

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
MONITORAMENTO AMBIENTAL

Michele Provase

**ANÁLISE GENOTÓXICA DO FIPRONIL® NO CÉREBRO DE ABELHAS DA  
ESPÉCIE *Bombus atratus* (HYMENOPTERA, BOMBINI)**

Sorocaba  
2022

Michele Provase

**ANÁLISE GENOTÓXICA DO FIPRONIL® NO CÉREBRO DE ABELHAS DA  
ESPÉCIE *Bombus atratus* (HYMENOPTERA, BOMBINI)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento ambiental, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento ambiental

Orientação: Dr. Prof. Fábio Camargo Abdalla

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

Sorocaba

2022

Provase, Michele

Análise genotóxica do Fipronil® no cérebro de abelhas da espécie *Bombus atratus* (HYMENOPTERA, BOMBINI) / Michele Provase -- 2022.  
81f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba  
Orientador (a): Fábio Camargo Abdalla  
Banca Examinadora: Fabiana Martins Costa Maia, José Eduardo Serrão  
Bibliografia

1. Ecotoxicologia terrestre. 2. Genotoxicidade. 3. Abelhas. I. Provase, Michele. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -  
CRB/8 6979



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Michele Provase, realizada em 22/02/2022.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Fabio Camargo Abdalla (UFSCar)

Profa. Dra. Fabiana Martins Costa Maia (UTFPR)

Prof. Dr. José Eduardo Serrão (UFV)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

## DEDICATÓRIA

*Dedico a minha mãe e ao meu pai, pelo  
apoio e amor incondicional.  
E ao meu irmão, por todos os  
ensinamentos da vida*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus e a Nossa Senhora pela força e proteção, ao longo dessa trajetória.

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Fábio C. Abdalla, pela orientação, ensinamentos, seriedade profissional, confiança, e principalmente pelo carinho, por sempre me motivar e acreditar em meu potencial. Não há palavras suficientes para descrever o quanto sou grata por tudo.

Agradeço ao Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, pela oportunidade dada em obter mais essa conquista, e aos demais colegas e amigos de laboratório (Gláucia, Fernanda, Luccas e Felipe L. A. Nogueira).

Agradeço ao Guilherme A. N. S. Boeing, se não fosse por seu auxílio, dedicação e paciência, junto com o Prof. Fábio ao longo desse período com certeza este trabalho não teria sido concluído, obrigada por tudo.

Agradeço aos meus pais, Miguel Provase e Marli G. de F. Provase por todo apoio, conselhos e amor incondicional, e ao meu irmão Miguel Provase Jr., não há palavras para descrever o quanto amo vocês, obrigada por sempre ensinar a nunca desistir e me motivar a ser cada vez mais fortes com as dificuldades da vida.

Agradeço às minhas amigas, Natali S. Ferreira, por sempre estar ao meu lado como um anjo em todos os momentos maravilhosos (e outros nem tanto), mesmo com a distância esteve sempre me dando forças, incentivos e muito carinho. A minha eterna parceria de laboratório Cíntia R. de Lima, pelo carinho, apoio, encorajamento, pelas risadas e pelos ótimos momentos compartilhados.

Agradeço aos amigos Vinícius A. de Leles, por sempre estar presente nos momentos mais importantes da minha vida, sempre me dando apoio e carinho, e ao Felipe A. Silva, pelo imenso carinho, incentivos, apoio.

Agradeço às minhas amigas Bárbara A. Godinho, Giovana H. T. dos Santos, Larissa C. da Silva pelo companheirismo e apoio mesmo a distâncias, me proporcionando altas risadas.

Agradeço às minhas amigas e amigo Liliane Neri, Marina Tauche , Luana Tavares, João Godinho e Amanda Jabur que tive o prazer de conhecer nessa pós-graduação, obrigada pela amizade, companheirismo e paciência. Admiro muitos vocês pela determinação e por lutarem pelos seus sonhos. Guardarei todos no meu coração com muito carinho.

Agradeço a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental, pela oportunidade de desenvolver esse projeto.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos (Processo - 88887.492976/2020-00), que me permitiu desenvolver esse projeto

## RESUMO

PROVASE, Michele. Análise genotóxica do Fipronil<sup>®</sup> no cérebro de abelhas da espécie *Bombus atratus* (Hymenoptera: Bombini). 2021. Dissertação Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, 2021.

O fipronil<sup>®</sup> é um inseticida de ação neurotóxica, efetivo no combate às pragas. Atualmente não há estudos sobre os seus efeitos genotóxico no cérebro de abelhas. Em razão disso, o presente estudo buscou verificar a genotoxicidade do fipronil<sup>®</sup> às duas concentrações estimadas em campo no cérebro de operárias de *Bombus atratus* através de microeletroforese. Operárias de *B. atratus* foram coletadas em campo e transferidas para o laboratório onde foram mantidas isoladamente em estufa B.O.D. (26 °C, 70% umidade relativa) por 96 horas. A exposição foi realizada oferecendo uma solução contaminada com fipronil à 2,5 ppb e 3,5 ppb. O grupo controle mantido em mesma condição foi ofertada água filtrada. Para todos os grupos foram ofertada sacarose 70% *ad libitum* como alimento. Após exposição, as abelhas foram crio-anestesiadas e dissecadas, o cérebro retirado foi macerado e centrifugado para isolamento dos núcleos. As amostras preparadas foram submetidas à técnica Ensaio Cometa. Os cometas foram analisados através de microscópio ótico, e pelos parâmetros: Índice de Danos (ID), Frequência de Dano (FD%) e Dano total (DT). Aplicou-se também teste estatístico de *Tukey* ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram que os valores médios obtidos para ID e FD% apresentaram diferenças notáveis entre os grupos experimentais em relação ao grupo controle. Entretanto, ao analisar DT através do teste de *Tukey*, observou-se que a concentração 2,5 ppb não causou danos significativos ao DNA nas células neurais de *B. atratus* ( $p = 0,4434$ ), como observado na concentração de 3,5 ppb que induziu efeitos genotóxicos significativos ao cérebro dessas abelhas ( $p = 0,0215$ ). Assim, conclui-se que a concentração encontrada em campos de 3,5 ppb é genotóxica ao cérebro de operárias de *B. atratus*.

Palavras-chave: ensaio cometa; *Bombus atratus*; fipronil; genotoxicidade.

## ABSTRACT

PROVASE, Michele. Genotoxicity of Fipronil® in the brain of bumblebee *Bombus atratus* (Hymenopter: Bombini). 2021. Dissertação Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, 2021.

Fipronil® is a neurotoxic insecticide, effective for control of crop pests. However, there are no data about possible genotoxic effect of sublethal concentrations in the brain of pollinator bees. Therefore, this study aimed sought to analyze the genotoxicity of fipronil® at two concentrations estimated in the field in the brain of foraging workers of *Bombus atratus* through microelectrophoresis. Workers of *B. atratus* were collected in the field and transferred to laboratory where they were kept isolately at 26 °C and 70% relative humidity for 96 hours. Exposure was performed by offering a solution contaminated with fipronil at 2.5 ppb and 3.5 ppb and water as control. Sucrose syrup at 70% was offered to all groups as food *ad libitum*. After exposure, the workers were cri-anesthezed at 4 °C and dissected, the removed brain was macerated and centrifuged to isolate the nuclei. The prepared samples were submitted to the Comet Assay technique. Comets were analyzed using an optical microscope, and by the parameters: Damage Index (ID), Damage Frequency (FD%) and Total Damage (DT). Tukey's statistical test was also applied ( $p < 0.05$ ). The results showed that the mean values obtained for ID and FD% showed notable differences between the experimental groups in relation to the control group. However, when analyzing DT through the Tukey test, it was observed that the concentration of 2.5 ppb did not cause significant damage to the DNA of the neural cells of *B. atratus* ( $p = 0.4434$ ), as observed in the concentration of 3.5 ppb, that induced significant genotoxic effects in the brain of these bees ( $p = 0.0215$ ). Thus, it is concluded that the concentration found in fields of 3.5 ppb is genotoxic to the brain of *B. atratus* workers.

Keywords: comet assay; *Bombus atratus*; fipronil; genotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Visualização interna do ninho de abelhas pertencente ao gênero <i>Bombus</i> .	23
FIGURA 2. Representação do sistema nervoso das abelhas .....	25
FIGURA 3. Representação das diferentes estruturas morfológicas presentes no cérebro das abelhas.....	26
FIGURA 4. Principais etapas da técnica Ensaio Cometa.....	29
FIGURA 5. Níveis de danos ao DNA e suas respectivas categorias no Ensaio Cometa. ....	29
FIGURA 6. Número de periódicos indexados nos anos de 2010 a 2021 no banco de dados <i>Scopus</i> e <i>ScienceDirect</i> referentes aos estudos com Ensaio Cometa em insetos. ....	32
FIGURA 7. Estrutura química do inseticida fipronil .....	38
FIGURA 8. Estrutura química dos metabólitos resultantes do processo de degradação do fipronil no meio ambiente.....	39
FIGURA 9. Mecanismo de ação do fipronil no receptor GABA.....	41
FIGURA 10. Número de periódicos indexados nos anos de 2010 a 2021 no banco de dados <i>Scopus</i> e <i>ScienceDirect</i> referentes aos estudos com inseticida fipronil em abelhas .....	42
FIGURA 11. Abelha operária de <i>Bombus atratus</i> .....	47
FIGURA 12. Protótipo de Caixa Entomológica para exposição de insetos em ensaios ecotoxicológicos .....	48
FIGURA 13. Representação esquemática do processo de análise e contagem dos nucleoides presentes nas lâminas histológicas de ambos os grupos.....	51
FIGURA 14. Representação visual das comparações analíticas entre os estados de integridade da cromatina em diferentes níveis no cérebro de <i>Bombus atratus</i> . ....	52
FIGURA 15. Micrografia referente a presença de nucleoides no cérebro de <i>Bombus atratus</i> observado no grupo controle .....	54
FIGURA 16. Micrografia dos níveis de cometas observados nos grupos experimentais 1 e 2. ....	56

FIGURA 17. Micrografias referentes aos padrões observados nos grupos: Experimental 1 (2,5 ppb de fipronil) e Experimental 2 (3,5 ppb de fipronil) .....	57
FIGURA 18. Análise estatística referente ao Dano Total (DT) entre os grupos controle, experimental 1 e experimental 2.....	60

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Aplicação da técnica Ensaio Cometa na avaliação de danos ao DNA em diferentes modelos de insetos. ....	34
TABELA 2. Efeitos do fipronil em diferentes espécies de abelhas. ....	44
TABELA 3. Valores descritivos do Índice de danos (ID), Frequência de Dano (FD%) e Dano Total (DT) no cérebro de <i>Bombus atratus</i> expostas às concentrações de 2,5 ppb e 3,5 ppb de fipronil. ....	59

## LISTA DE AREVIATURAS E SIGLAS

Ab – Anel basal

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANOVA – Análise de Variância

b – Borda

c – Colar

Ce – Cérebro

cc – Corpo central

co – Conectivos

cm – Cálice mediano

cp – Corpo pedunculado

CT – Cometas

DT – Dano Total

FAO – Food and Agriculture of the United Nations

FD% – Frequência de Dano

ga – Gânglios abdominais

GABA – Ácido gama-aminobutírico

gt – Gânglio torácico

GluCl – Glutamato

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

ID – Índice de Dano

la – Lâmina

La – Lobo antenal

lo – Lobo óptico

me – Medula

n – Nucleoides

N – Nervos

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development

P – Pedúnculo

pc – *pons cerebralis*

Pr – Protocérebro

Pl – Lateral do protocérebro

SCGE – Single Cell Gel Eletrophoresis

SN – Sistema Nervoso

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2 Objetivo Específico</b> .....	<b>20</b>
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1 Abelhas do gênero <i>Bombus</i></b> .....	<b>21</b>
3.1.1 Biologia geral das abelhas <i>Bombus</i> .....	21
3.1.2 Ciclo biológico das colônias de <i>Bombus atratus</i> .....	22
<b>3.2 Sistema Nervoso das abelhas: Cérebro</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3 Ensaio Cometa</b> .....	<b>27</b>
3.3.1. Caracterização da técnica Ensaio Cometa .....	27
3.3.2. Benefícios do Ensaio Cometa para a ecotoxicologia.....	30
3.3.3. Aplicabilidade do Ensaio Cometa em insetos .....	31
3.3.4 Diversificando modelos de estudos no Ensaio Cometa: As abelhas .....	37
<b>3.4. Fipronil</b> .....	<b>38</b>
3.4.1. Fipronil: Propriedades físicas, químicas e biológicas. ....	38
3.4.2 Fipronil: Mecanismo de ação .....	40
3.4.3 Evidências do efeito de inseticidas fipronil em abelhas eussociais .....	41
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1. Coleta</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2. Manutenção dos animais em condições laboratoriais</b> .....	<b>47</b>
<b>4.3 Fracionamento celular para o Ensaio Cometa</b> .....	<b>48</b>
<b>4.4 Ensaio Cometa</b> .....	<b>49</b>
4.4.1 Preparo das lâminas histológicas .....	49
4.4.2 Tratamento com Solução de Lise .....	49
4.4.3. Eletroforese.....	50
<b>4.5 Coloração das lâminas histológicas Ensaio Cometa</b> .....	<b>50</b>
<b>4.6 Análise das lâminas histológicas</b> .....	<b>50</b>
4.6.1 Análise estatísticas das lâminas histológicas.....	52
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>5.1 Análise visual do efeito genotóxico do fipronil no cérebro de <i>Bombus atratus</i></b> .....	<b>54</b>
<b>5.2 Danos ao DNA no cérebro de <i>Bombus atratus</i></b> .....	<b>58</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>64</b>
<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>77</b>
<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>79</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As abelhas são importantes polinizadores devido à sua eficácia e ampla distribuição em diferentes paisagens geobotânicas. Estudos mostram que cerca de 25 mil espécies de abelhas são responsáveis pelos serviços de polinização de diferentes biomas, bem como na manutenção de 90% das florestas nativas, proporcionando o melhoramento na qualidade dos frutos e na ampliação de 70% da produtividade agrícola (FAO, 2004; FAO, 2021; FREITAS; PINHEIROS, 2012; KHALIFA *et al.*, 2021; KLEIN *et al.*, 2007, RICKETTS *et al.*, 2008; REILLY *et al.*, 2020; SCIENCE FOR ENVIRONMENT POLICY, 2020).

Embora seja evidente a importância dos polinizadores para os serviços ecossistêmicos e para produção de alimentos do setor agrícola, um fenômeno que tem preocupado a comunidade científica é o crescente registro de desaparecimento e redução de populações inteiras de abelhas pelo mundo, ocasionado por diferentes fatores bióticos e abióticos (ABDALLA; DOMINGUES; BALSAMO, 2018; BALSAMO *et al.*, 2019; DOMINGUES *et al.*, 2017; FREITAS; PINHEIROS, 2012; GOULSON *et al.*, 2015; NOGUEIRA *et al.*, 2019).

Atualmente tem-se observado o desaparecimento e diminuição de populações de muitas espécies de abelhas pertencentes ao gênero *Bombus*, principalmente nos continentes europeu e americano, regiões que possuem um monitoramento maior e mais frequente (BIESMEIJER *et al.*, 2006; CAMERON *et al.*, 2011). Dentre os fatores que causam esse fenômeno, encontram-se: desmatamento; presença de patógenos; atividades industriais intensivas; fragmentação de áreas florestais devido à expansão agrícola; e uso indiscriminado de agrotóxicos (CAMERON *et al.*, 2011, FREITAS *et al.*, 2009; HUNG *et al.*, 2018; RICKETTS *et al.*, 2008).

Além disso, estudos recentes têm mostrado aumento dos índices de contaminação de abelhas por xenobióticos, principalmente durante as atividades de forrageamento, processo pelo qual as abelhas coletam pólen, néctar, água, resina e até argila ou barro para a manutenção da colônia. Sendo através da atividade de forrageamento que aumentam as chances de exposição dessas abelhas a diferentes substâncias químicas, como fungicidas (DOMINGUES *et al.*, 2017; PETTIS *et al.*, 2013), herbicidas (BOILY *et al.*, 2013), inseticidas (BALSAMO *et al.*, 2019; SIMON-DELISO *et al.*, 2015), e metais traços (ABDALLA; DOMINGUES; BALSAMO, 2018; CESCHI-BERTOLI *et al.*, 2020;

PROVASE *et al.*, 2021). De modo que os agrotóxicos — aos quais abrange as classes de herbicidas, fungicidas e inseticidas — tem-se destacados como os principais agentes tóxicos que mais causam efeitos negativos ao ciclo de vida das abelhas, contribuindo para o declínio das colônias (DICKS *et al.*, 2016; NOCELLI *et al.*, 2012).

No Brasil, o agronegócio é uma das principais atividades econômicas do país (VALADARES; ALVES; GALIZA, 2020), e à medida que ocorre expansão das áreas agrícolas, a demanda e uso de agrotóxicos aumenta, principalmente os agrotóxicos pertencentes a classe de inseticidas. Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), o Brasil está entre os maiores consumidores mundiais de agrotóxicos (IBAMA, 2019). Em 2019, contextualizando a situação, foi registrado um aumento de 12,97% (620.537,98 toneladas do princípio ativo) nas vendas internas de agrotóxicos em relação a 2018 (IBAMA, 2019).

O uso intensivo de inseticidas recorrentes das atividades agrícolas é altamente preocupante, principalmente para os polinizadores, visto que, esses agentes tóxicos apresentam grande persistência no meio ambiente, podendo ser encontrados resíduos no solo, água, pólen e néctar das plantas (CULLEN *et al.*, 2019; KRUPKE *et al.*, 2012; LENTOLA *et al.*, 2017; THOMPSON *et al.*, 2014), elementos com os quais as abelhas estão em constante contato (PANSERI *et al.*, 2014) como é o caso das espécies do gênero *Bombus*.

Algumas espécies do gênero *Bombus* são abelhas nativas e apresentam grande importância nas atividades de polinização, principalmente para as plantas silvestres, isso em relação à atividade de polinização realizada por espécies exóticas, como *Apis mellifera* Linnaeus 1758, uma polinizadora generalista (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2012). Essas abelhas do gênero *Bombus* também desempenham papel de destaque na polinização de algumas culturas agrícolas, como a do tomate (VELTHUIS; VAN DOORN, 2006).

Além disso, as abelhas do gênero *Bombus* são eficientes bioindicadores, e a utilização dos seus órgãos internos tem-se mostrado altamente relevante para estudos ecotoxicológicos, visto que um determinado agente tóxico pode não afetar a taxa de mortalidade de uma população, entretendo este pode interferir no *fitness* de seus indivíduos (ABDALLA; DOMINGUES; BALSAMO, 2018; NOGUEIRA *et al.*, 2019; PROVASE *et al.*, 2021).

