam dilatação do espaço perinuclear e as setas preenchidas indicam compactação cromatínica.

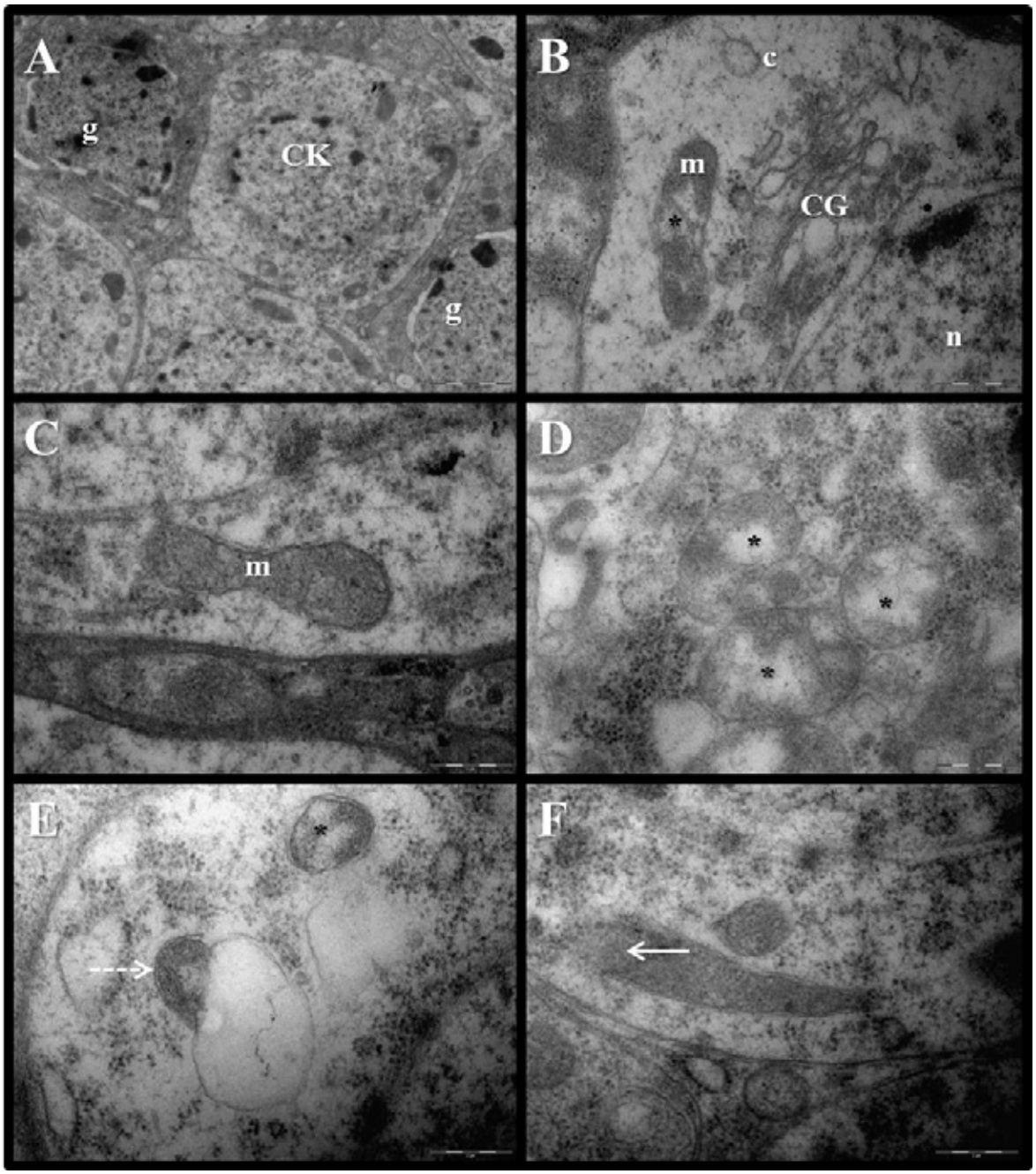

Figura 4: Ultraestrutura das células dos corpos pedunculados de *S. postica* nas condições experimentais tratadas com imidacloprido nas concentrações 85 ng/µL por 4 horas (A), 42,50 ng/µL por 24 horas (B), controle 1 hora (C), 21,25 ng/µL por 24 horas (D), 21,25 ng/µL por 24 horas (E) e 85 ng/µL por 4 horas (F). (c) citoplasma das células de Kenyon, (CG) Complexo de Golgi, (CK) Células de Kenyon, (g) células da glia, (m) mitocôndria e (n) núcleo das células de Kenyon. Os asteriscos indicam mitocôndrias com perda de eletrondensidade, a seta tracejada indica um autofagossomo em fase de formação e a seta preenchida indica rompimento das membranas mitocondriais.