No que se refere aos estudos ecotoxicológicos utilizando a espécie *Bombus atratus* Franklin 1913, estes são pouco explorados, e mais raros são os estudos utilizando

o cérebro destas abelhas na avaliação de genotoxicidade frente à ação dos inseticidas. Uma temática altamente relevante, dado que os inseticidas embora sejam aplicados em insetos-alvo, seu uso na agricultura pode ter implicações negativas ao atingir insetos não-alvo que atuam no controle de pragas ou na polinização (CULLEN *et al.*, 2019). Além disso, estudos apontam que cerca de 90% dos inseticidas utilizados possuem ação neurotóxica nos insetos (PEREIRA, 2010) como por exemplo, o fipronil.

O fipronil é um inseticida altamente tóxico, que se caracteriza por sua ação neurotóxica nos insetos, considerado o princípio ativo que mais causa a mortalidade em abelhas (CASTILHOS *et al.*, 2019; EL HASSANI *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2018; VIDAU *et al.*, 2011). O principal mecanismo de ação desse inseticida é o bloqueio do influxo de íons de cloreto através dos receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA) (BARBARA *et al.*, 2005), bem como os canais de cloreto ativados pelo glutamato (GluCl), presentes nos insetos (BARBARA *et al.*, 2005; NARAHASHI *et al.*, 2010). Como consequência da interrupção do influxo de íons de cloro, os impulsos sinápticos que ocorrem nas células nervosas são afetados negativamente, resultando em hiperexcitação neuronal, paralisia severa, e posteriormente, a morte dos insetos (WANG *et al.*, 2016b; ZHANG *et al.*, 2018).

Estudos realizados em abelhas *A. mellifera* mostraram que o fipronil, pode causar alterações morfológicas nos corpos celulares de neurônios, as chamadas células de Kenyon, presentes nos corpos pedunculados localizado no cérebro dessas abelhas (JACOB *et al.*, 2015; ROAT *et al.*, 2013). Desse modo, considerando que no cérebro das abelhas os corpos pedunculados (*corpora pedunculata*) estão associados principalmente a plasticidade comportamental desses organismos, representando o centro de integração multimodal, ao qual recebem informações olfativas, visuais e gustatórias (KIYA *et al.*, 2007), o comprometimento da funcionalidade e integridade dessas estruturas, induzidas pela ação do fipronil, resultam em inexorável disfunção sensorial e cognitiva do cérebro e consequente inabilidade das abelhas exercerem suas funções.

Nessa perspectiva, é possível compreender os danos genéticos causados pela ação do fipronil no cérebro de abelhas *B. atratus*, através da técnica do Ensaio Cometa, uma metodologia que consiste na migração diferencial das alças de DNA em cromatinas que sofrem descompactação, por um processo de microeletroforese (ÖSTILING; JOHANSON, 1984; SHAPOSHNIKOV *et al.*, 2008). Na ecotoxicologia, essa técnica vem se destacando como uma ferramenta importante para o monitoramento ambiental

(LAPUENTE *et al.*, 2015). Embora sua aplicação em estudos genotoxicológicos utilizando abelhas neotropicais seja pouco explorada, os pesquisadores Ceschi-Bertoli *et al.* (2020) realizaram um protocolo validando o uso do Ensaio Cometa em tecidos de abelhas, voltado para as espécies neotropicais *B. atratus*.

Nesse contexto, o presente estudo visou avaliar o efeito do fipronil no cérebro de abelhas operárias *B. atratus*, utilizando concentrações estimadas em campos (2,5 ppb e 3,5 ppb), através da técnica do Ensaio Cometa, com o intuito de elucidar os impactos causados por essa substância nestes organismos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Verificar possíveis efeitos genotóxicos do fipronil® no cérebro de operárias de *Bombus atratus*.

### **2.2 Objetivo Específico**

- Verificar se há efeitos de genotoxicidade do fipronil® no cérebro de operárias *Bombus atratus* nas concentrações de 2,5 ppb e 3,5 ppb.
- Verificar os efeitos de genotoxicidade do fipronil® a partir da aplicação dos parâmetros de Índice de Dano (ID), Dano Total (DT) e da Frequência de Dano (FD%).

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Abelhas do gênero *Bombus*

##### 3.1.1 Biologia geral das abelhas *Bombus*

As espécies do gênero *Bombus* são abelhas primitivamente eussociais pertencentes à Apidae (Bombini) (MICHENER, 2007), que compõem aproximadamente 250 espécies classificadas em 38 subgêneros (WILLIAMS, 1998; CAMERON; HINES; WILLIAMS, 2007).

Comumente encontradas em regiões com clima temperado, as abelhas das espécies *Bombus* estão presentes em todos os continentes com exceção da Oceania e Antártida (CAMERON *et al.*, 2011; GRIXTI *et al.*, 2009; MARTINS; MELO, 2010). Em termos de riqueza de espécies, essas abelhas apresentam altos índices em áreas montanhosas ou em latitudes elevadas como no Oriente e Paleoártico com cerca de 175 espécies, quando comparada à América do Sul, cujo número é reduzido a aproximadamente 22 espécies (WILLIAMS, 1996).

No Brasil as abelhas do gênero *Bombus* são popularmente conhecidas como “mamangavas” (GARÓFALO, 2005), as quais estão distribuídas geograficamente em 23 estados, exceto nos estados do Piauí, Sergipe e Tocantins (GARÓFALO, 1978a; 1978b; MOURE; MELLO, 2008). Segundo os registros apontados por Moure e Sakagami (1962) apenas seis espécies deste gênero são encontradas no país, sendo: *Bombus morio* Swederus 1787, *Bombus atratus* Franklin 1913, *Bombus bellicosus* Smith 1879, *Bombus brasiliensis* Lepeletier 1836, *Bombus brevivillus* Franklin 1913 e *Bombus transversalis* Oliver 1789. Embora as espécies *Bombus morio* e *Bombus atratus* sejam as mais abundantes e simpátricas principalmente nas regiões sul e sudeste do país (MICHENER, 2007; MOURE; SAKAGAMI, 1962; SAKAGAMI, 1976).

As abelhas pertencentes a esse grupo destacam-se por serem robustas, apresentando tamanho corporal grande (9 – 22 mm) e coloração diferenciada no tórax e abdômen, características variáveis de acordo com a espécie e subespécie (MICHENER, 2007). Devido ao seu tamanho corporal, esses indivíduos podem transportar uma grande quantidade de pólen de diferentes paisagens geobotânicas mesmo quando em condições adversas, além de possuírem estruturas especializadas como uma glossa longa que alcança até mesmo flores com corolas tubulares longas, comportamento de vibração do

tórax, agitando as anteras e liberando o pólen; sendo de grande importância para aumentar a variabilidade ou mesmo para que ocorra a fecundação cruzada em determinadas espécies vegetais (AGUILAR-BENAVIDES, 2008; HEINRICH, 2004).

A distância percorrida pelas abelhas operárias durante suas atividades de forrageamento depende de alguns fatores, tais como: densidade, sazonalidade da fonte de alimento, tamanho do corpo da abelha. Segundo os pesquisadores Goulson *et al.* (2010) as espécies de *Bombus* podem percorrer uma distância entre 3 – 10 Km durante o forrageamento, embora as distâncias mais comuns de forrageamento relatadas na literatura para esses indivíduos variam entre 250m e 2 Km, (KNIGHT *et al.*, 2005; HAGEN *et al.*, 2011; JHA; KREMEN, 2012; REDHEAD *et al.*, 2016).

### **3.1.2 Ciclo biológico das colônias de *Bombus atratus***

Em regiões tropicais as espécies de *Bombus* podem apresentar dois ciclos de vida anuais, já em regiões temperadas, há somente um ciclo, devido à estação de inverno, na qual a rainha fecundada tem um período de hibernação (GARÓFALO, 1979; DUCHATEAU; VELTHUIS, 1988; DEVILLERS; PHAM-DELEGUE, 2003). As espécies *B. atratus* apresentam ciclo de vida anual, embora no Brasil não há dados suficiente evidenciando a ocorrência de apenas um ou dois ciclos anuais (GARÓFALO; ZUCCHI; MUCCILLO, 1986). Entretanto, segundo Abdalla, F.C. (informação pessoal), os ninhos de *B. atratus* apresentam mais de um ciclo com a substituição da rainha mais de uma vez por ano.

Os ninhos são geralmente construídos em diferentes substratos naturais como em cavidade subterrânea (Figura 1) como solo, câmaras de saueiros abandonados, cupinzeiros e ocos de madeiras, sendo cobertos com uma camada de cera, detritos de plantas ou barro (MARTINS; MELO, 2010; MICHENER, 2007; MOURE; SAKAGAMI, 1962).

O ciclo de vida dessas abelhas se inicia na fase solitária da colônia com uma rainha fecundada que constrói os primeiros alvéolos de cria dando origem às primeiras operárias que auxiliarão no desenvolvimento da colônia (GARÓFALO, 2005; GOULSON, 2010). Período na qual a rainha realiza as atividades externas e internas da colônia, como coleta de alimento, construção dos potes de mel e casulos, até cuidado com as crias (GOULSON, 2010). Após o emergir das primeiras operárias a rainha cessa as atividades externas e

assumindo unicamente a função reprodutiva no interior da colônia, enquanto as operárias assumem as demais atividades internas, bem como as externas de forrageamento para manutenção da colônia (GARÓFALO, 2005; GOULSON, 2010).

FIGURA 1. Visualização interna do ninho de abelhas pertencente ao gênero *Bombus*.



Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional. Fotografia: Sidney Cardoso.

A dominância da rainha sobre as operárias é realizada através de agressões físicas não ritualizadas e com ausência de feromônios (VELTHUIS; VAN DOORN, 2006). Esse comportamento também é observado em *B. atratus* como uma maneira de impor limitações e defender o território de outras rainhas (GARÓFALO, 2005).

Contudo, quando a colônia atinge seu clímax de desenvolvimento, ocasionado pelo aumento na frequência de oviposições pela rainha acelerando o crescimento populacional da colônia e, conseqüentemente, o número de operárias, a rainha pode perder sua dominância e operárias com ovários desenvolvidos dão início a produção de sexuais (machos e rainhas), onde começam a ovipositar ovos haplóides que originarão machos (GARÓFALO, 1979). Os machos (filhos das operárias) saem do ninho após 3 – 4 dias de emergência, podendo variar entre as espécies deste gênero (GARÓFALO, 2005; AGUILAR-BENAVIDES, 2008).

O ciclo da colônia termina quando a rainha fundadora morre (CAMERON; JOST, 1998). Embora as colônias de *Bombus* Neotropicais, ao contrário do que acontece com espécies de clima temperado, são abelhas perenes, permitindo que uma rainha nova

assuma o ninho iniciando um novo ciclo evitando o final do ciclo biológico (GARÓFALO, 1979).

### **3.2 Sistema Nervoso das abelhas: Cérebro**

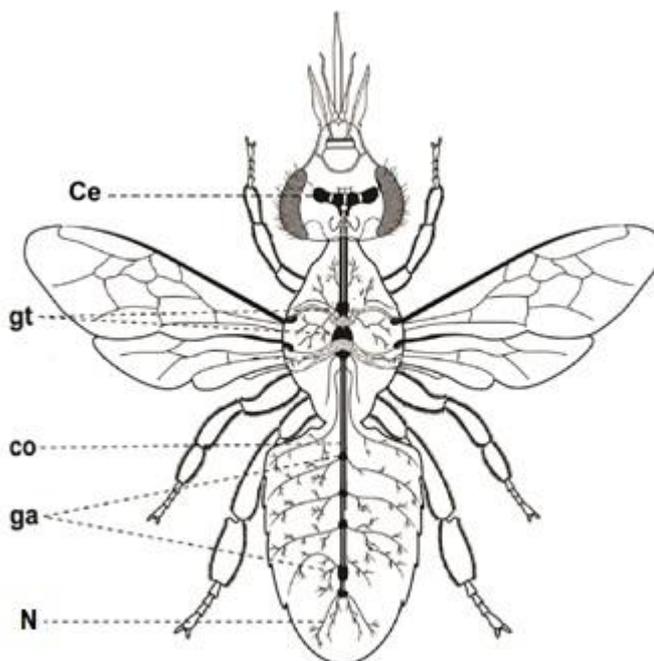
A aplicação de estudos ecotoxicológicos utilizando biomarcadores moleculares e celulares são de grande relevância para obter melhor compreensão dos fatores e os efeitos que causam mortalidade das abelhas. Perspectiva atribuída em relação aos estudos clássicos que pode não apresentar informações suficientes para uma compreensão clara e coesiva dos fenômenos que afetam as abelhas. (ABDALLA; DOMINGUES; BALSAMO, 2018; CATAE *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2015; DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007).

Estudos tem destaca que as abelhas são os insetos mais susceptíveis a exposição de diferentes contaminantes ambientais, principalmente durante a atividade de forrageamento. Em razão disso, estes organismos são considerados eficientes bioindicadores para estudo de avaliação risco como por exemplo, na avaliação de contaminantes ambientais com os inseticidas, visto que as abelhas são organismos altamente vulneráveis à ação neurotóxica dessas substâncias (BELZUNCES; TCHAMITCHIAN; BRUNET, 2012; JACOB, 2015).

Embora apresentem diferença anatômica entre o sistema nervoso dos vertebrados e dos insetos, a sua organização geral pode ser considerada homoplásica à função e à especialização dos neurônios no cérebro, cordão nervoso ventral e nas terminações sensoriais ao longo do corpo e formando estruturas complexas, como antenas, olhos compostos e ocelos. Em ambos os organismos há um sistema nervoso central com vias eferentes e aferentes que comandam os músculos, as glândulas e os receptores sensoriais (CRUZ-LANDIM, 2009; SNODGRASS, 1956).

O sistema nervoso das abelhas é formado pelo cérebro e ramificações da cadeia nervosa ventral, constituída de gânglios interligados por segmentos nervosos os chamados conectivos (Figura 2) (AZEVEDO; NOCELLI, 2020; CRUZ-LANDIM, 2009; SNODGRASS, 1956).

FIGURA 2. Representação do sistema nervoso das abelhas. Legenda: Ce: Cérebro, gt: gânglio torácico, co: conectivos, ga: gânglios abdominais, N: nervos.



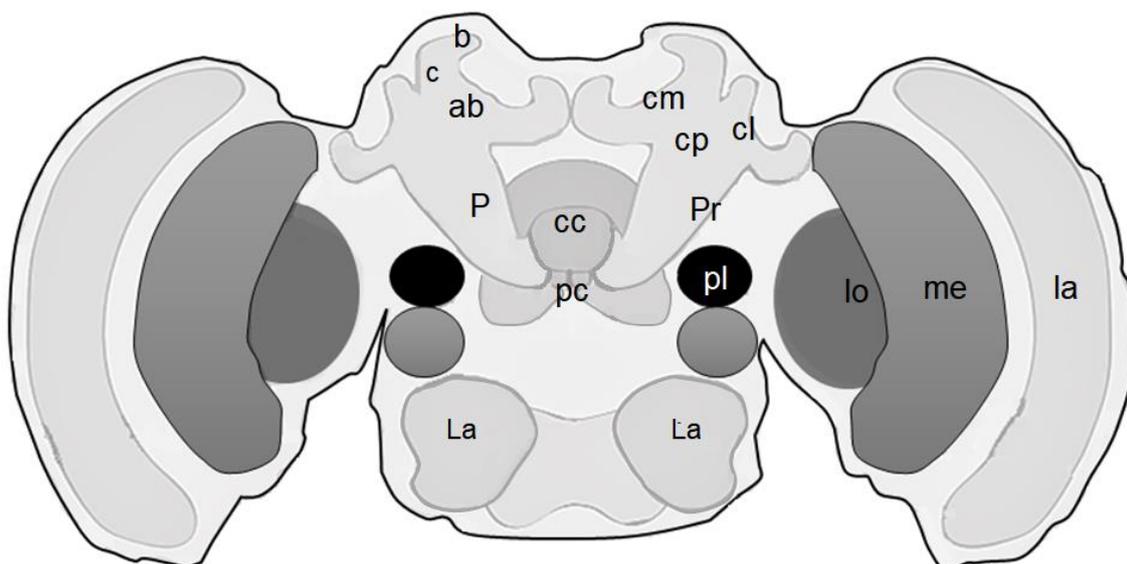
Fonte: Adaptada de Azevedo; Nocelli, 2020.

O cérebro é o órgão responsável por receber os impulsos sensoriais vindos dos órgãos dos sentidos da cabeça e dos gânglios da cadeia nervosa ventral, através de interneurônios ascendentes. Nas abelhas o cérebro é dividido em três regiões: protocérebro, deutocérebro e tritocérebro. O tritocérebro representa a menor região do cérebro, composto por um par de lobos localizados ventralmente aos lobos antenais e paralelamente ao esôfago. Esta porção do sistema nervoso fica localizada fora da estrutura cerebral e apresenta elementos motores e sensoriais que o ligam ao sistema estomogástrico (CRUZ-LANDIM, 2009; SNODGRASS, 1956). Na região onde está localizado o deutocérebro são encontrados os lobos antenais, estruturas esféricas que recebem estímulos olfatórios captados por neurônios sensitivos presentes nas antenas e nas estruturas da boca (AZEVEDO; NOCELLI, 2020; CRUZ-LANDIM, 2009).

O protocérebro é constituído em *pons cerebrealis*, complexo ou corpo central, os *corpora pedunculata*, *pars intercerebrailis* e lobos ópticos (Figura 3). Os corpos pedunculados ou *corpora pedunculata*, são formados por estruturas pares constituídas cada uma com duas neurópilas, que compõem os corpos celulares de neurônios, as células de Kenyon, que recebem e transmitem estímulos informacionais através de nervos

aferentes e eferentes, que fazem conexão com os órgãos dos sentidos nas abelhas (CRUZ-LANDIM, 2009; FAHRBACH, 2006). As células de Kenyon podem ser subdivididas em três subtipos: células de Kenyon compactas internas, externas e não compactas. Essas células são facilmente identificadas pelo tamanho e localização de seus corpos celulares (FARRIS; SINAKEVITCH, 2003; KIYA *et al.*, 2007).

FIGURA 3. Representação das diferentes estruturas morfológicas presentes no cérebro das abelhas. Legenda: cc: corpo central; La: lobo antenal, lo: lobo óptico; Pr: protocérebro; pl: lateral do protocérebro; pc: *pons cerebralis*; cp: corpo pedunculado; cm: cálice mediano; cl: cálice lateral; ab: anel basal; b: borda; c: colar; P: pedúnculo; Região dos lobos ópticos (me: medula; la: lâmina).



Fonte: Elaborada pela autora. Referencial CRUZ-LANDIM (2009) e KLEI *et al.* (2017).

Devido à sua alta plasticidade sináptica que está diretamente relacionada com a capacidade de aprendizagem, armazenamento e memorização, as abelhas são consideradas excelentes modelos para estudos neurobiológicos (ROAT; CRUZ-LANDIM, 2011). Portanto, ao considerar a temática proposta neste estudo, pode-se compreender que o comprometimento do sistema nervoso e do cérebro das abelhas conduz à inativação e/ou desorientação do processamento de informações que asseguram coordenação e resposta rápidas das funções motoras, visuais, gustativas e olfativas nesses organismos (CRUZ-LANDIM, 2009).

### 3.3 Ensaio Cometa

#### 3.3.1. Caracterização da técnica Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única (SCGE, do inglês, *Single Cell Gel Electrophoresis*) (COLLINS, 2014; ÖSTILING; JOHANSON, 1984), é um método utilizado na avaliação de danos ao material genético em núcleos celulares individuais, podendo ser aplicado em qualquer tipo de célula de diferentes órgãos e/ou tecidos de organismos eucarióticos (AFANASIEVA; SIVOLOB, 2018; GAJSKI *et al.*, 2019a). Considerado uma técnica altamente sensível, com capacidade de detectar a presença de contaminantes presentes no meio ambiente, através da avaliação do dano ao DNA em organismos modelos (AZQUETA *et al.*, 2019; GAJSKI *et al.*, 2019a).

Essa técnica tem ganhado grande repercussão em estudos de biomonitoramento humano e ambiental, testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* de produtos químicos, e estudos de ecotoxicidade, incluindo pesquisa básica focada nas análises aos mecanismos de dano e reparo do DNA (AZQUETA *et al.*, 2011; GAJSKI *et al.*, 2019a; 2019b; LANGIE; AZQUETA; COLLINS, 2015). Todavia, nos últimos anos o Ensaio Cometa vem se tornando uma ferramenta importante para ecotoxicologia, nas análises de genotoxicidade em modelos experimentais aquáticos e terrestres (DE LAPUENTE *et al.*, 2015) para o monitoramento ambiental.

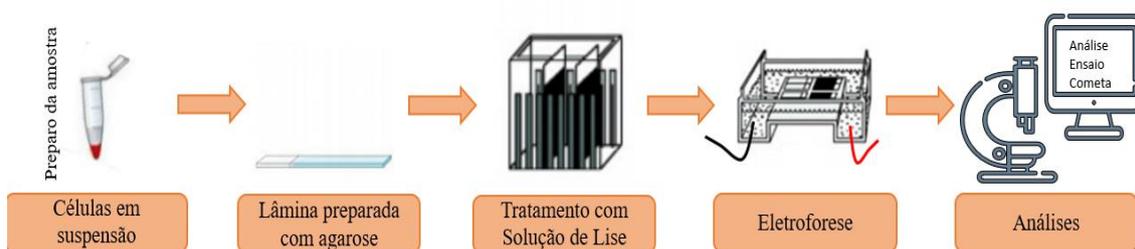
Os primeiros estudos utilizando a técnica do Ensaio Cometa passaram por modificações metodológicas até chegar ao método atual. Inicialmente Rydberg e Johanson (1978), desenvolveram um método capaz de realizar a quantificação do dano ao DNA por lise de células incorporadas em gel de agarose sob condições alcalinas (pH 12). Algum tempo depois Östling e Johanson (1984) apresentaram uma versão modificada, desenvolvendo a técnica de eletroforese em micro-gel, denominada também de Ensaio Cometa com a aplicação de eletroforese em pH 9,5, visando melhorar a sensibilidade da detecção de danos ao DNA de uma única célula.

Outras modificações foram realizadas ao longo dos anos, como a aplicação de eletroforese em condições neutras; uso de enzima para detecção de danos; hibridização de fluorescência *in situ* para marcação de regiões da calda (cromatina desenovelada) que apresentam genes de interesse (AZQUETA; COLLINS, 2013; GAJSKI *et al.*, 2019a; 2019b; MØLLER, 2005).

Atualmente o Ensaio Cometa é comumente utilizado nas condições alcalinas ou neutras em sistemas *in vitro* e *in vivo* (SHARMA *et al.*, 2010). Em condição alcalina o Ensaio Cometa é considerado um método ideal para estudos ecotoxicológicos, desenvolvido por Singh *et al.* (1988) com eletroforese conduzido sob condições em pH 13. Essa técnica não resulta apenas na detecção de danos ao DNA, mas também de sítios abásico ou AP (sítios apurínicos/apirimidínicos), esses sítios são resultantes de quando uma base é perdida do DNA espontaneamente ou durante o reparo do DNA (AZQUETA *et al.*, 2011; PU; WANG; KLAUNING, 2015).

O processo da técnica do Ensaio Cometa consiste na migração diferencial das alças de DNA em cromatinas superenoveladas que sofrem descompactação, devido ao dano causado na cromatina e são visíveis através do processo de microeletroforese (ÖSTLING; JOHANSON, 1984; SHAPOSHNIKOV *et al.*, 2008). Ou seja, em termos metodológicos, as amostras celulares em suspensão são incorporadas em gel de agarose, seguido de tratamento com solução de lise, com a finalidade de remover membranas celulares, envelope nuclear e proteínas, de modo que fique somente o nucleóide incorporado ao gel (Figura 4), em seguida, as amostras são submetidas a eletroforese. Durante aplicação do campo elétrico, as fitas simples de DNA perdem sua estrutura compacta e tendem do núcleo para a suspensão de agarose de baixo ponto de fusão. Durante o processo de eletroforese o DNA não danificado não se move, enquanto o DNA danificado está livre para migrar para longe do núcleo, isso acontece devido à característica do DNA, a qual apresenta uma carga negativa sendo atraído para o cátodo com carga positiva (AZQUETA; COLLINS, 2013; GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015).

FIGURA 4. Principais etapas da técnica Ensaio Cometa.



Fonte: Elaborado pela autora. Referencial Azqueta; Collins, 2013 e Gunasekarana; Raj; Chad, 2015.

Os danos celulares são observados através do processo de migração das alças de DNA, resultando em imagens semelhantes a cometas, fenômeno que dá origem ao nome da técnica em questão. Esse processo de migração das alças de DNA, que formam a cauda é analisado através de microscópio de fluorescência e microscópio óptico convencional, pontuados visualmente ou com auxílio de um *software* de análise de imagem (GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015; HONG *et al.*, 2020; MURUZABAL; COLLINS; AZQUETA, 2021). Na Figura 5, podemos observar a magnitude da cauda de DNA do cometa, obtendo assim informações sobre o nível de lesões de DNA na célula (AZQUETA; COLLINS, 2013). Quanto maior o trecho de cromatina desenovelada, maior e mais nítida é a cauda do cometa, cuja cabeça é composta de cromatina intacta (ÖSTILING; JOHANSON, 1984; SHAPOSHNIKOV *et al.*, 2008).

FIGURA 5. Níveis de danos ao DNA e suas respectivas categorias no Ensaio Cometa.



Fonte: Adaptado de Collins, 2004.

Núcleos intactos sem cauda (nucleoides) são classificados como células sem danos detectáveis ao DNA, denominado Nível 0. Enquanto, células lesionadas são identificadas através da formação de uma cauda similar ao de um cometa, formado pelas

alças de DNA desenovelado (Nível 1). À medida que os danos ao DNA aumentam, o processo de migração do DNA danificado varia em diferentes tamanhos (Nível 1– 4), permanecendo associados ao núcleo por uma cadeia simples. O tamanho da cauda é proporcional à dimensão do dano causado a célula, mas é de consenso que a simples visualização do “cometa” já significa que danos estão presentes no DNA (GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015).

Durante o procedimento metodológico alguns cuidados devem ser tomados para evitar possíveis contaminações ou resultados não conclusivos, sendo estas: a manipulação das amostras deve ser realizada cuidadosamente, de modo a não promover danos ao DNA durante o preparo das lâminas; evitar a utilização de amostras celulares que possuem citoplasma bem estruturado, o que dificulta seu processo de lise, e conseqüentemente, diminuindo a eficiência dessa metodologia (AFANASIEVA; SIVOLOB, 2018; ROJAS *et al.*, 2014).

### **3.3.2. Benefícios do Ensaio Cometa para a ecotoxicologia**

A utilização de biomarcadores e bioindicadores como ferramentas para detecção de exposição e avaliação de efeitos genotóxicos vem aumentando cada vez mais, proporcionando informações cruciais para avanços e melhorias na ecotoxicologia. Uma ciência que visa estudar os efeitos das substâncias naturais e/ou sintéticas sobre os organismos, avaliando as respostas biológicas causadas por diferentes xenobióticos (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Nas últimas décadas vários estudos têm buscado destacar a importância da avaliação de danos ao material genético induzidos em espécies naturais, ressaltando a importância do uso da técnica Ensaio Cometa em estudos voltados a ecotoxicologia e ecogenotoxicologia, uma vez que, inicialmente essa técnica era destinado apenas para análise clínicas voltada para a saúde humana (JHA, 2008).

Na ecotoxicologia, o Ensaio Cometa foi utilizado, a princípio, em avaliação de genotoxicidade em ambientes aquáticos direcionados aos peixes e alguns invertebrados, quando relacionado aos animais terrestres essa técnica é pouco abordada, e os dados disponíveis estão voltados para minhocas, caracóis e pequenos mamíferos (AUGUSTYNIAK *et al.*, 2014; DE LAPUENTE *et al.*, 2015).

Por ser um método versátil e que proporciona grandes vantagens como: capacidade de detecção de danos genotóxicos em nível celular; não apresenta restrições aos diferentes tipos de células eucariontes; proporciona resultados com pequeno número de células; fácil de conduzir e mais sensível que outros métodos para avaliação de danos a cromatina do DNA (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009). Em razão disso essa metodologia foi adotada como ferramenta padrão para estudos de biomonitoramento, nos processos de avaliação, interpretação e compreensão dos danos ao DNA das células e/ ou tecidos de diferentes organismos (DE LAPUENTE *et al.*, 2015).

Com uma perspectiva ecotoxicológica, a aplicação da técnica do Ensaio Cometa na análise de danos ao material genético é relevante, visto que, o surgimento de lesões no DNA possibilita a manifestação de aberrações cromossômicas, resultando em riscos ao sucesso reprodutivo dos organismos e, conseqüentemente, perda de biodiversidade, um dos parâmetros mais relevantes para a estudos na ecotoxicologia (JHA, 2008).

Embora apresente vários benefícios, uma problemática observadas em alguns estudos por um período, foi referente a más interpretações dos resultados obtidos do Ensaio Cometa, por muito tempo se pensou que a cauda do cometa era composta de DNA fragmentado, porém, Östling e Johanson (1984) demonstraram que, o que se observa nesta técnica é a migração das alças descompactadas de DNA devido a efeitos genotóxicos. Neste contexto, os estudos utilizando Ensaio Cometa ficaram até mais interessantes, pois pode-se estudar genes específicos das alças de DNA da cauda, verificar se estes danos são reversíveis ou não, e se há fenômenos epigenéticos nessas alterações (SHAPOSHNIKOV *et al.*, 2008).

### **3.3.3. Aplicabilidade do Ensaio Cometa em insetos**

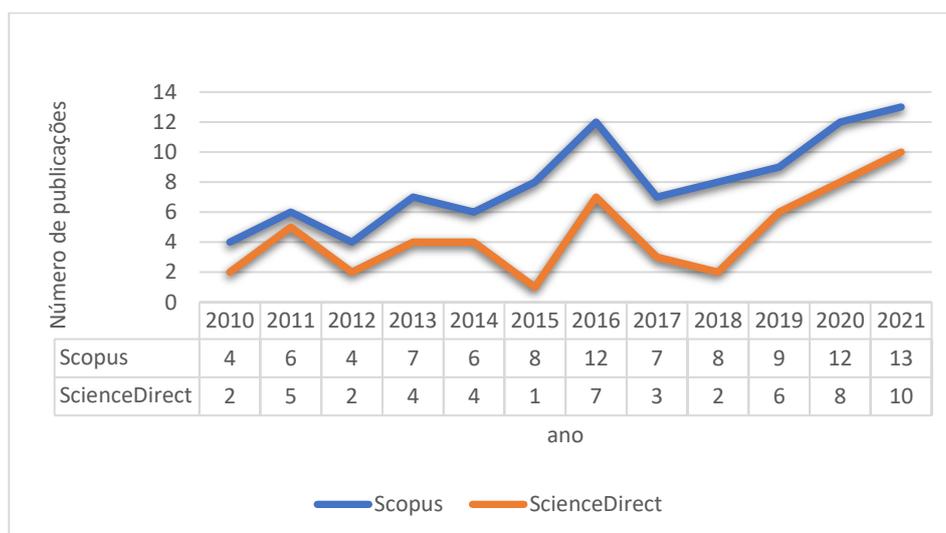
Os primeiros estudos utilizando a técnica Ensaio Cometa foram realizados em mamíferos (ÖSTLING; JOHANSON, 1984). Como o principal foco dessa técnica é o DNA, uma molécula ubíqua e que apresenta estrutura, função e mecanismos de reparo similares ao de vários outros organismos, a implantação do Ensaio Cometa torna-se possível em vários organismos diferentes como por exemplo, os invertebrados, que são modelos importantes nos estudos ecotoxicológicos devido seu papel nos ecossistemas (AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIECKA, 2016).

Em razão disso, o Ensaio Cometa é uma técnica com aptidão para estudar a genotoxicidade de produtos químicos e para avaliar a influência de xenobióticos como potencial genotóxico presente no meio ambiente (AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIECKA, 2016), permitindo assim o desenvolvimento de novas possibilidades para as áreas da toxicologia, ecotoxicologia e monitoramento ambiental.

Dentre o grupo de invertebrados, os que mais se destacam são os insetos, amplamente utilizados em estudos de toxicologia genética e avaliações de risco ambiental (MØLLER, 2005; AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIECKA, 2016), por serem organismos que concernem vários grupos sistemáticos e habitam diferentes nichos ecológicos (GAJSKI *et al.*, 2019a).

Nessa percepção, ao realizar uma análise de dados referentes à utilização da técnica Ensaio Cometa em insetos, resultando em um levantamento de estudos científicos publicados (*Research articles*) através dos bancos de dados *Scopus* e *ScienceDirect* no período de 2010 a 2021, mostrou que 96 (*Scopus*) e 54 (*ScienceDirect*) documentos de pesquisa indexados, são referentes as publicações voltadas para a utilização dessa técnica, em forma de citação de sua metodologia e/ou suas aplicações. Para essa consulta foi utilizando as palavras-chave (*Keywords*) “*comet assay*”, “*insects*” e “*Bees*” (Figura 6).

FIGURA 6. Número de periódicos indexados nos anos de 2010 a 2021 no banco de dados *Scopus* e *ScienceDirect* referentes aos estudos com Ensaio Cometa em insetos.



Fonte: Bancos de dados *Scopus* e *ScienceDirect*. Palavra-chave (*Keywords*) “*comet assay*”, “*insects*” e “*Bees*”.

No ano de 2016 em ambos os bancos de dados foi registrado um aumento considerável de estudos utilizando a técnica Ensaio Cometa atrelados aos insetos. Contudo, essa tendência de crescimento não se manteve, onde em 2018 houve um decréscimo de publicações registradas, e só voltou a ter um crescimento contínuo em 2019 até o momento. Vale ressaltar que ao filtrar os resultados com foco apenas na aplicação da técnica Ensaio Cometa utilizando abelhas como organismo modelo, foram obtidos menos de 5 estudos científicos publicados (*Research articles*).

Esses dados evidenciam a necessidade de fortalecer e impulsionar mais estudos nessa área e incentivar novos estudos com abelhas como bioindicador, uma vez que os insetos, assim como as abelhas, são considerados eficientes bioindicadores terrestres na avaliação de compostos químicos com características bioacumulativas em níveis celulares, histológicos e nos órgãos desses organismos (MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006), permitindo assim criar métodos de monitoramento e proteção ao ecossistema de substâncias tóxicas com essas características.

Os primeiros estudos do Ensaio Cometa em insetos foram realizados em *Drosophila melanogaster* na análise de genotoxicidade de produtos químicos em estudos clínicos. A escolha desse organismo como modelo é devido sua alta relevância para diferentes tipos de processos relacionados à saúde humana, incluindo respostas a danos no DNA (LANGIER; AZQUETA; COLLINS, 2015). Na Tabela 1, são apresentados alguns estudos utilizando insetos de diferentes ordens, com o intuito de observar e comparar as aplicações do Ensaio Cometa nesses organismos.

TABELA 1. Aplicação da técnica Ensaio Cometa na avaliação de danos ao DNA em diferentes modelos de insetos.

Organismo	Método	Aplicação	Referências
<i>Drosophila melanogaster</i> (Diptera)	Ensaio Cometa alcalino com uso de enzimas endonucleases formamidopirimidina-DNA glicosilase (FPG) e endonuclease III.	Avaliação <i>in vivo</i> do dano oxidativo ao DNA após exposição aos produtos químicos ambientais como peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), cloreto de cádmio (CdCl) e sulfato de cobre (CuSO).	Shukla; Pragma; Kar Chowdhuri, (2011)
<i>Lasioderma serricorne</i> (Coleoptera)	Ensaio Cometa alcalino*	Avaliação para identificar o histórico de tratamento de irradiação de insetos-praga.	Kameya <i>et al.</i> (2012)
<i>Chorthippus brunneus</i> (Orthoptera)	Ensaio Cometa alcalino*	Deteção de danos ao DNA em gafanhotos submetidos a estresse ambiental multigeracional.	Augustyniak <i>et al.</i> (2014)
<i>Sesamia nonagrioides</i> (Lepidoptera)	Ensaio Cometa alcalino	Analisar os efeitos da irradiação de raios-X no DNA em <i>S. nonagrioides</i> nos estágios: larvas, pupas e adultos.	Avan Aksoy; Yazici; Erel (2017)
<i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera)	Ensaio Cometa alcalino*	Análises de toxicidade no desenvolvimento reprodutivo induzido pelo fluoreto de sódio (NaF) resultando em dano ao DNA nas larvas de bicho-da-seda submetidas ao NaF.	Tang <i>et al.</i> (2018)

Fonte: Organizado pela autora. Nota: (\*) Aplicação do ensaio com algumas modificações.

*Continuação.* TABELA 1. Aplicação da técnica Ensaio Cometa na avaliação de danos ao DNA em diferentes modelos de insetos.

<i>Bombus atratus</i> (Hymenoptera)	Ensaio Cometa no desenvolvimento de um protocolo de análise.	Proporcionar melhores resultados visuais de células no Ensaio Cometa em relação ao método original (Singh <i>et al.</i> , 1988), para abelhas <i>B. atratus</i> exposta ao mercúrio.	Ceschi-Bertoli <i>et al.</i> (2020)
--	--	--	-------------------------------------

Fonte: Organizado pela autora. Nota: (\*) Aplicação do ensaio com algumas modificações.

Os estudos abordados nesta revisão, reafirmam a eficácia da aplicação do Ensaio Cometa em diferentes insetos, comprovando sua eficiência, simplicidade e versatilidade. Outro aspecto observado foi a menção de adaptações metodológicas da técnica seguindo as necessidades de cada organismos de estudo, para obter melhor eficiência na avaliação e análise de danos ao DNA, mas sem perder a fidelidade e eficácia do ensaio. Desse modo, a otimização dos protocolos reafirma a eficiência e adequação do Ensaio Cometa como uma metodologia satisfatória para praticamente qualquer tipo de célula e/ou tecido, possibilitando a sua aplicação em diferentes organismos independente das diversas abordagens (AUGUSTYNIAK; GLADYSZ; DZIEWIECKA, 2016; GLEI; SCHNEIDER; SCHLÖRMANN, 2016).