CONCLUSÃO

A expressão significativa de caspase-3, compactação cromatínica, perda de eletrondensidade mitocondrial e rompimento das mitocôndrias observados nas células dos corpos pedunculados de abelhas tratadas com imidacloprido mostram que a alta toxicidade do composto ao sistema nervoso causa alterações celulares graves culminando na morte das células de Kenyon.

A morte dos neurônios dos corpos pedunculados, estruturas relacionadas com a formação de memória e aprendizagem, comprometem o comportamento das abelhas, o que possivelmente afeta a viabilidade de toda a colônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHID, E; YOKOKURA, T; KRIESER, R. J; BALASUNDARAM, S; FOWLE,W. H; WHITE, K. Mitochondrial Disruption in Drosophila Apoptosis. **Developmental Cell**, Cambridge, v.12, p.793–806, 2007.

ALBERTS, B; BRAY,D; HOPKIN,K; JOHNSON,A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER,P. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 740p.

ARMENGAUD, C; AIT-OUBAH, J; CAUSSE, N; GAUTHIER, M. Nicotinic acetylcholine receptor ligands differently affect cytochrome oxidase in the honeybee brain. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v.304, p.97-101, mai. 2001.

BICKER, G. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 45, n. 3, p.174-183, 1999.

BUCKINGHAM, S. D; LAPIED, B; CORRONG, H. L. E; GROLLEAU, F; SATTELLE, D. B. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 200, n. 21, p. 2685-2692, 1997.

CHEN, C; CHEN, Q; MAO, Y; XU, S; XIA, C; SHI, X; ZHANG, J. H; YUAN, H; SUN, X. Hydrogen-Rich Saline Protects Against Spinal Cord Injury in Rats. **Neurochemical Research**, New York, v.35, p.1111-1118, mar. 2010.

CIKALA, M; WILM, B; HOBMAYER, E; BÖTTGER, A; DAVID, C. N. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. **Current Biology**, London, v. 9, p.959-962, 1999.

DENTON, D; NICOLSON, S; KUMAR, S. Review. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. **Cell Death and Differentiation**, Oxford, v.19, p.87–95, 2012.

DORSTYN, L; READ, S. H; QUINNI, L. M; RICHARDSONI, H; KUMAR, S. Decay, a Novel *Drosophila* Caspase Related to Mammalian Caspase-3 and Caspase-7. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 43, p. 30778–30783, out .1999.

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

ELLIS, H. M; HORVITZ, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. **Cell Press**, Cambridge, v.44, p.817-829, mar. 1986.

GREGORC, A; ELLIS, J. D. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (Apis mellifera L.) larvae treated with pesticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.99, p.200–207, 2011.

GREGORC, A; POGACNIK, A; BOWEN, I. D. Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. **Apidologie,** Versailles, v. 35, p.453–460, 2004.

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

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **International Journal of Oncology**, Athens, v.22, p.15-20, 2003

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

KAM, P. C. A; FERCH, N. I. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. **Anaesthesia**, London, v.55, p.1081-1093, 2000.

JOZA, N; SUSIN, S. A; DAUGAS, E; STANFORDK, W. L; CHO, S. K; LIK, C. Y. J; SASAKI, T; ELIA, A. J; CHENG, H. Y. M; RAVAGNAN, L; FERRI, K. F; ZAMZAMI, N; WAKEHAM, A; HAKEM, R; YOSHIDA, H; KONG, Y. Y; MAK, T.

W; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C; KROEMER, G; PENNINGER, J. M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**. v.410, p.549-554, mar.2001.

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

KERR, W. E; CARVALHO, G. A; SILVA, A. C; ASSIS, M. G. P. Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias estratégicas**, Brasília, n.12, p. 20 - 41, 2001.

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

KOMISCHKE, B; SANDOZ, J. C; MALUN, D; GIURFA, M. Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. **European Journal of Neuroscience,** Oxford, v.20, p.477-485, 2005.

LING, S; ZANG, R. Effect of fipronil on brain and muscle ultrastructure of *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.74, n.5, p.1348-1354, jul 2011.

LODISH, H; BERK, A; KAISER, C. A; KRIEGER, M; SCOTT, M. P; BRETSCHER, A; PLOEGH, H; MATSUDAIRA, P. **Molecular cell biology**. 6. ed. New York: W. H. Freeman and company, 2007. 1148p.

LOEFFLER, M; KROEMER, G. The Mitochondrion in Cell Death Control: Certainties and Incognita. **Experimental Cell Research**, New York, v.256, p.19–26, 2000.