Organismos da ordem Neuroptera são um indicativo dessa abordagem de otimizações dos protocolos para diferentes organismos, uma vez que, foram utilizados como sistema teste para monitoramento ecotoxicológico, destacando-se como organismos promissores para o Ensaio Cometa como relatado no estudo de Gastelbond-Pastrana *et al.* (2019), que utilizaram *Ceraeochrysa claveri* para detecção de genotoxicidade em células somáticas e germinativas sobre exposição de um biopesticida à base de azadiractina.

Já a ordem Orthoptera o uso do Ensaio Cometa teve como princípio avaliar o potencial genotóxico de substâncias potencialmente tóxicas presentes no meio ambiente, utilizando larvas de gafanhotos da espécie *Chorthippus brunneus* contaminado com metais traço. Além disso, foi discutido também a toxicidade do herbicida Paraquat em organismos da mesma espécie, através do Ensaio Cometa, que permitiu evidenciar os danos genotóxicos. (AUGUSTYNIAK *et al.*, 2014).

Durante análises dos estudos atribuídos nessa revisão referente aos insetos, a ordem Hymenoptera, é a que apresentou menor proporção, o que mostra que ainda é necessário ampliar sua aplicação para obter uma maior biodiversidade, contemplando esses organismos, como o objetivo de favorecer uma melhor compreensão de sua ecologia, assim como a realização de um biomonitoramento ambiental mais efetivo. Outro ponto a ser levantado, é incentivar a aplicação dessa técnica sobre uma temática mais restrita como por exemplo, a implantação desta técnica para avaliar os danos ao DNA, induzidos pelos inseticidas.

### 3.3.4 Diversificando modelos de estudos no Ensaio Cometa: As abelhas

As abelhas são insetos que pertencem à ordem Hymenoptera, esses organismos desempenham um papel extremamente importante tanto para setor econômico alimentício quanto para os serviços ecossistêmicos, atuando assim na conservação e manutenção das florestas (BUDGE *et al.*, 2015; SCHÖNFELDER; BOGNER, 2017), devido sua capacidade de percorrer longas distâncias (podendo variar de 100 metros até 12 km de distância de acordo com gêneros e espécies) (GOULSON, 2010; HOFMANN; FLEISCHMANN; RENNER, 2020), esses organismos pode ser um importante objeto de estudo para avaliar a genotoxicidade induzidos pelos xenobióticos com capacidade de reagir com o DNA diretamente ou após a sua ativação metabólica, produzindo danos na estrutura e/ou função do DNA.

Durante as análises do uso do Ensaio Cometa em abelhas, foi observado uma limitação na abordagem dessas técnicas referente aos danos genotóxicos. Os poucos estudos encontrados estão concentrados em abelhas *Apis mellifera*. Sendo que alguns dos estudos divergem da temática de biomonitoramento ambiental, apresentando um foco em ensaios clínicos, um exemplo foram os estudos realizados com o veneno de *A. mellifera* na compreensão do seu potencial genotóxico no sangue dos seres humanos, tendo em vista que apesar de suas propriedades medicinais serem bem conhecidas, ainda há lacunas acerca dos seus efeitos genotóxicos (GAJSKI; GARAJ-VRHOVAC, 2008).

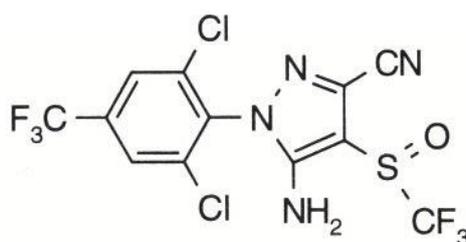
A primeira aplicação do Ensaio Cometa em *B. atratus* é recente (CESCHIBERTOLI *et al.*, 2020) e objetivou a eficiência da técnica por meio da avaliação dos efeitos do mercúrio em células do corpo gorduroso e células pericárdicas associadas ao vaso dorsal.

### 3.4. Fipronil

#### 3.4.1. Fipronil: Propriedades físicas, químicas e biológicas

O fipronil, nome químico (RS)-5-amino-1-(2,6-dicloro- $\alpha$ - $\alpha$ - $\alpha$ -trifluorop-totil) -4-trifluorometilsulfinil-pirazol-3carbonitrila, é um inseticida que pertence à classe dos fenilpirezóis, sua fórmula química é  $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$  (Figura 7) (ANVISA, 2021), peso molecular 437.1 g/mol, classificado como um inseticida quiral de baixa a moderada solubilidade na água. Esse inseticida tem afinidade com matrizes lipofílicas, como lipídios, óleos, proteínas e solventes orgânicos, e apresenta característica estável sob temperatura ambiente (GUNASEKARA *et al.*, 2007).

FIGURA 7. Estrutura química do inseticida fipronil.



Fonte: ANVISA, 2021.

Desenvolvido em 1987 por Rhône-Poulenc Ag Company (atualmente Bayer CropScience), o fipronil é comumente utilizado no controle de pragas em culturas agrícolas e florestais (formigas, cupins), bem como, em no uso veterinários e doméstico (ANVISA, 2021; LI *et al.*, 2020; WRIGHT, 2013). Considerado um inseticida de amplo espectro, o fipronil tem ação em todas as fases de desenvolvimento em insetos.

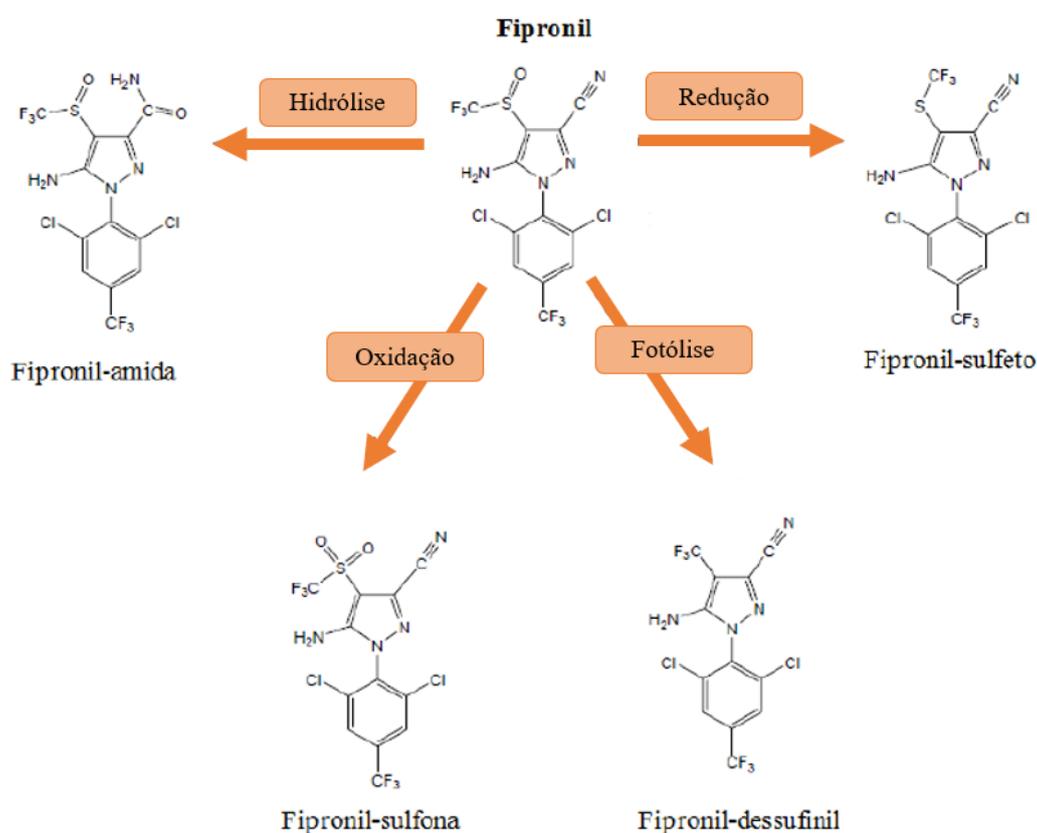
O fipronil é classificado como altamente tóxico (classe II), segundo a Classificação Toxicológica da ANVISA (2021), e avaliado como muito perigoso ao ambiente (classe II), de acordo com a Classificação Ambiental do IBAMA, (MAPA, 2012). Quando presente no ambiente, este pode sofrer degradação através dos processos de hidrólise, fotólise, redução e/ou oxidação, podendo ser convertido nos metabólitos: fipronil sulfona, fipronil desulfinil, fipronil sulfeto e fipronil amida (Figura 8) (GUNASEKARA *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2020; WANG, 2016b).

Estudos comprovaram que os metabólitos de fipronil são mais tóxicos do que seu composto original (SIMON-DELSO *et al.*, 2015; QU *et al.*, 2016). Analisar a taxa de

degradação dos pesticidas são extremamente importantes, pois permitem a previsão do potencial risco desse composto, associado ao período de exposição, ou seja, apresentam informações sobre a natureza e as quantidades dos metabólitos farmacológicos ativos do fipronil no solo são necessárias para conhecer o destino do inseticida (MANDAL *et al.*, 2013).

A contaminação do fipronil no meio ambiente pode ocorrer através de aplicações contínuas nos solos, pelo processo de lixiviação. Outra forma de contaminação é por meio da dispersão mediada pelo vento e por animais polinizadores, como as abelhas que carregam o pólen e néctar contaminados de plantas expostas ao fipronil, visto que, em relação à vegetação, mais especificamente em plantas não-alvo, a contaminação ocorre pelo processo de absorção através de suas raízes (BONMATIN *et al.*, 2014).

FIGURA 8. Estrutura química dos metabólitos resultantes do processo de degradação do fipronil no meio ambiente.



Fonte: Adaptado de PEI *et al.*, 2004.

O tempo de permanência (meia-vida) do fipronil no meio ambiente é de aproximadamente 15 dias, porém pode variar desde 4 a 200 dias. Essa variação está

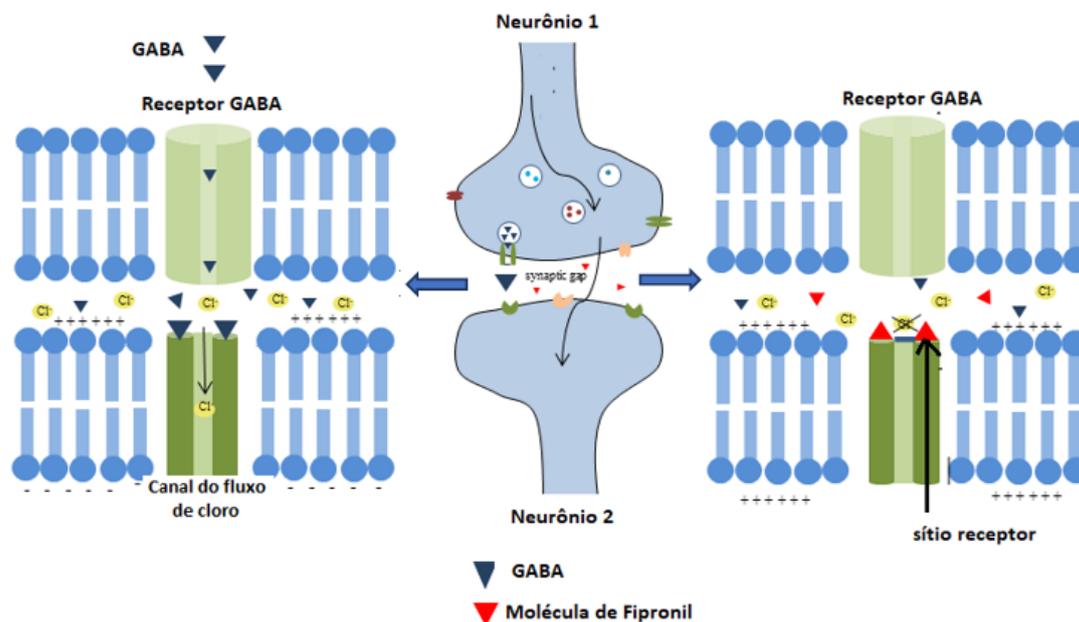
relacionada às características do ambiente em que foi depositado, por exemplo, em estudos de laboratório, analisando o fipronil em solo arenoso, observou-se que sua permanência variava entre 122 e 128 dias (BONMATIN *et al.*, 2014; WANG, 2016a).

### **3.4.2 Fipronil: Mecanismo de ação**

O fipronil é conhecido por sua ação neurotóxica, atuando na inibição dos canais de cloreto do receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor inibitório encontrado no sistema nervoso dos insetos (MÖHLER *et al.*, 2004; SACHÄFER; BICKER, 1986), interrompendo o influxo neuronal normal dos íons de cloro e levando ao acúmulo de GABA nas junções sinápticas causando hiperexcitação no sistema nervoso, paralisia severa e, conseqüentemente, a morte dos organismos (WANG *et al.*, 2016a; WANG *et al.*, 2016b; ZHANG *et al.*, 2018).

Na Figura 9, podemos observar o controle do fluxo de íons de cloro através da membrana da célula nervosa, onde o fipronil compete com o GABA pelos sítios de ligação do receptor GABA, bloqueando os canais de cloreto e levando a inibição da transmissão sináptica no sistema nervoso dos insetos. Os íons cloro tem um papel importante na regulação do impulso elétrico nas sinapses. Em uma sinapse inibitória, há o aumento de íons cloro dentro da célula devido a maior permeabilidade da membrana a ele. Por ser um ânion, a carga negativa na face citoplasmática da membrana celular hiperpolariza a célula e isso impede que haja deflagração de um potencial de ação (representação da direita – Figura 9). O contrário pode ocorrer, ou seja, se há inibição da difusão de íons cloro para dentro da célula, isso causa uma hiperexcitação das células (ALBERTS *et al.*, 2002; BLOOMQUIST, 2003).

FIGURA 9. Mecanismo de ação do fipronil no receptor GABA.



Fonte: Adaptado de Robea (2018).

Embora os canais de cloreto dependentes de GABA sejam expressos no sistema nervoso de vertebrados e invertebrados, o fipronil apresenta maior afinidade para os receptores GABA de insetos em relação aos receptores GABA de vertebrados (WANG *et al.*, 2016a), estudos mostram que o fipronil apresenta uma toxicidade seletiva de 500 vezes para esses organismos quando comparado aos mamíferos (GUPTA; ANADÓN, 2018). Um fator que proporciona essa maior eficácia do fipronil em invertebrados como os insetos, é sua capacidade de interação com os canais de cloro ativados por glutamato (GluCl) que estão presentes em invertebrados, e não em mamíferos (NARAHASHI *et al.*, 2010; SIMON-DELSO *et al.*, 2015).

### 3.4.3 Evidências do efeito de inseticidas fipronil em abelhas eussociais

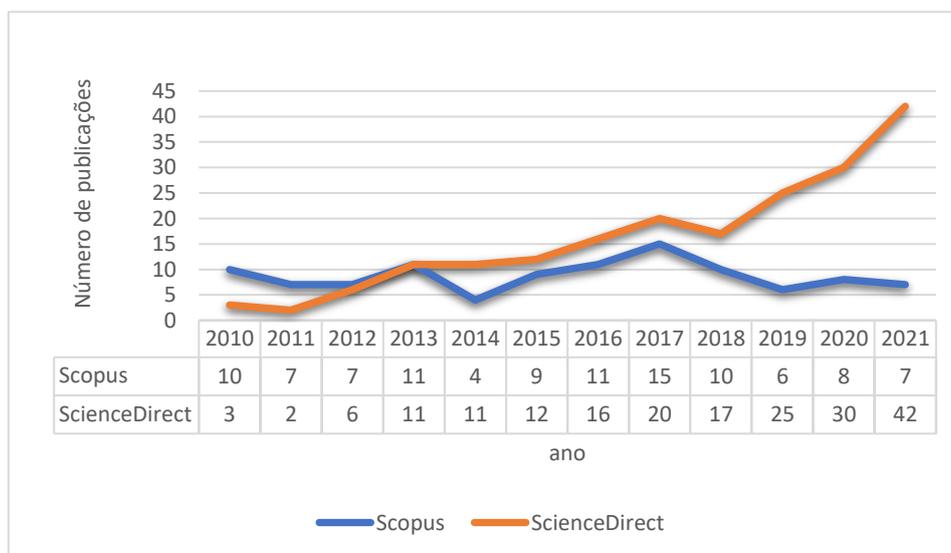
O crescente registro de desaparecimento e mortalidade de populações de abelhas, tem causado preocupação a comunidade científica, não somente devido a sua importância para a manutenção dos *habitats*, mas também devido ao seu papel no setor econômico agrícola (LAUTENBACH *et al.*, 2012; LIMA; ROCHA, 2012). Em razão disso, estudos apontam os agrotóxicos com um dos principais causadores desses eventos ocorrentes, visto que quando utilizado indiscriminadamente, independentemente de sua composição,

estes não só afetam de forma drástica a saúde do indivíduo, mas também a integridade da colônia (DICKS *et al.*, 2016).

Dentre as classes que envolvem os agrotóxicos, os inseticidas são o principal foco dos estudos toxicológicos em abelhas (BLACQUIÈRE *et al.*, 2012). Em razão disso, estudos referentes aos inseticidas tornaram-se temas de debate ao longo dos anos devido aos seus efeitos adversos no meio ambiente, e no organismo das abelhas, podendo levar ao comprometimento das funções cognitivas, comportamentais e fisiológicas (BELZUNCES; TCHAMITCHIAN; BRUNET, 2012). Um exemplo disso é o fipronil, embora seja considerado um inseticida eficaz para o controle de pragas, este resulta em ser altamente tóxico para as abelhas (LOURENÇO *et al.*, 2012a; 2012b), fato que levou a sua proibição nos países da Europa, como França, Itália, Alemanha e Eslovênia, por causar a redução de colônias inteiras de abelhas *A. mellifera* (GHISI *et al.*, 2011).

Uma análise de dados referentes aos efeitos do fipronil em abelhas apresentou oscilações ao longo dos anos. Evento que é apresentado durante um levantamento de estudos científicos publicados (*Research articles*) através dos bancos de dados *Scopus* e *ScienceDirect* entre os períodos de 2010 a 2021. Os registros mostram que 83 estudos voltados a essa temática foram indexados nos bancos de dados (Figura 10).

FIGURA 10. Número de periódicos indexados nos anos de 2010 a 2021 no banco de dados *Scopus* e *ScienceDirect* referentes aos estudos com inseticida fipronil em abelhas.



Fonte: Bancos de dados *Scopus* e *ScienceDirect*. Para essa consulta foram utilizando as palavras-chave (*Keywords*) “fipronil” e “bees”.

Considerando a importância das abelhas para os serviços ecossistêmicos e econômico já mencionados nos tópicos anteriores, esses dados apresentados são indicativos de uma limitação na preservação/conservação dessas abelhas, pois é através da avaliação de riscos e impactos ecológicos perante a esses organismos que permitem o desenvolvimento de métodos que possam amenizar os casos de desaparecimento e mortalidade das abelhas. Para proporcionar uma melhor interpretação dos efeitos negativos que o fipronil causa nas abelhas, a Tabela 2, apresenta a relação dos danos celulares e morfológicos.