LOURENÇO, C.T; SANTOS, J. F; NOCELLI, R. C. F. Effects of insecticides in bees: situation in Brazil. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 9, 2010, Ribeirão Preto. **Anais…** Ribeirão Preto: FFCLRP-USP, 2010. p. 607.

MALASPINA, O; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell makers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v.23, n.3/4, p.303-309, 2006.

ROAT, T. C. **Diferenciação do cérebro de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose: estudo comparativo entre castas e sexos**. 2008. 184f. Tese de doutorado em Ciências Biológicas - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

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

ROSSI, C. A. **Efeitos de doses subletais do imidaclopride no cérebro, ventrículo e túbulo de Malpighi de *Apis mellifera* africanizada**. 2010. 101f. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

SOARES, H. M. **Avaliação dos efeitos do imidaclopride, sobre o sistema nervoso de *Apis mellifera* africanizada, através da expressão da proteína Fos.** 2009. 43f. Trabalho de conclusão do curso em Ciências Biológicas- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

SOUZA, T. F. **Efeito das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) por meio de análises morfológicas e comportamentais.** 2009. 47f. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. **Genes e Development**. v.15, p. 2922–2933, 2001.

WHITE K; GRETHER, M. E; ABRAMS, J. M; YOUNG L; FARRELL, K; STELLER H. Genetic control of programmed cell death in Drosophila. **Science**, v.264, n.5159, p. 677-683, abr.1994.

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

WYLLIE, A. H; KERR, I. F. R; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, New York, v.68, p.251-305, 1980.

YUAN, J. Y; SHAHAM, S; LEDOUX, S; ELLIS, H. M; HORVITZ, H. R. The C. elegans cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1β-converting enzyme. **Cell Press**, Cambridge, v. 75, n. 4, p.641-652, nov. 1993.

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

7. DISCUSSÃO GERAL

Os resultados obtidos pelo presente estudo mostram que o inseticida imidacloprido é tóxico para as abelhas sem ferrão *S. postica*, sendo que a DL_{50} tópica encontrada foi menor do que as descritas para a espécie *A. mellifera*. Este dado corrobora outros autores que afirmam que as abelhas sem ferrão tendem a ser mais sensíveis que a espécie melífera aos produtos tóxicos aplicados nas áreas de cultivo (MORAES et al., 2000; DEL SARTO, 2009).

Muitos são os fatores que interferem na toxicidade de inseticidas para os insetos como, idade e fisiologia dos indivíduos, nutrição, doenças infecciosas, condições ambientais, entre outros (DECOURTYE et al., 2004; VIDAU et al., 2001). Pesquisas relacionaram também o tamanho/peso corporal à susceptilibidade das abelhas aos pesticidas, o que pode explicar os resultados obtidos. A resistência dos indivíduos diminui com a redução no peso corporal, como foi observado por Del Sarto (2009) comparando as espécies *A. mellifera* e *Melipona scutellaris*, Van der Steen (2001) comparando indivíduos da espécie *Bombus terrestres* e Nogueira-Couto et al. (1996) comparando indivíduos da espécie *A. mellifera*.

A metodologia utilizada para a determinação da toxicidade do imidacloprido por ingestão foi diferente do mostrado na literatura, uma vez que os estudos existentes estimam a quantidade ingerida de ingrediente ativo por cada indivíduo teste (SCHUMUCK et al., 2001; NAUEN et al., 2001; SCHUMUCK et al., 2003; SUCHAIL et al., 2004; ROSSI, 2008) e neste trabalho a concentração de inseticida presente no alimento é que foi levada em consideração, independente da quantidade ingerida por cada abelha.

A CL_{50} por ingestão estabelecida foi utilizada para a escolha das concentrações com as quais as abelhas foram tratadas para posterior análise dos efeitos adversos do imidacloprido sobre as células dos corpos pedunculados, do ventrículo e dos túbulos de Malpighi.

Alterações morfológicas causadas pelo imidacloprido, como incidência de núcleos picnóticos, halos pericromatínicos, degeneração do epitélio e ninhos regenerativos sem coloração, foram notadas no ventrículo, enquanto que inchaço, rompimento celular, eliminação de células no lúmen e perda do bordo em escova foram notadas nos túbulos de Malpighi. Outros autores trabalhando com o imidacloprido ou com outros inseticidas relataram danos semelhantes no trato digestório e nos túbulos de

abelhas *A. mellifera* adultas ou em estágio larval (JESUS, 2007; KAKAMAND et al.,2008; CRUZ et al., 2010, FERREIRA, 2010, ROSSI, 2010).

Segundo Malaspina e Stort (1985), inseticidas que agem no sistema nervoso, como o imidacloprido, podem causar paralisia das pernas, asas e, principalmente, do trato digestório fazendo com que as abelhas deixem de se alimentar e se hidratar culminando na morte dessas por fome ou desidratação.

A técnica histoquímica para CO é utilizada como marcador metabólico de atividade celular. Os níveis de marcação desta enzima revelam, segundo Armengaud et al. (2001), efeitos patológicos, crônicos de cirurgias e de tratamentos farmacológicos em células de mamíferos. Pridgeon et al. (2009) comprovaram que a expressão da subunidade III da CO é induzida por contaminação de xenobióticos nos insetos.

O aumento no metabolismo celular, evidenciado pela maior marcação de CO, no ventrículo de abelhas tratadas após a identificação de alterações morfológicas pode ter ocorrido em resposta à citotoxicidade do inseticida indicando a tentativa de combater os danos provocados pelo mesmo e de neutralizar o imidacloprido ingerido.

Os túbulos de Malpighi apresentam um importante papel no processo de desintoxicação por agirem ativamente na eliminação de substâncias que não foram metabolizadas e/ou que estão em excesso no organismo (BERRIDGE, 1969). Assim, a marcação aumentada de CO para as duas concentrações mais altas de imidacloprido refletiria a potencialização da atividade de excreção para eliminação do composto tóxico presente na hemolinfa.

Nos corpos pedunculados tratados com a menor concentração, $CL_{50}/10$= 4,25 ng i.a./µL dieta, não houve marcação aumentada de CO e de caspase-3 e a incidência de alterações morfológicas e ultraestruturais foi baixa em relação aos corpos pedunculados de indivíduos controle. Para esta concentração subletal não houve diferença de marcação de CO em comparação ao controle também para o ventrículo e túbulos de Malpighi.

Tais resultados sugerem que a concentração de 4,25 ng/µL não atingiu o limiar que dispara respostas celulares à citotoxicidade, por isso a atividade celular permaneceu semelhante ao controle para as três estruturas analisadas.

Embora o metabolismo celular não tenha sido aumentado, as atividades normais de digestão, metabolização, desintoxicação e excreção do organismo podem ter dificultado a chegada do imidacloprido ao sistema nervoso, além da presença da barreira neuroglial que possui função seletiva e protege o cérebro da entrada de

substâncias potencialmente nocivas. Tal fato explicaria a baixa ocorrência de alterações e danos celulares nos corpos pedunculados de abelhas que receberam alimento contaminado com 4,25 ng/µL de imidacloprido.

Em trabalho realizado por Brunet et al. (2005) abelhas *A. mellifera* receberam o inseticida acetamiprido por tratamento oral em dose 1500 vezes menor do que a dose letal de ingestão e sua distribuição e metabolização foram acompanhadas. Os resultados mostraram que a quantidade do inseticida que atingiu a região da cabeça foi menor do que 7,6% do composto ingerido. Em pesquisa semelhante, Suchail et al. (2004) detectaram apenas 5% da quantidade total ingerida de imidacloprido na cabeça de abelhas melíferas.

Os sintomas de intoxicação como hiperexcitação e paralisia, decorrentes desta pequena concentração podem ter sido provocados pela ação agonista do imidacloprido sobre o cordão nervoso ventral e não necessariamente sobre o cérebro.

Zafeiridou e Theophilidis (2004) expuseram o cordão nervoso de *Tenebrio molitor* a diferentes concentrações de imidacloprido para avaliar a atividade respiratória dos motoneurônios. Os autores comprovaram que a atividade respiratória aumentou de forma dose dependente sendo que na dose de 1,00 µM houve uma hiperexcitação abrupta dos motoneurônios levando a contração da musculatura abdominal.

Nas concentrações de 21,25 ($CL_{50}/2$), 42,50 (CL_{50}) e 85 ($CL_{50}X2$) ng i.a./µL dieta, a ausência de marcação diferenciada de CO em relação ao controle pode ser explicada pelos danos observados nas mitocôndrias através de ultraestrutura. Segundo Loeffler e Kroemer (2000), quando a apoptose acontece por via intrínseca a permeabilidade das mitocôndrias é alterada e a liberação de citocromo c para o citoplasma interrompe o fluxo de elétrons entre os complexos III e IV. Assim, como a CO é uma enzima terminal da cadeia respiratória indicando a atividade mitocondrial, sua não marcação neste trabalho pode ser decorrente do desacoplamento da cadeia respiratória.

Pridgeon et al. (2009) ao submeterem mosquitos da espécie *Aedes aegypti* ao tratamento com DL_{100} do inseticida permetrina verificaram que doses elevadas causam baixa transcrição da CO, devido a potencialização do modo de ação do composto levando rapidamente o inseto a morte.