TABELA 2. Efeitos do fipronil em diferentes espécies de abelhas.

Espécies	Efeitos do fipronil	Referências
<i>Apis mellifera</i> (organismo em fase larval)	Alterações morfológicas no intestino médio larval, com núcleos com morfologia modificada e alterações citoplasmáticas nas células digestivas;	Silva Cruz <i>et al.</i> , 2010
<i>Apis mellifera</i>	Comprometimento da atividade metabólica, com aumento da atividade respiratória mitocondrial no corpo pedunculado.	Roat <i>et al.</i> , (2012)
<i>Scaptotrigona postica</i>	Danos irreversíveis às células excretoras com vacuolização citoplasmática e acúmulo de material amorfo no lúmen. Indução sutil na expressão de HSP70 e alterações morfológicas no epitélio dos túbulos de Malpighi.	Ferreira <i>et al.</i> (2013)
<i>Apis mellifera</i>	Extremamente deletério a pupas. Anomalias apresentadas: pigmentação alta na região proximal e corpo larval distal e malformação corporal, como ausência de cabeça e membros.	Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Scaptotrigona postica</i>	Alterações nas células de Kenyon, resultando em perfis picnóticos, indicando morte celular.	Jacob <i>et al.</i> , (2015)
<i>Apis mellifera</i>	Induziu alteração nas glândulas mandibulares e hipofaríngeanas.	Zaluski, Justulin Jr.; Orsi (2017).

Fonte: Organizado pela autora.

Continuação. TABELA 2. Efeitos do fipronil em diferentes espécies de abelhas.

<i>Melipona scutellaris</i>	Alterações comportamentais: dificuldade motora, paralisia, hiperexcitação; Alterações citológicas: heterocromatina caracterizando morte celular.	Morais <i>et al.</i> (2018)
<i>Partamona helleri</i>	Alterações nas atividades enzimática de desintoxicação. Indução estresse oxidativo no intestino médio.	Farder-Gomes <i>et al.</i> (2021)
<i>Partamona helleri</i>	Alterações comportamentais: dificuldade motora, hiperexcitação. Comprometimento da atividade da catalase (CAT) e da glutathione S-transferase (GST). Danos histopatológicos no cérebro.	Farder-Gomes <i>et al.</i> (2021)

Fonte: Organizado pela autora.

Por apresentar efeito neurotóxico, todas as exposições a este composto resultam principalmente em danos às células neurais, comprometimento da atividade locomotora, indução de alterações comportamentais, bem como alterações morfológicas como observados em estruturas cerebrais de abelhas como corpos de pedunculados, células antenais e dos lobos ópticos (JACOB *et al.*, 2015; ROAT *et al.*, 2012; ZALUSKI, JUSTULIN Jr.; ORSI, 2017). Estudos mostram que algumas espécies apresentam sensibilidade maior que outras espécies expostas ao fipronil, por exemplo, as abelhas *Melipona scutellaris* são mais sensíveis ao fipronil em relação a abelhas silvestres como *Nomia melanderi*, e *Scaptotrigona postica* (MORAIS *et al.*, 2018).

Assim, perante a esses dados analisados podemos observar que apesar desses estudos demonstrarem de forma clara os efeitos negativos causados pelo fipronil nas abelhas e de pesquisas que os associem aos declínios de colônias, estudos referentes a essa temática são escassos, isso considerando a importâncias das abelhas para os serviços ecossistêmicos, e o aumento do uso desse inseticida em culturas agrícolas, principalmente no Brasil, ao qual é considerado uns dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo (IBAMA, 2019). Dentre os fatores que tornam esse cenário ainda mais crítico é o fato de estudos sobre os efeitos genotóxicos do fipronil em populações de abelhas nativas com as espécies pertencentes ao gênero *Bombus*, não despertarem interesse relevante a sociedade e comunidade científica, tornando o biomonitoramento dessas abelhas ainda mais limitantes. Portanto, deve-se incentivar e priorizar estudos referentes aos riscos de efeitos dos agrotóxicos, bem como do inseticida fipronil sobre polinizadores, avaliando todas as espécies de abelhas, e não limitando-se apenas as abelhas economicamente importante com as abelhas da espécie *A. mellífera* (DICKS *et al.*, 2016; FAO, 2004; FAO, 2021).

Em razão disso o objetivo do presente trabalho se insere, visando constatar se as concentrações de fipronil (2,5 ppb e 3,5 ppb) que foram detectadas no pólen como relatado nos estudos de Zaluski, Justulin Jr. e Orsi (2017) e Stoner; Eitzer, (2013), podem induzir ou não efeitos genotóxicos nas abelhas tendo como modelo as abelhas *B. atratus*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Coleta

Operárias de *B. atratus* (Figura 11) foram coletadas em fragmentos remanescentes de floresta de Mata Atlântica e Cerrado (23°34' S 47°31' W) da Universidade Federal de São Carlos, no *Campus* de Sorocaba, no município de Sorocaba, Estado de São Paulo, Brasil. As operárias foram coletadas individualmente com o auxílio de uma rede entomológica nos meses de janeiro a fevereiro de 2021, quando as colônias ainda estão estáveis e não há indivíduos reprodutivos em campo. Após a coleta, as operárias foram transferidas, individualmente, para um tubo Falcon de 50 mL. Todos os tubos Falcon contendo as operárias coletadas foram mantidos em uma caixa térmica no escuro para evitar o estresse nas abelhas antes de serem levadas ao laboratório. Para as áreas de estudos utilizadas não foi necessário um formulário de permissão formal ou parecer ético.

FIGURA 11. Abelha operária de *Bombus atratus*.



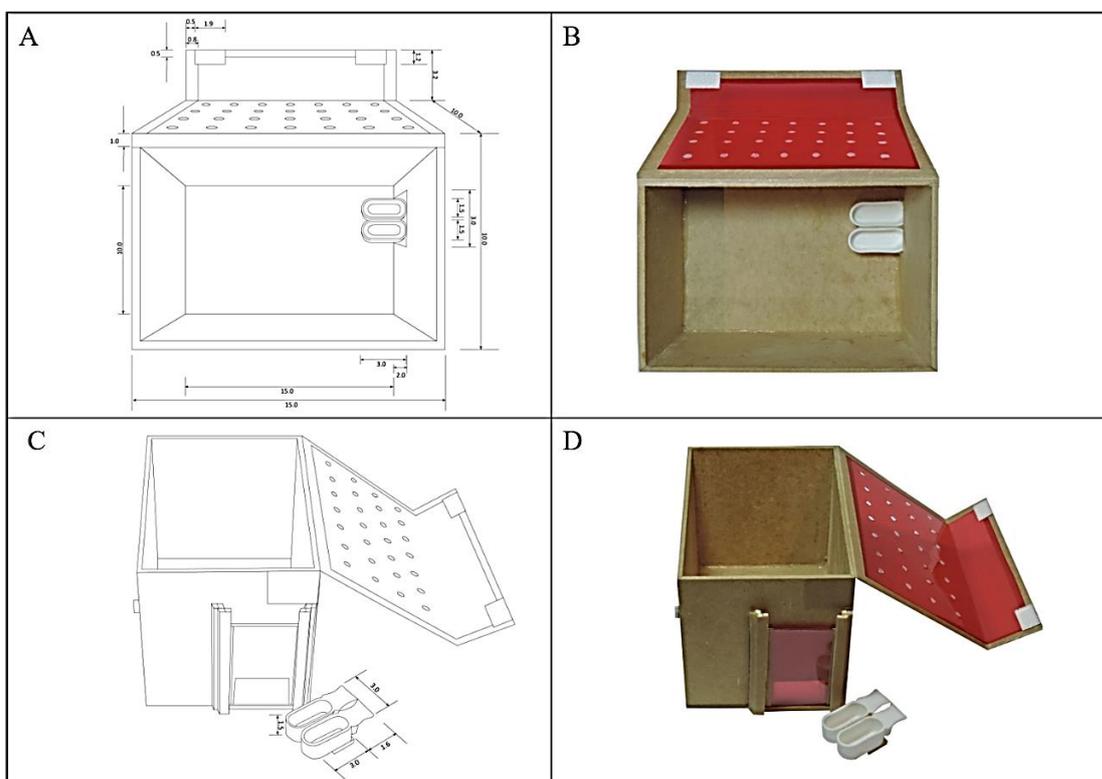
Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional. Fotógrafo: Sidney Cardoso.

### 4.2. Manutenção dos animais em condições laboratoriais

As operárias de *B. atratus* foram mantidas individualmente em caixa entomológica especial (Figura 12) com dois alimentadores colados na parte inferior de uma das porções laterais das caixas. As abelhas foram divididas em 3 grupos, sendo realizado dois bioensaios para o grupo experimental (n = 22) e um grupo controle (n = 11). Para os grupos experimentais foi ofertado 2 mL de solução contendo 2,5 ppb fipronil® (Sigma-Aldrich; >98% de pureza) (grupo experimental 1) e 3,5 ppb (grupo

experimental 2), além de alimento *ad libitum* (solução de 70% de sacarose). Para o grupo controle, foi ofertado 2 mL de água e o mesmo alimento ofertado ao grupo experimental. Após 96 horas de exposição, as abelhas foram crio-anestesiadas à 4 °C e, em seguida, dissecadas para a retirada do cérebro. As concentrações foram determinadas com base nos estudos de Zaluski, Justulin Jr.; Orsi (2017) e Stoner; Eitzer, (2013). Para esse procedimento foram consultadas as diretrizes da OECD (Guidelines 247) para testes de produtos químicos em *B. terrestris* (OECD, 2017).

FIGURA 12. Protótipo de Caixa Entomológica para exposição de insetos em ensaios ecotoxicológicos. Plano Base Superior (A), Protótipo em plano superior (B), Plano Base Lateral (C), Protótipo em plano lateral (D).



Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional. Patente-Processo BR 10 2020 0239090.

### 4.3 Fracionamento celular para o Ensaio Cometa

Os cérebros foram inseridos em um microtubo (Eppendorf®) contendo 100 µL da solução de fracionamento (250 mM de sacarose, 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 5 mM de MgCl<sub>2</sub>) dando assim início ao processo de fracionamento celular (DIMAURO *et al.*,

2012). A amostra em solução de fracionamento foi macerada com o auxílio de um pistão rotativo para microtubo (Eppendorf®) durante 20 minutos e, em seguida, levada ao Agitador Vortex durante 1 minuto. Em sequência, as amostras foram submetidas ao processo de centrifugação à 1000xg durante 20 minutos. Após o processo de centrifugação e formação do precipitado, foi realizada a remoção cuidadosa do sobrenadante e a ressuspensão do precipitado utilizando 100 µL de solução de fracionamento.

#### **4.4 Ensaio Cometa**

##### **4.4.1 Preparo das lâminas histológicas**

Para o Ensaio Cometa as lâminas histológicas foram preparadas com um dia de antecedência. Diluiu-se a Agarose de Grau Técnico Genético (GTG) (Agarose GTG 0,3 g, água destilada 20 mL), fervendo-a de duas a três vezes. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas no gel 1,5% (p/v), utilizando um porta lâmina tipo frasco. As lâminas foram secas *overnight*. O órgão de interesse foi macerado como descrito no item 4.3, após esse processo, 55 µL da amostra foram transferidos para um novo microtubo separado, no qual foram adicionados 45 µL de agarose 0,5% (p/v) (Agarose *Low Electroendosmosis* (LE) — 0,1 g, água destilada 20 mL). Assim, com auxílio de uma micropipeta, os 100 µL presentes no microtubo foram acomodados na lâmina histológica previamente preparada. Colocou-se uma lamínula sobre a amostra imediatamente quando adicionada à lâmina. Ao final do processo, as lâminas foram resfriadas a 4 °C por dez minutos e, em seguida, tiveram suas lamínulas cuidadosamente retiradas.

##### **4.4.2 Tratamento com Solução de Lise**

As lâminas histológicas foram submersas em Solução de lise durante uma hora e trinta minutos. Essa solução foi produzida a partir de 133,5 mL de uma Solução de lise Estoque (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, N-Lauroyl-sarcosine 1%), 13,5 mL de Dimetilsulfoxido (DMSO 9%) e 3 mL de Triton X-100 (2%), duas horas antes do uso para atingir 4 °C. Transcorrido esse período, as lâminas foram removidas da solução e

submetidas a um banho com Solução de Neutralização (Tris 265 mM, pH 7,5) durante cinco minutos.

#### 4.4.3. Eletroforese

As lâminas foram dispostas na cuba eletroforética horizontal com a parte fosca (identificação) voltada para o polo positivo. A Solução de Eletroforese (EDTA 100 mM, NaOH 0,3 M) a 4 °C foi adicionada e as lâminas permaneceram trinta minutos em descanso nesta solução. Transcorrido esse período, a fonte eletroforética foi ligada e ajustada para os parâmetros 25 volts (1V/cm), 300 mA. A corrida eletroforética ocorreu durante 20 minutos. Após esse período, as lâminas foram retiradas da cuba e lavadas com água destilada por 5 minutos, repetindo o processo 3 vezes.

#### 4.5 Coloração das lâminas histológicas Ensaio Cometa

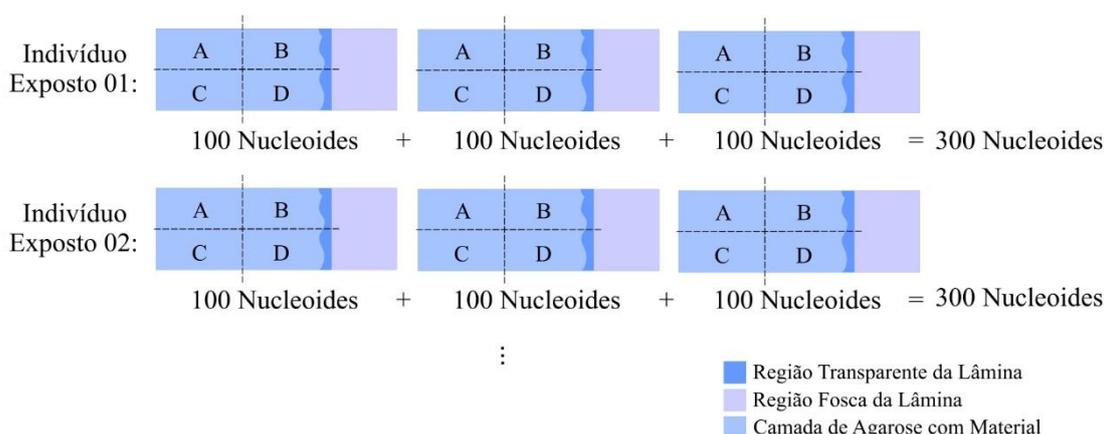
As lâminas foram lavadas duas vezes com água destilada e deixadas para secar durante uma hora e trinta minutos a 37 °C em estufa B.O.D. Após secas, foi aplicada Solução Fixadora (HCl 4M, Glicerol 1%, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,2 M) nas lâminas, durante dez minutos, após este período, as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada, sendo armazenadas, em seguida, em uma cubeta abrigada totalmente da luz. Para coloração por prata preparou-se uma solução de coloração (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,47 M, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 12,5 mM, AgNO<sub>3</sub> 6 mM, Ácido Tungstosilícico - H<sub>4</sub>[W<sub>12</sub>SiO<sub>40</sub>] 0,86 mM, Formol 0,15%) que foi despejada na cubeta, onde ficou em contato com as lâminas, no escuro, durante quarenta e cinco minutos. Ao final deste processo, as lâminas foram removidas da cubeta e lavadas três vezes com água destilada, onde foram submetidas, posteriormente, a um banho de ácido acético a 1% (v/v) durante cinco minutos e três lavagens com água destilada. Finalizado o processo, as lâminas foram deixadas para secar *overnight* à temperatura ambiente em local controlado.

#### 4.6 Análise das lâminas histológicas

As lâminas histológicas foram analisadas através do microscópio ótico (Leica® DM 4000 B LED) a partir do estabelecimento de padrões comparativos entre as lâminas dos indivíduos do grupo exposto e as lâminas dos indivíduos controle. Para excluir

qualquer análise tendenciosa, as áreas totais de todas as lâminas foram analisadas cuidadosamente a partir da implementação de quadrantes (“A”, “B”, “C” e “D”) em cada uma das lâminas de ambos os grupos (Figura 13). Em cada um destes quadrantes, 25 nucleoides foram contabilizados e classificados a partir do registro iconográfico das lâminas histológicas, sendo a classificação de acordo com a intensidade do dano ocorrido ao DNA. Sendo assim, o nível 0 é aquele onde o dano ao material genético é nulo (<5%), o nível 1 onde o dano é baixo (5~20%), o nível 2 onde o dano é médio (20~40%), o nível 3 onde o dano é alto (40~95%) e por fim, o nível 4 onde o dano ao DNA é total (>95%) e o cometa mais intenso (COLLINS, 2002).

FIGURA 13. Representação esquemática do processo de análise e contagem dos nucleoides presentes nas lâminas histológicas de ambos os grupos.

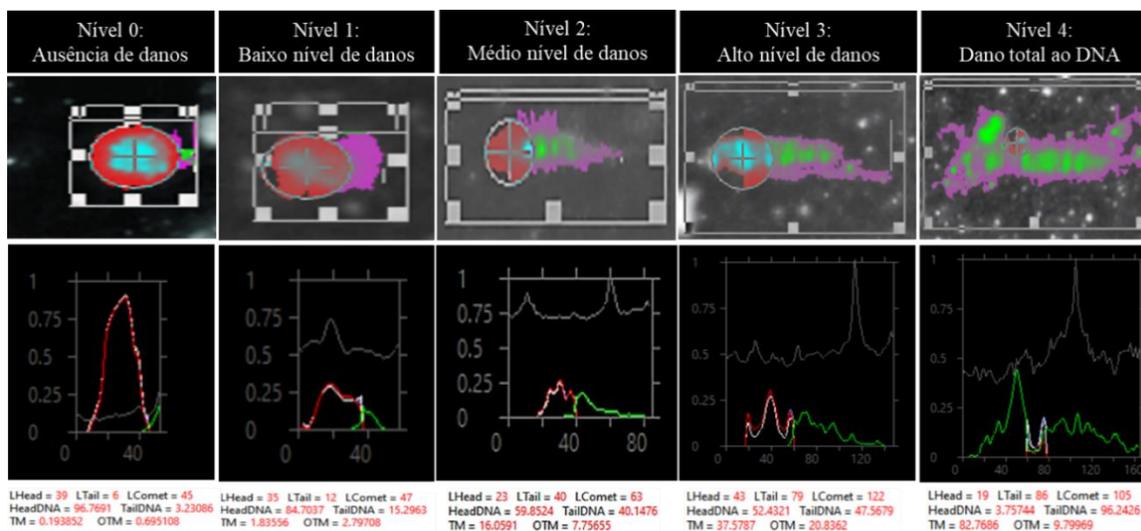


Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional.

Assim, a análise visual foi realizada a partir da soma do número de nucleóide por quadrante, obtém-se um valor de 100 nucleóides por lâmina (3 lâmina para cada indivíduo). Foram contabilizados 300 cometas por indivíduo, totalizando 3300 cometas por grupo (controle e experimentais).