Ling e Zhang (2011) relataram resultados semelhantes aos deste trabalho para as mitocôndrias do sistema nervoso de insetos da espécie *Nilaparvata lugens* tratados com

fipronil, as quais apresentaram ausência de cristas, inchaço, distorção e ruptura de membranas.

Os danos provocados ao órgão alvo do imidacloprido foram comprovados pela expressão significativa de caspase-3, enzima efetora do processo apoptótico (GRIVICICH et al., 2007), nas concentrações de 21,25, 42,50 e 85 ng/µL em relação ao controle e pela compactação cromatínica, primeira alteração nuclear observada durante a morte celular (WYLLIE et al., 1980).

Silva-Zacarin et al. (2006) constataram um aumento no nível de morte celular em glândulas salivares de larvas de *A. mellifera* expostas ao ácido oxálico e Jia e Misra (2007) observaram expressão significativa de caspase-3 após a exposição de células de neuroblastoma humanas ao endosulfan, assim, estes autores sugerem que a exposição aos inseticidas induz a ocorrência de morte celular.

Trabalhos tem demonstrado alterações comportamentais em decorrência do tratamento com o imidacloprido. Medrzycki et al. (2003) realizaram testes laboratoriais e observaram que as abelhas quando tratadas oralmente tiveram sua mobilidade reduzida e declínio na capacidade de comunicação. Decourtye et al. (2004) mostraram que após trinta minutos de tratamento oral com imidacloprido, as abelhas apresentaram uma deficiência no aprendizado olfatório, verificada através do método de resposta de extensão da probóscide (REP). Lambin et al. (2001) em contaminação tópica das abelhas mostraram que a atividade motora foi prejudicada nas doses de 2.5, 5, 10 e 20 ng/abelha e favorecida pela dose de 1.25 ng/abelha.

Os danos cerebrais evidenciadas por este trabalho podem explicar os resultados encontrados pelos autores acima, principalmente no que se refere às alterações cognitivas, como capacidade de comunicação e aprendizagem. Os corpos pedunculados são centros de convergência multissensorial e por isso estruturas diretamente relacionadas com a interpretação dos estímulos olfativos, visuais e mecanossensoriais e, consequentemente, com a aprendizagem e formação de memória (KIYA et al., 2007).

Assim, conclui-se que o imidacloprido é citotóxico para as células dos corpos pedunculados, ventrículo e túbulo de Malpighi podendo comprometer a fisiologia destes. As alterações observadas em decorrência da exposição ao inseticida podem comprometer o comportamento e sendo os meliponíneos importantes agentes polinizadores da flora nativa não só a colônia destas abelhas é prejudicada, como também o ecossistema do qual estes indivíduos fazem parte.

O uso de inseticidas em culturas, especialmente aquelas localizadas próximas a meliponários e matas que abrigam colônias de abelhas, deve ser revisto a fim de preservar as espécies polinizadoras e evitar prejuízos posteriores. A redução na densidade populacional das abelhas decorrentes da intoxicação por pesticidas, como já foi sugerido por Malaspina e Silva-Zacarin (2006), pode diminuir os serviços de polinização nos ecossistemas naturais e agrícolas e a manutenção da capacidade reprodutiva das plantas.

Os dados obtidos não só visam embasar pesquisas toxicológicas posteriores, como também alertar para a importância da preservação dos agentes polinizadores, como as abelhas sem ferrão, e o meio ambiente onde esses insetos são encontrados.

8. CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

1 - A toxicidade letal tópica (DL_{50}) do imidacloprido para a espécie *S. postica* foi de 25,20 em 24 horas e de 24,46 ng i.a./µL/abelha em 48 horas mostrando que esta espécie foi mais susceptível à ação do imidacloprido do que *A. mellifera*. A CL_{50} por ingestão foi de 42,50 em 24 horas e de 42,50 ng i.a./µL dieta em 48 horas, assim, conclui-se que o imidacloprido é mais tóxico para as abelhas sem ferrão quando administrado topicamente, provavelmente devido à metabolização do inseticida em produtos de menor toxicidade no trato digestório.

2- Corroborando o exposto acima, os órgãos que participam da metabolização e excreção de substâncias no organismo, ventrículo e túbulos de Malpighi respectivamente, tiveram um aumento no metabolismo celular evidenciado pelo aumento na marcação de CO. Este fato indica a tentativa de neutralizar os efeitos tóxicos do imidacloprido. Alterações morfológicas como a degeneração do epitélio digestivo e o rompimento celular dos túbulos de Malpighi sugerem que o inseticida prejudica a fisiologia do sistema digestório e excretório dos insetos.

3- Não houve alterações na marcação de CO nos corpos pedunculados de abelhas tratadas em relação ao controle, porém nas técnicas de HE e CEC uma dilatação dos espaços celulares foi evidenciada. A marcação significativa para caspase-3 comprovou que o imidacloprido leva a morte das células de Kenyon e a ultraestrutura mostrou, ainda, que danos graves foram ocasionados nas células nervosas de abelhas tratadas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSY, M. L; BEZERRA, E. B; KERR, W. E. Plantas nectaríferas utilizadas por duas espécies de *Melipona* da Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v.10, n.3, p.81-271, 1980.

ALBERTS, B; BRAY,D; HOPKIN,K; JOHNSON,A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER,P. **Fundamentos da Biologia Celular**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 740 p. (2ª edição).

ASHE, P. C; BERRY, M. D. Apoptotic signaling cascades. **Progress in Neuro-phychopharmacology and biological psychiatry**, Oxford, v.27, n.2, p.199-214, abr. 2003.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL/ANDEF. **Liderança em tecnologia fitossanitária.**
Disponível em: <http://www.andef.com.br/2008/opiniao.asp?numero=181>. Acesso em: nov. 2009.

ARMENGAUD, C; AIT-OUBAH, J; CAUSSE, N; GAUTHIER, M. Nicotinic acetylcholine receptor ligands differently affect cytochrome oxidase in the honeybee brain. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v.304, p.97-101, mai. 2001.

BANERJEE, S; BHAT, M. A. Neuron-Glial Interactions in Blood-Brain Barrier Formation. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v.30, p.235-258, 2007.

BERRIDGE, M.J.; OSCHMANN, J.L. A structural basis for fluid secretion by Malpighian tubules. **Tissue and Cell**, Edinburgh, v.1, n.2, p. 247-272, 1969.

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

BONMATIN, J. M; MOINEAU, I; CHARVET, R; FLECHE, C; COLIN, M. E; BENGSCH, E. R. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. **Analytical Chemistry**, Washington, v.75, n.9, p.2027-2033, mai. 2003.

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

BRADLEY, T. J. The excretory system: structure and physiology. In: KERKUT, G. A; GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemestry and pharmacology**. London: Pergamon. 1985. p. 421-465. v.4.

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

BRUNET, J. L; BADIOU, A. BELZUNCES, L. P. In vivo metabolic fate of [14C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. **Pest Management Science**, Sussex, v.61, n.8, p.742-748, 2005.

BUCKINGHAM, S. D; LAPIED, B; LE CORRONC, H; GROLLEAU, F; SATTELLE, D. B. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. **The Journal of Experimental Biology**, Cambrigde, v.200, p.2685-2692, ago.1997.

CAPALDI, E. A; ROBINSON, G. E; FAHRBACH, S. E. Neuroethology of spatial learning: the birds and the bees. **Annual Review of Psychology**, Palo Alto, v.50, p.651-682, fev. 1999.

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

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

CHEN, Y. F; CHIANG, H. M; TAN, T. W; LAI, J. S; TSAI, H.Y. The Influence of Noise Stress-Induced Pain-Threshold Increase on Central Monoaminergic Neurons. Mid. **Taiwan Journal of Medicine**, v.7, p. 135-145, 2002.

CHEN, C; CHEN, Q; MAO, Y; XU, S; XIA, C; SHI, X; ZHANG, J. H; YUAN, H; SUN, X. Hydrogen-Rich Saline Protects Against Spinal Cord Injury in Rats. **Neurochemical Research**, New York, v.35, p.1111-1118, mar. 2010.

CRUZ, A. S; SILVA- ZACARIN, E. C. M; BUENO, O. C; MALASPINA, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biology and Toxicology**, Dordrecht, v.26, p. 165-179, 2010.

CRUZ-LANDIM, C. Specializations of the Malpighi Tubules cells in a stingless bee, *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae). **Acta Microscópica**. Caracas, v. 7, n. 2, p. 26-33, 1998.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Ed. UNESP, 2009. 416p.

CRUZ-LANDIM, C; SILVA-DE-MORAES, R. L. M.; SERRÃO, E. Ultraestrutural aspects of epitelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). **Journal of comparative biology**, São Paulo, v.1, p.29-40, 1996.

CUTLER, G. C; SCOTT-DUPREE, C. D. Exposure to clothianidin seed-treated canola has no long-term impact on honey bees. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.100, p.765-772, 2007.

DECOURTYE, A; ARMENGAUD, C; 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 of Biochemistry Physiology**, San Diego, v.78, p.83-92, 2004.