Nesse estudo foi utilizado o *software* gratuito CASP (<http://casp.of.pl>) para a medição e padronização dos cometas em seus respectivos níveis de dano. O *software* CASP fornece histogramas que estimam a porcentagem de DNA encontrado em cada parte da célula analisada (Figura 14), valores estes representados em *HeadDNA* e *TailDNA* que auxiliaram na classificação. Esse sistema de análise em imagem pode contribuir para a minimização dos problemas de subjetividade e tornar o teste do cometa mais objetivo e com maior reprodutibilidade (KUMARAVEL *et al.*, 2009).

FIGURA 14. Representação visual das comparações analíticas entre os estados de integridade da cromatina em diferentes níveis no cérebro de *Bombus atratus*.



Fonte: Elaborada pela autora com auxílio do Software CASP.

#### 4.6.1 Análise estatísticas das lâminas histológicas

A partir do processo de verificação visual dos registros iconográficos foram realizadas análises estatísticas, contabilizando-se todos os níveis de danos ao material genético. Para isso foi realizada uma contagem e classificação de 100 núcleos (estágios 0 a 4) por lâmina. Os cometas contabilizados foram avaliados a partir de três parâmetros: Índice de Dano (ID), Dano Total (DT) e Frequência de Dano (FD%).

O ID classifica os cometas em cinco níveis (Nível 0-4) de acordo com o comprimento da cauda como anteriormente citado, os valores obtidos para cada indivíduo podem variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (ANDRADE; FREITAS; SILVA, 2004). Os valores de ID foram calculados para cada indivíduo (n=11), com base na fórmula:

$$ID = 0 * (N0) + 1 * (N1) + 2 * (N2) + 3 * (N3) + 4 * (N4)$$

Sendo:

ID = Índice de Dano;

N= Número de cometas em cada nível, onde:

N0= Número de cometas em nível 0;

N1= Número de cometas em nível 1;

N2= Número de cometas em nível 2;

N3= Número de cometas em nível 3;

N4= Número de cometas em nível 4.

O DT representa a somatória de todos os níveis de dano (nível 1 a 4). Os valores de DT foram calculados através da fórmula:

$$DT = (N1 + N2 + N3 + N4)$$

Sendo:

DT = Dano total;

N= Número de cometas em cada nível, onde:

N1= Número de cometas em nível 1;

N2= Número de cometas em nível 2;

N3= Número de cometas em nível 3;

N4= Número de cometas em nível 4.

A Frequência de dano (FD%) representa em percentual o número de células que apresentaram dano ao DNA de todos os níveis de cometas (nível 1 a 4) em relação ao total de cometas contados (nível 0 à nível 4) (ANDRADE; FREITAS; SILVA, 2004). Para esse estudo foi contabilizado 300 cometas por indivíduo. Assim aplicou-se o seguinte cálculo:

$$FD\% = [DT / n \text{ total}] * 100$$

Sendo:

FD% = Frequência de dano;

DT= Dano total;

*n total* = valor total de cometas contabilizado.

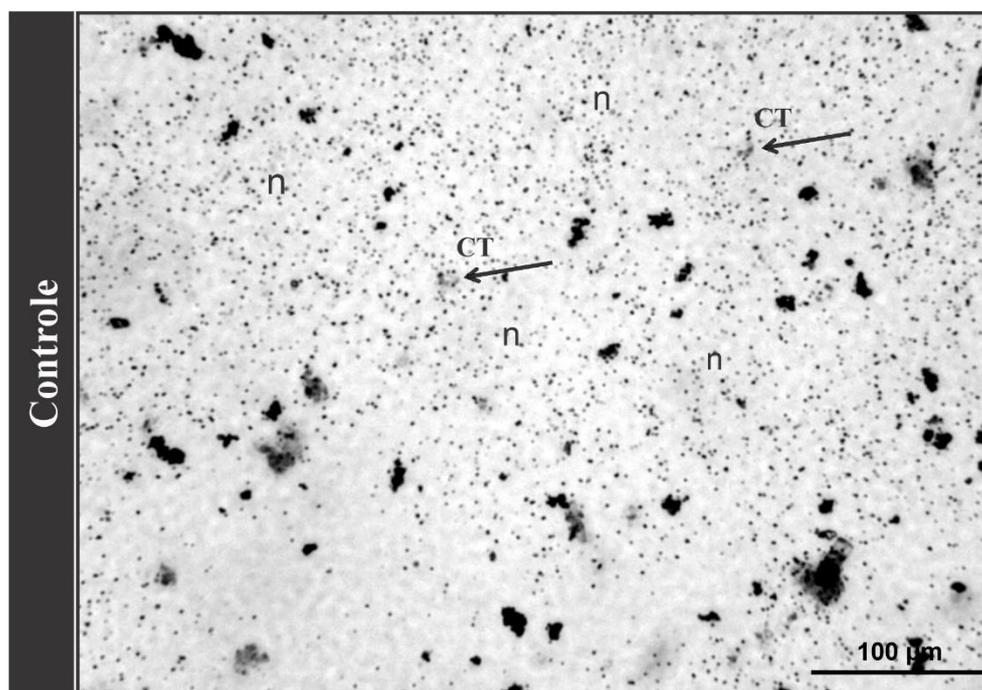
O teste de *Tukey*, foi aplicado aos valores médios obtidos do DT entre os grupos experimentais e controle. A probabilidade (*p*) menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foi considerada significativo. Para a análise foi utilizado o *software* GraphPad Prism v 8,0.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise visual do efeito genotóxico do fipronil no cérebro de *Bombus atratus*

No grupo controle foi observada a predominância de nucleoides, núcleos interfásicos com cromatina nuclear intacta, sem danos à matriz nuclear ou DNA (Figura 15). A presença de nucleóide é indicativo que o cérebro dessas abelhas se encontra em condições normais (GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015). Vale ressaltar, que embora tenha-se observado a formação de alguns cometas, este fenômeno não está estritamente relacionado a presença de substâncias com ação genotóxica. De acordo com a literatura, a presença de danos ao DNA pode estar associada a uma alteração na estrutura química do DNA, erros no mecanismo de reparo e replicação do DNA e inclusive, senescência (AZQUETA; COLLINS, 2013; CLANCY, 2008) resultando assim na formação de cometas.

FIGURA 15. Micrografia referente a presença de nucleoides no cérebro de *Bombus atratus* observado no grupo controle. Legenda: n: nucleoides; CT: cometas (Seta).



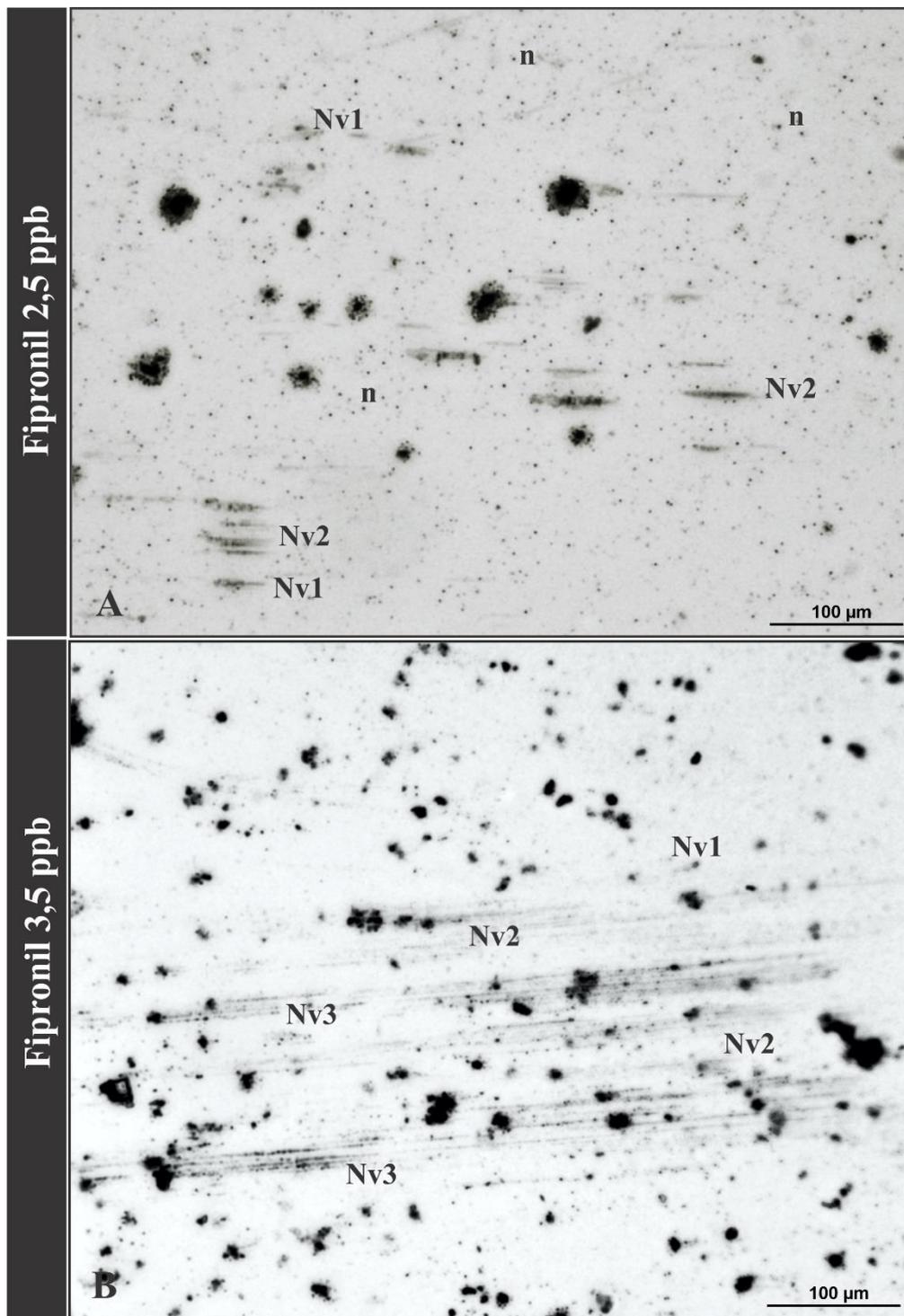
Fonte: Elaborado pela autora.

Nos grupos experimentais observou a formação de cometas no cérebro de operárias de *B. atratus* expostas às concentrações de 2,5 ppb e 3,5 ppb de fipronil. No grupo experimental 1 (2,5 ppb) foram observados a presença de cometas em nível 1 e 2,

em relação ao grupo controle, similares aos apresentados na Figura 16A. Já em relação ao grupo experimental 2 (3,5 ppb) houve um aumento considerável na frequência de cometas em nível 1 e 2, seguido de cometas com formação de caudas mais extensas, quando comparadas ao grupo experimental 1 (Figura 16B). Portanto, visualmente a concentração de 3,5 ppb de fipronil induziu um aumento da concentração de DNA na cauda do cometa, resultando no aparecimento de regiões mais descondensadas, indicativo de dano à cromatina o mesmo fenômeno ocorreu aos níveis 3 e 4.

Os resultados da análise visual mostram que os grupos submetidos às concentrações encontradas em campo induziram o desenrolamento da fita de cromatina e seu desacoplamento da matriz endonuclear, resultando na formação de cometas (HONG *et al.*, 2020; UEDA, 2020), e assim apresentando visualmente possíveis danos ao DNA das células neurais.

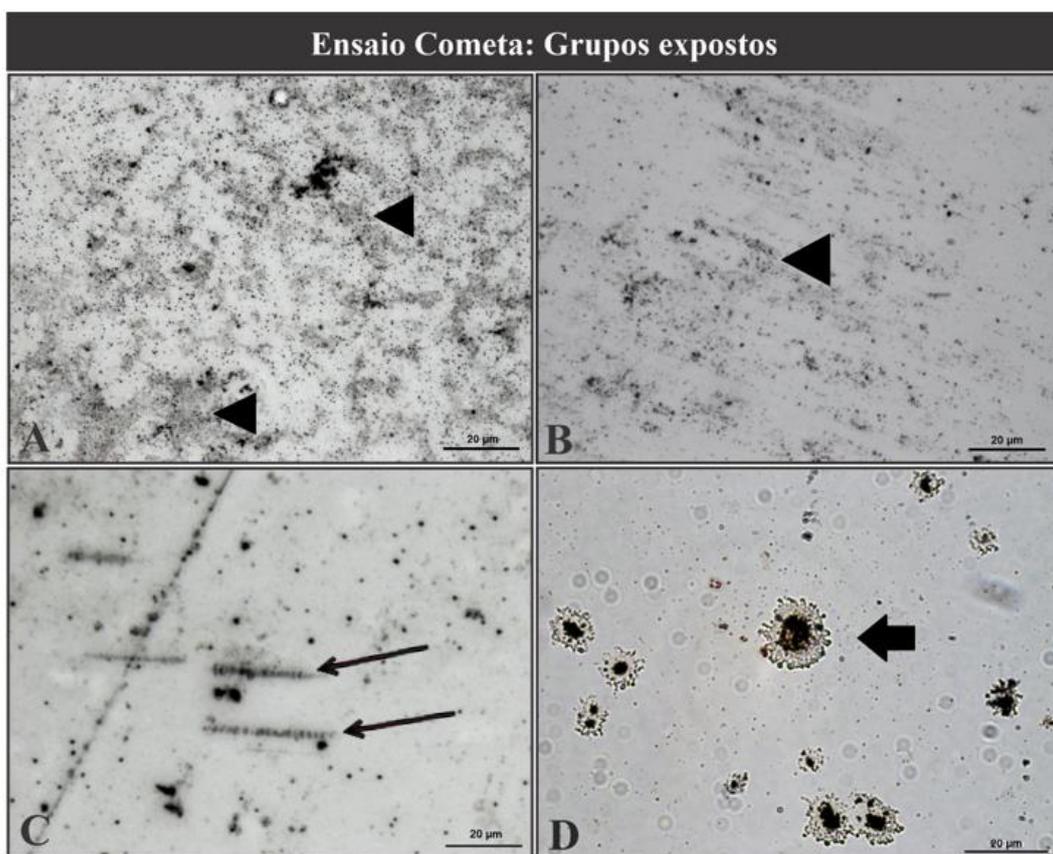
FIGURA 16. Micrografia dos níveis de cometas observados nos grupos experimentais 1 e 2. (A) Cometas observados no grupo experimental 1 submetido à 2,5 ppb de fipronil. (B) Cometas observados no grupo experimental 2 submetido à 3,5 ppb de fipronil. Legenda: n: nucleoides; Nv1: Nível 1; Nv2: Nível 2; Nv3: Nível 3.



Fonte: Elaborado pela autora.

Ademais, em ambos os grupos experimentais, foi observada a presença de alguns padrões nas amostras, tais como: material com aspecto “sombreado” nas regiões com cometas (Figura 17 A e B); presença de cometas com bandas de DNA mais condensadas e menos condensadas (Figura 17 C); células com membrana celular (Figura 17 D).

FIGURA 17. Micrografias referentes à padrões observados nos grupos: Experimental 1 (2,5 ppb de fipronil) e Experimental 2 (3,5 ppb de fipronil). (A) e (B) Regiões com “sombreamento”, ponta de seta (◄); (C) Seta pequena (→) indica a formação de cometas com bandas de DNA mais e menos condensada; (D) Seta grande (←) Célula neural com membrana plasmática.



Fonte: Elaborado pela autora.

O fenômeno de “sombreamento” observado durante a análise visual nos grupos experimentais (Figura 15 A; B) pode ser classificado como cometas “ghost”, “clouds” ou “hedgehog” (KUMARAVEL *et al.*, 2009; LORENZO *et al.*, 2013). De acordo com a literatura, o “ghost” representa cometas que aparentemente reduziram muito o conteúdo de DNA durante o processo de eletroforese, ou seja, um possível indicativo de intenso dano ao material genético devido à ação da genotóxica de determinado contaminante

(LORENZO *et al.*, 2013). Resultando assim em cometas difíceis de realizar a medição de dano ao DNA através de sistemas de análise de imagens, podendo ser apenas pontuados por meio de análise visual (KUMARAVEL *et al.*, 2009). Desse modo a presença desse fenômeno neste estudo é considerado um cometa resultante da ação do fipronil, embora não seja possível determinar o estado de integridade da cromatina da célula de acordo com os níveis de cometa estabelecido na literatura (nível 0 a 4) e, portanto, não sendo atribuído em análise quantitativa.

Na Figura 17D, a presença de células com membrana, após a preparação do material para a microeletroforese, é considerada um artefato de técnica comum. Uma vez que nos Ensaio Cometas, a solução lise auxilia a remover as membranas das células e solubilizar os componentes celulares, deixando o DNA superenovelado exposto (AZQUETA; COLLINS, 2013). Desse modo, a ausência de lise observada neste estudo pode estar atrelada ao tempo de duração do procedimento e temperatura da solução de lise para o órgão analisado, visto que estes são fatores indispensáveis para uma lise celular eficiente (KARBASHI *et al.*, 2019; MØLLER *et al.*, 2020), permitindo assim destacar a importância da padronização do tempo de lise para cada tipo de tecido e órgão estudado, de modo a otimizar a sensibilidade do Ensaio Cometa e garantir a detecção dos danos ao DNA (ENCISO *et al.*, 2018).

Portanto, o apontamento desses fenômenos e a realização da análise visual apresentada neste estudo fornecem informações que serão cruciais e norteadoras para outros pesquisadores que buscam realizar estudos de genotoxicidade em abelhas, através dessa técnica.

## **5.2 Danos ao DNA no cérebro de *Bombus atratus***

Através do Índice de Dano (ID) pode-se observar que os grupos experimentais apresentaram um ID maior em relação ao observado no grupo controle (Tabela 3). Onde no grupo controle há um baixo índice de Dano ( $138 \pm 37$ ) em relação ao grupo experimental 1 exposto à concentração de 2,5 ppb ( $215 \pm 118$ ) e grupo experimental 2 exposto à 3,5 ppb de fipronil ( $321 \pm 198$ ). Vale ressaltar que também há uma diferença notável entre ambos os valores médios nos grupos experimentais.

O mesmo pode ser observado através da Frequência de dano (FD%), que no grupo controle é de 27%, no grupo experimental 1 é de 38% e no grupo experimental 2 53% (Tabela 3).

TABELA 3. Valores descritivos do Índice de danos (ID), Frequência de Dano (FD%) e Dano Total (DT) no cérebro de *Bombus atratus* expostas às concentrações de 2,5 ppb e 3,5 ppb de fipronil. Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) obtida para os três grupos independentes.

Grupos	Índice de Danos (ID)	Frequência de Dano (FD%)	Dano Total (DT)
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
<b>Controle</b>	138 $\pm$ 37	27 $\pm$ 6,4	80,9 $\pm$ 18,7
<b>Experimental 1 (2,5 ppb)</b>	215 $\pm$ 118	38 $\pm$ 19,4	114,5 $\pm$ 58,2
<b>Experimental 2 (3,5 ppb)</b>	321 $\pm$ 198	53 $\pm$ 30,7	155,2 $\pm$ 92,3

Fonte: Elaborado pela autora. Nota: Dados individuais por grupo podem ser consultados no Apêndice A.