DEL SARTO, M. C. L. **Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae).** 2009. 64f. Tese de doutorado em Entomologia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

DEPLEDGE, M. H; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment. 2. Invertebrates. **Ecotoxicology**, London, v. 3, p.161–172, 1994.

DEPLEDGE, M. H; AAGAARD, A; GYÖRKÖS, P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v.31, p.19–27, 1995.

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

DOW, J. A. T. Ion and water transport in locust alimentary canal: evidence from in vivo electrochemical gradients. **The Journal of Experimental Biology**, v.93, p.167-179, 1981.

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

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

FARRIS, S. M; ROBINSON, G. E; DAVIS, R. L; FAHRBACH, S.E. Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. **The Journal of Comparative Neurology**, Hoboken, v.414, p.97-113, 1999.

FARRIS, S. M; SINAKEVITCH, I. Development and evolution of the insect mushroom bodies: towards the understanding of conserved developmental mechanisms in a higher brain center**. Arthropod Structure and Development**, Oxford, v.32, n.1, p.79-101, 2003.

FERREIRA, F. C; CRUZ-LANDIM, C. Comparative study of the midgut morphology and digestive parameters in workers, queens and males of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae, Apinae). **Naturalia**, Rio Claro, v.29, p.39-48, 2004.

FERREIRA, R. A. C. **Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de malpighi de operárias adultas de S*captotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico**. 2010. 83f. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

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

GALLO, D; NAKANO, O; SILVEIRA NETO, S; CARVALHO, R. P. L; BAPTISTA, G. C; BERTI FILHO, E; PARRA, J. R. P; ZUCCHI, R. A; ALVEZ, S. B; VENDRAMIM, J. D; MARCHINI, L. C; LOPES, J. R. S; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, v.10).

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

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

HO, M. W; CUMMINS, J. Mystery of disappearing honeybees. **Science Society,** v. 34, p.35-36, 2007.

JESUS, D. **Análise morfológica dos túbulos de Malpighi e dos ventrículos de operárias recém-emergidas de *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apinae) tratadas com fipronil e ácido bórico**. 2007. 101f. Trabalho de conclusão do curso (Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

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

JIMENEZ, D. R; GILLIAM, M. Ultrastructure of the ventriculus of the honeybee *Apis mellifera* L.: cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase and nonspecific esterase. **Cell and Tissue Research**, New York, v.261, p.431-443, 1990.

JUNQUEIRA, L. C. U; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia.** São Paulo: Editora Santos, p.48-81, 1983.

KAKAMAND, F. A. K. H; MAHMOUD, T. T; AMIN, A. B. M. The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers. **Journal of Duhok University**, v. 11, n.1, p.144-151, 2008

KERR, W. E; NASCIMENTO, V. A; CARVALHO, G. A. Preservation of native Brazilian bees: a question of historical and ecological conscience. **Ciência e Cultura - Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science.** São Paulo, v.51, p.390-393, 1999.

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

KOMISCHKE, B; SANDOZ, J. C; MALUN, D; GIURFA, M. Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. **European Journal of Neuroscience,** Oxford, v.20, p.477-485, 2005.

LAMBIN, M; ARMENGAUD, C; RAYMOND, S; GAUTHIER, M. Imidacloprid-Induced Facilitation of the Proboscis Extension Reflex Habituation in the Honeybee. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.48, p.129-134, 2001.

LING, S; ZANG, R. Effect of fipronil on brain and muscle ultrastructure of *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.74, n.5, p.1348-1354, jul. 2011.

LOEFFLER, M; KROEMER, G. The Mitochondrion in Cell Death Control: Certainties and Incognita. **Experimental Cell Research,** New York, v.256, p.19–26, 2000.

MALASPINA, O; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell makers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v.23, n.3/4, p.303-309, 2006.

MALASPINA, O; STORT, A. C. As abelhas e os pesticidas. **Apicultura no Brasil**, v.2, n.10, p.42-45, 1985.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas.** 6.ed. São Paulo: Nobel, 1983. 305p. v.1.

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

MELLO, M. L. S; VIDAL, B. C; DANTAS, M. M; MONTEIRO, A. L. P. Discrimination of the nucleolus by a critical eletrolyte concentration method. **Acta Histochemical Cytochemica**l, v.26, p.1-3, 1993.

MICHENER, C.D. **The social behavior of the bees: a comparative study.** Cambridge: Harvard Univ. Press, 1974. 404p.

MORAES, S. S; BAUTISTA, A. R. L; VIANA, B. F. Avaliação da Toxicidade Aguda (DL_{50} e CL_{50}) de Inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): Via de Contato**. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.29, n.1, p.31-37, 2000.