Apesar dos notáveis danos ao material genético observados no cérebro de *B. atratus* apresentado pelo ID e FD%, a ação genotóxica do fipronil nas abelhas estudadas é melhor evidenciado através do dano total (DT), uma vez que este parâmetro avalia, os níveis de danos ao DNA nas células, mantendo isolado da análise os nucleoides. Portanto, neste trabalho o DT foi considerado o principal parâmetro para realizar as análises estatísticas.

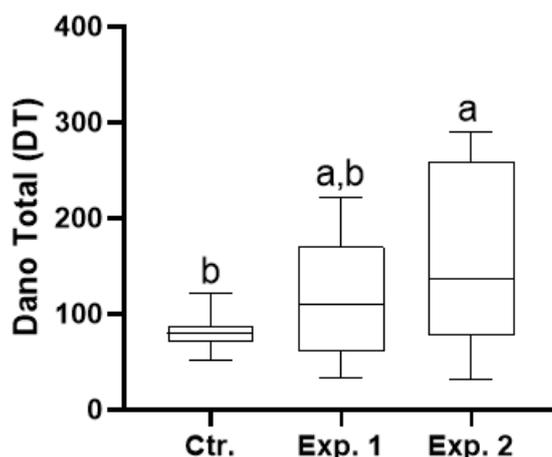
O grupo controle apresentou DT menor (80,9 $\pm$ 18,7) em relação aos DT dos grupos experimentais 1 (114,5 $\pm$ 58,2) e 2 (155,2 $\pm$ 92,3), estes últimos também apresentaram diferenças entre seus valores médios (Tabela 3). Frente a estes resultados, é importante destacar que danos a integridade e funcionabilidade de células neurais induzida pelo fipronil podem acarretar o comprometimento da atividade motora e, conseqüentemente, da atividade de forrageamento e orientação durante a localização de fontes de recursos para a colônia, (EL HASSANI *et al.*, 2005).

Como apresentado pelos pesquisadores Farder-Gomes *et al.* (2021a), ao submeterem operárias da espécie *Partamona helleri* ao fipronil, observou-se a indução de hiperatividade comportamental nessas abelhas, além de alterações morfológicas nas

células Kenyon, resultando em espaços intercelulares ampliados, vacuolização intensa nas neurópilas e condensação de cromatina nuclear.

Na análise estatística referente ao DT obtido através do teste de *Tukey* (Apêndice B) observou-se uma diferença significativa apenas entre o grupo controle e o grupo experimental 2 (3,5 ppb) de  $p=0,0215$  ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 18), mas não em relação ao grupo controle e experimental 1 (2,5 ppb) sendo  $p=0,4434$  e, portanto, apresentando  $p \geq 0,05$ .

FIGURA 18. Análise estatística referente ao Dano Total (DT) entre os grupos controle, experimental 1 e experimental 2. Legenda: **Ctr.**: DT do grupo controle; **Exp. 1**: DT do grupo experimental 1 (2,5 ppb); **Exp. 2**: DT do grupo experimental 2 (3,5 ppb). Note letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos - teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) e grupo seguido de mesma letras não são significativamente diferentes.



Fonte: Elaborado pela autora, com auxílio do *software* GraphPad Prism v.8.

Esse resultado corrobora com os dados de estudos que estão sendo desenvolvido no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF). Através de análise histoquímica de fluorescência com Acridine Orange (AO), foi possível observar que indivíduos expostos à 2,5 ppb de fipronil, não apresentaram impactos significativos às células do sistema hepato-nefrocítico (trofócitos, enócitos e células pericárdicas). Entretanto, nos indivíduos expostos à 3,5 ppb de fipronil observaram-se impactos nas células trofócitos.

Portanto, a concentração estimada em campo de 2,5 ppb não induz genotoxicidade ao cérebro das abelhas analisadas. Enquanto a concentração de 3,5 ppb de fipronil induziu danos ao DNA das células neurais presentes no cérebro de abelhas *B. atratus*. Esses dados

contribuem para um tema quase inexplorado: a dos efeitos genotóxicos de poluentes ambientais em abelhas nativas. Os resultados também são preocupantes, mesmo concentração traço de 3,5 ppb interferem no DNA das células neurais dessas abelhas e, muito provavelmente, na capacidade de desempenhar suas tarefas na colônia.

No estudo de Jacob *et al.* (2015), ao avaliarem o impacto do fipronil no corpo pedunculado de abelhas *Scaptotrigona postica*, após submeter as abelhas a exposição tópica e oral, constatou que doses subletais 0.27 ng/abelha ou aproximadamente 270 ppb (tópico) e 0.24 ng/ $\mu$ L ou 240 ppb (oral) causaram alterações nas células de Kenyon, com a formação de núcleos picnóticos, indicativos de morte celular. Se comparamos as concentrações utilizadas, o fato da concentração traço utilizada nesta pesquisa (3,5 ppb) ter causado impacto semelhante à administração oral acima de 200 ppb, torna ainda mais impactante os resultados aqui apresentados e a necessidade de se determinar a concentração segura às abelhas em trabalhos futuros.

Frente aos resultados observados neste estudo, a utilização do cérebro de abelhas *B. atratus* se mostrou um eficiente bioindicador de efeitos genotóxicos associado a contaminação por ingestão de inseticida, visto que foi possível comparar e mensurar concentração traço semelhante, como as utilizadas nesta pesquisa. Isso, pois os órgãos internos dos indivíduos predizem potenciais efeitos deletérios que somente a taxa de sobrevivência atribuída em estudos sobre determinado período de exposição não mostra (ABDALLA; DOMINGUES, 2015).

Uma grande preocupação que surge desta pesquisa é o fato das colônias pertencente ao gênero *Bombus*, além de apresentarem tamanho populacional afetivo pequeno, quando comparada as espécies pertencentes ao gênero *Apis*, essas espécies iniciam o ciclo biológico da colônia com um único indivíduo, ou seja, a rainha fecundada (GARÓFALO, 1979; 2005). Em tese, cada perda de uma rainha fecundada é uma colônia destruída. Mesmo se a rainha não for contaminada, a fase social da colônia começa com poucas operárias, de 3 a 8 no máximo (GARÓFALO, 1979). Caso estas operárias forem contaminadas pelo fipronil, estas perdem a capacidade de orientação ou da realização das tarefas no ninho e fora dele, levando a colônia a colapsar precocemente.

Vale ressaltar que no presente estudo não houve monitoramento comportamental das abelhas durante a realização dos bioensaios, embora foram presenciados movimentos letárgicos e padrões comportamentais atípicos como descrito na literatura (BELZUNCES; TCHAMITCHIAN; BRUNET, 2012; FARDER-GOMES *et al.*, 2021a;

NOGUEIRA *et al.*, 2019). Esses comportamentos podem estar atrelados a ação antagonista do fipronil nos neurotransmissores de ácido gama-aminobutírico (GABA) e canais de cloreto ativados por glutamato, proporcionando estímulo neural excessivo levando a morte do inseto (NARAHASHI *et al.*, 2010; SIMON-DELSO *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016a).

Sendo assim, os dados obtidos nesse estudo são essenciais para desenvolver novos estudos que permitam a identificação dos mecanismos de ação do fipronil sobre diferentes espécies de abelhas. De modo que a concentração utilizada neste estudo reflete a concentração encontrada no meio ambiente, de forma que possa ser usada como bioindicador de contaminação ambiental, no conceito ecotoxicológico. Esse estudo também é considerando um parâmetro norteado para estudos de avaliação dos efeitos genotóxicos utilizando o Ensaio Cometa em outros inseticidas e contaminantes ambientais, visto que nesse estudo ficou evidente que a técnica é precisa, podendo detectar dano ao DNA em concentrações traços.

## 6. CONCLUSÃO

O efeito genotóxico do fipronil nos cérebros de operárias de *Bombus atratus* expostas há 96 horas, foi observado somente à concentração de 3,5 ppb. Através desse resultado evidencia a precisão da técnica Ensaio Cometa e a utilidade das abelhas como bioindicadoras, assim como dos órgãos internos dessas abelhas como biomarcadores de efeito em estudos de contaminação ambiental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, F. C.; DOMINGUES, C. E. C. Hepato-Nephrotoxic System: A Novel Model of Biomarkers for Analysis of the Ecology of Stress in Environmental Biomonitoring. **PLoS One**, v.10, n.7, p. 1-9, 2015.
- ABDALLA, F. C.; DOMINGUES, C. E. C.; BALSAMO, P. J. Effect of Cadmium on Worker Ovary Morphology of *Bombus morio* (Hymenoptera: Bombini). **Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 13, p. 28-37, 2018.
- ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation research**, v. 560, n.1, p. 57–67, 2004.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.02.006>
- AFANASIEVA, K.; SIVOLOB, A. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophysical chemistry**, v. 238, p.1–7, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.04.003>.
- AGUILAR-BENAVIDES, M. **Aspectos da biologia reprodutiva de *Bombus morio* (swederus) e *Bombus atratus* Franklin (Hymenoptera, Apidae)**. Dissertação de mestrado (Programa de pós-graduação em entomologia) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 12-13, 2008.
- ALBERTS, B. *et al.* Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26910/>. Acesso 26 novembro 2021.
- AUGUSTYNIAK, M. *et al.* DNA damage in grasshoppers' larvae - Comet assay in environmental approach. **Chemosphere**, v. 96, p. 180–187, 2014.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.033>
- AUGUSTYNIAK, M.; GLADYSZ, M.; DZIEWIECKA, M. The Comet assay in insects--Status, prospects, and benefits for science. **Mutation research. Reviews in mutation research**, v. 767, p. 67–76, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.09.001>
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice monográfico F43: Fipronil**. 2019. Disponível em:  
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5612748/CONSULTA+P%C3%A9BLICA+N+692+GGTOX.pdf/332022d9-cb9b-4ddf-bcd7-197e629636ae> . Acesso em: 01 Agosto 2021.
- AVAN AKSOY, H.; YAZICI, N.; EREL, Y. Effects of X-ray irradiation on different stages of *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae) and DNA damage. **Radiation Physics and Chemistry**, v.130. [10.1016/j.radphyschem.2016.08.012](https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.08.012).
- AZEVEDO, P.; NOCELLI, R. C. F. Revisão da anatomia do sistema nervoso central de *Apis mellifera*: uma base teórica para estudos ecotoxicológicos. **Revista da Biologia**, v. 1, p. 10-20, 2020. <http://dx.doi.org/10.7594/revbio.20.01.10>

- AZQUETA, A. *et al.* Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation research**, v. 724(1-2), p. 41–45, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.05.010>.
- AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of Toxicology**, v. 87, n.6, p. 949–968, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>
- AZQUETA, A. *et al.* technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies. **Genetic toxicology and environmental mutagenesis**, v. 843, p. 24–32, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.04.007>.
- BALSAMO, P. J. *et al.* Impact of sublethal doses of thiamethoxam and inoculation on the Hepato-Nephrotoxic system in young Africanized. **Journal of Apicultural Research**, v. 1, p. 1-12, 2019. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2019.1686575>.
- BARBARA, G.S. *et al.* Acetylcholine, Gaba and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 191, p. 823-836, 2005.
- BELZUNCES, L.; TCHAMITCHIAN, S.; BRUNET, J. L. Neural effects of insecticides in the honeybee. **Apidologie**, v. 43, n. 3, p. 348-370, 2012.
- BIESMEIJER, J. C. *et al.* Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, v. 313, p. 351–354, 2006. <https://doi.org/10.1126/science.1127863>
- BOILY, M. *et al.* Acetylcholinesterase in honeybees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine, and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 8, p.5603-5614, 2013.
- BONMATIN, J. M. *et al.* Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 35–67, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>
- BLOOMQUIST, J. R. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 54, p. 145-156, 2003.
- BUDGE, G. E. *et al.* Evidence for pollinator cost and farming benefits of neonicotinoid seed coatings on oilseed rape. **Scientific Reports**, v. 5, p.12574, 2015.
- BLACQUIÈRE, T. *et al.* Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects, and risk assessment. **Ecotoxicology**. v. 21(4), p.973-992. 2012.
- CAMERON, S.; JOST, M. Mediators of dominance and reproductive success among queens in the cyclically polygynous Neotropical bumble bee *Bombus atratus* Franklin. **Insectes Sociaux**, v. 45, p. 135–149, 1998.

CAMERON, S. A.; HINES, H. M.; WILLIAMS, P. H. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). **Biological Journal of the Linnean Society**, 911: 161–188, 2007.

CAMERON, S. A. *et al.* Patterns of widespread decline in North American bumblebees. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 108, p. 662-667, 2011.

CASTILHO, *et al.* Neonicotinoids and fipronil concentrations in honeybees associated with pesticide use in Brazilian agricultural areas. **Apidologie**, v. 50, p. 657–668, 2019.

CATAE, A. F. *et al.* Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and Malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 4, p. 274-281, 2014.

CESCHI-BERTOLI, L. *et al.* Comet assay protocol for *Bombus atratus* fat body and pericardial cells (Hymenoptera, Bombini) at a safe concentration of mercury. **Chemosphere**, v. 261, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127752>

COLLINS, A. R. The comet assay, principles, applications and limitations. *In*: DIDENKO, V. V. (Ed), **In Situ Detection of DNA Damage. Method and Protocols**, v. 203. Humana Press Inc., Totowa, p. 163-177, 2002.

COLLINS, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica et Biophysica Acta (bba)**, v. 1840, n. 2, p.794-800, 2014.

COSTA, L. M. *et al.* Determination of acute lethal doses (LD50 and LC50) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 62, p. 578-582, 2015.

CULLEN, M. G. *et al.* Fungicides, herbicides and bees: A systematic review of existing research and methods. **PLoS One**, v. 14, n. 12, p. 1-17, 2019.

CLANCY, S. DNA damage & repair: Mechanisms for maintaining DNA integrity. **Nature Education**, v.1 (1), p. 103, 2008.

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

DE LUPENTE, J. *et al.* The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. **Frontiers in genetics**, v.6, p.180. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00180>

DEVILLERS, J.; PHAM-DELEGUE, M. **Honeybees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals**. 1 St. New York: Taylor & Francis e-Library, 7 p., 2003.

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

DICKS, L.V. *et al.* Ten policies for pollinators. **Science**, v. 354, p. 975-976, 2016.

DIMAURO, I.; PEARSON, T.; CAPOROSI, D.; JACKSON, M. J. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. **BMC Research Notes**, v. 5(1), p. 513, 2012. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-513>

DOMINGUES, C. E. C.; *et al.* Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the Hepato-Nephrotoxic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, v. 186, p. 994-1005, 2017.

DUCHATEAU, M. J.; VELTHUIS, H. H. W. Development and reproductive strategies in *Bombus terrestris* colonies. **Behaviour**. v. 107, n. 3, p. 186-207, 1988.

EL HASSANI A.K.E. *et al.* Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.82, p. 30–39, 2005.

ENCISO, J. M.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; OLSEN, A. K.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; AZQUETA, A. Standardisation of the in vitro comet assay: influence of lysis time and lysis solution composition on the detection of DNA damage induced by X-rays. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, p.25-30, 2018. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex039>

FAHRBACH, S. E. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual review of entomology**, v. 51, p. 209-32. 2006.

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 & development**, v. 32, n. 1, p. 79-101, 2003.

FAO- Food and Agriculture of the United Nations. **Pollination & human livelihoods**. Organization FAO's Global Action on Pollination Services for Sustainable Agriculture. Disponível em: <https://www.fao.org/pollination/background/en/>. Acesso: 12 de setembro 2021.

FAO- Food and Agriculture of the United Nations. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture the international response. *In*: FREITAS, B. M.; PEREIRA, J.O.P. **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Fortaleza, p. 203-211, 2004. Federal University of Ceará, Brazil.

FARDER-GOMES, C. F.; *et al.* Harmful effects of fipronil exposure on the behavior and brain of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Meliponini). **Science of the Total Environment**, v.794, 2021a.

FARDER-GOMES, C. F.; *et al.* Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Science of the Total Environment**, v. 774, p. 145679, 2021.

FERREIRA, R. A. C.; *et al.* Cellular responses in the Malpighian tubules of *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) exposed to low doses of fipronil and boric acid. **Micron** v. 46, p. 57–65, 2013.

FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; MEDINA, L. M.; KLEINTER, A. M. P.; GALETTO, L.; NATES-PARRA, G.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics, **Apidologie**, v. 40, p. 332–346, 2009.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Polinizadores e pesticidas: princípios e manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Brasília: MMA**, 2012. 112 p.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation research**, v. 681(1), p. 80–92, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001>

GAJSKI, G. *et al.* The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 1 Invertebrates). **Mutation research. Reviews in mutation research**, v. 779, p. 82–113, 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.02.003>

GAJSKI, G. *et al.* The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 2 Vertebrates). **Mutation research. Reviews in mutation research**, v. 781, p. 130–164, 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.04.002>

GAJSKI, G.; GARAJ-VRHOVAC, V.; OREŠČANIN, V. Cytogenetic status and oxidative DNA-damage induced by atorvastatin in human peripheral blood lymphocytes: Standard and Fpg-modified comet assay. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 231(1), p. 85–93, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.03.013>

GARÓFALO, C.A. On the bionomic of *Bombus* (*Fervidobombus*) *morio* (Swederus). I. cell construction and oviposition behavior of the queen (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira Biologia**, v. 38, p. 227-236, 1978a.

GARÓFALO, C.A. Bionomics of *Bombus* (*Fervidobombus*) *morio*. II. body size and length of life of worker. **Journal of Apicultural Research**, v. 17, p. 130-136, 1978b.

GARÓFALO, C. A. Observações preliminares sobre a fundação solitária de colônias de *Bombus* (*Fervidobombus*) *atratus* Franklin (Hymenoptera, Apidae). **Boletim de Zoologia Universidade de São Paulo**, 4: 53-64, 1979.

GARÓFALO, C. A.; ZUCCHI, R.; MUCCILLO, G. Reproductive studies of a neotropical bumblebee, *Bombus atratus* (Hymenoptera, Apidae). **Revista brasileira de Genética**. v. 9, n.2, p. 231-243, 1986.

GARÓFALO, C. A. **Bombus: as mamangavas de chão e sua importância como agentes polinizadores**. Apacame. Mensagem Doce, n. 80. 2005. Disponível em: <https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/80/polinizacao2.htm>. Acesso em 10 setembro 2021.

GASTELBONDO-PASTRANA, B. I. *et al.* The comet assay in *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae): A suitable approach for detecting somatic and germ cell genotoxicity induced by agrochemicals. **Chemosphere**, v. 235, p. 70–75, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.142>

GHISI, N.C. *et al.* Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with fipronil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.180, n. 1, p.589-599, 2011.

GLEI, M.; SCHNEIDER, T.; SCHLÖRMANN, W. Comet assay: An essential tool in toxicological research. **Archives of toxicology**, v. 90(10), p. 2315–2336, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1767-y>

GOULSON, D. **Bumblebees- Behaviour and Ecology**. ed.2. Oxford University Press, Oxford. 2010.