NAUEN, R; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U; SCHMUCK, R. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Pest Management Science,** West Sussex, v.57, p.577-586, jul. 2001.

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

NICHOLSON, D. W; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochemical Sciences**, Cambridge, v.22, p.299-306, 1997.

NOGUEIRA-COUTO, R. H; ABE, C.S; PITELLI, R. A. Efeito do paraquat na mortalidade de operárias de *Apis mellifera* (abelhas africanizadas). **Naturalia**, v.21, p.49-55, 1996.

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

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 2, EFFECTS ON BIOTIC SYSTEMS. Honeybees, Acute Contact Toxicity Test, n.214, set. 1998a. 7p.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 2, EFFECTS ON BIOTIC SYSTEMS. Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, n.213, set. 1998b. 8p.

OLDROYD, B.P. What´s killing American honey bees? **Plos Biology**, San Francisco, v.5, n.6, p.1195-1199, 2007.

PRIDGEON, J. W; BECNEL, J. J.; CLARK, G. G.; LINTHICUM, K. J. Permethrin induces overexpression of multiple genes in *Aedes aegypti*. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.46, p.580-587, 2009.

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

ROAT, T. C. **Diferenciação do cérebro de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose: estudo comparativo entre castas e sexos**. 2008. 184f. Tese de doutorado em Ciências Biológicas- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

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

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

ROSSI, C. A. **Efeitos de doses subletais do imidaclopride no cérebro, ventrículo e túbulo de Malpighi de *Apis mellifera* africanizada**. 2010. 101f. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)- Instituto de Biociências Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

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

SANTOS, T. C. A; CRUZ-LANDIM, C. Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): diferenciação do ovário. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v.19, n.3, p.703 - 714, jul. 2002.

SATTLER, A. Doenças de Abelhas no Sul do Brasil. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 8, 2008, Ribeirão Preto. **Anais…** Ribeirão Preto: FFCLRP-USP, 2008. p.49.

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

SCHMUCK, R; SCHONING, R; STORK, A; SCHRAMEL, O. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers**. Pest Management Science,** West Sussex, v.57, p.225-238, set. 2001.

SILVA-ZACARIN, E. C. M; GREDORC, A; SILVA DE MORAES, R. L. M. 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.

SNODGRASS, R. E. **Principles of Insect Morphology**. New York: McGraw-Hill Co., 1935. p.667.

SPADOTTO, C. A; GOMES, M. A. F; LUCHINI, L. C; ANDRÉA, M. M. Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Documentos 42. EMBRAPA: CNPMA, Jaguariúna, 2004. 29p.

SUCHAIL, S; DEBRAUWER, L; BELZUNCES, L. P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science,** West Sussex, v.60, n.3, p.291-296, mar. 2004.

TERRA, W. R; FERREIRA, C. The physiological role of the peritrofic membrane and trehalose: digestive enzymes in the midgut and excreta of stawed larval of *Rhynchosciara*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.27, p. 325-331, 1981.

TERRA, W. R. The origin and function of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.47, p.47-61, 2001.

THOMPSON, H. Behavioral effects of pesticides in bees- their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, London, v.12, p.317-330, fev. 2003.

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

VAN DER STEEN, J. J. M. Review of the methods to determine the hazard and toxicityof pesticides to bumblebees. **Apidologie**, Versailles, v.32, p. 399-406, 2001.

VANENGELSDORP, D; EVANS, J. D; SAEGERMAN, C; MULLIN, C; HAUBRUGE, E; NGUYEN, B. K; FRAZIER, M; FRAZIER, J; COXFOSTER, D; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R. M.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Colony Collapse Disorder: a descriptive study. **Plos One**, San Francisco, v.4, n.8, p.1-17, ago. 2009.

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

WALKER, C. H. The Use of Biomarkers to Measure the Interactive Effects of Chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.40, p.65-70, 1998.

WESTIN, R. Sumiço de abelhas intriga cientistas. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 7 jul. 2007. Vida & Meio Ambiente, p. A-14.

WYLLIE, A. H; KERR, I. F. R; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, New York, v.68, p.251-305, 1980.

YANG, E. C.; CHUANG, Y. C.; CHEN Y. L.; CHANG, L. H. Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.101, n.6, p.1743-1748, 2008.

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

ZAFEIRIDOU, G; THEOPHILIDIS, G. The action of the insecticide imidacloprid on the respiratory rhythm of an insect: the beetle *Tenebrio molitor*. **Neuroscience Letters**, Limerick, v.365, p. 205–209, 2004.

ZERBO, A. C. **Diferenciação morfológica e funcional do tubo digestivo de operárias de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2003. 101f. Tese de doutorado em Ciências Biológicas- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.