GOULSON, D. Neonicotinoids impact bumblebee colony fitness in the field; a reanalysis of the UK's Food & Environment Research Agency 2012 experiment. **PeerJ**, 3, e854, 2015. <https://doi.org/10.7717/peerj.854>

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, 2015.

GRIXTI, J. C.; WONG, L. T.; CAMERON, S. A.; FAVRET, C. Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. **Biological Conservation**, v. 142, p. 75-84, 2009.

GUNASEKARA, V.; RAJ, G. V.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 9, n.3, p. GE01–GE5, 2015. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/12062.5622>

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

GUPTA, R. C.; ANADÓN, A. Fipronil. *In*. GUPTA, R. C. **Veterinary toxicology: Basic and Clinical Principles**, 3 ed. London. 2018, p.533-538. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00042-8>

HAGEN, M.; WIKELSKI, M.; KISSLING, W. D. Space Use of Bumblebees (*Bombus* spp.) revealed by Radio-Tracking. **PLoS ONE**, v. 6, n.5, p.e19997, 2011

HEINRICH, B. **Bumblebee Economics**. Harvard College. United States of America. 288 p. 2004.

HOFMANN, M. M.; FLEISCHMANN, A.; RENNER, S. S. Foraging distances in six species of solitary bees with body lengths of 6 to 15 mm, inferred from individual tagging, suggest 150 m-rule-of-thumb for flower strip distances. **Journal of Hymenoptera Research**, v. 77, p. 105-117, 2020. <https://doi.org/10.3897/jhr.77.51182>

HONG, Y. *et al.* Deep learning method for comet segmentation and comet assay image analysis. **Scientific Reports**, v. 10, p. 18915, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75592-7>

HUNG, K. J. *et al.* The worldwide importance of honeybees as pollinators in natural habitats. **Proceedings Biological Science**, v. 285, e20172140, 2018.

IBAMA. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil**. Boletim 2019. [Internet]. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios> . Acesso em: 19 agosto 2021.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; GONÇALVES, L. S.; FRANCOY, T. M.; SILVA, P. N. O Desaparecimento das Abelhas Mellífera (*Apis mellifera*) e as Perspectivas do Uso de Abelhas Não Mellífera na Polinização. In: **SEMANA DOS POLINIZADORES**, 3., Petrolina, 2012. Palestras e resumos. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2012. p. 213-226.

JACOB, C. R.; SOARES, H. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. O Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee. *Scaptotrigona postica*. **Pest Management science**, v. 71, p. 114-122, 2015.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay, *Mutagenesis*, v. 23, n. 3, p. 207–221, 2008. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen014>

JHA, S.; KREMEN, C. Resource diversity and landscape-level homogeneity drive native bee foraging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n.2, p. 555–558, 2012.

KAMEYA, H. *et al.* Assessment of gamma ray-induced DNA damage in *Lasioderma serricornis* using the comet assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, p.316–321. [10.1016/j.radphyschem.2011.10.022](https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2011.10.022).

KARBASHI, M. *et al.*, Evaluation of the Major Steps in the Conventional Protocol for the Alkaline Comet Assay. **Intention Journal of Molecule Science**, v. 20, n. 23, 6072, 2019.

KIYA, T. *et al.* Increased neural activity of a mushroom body neuron subtype in the brains of forager honeybees. **PLoS One**, v. 2, n. 4, p. e371, 2007.

KNIGHT, M. E.; MARTIN, A. P.; BISHOP, S.; OSBORNE, J. L.; HALE, R. J.; SANDERSON, R. A.; GOULSON, D. An interspecific comparison of foraging

range and nest density of four bumblebee (*Bombus*) species. **Molecular Ecology**, v. 14, n.6, p. 1811–1820, 2005.

KHALIFA, S. A. M. *et al.* Overview of Bee Pollination and Its Economic Value for Crop Production. **Insects**, v. 12, n. 688. 2021. <https://doi.org/10.3390/insects12080688>

KLEIN, A. M. *et al.* Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceeding of the Royal Society Biological Science**, v. 274, p.303–313, 2007. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721> .

KLEI, A. M.; CABIROL, A.; DEVAUD, J. M.; BARRON, A. B.; LIHOREAU, M. Why Bees Are So Vulnerable to Environmental Stressors. **Trends in ecology & evolution**, v. 32(4), p. 268–278, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.12.009>

KRUPKE, C. H. *et al.* Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honeybees Living Near Agricultural Fields. **PLoS ONE**, v.7, n.1, 2012.

KUMARAVEL, T. S.; VILHAR, B.; FAUX, S. P.; JHA, A. N. Comet Assay measurements: a perspective. **Cell Biology and Toxicology**. v. 25, p. 53–64, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9>

LANGIE, S. A.; AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The comet assay: past, present, and future. **Frontiers in genetics**, v. 6, n. 266. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00266>

LAPUENTE, J. *et al.* The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. **Frontiers In Genetics**, v. 6, p.1-20, 2015.

LAUTENBACH, S.; SEPPELT, R.; LIEBSCHER, J.; DORMANN, C. F. Spatial and temporal trends of global pollination benefit. **PLoS One**, v. 7, n. 3, 2012.

LENTOLA, A. *et al.* Ornamental plants on sale to the public are a significant source of pesticide residues with implications for the health of pollinating insects. **Environmental Pollution**, v. 228, p. 297–304, 2017.

LI, X. *et al.* Determination of residual fipronil and its metabolites in food samples: A Review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 97, p. 185–195, 2020.

LIMA, C. M.; ROCHA, A. Efeito dos Agrotóxicos Sobre as Abelhas Silvestres no Brasil. 1st.ed. **Brasília: IBAMA**, 86 p. 2012.

LOURENÇO, C. T. *et al.* Determination of fipronil LD50 for the Brazilian bee *Melipona scutellaris*. **Julius-Kühn-Archiv**. 174-178. 2012a

LOURENÇO, C. T. *et al.* Oral Toxicity of Fipronil Insecticide Against the Stingless Bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Julius-Kühn-Archiv**, n. 89, p. 921–924, 2012b.

LORENZO, Y.; COSTA, S.; COLLIS, A. R.; AZQUETA, A. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. **Mutagenesis**, v. 28, n.4, p. 427–432, 2013. <https://doi.org/10.1093/mutage/get018>

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento Aquáticos. **Oecologia**, v.12, n.3, p.355-381, 2008.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian journal of morphological sciences**, v. 23, p. 3-4, 2006.

MANDAL, K, *et al.* Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v 93, p.87–92, 2013.

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- **Agrofit: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. 2012 Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 15 nov. 2021.

MARTINS, A. C.; MELO, G. A. R. Has the bumblebee *Bombus bellicosus* gone extinct in the northern portion of its distribution range in Brazil? **Journal of Insect Conservation**, v.14, p 207–210, 2010.

MICHENER, C. D. **The Bees of the World**. 2nd. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2007.

MORAIS, C. R. *et al.* Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini). **Chemosphere**, v. 206, p. 632-642, 2018.

MOURE, J. S.; MELO, G. A. R. *Bombus Latreille*, 1802. In: Moure, J. S., Urban, D.; Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region.**, 2008. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em 10 maio 2021.

MOURE, J. S.; SAKAGAMI, S. F. As mamangavas sociais do Brasil (*Bombus* Latr.). **Studia Entomological**, v. 5, p.65–194, 1962.

MÖHLER, H. *et al.* Specific GABA (A) circuits in brain development and therapy. **Biochemical Pharmacology**, v.15, n.8, p. 1685-1690, 2004.

MØLLER, P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 96, p. 1–42, 2005.

MØLLER, P.; *et al.* Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. **Nature Protocols**, p. 3817–3826, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0398-1>.

MURUZABAL, D.; COLLINS, A.; AZQUETA, A. The enzyme-modified comet assay:

past, present and future. **Food and Chemical Toxicology**, v. 147, 2021.

NARAHASHI, T.; ZHAO, X.; IKEDA, T.; SALGADO, V.L.; YEH, J. Z. Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, p.149-152, 2010.

NOCELLI, R. C. F. *et al.* **Riscos de Pesticidas sobre as Abelhas**. p. 196-212. 2012.

Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69299/1/Roberta.pdf>. Acesso em: 02 agosto 2021.

NOGUEIRA, F. L. A. *et al.* Exposure to Mercury at Trace Concentrations Leads to Collapse of the Hepato-Nephrotoxic System in Two Neotropical Species of Bumblebee. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v.14, p. 1-10, 2019.

OECD- Organization for Economic Cooperation and Development. Test No. 247: Bumblebee, Acute Oral Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, **OECD Publishing**, 2017. <https://doi.org/10.1787/9789264284128-en>.

ÖSTLING, O., JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123. p.291–298, 1984.

PANSERI, S. *et al.* Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. **Food Control**, v. 38, n. 1, p. 150–156, 2014.

PEI, Z.; YITONG, L.; BAOFENG, L.; GAN, J.J. Dynamics of fipronil residue in vegetable-field ecosystem. **Chemosphere**, v.57, p.1691-1969, 2004.

PETTIS, J. S.; *et al.* Crop pollination exposes honeybees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p.e70182, 2013.

PEREIRA, A. M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas**. 2010. 125 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

PROVASE, M.; SALLA, R. F.; REQUEIÃO de LIMA, C.; ABDALLA, F. C. Effects of mercury at field estimated concentration in brain of *Bombus atratus* (Hymenoptera: Bombini). **Chemosphere**. v. 276, p. 130198, 2021.

PU, X.; WANG, Z.; KLAUNIG, J. E. Alkaline Comet Assay for Assessing DNA Damage in Individual Cells. **Current protocols in toxicology**, v. 65, p. 3.12.1–3.12.11, 2015. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0312s65>

QU, H. *et al.* The toxicity, bioaccumulation, elimination, conversion of the enantiomers of fipronil in *Anodonta woodiana*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 312, p. 169-174. 2016.

REDHEAD, J. W. *et al.* Effects of habitat composition and landscape structure on worker foraging distances of five bumble bee species. **Ecological Applications**, v. 26 n. 3, p. 726–739, 2016.

REILLY, J. R. *et al.* Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 287, 2020. <http://doi.org/10.1098/rspb.2020.0922>

RICKETTS, T. H. *et al.* Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**, p. 499–515, 2008.

ROBEA, M. *et al.* Fipronil: mechanisms of action on various organisms and future relevance for animal models studies. **Survey in Fisheries Sciences**. v. 5, n.1, p. 20-31, 2018.

ROAT, T. C.; CRUZ-LANDIM, C. Differentiation of the honeybee (*Apis mellifera L.*) antennal lobes during metamorphosis: a comparative study among castes and sexes. **Animal Biology**. v. 61, p.153-161, 2011. <http://dx.doi.org/10.1163/157075511X566489>

ROAT, T. C. *et al.* Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of Africanized honeybees. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64(3), p. 456-466, 2013.

ROJAS, E. *et al.* Epithelial cells as alternative human biomatrices for comet assay. **Frontiers in genetics**, v. 5, n. 386, 2014. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00386>

RYDBERG, B.; JOHANSON, K. J. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. *In*: HANAWALT, P. C; FRIEDBERG, E. C.; FOX, C. F. **DNA Repair mechanisms**. Academic, New York. p. 465–8, 1978.

SILVA, C. A. S. *et al.* Fipronil effect on the frequency of anomalous brood in honeybee reared in vitro. **Berlin: Julius-Kühn-Archiv**, v. 450, p. 140-146, 2015.

SACHÄFER, S; BICKER, G. Distribution of GABA-like immunoreactivity in the brain of the honeybee. **The journal of Comparative Neurology**, v. 246, p. 287-300, 1986.

SAKAGAMI, S. F. Specific differences in the bionomic characters of bumblebees. A comparative Review. **Journal of the Faculty of Science**, v. 20, n. 1, p. 390- 447. 1976.

SHAPOSHNIKOV, S. A.; SALENKO, V. B.; BRUNBORG, G.; NYGREN, J.; COLLINS, A. R. Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): Loops or fragments? **Electrophoresis**, v. 29, n.14, p. 3005–3012, 2008.

SHARMA, R. K. *et al.* TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility, **Urology**, v. 6, p. 1380-1386, 2010.

SILVA CRUZ A. *et al.* Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biol Toxicol** v.26, p. 165-176. 2010

SIMON-DELSO, N. *et al.* Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 5–34, 2015.

SCIENCE FOR ENVIRONMENT POLICY. Pollinators: importance for nature and human well-being, drivers of decline and the need for monitoring. **European Commission DG Environment**. European Union. n. 23, 2020. Disponível em: [https://ec.europa.eu/environment/integration/research/newsalert/pdf/issue-23-2020-05-pollinators-future-brief\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/environment/integration/research/newsalert/pdf/issue-23-2020-05-pollinators-future-brief_en.pdf) Acesso em: 12 setembro 2021.

SCHÄFER, S.; BICKER, G. Distribution of GABA-like immunoreactivity in the brain of the honeybee. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 246, p. 287-300, 1986.

SCHÖNFELDER, M. L.; BOGNER, F. X. Individual perception of bees: Between perceived danger and willingness to protect. **PLoS ONE**, v. 12(6):e0180168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180168>

SNODGRASS, R. E. **Anatomy of the Honeybee**. 1ed. New York: Comstock Publishing. 1956. 166 p.

STONER, K. A.; EITZER, B. D. Using a hazard quotient to evaluate pesticide residues detected in pollen trapped from honeybees (*Apis mellifera*) in Connecticut. **PLoS One**, v.8., 2013.

SHUKLA, A. K.; PRAGYA, P.; CHOWDHURI, D. K. A modified alkaline Comet assay for in vivo detection of oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster*. **Mutation research**, v. 726(2), p. 222–226, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.09.017>

TANG, W. *et al.* Effects of sodium fluoride on the reproductive development of *Bombyx mori*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 64, p.41-47, 2018. doi: 10.1016 / j. etap.2018.09.009.

THOMPSON, H. M. *et al.* Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. **Apidologie**, v. 45, n.5, p. 545–553, 2014.

UEDA, M. Alkali Comet Assay in Genotoxicity Tests. **Methods in Molecular Biology Springer**, p. 73-78, 2020.

VALADARES, A; ALVES, F; GALIZA, M. **O Crescimento do Uso de Agrotóxicos: uma Análise Descritiva dos Resultados de Censo Agropecuário**. 2017. Brasília, DF: Ipea, n. 65, 42 p., 2020. Disponível em: [https://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/nota\\_tecnica/200429\\_nt\\_disoc\\_n65.pdf](https://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/nota_tecnica/200429_nt_disoc_n65.pdf). Acesso em 02 agosto 2021.

VIDAU, C. *et al.* Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. **PLoS One**, v.6, n.6, p.1- 8, 2011.

VELTHUIS, H. H. W.; VAN DOORN, A. century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. **Apidologie**, v.37, n.4, p.421-451, 2006.

WANG, X. *et al.* Fumonisin: oxidative stress-mediated toxicity and metabolism *in vivo* and *in vitro*. **Archives Toxicology**, v.90, p. 81–101. 2016a

WANG, X. *et al.* Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 46, n.10, p.876–899. 2016b.

WILLIAMS, P. H. Mapping variations in the strength and breadth of biogeographic transition zones using species turnover. **Proceedings of the Royal Society of London B**, 263, 579-588, 1996.

WILLIAMS, P. H. An Annotated Checklist of Bumble Bees with an Analysis of Patterns of Description (Hymenoptera: Apidae, Bombini). **Bulletin of the Natural History Museum Entomology**, v. 67, n. 1, p. 79-152, 1998.

WRIGHT, I. *et al.* Fipronil: A microcosm of flea control? **Companion Animal**, v. 18, n.4, p. 139–141, 2013.

ZALUSKI, R.; JUSTULIN Jr., L. A.; ORSI, R. D. O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

ZHANG, B. *et al.* Interactions of Fipronil within Fish and Insects: Experimental and Molecular Modeling Studies. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n.23, p. 5756–5761, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00573>

## APÊNDICE A

Valores arbitrários do Índice de Dano, Frequência de Dano e Dano Total por indivíduo do grupo controle de *Bombus atratus*. \*Foram contabilizados 300 cometas por indivíduo, totalizando 3300 cometas.

Grupo Controle	Nível de Dano Genético*					Índice de Dano	Frequência de Dano	Dano Total
	N0	N1	N2	N3	N4	ID	FD%	DT
<b>01</b>	221	36	31	12	0	134	26	79
<b>02</b>	222	38	28	11	1	131	26	78
<b>03</b>	213	41	36	9	1	144	29	87
<b>04</b>	178	56	42	21	3	215	41	122
<b>05</b>	230	28	26	16	0	128	23	70
<b>06</b>	236	33	25	6	0	101	21	64
<b>07</b>	227	43	21	8	4	113	24	73
<b>08</b>	215	48	31	6	0	128	28	85
<b>09</b>	220	32	29	17	2	149	27	80
<b>10</b>	199	36	41	23	1	191	34	101
<b>11</b>	249	24	18	9	0	87	17	51
<b>MÉDIA</b>	<b>219</b>	<b>37,7</b>	<b>29,8</b>	<b>12,5</b>	<b>0,81</b>	<b>138,2</b>	<b>27%</b>	<b>80,9</b>

Fonte: Elaborado pela autora.

Valores arbitrários do Índice de Dano, Frequência de Dano e Dano Total por indivíduo do grupo exposto à 2,5 ppb de fipronil. \*Foram contabilizados 300 cometas por indivíduo, totalizando 3300 cometas.

Grupo experimental 1 (2,5 ppb)	Nível de Dano Genético*					Índice de Dano	Frequência de Dano	Dano Total
	N0	N1	N2	N3	N4	ID	FD%	DT
<b>01</b>	180	49	43	26	2	221	40	120
<b>02</b>	164	48	41	36	11	282	45	136
<b>03</b>	78	75	82	48	17	451	74	222
<b>04</b>	240	33	16	8	3	101	20	60
<b>05</b>	240	21	23	12	4	119	20	60
<b>06</b>	207	41	34	16	2	165	31	93
<b>07</b>	130	68	56	36	10	328	57	170
<b>08</b>	120	83	61	32	4	317	60	180
<b>09</b>	191	51	34	22	2	193	36	109
<b>10</b>	267	12	14	7	0	61	11	33
<b>11</b>	223	40	20	17	0	131	26	77
<b>MÉDIA</b>	<b>185,4</b>	<b>47,3</b>	<b>38,5</b>	<b>23,6</b>	<b>5</b>	<b>215,3</b>	<b>38%</b>	<b>114,5</b>

Fonte: Elaborado pela autora.

Valores arbitrários do Índice de Dano, Frequência de Dano e Dano Total por indivíduo do grupo exposto à 3,5 ppb de fipronil. \*Foram contabilizados 300 cometas por indivíduo, totalizando 3300 cometas.

<b>Grupo experimental 2 (3,5 ppb)</b>	<b>Nível de Dano Genético*</b>					<b>Índice de Dano</b>	<b>Frequência de Dano</b>	<b>Dano Total</b>
	<b>N0</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>	<b>N4</b>	<b>ID</b>	<b>FD%</b>	<b>DT</b>
<b>01</b>	28	101	79	71	21	556	91	272
<b>02</b>	11	93	114	63	19	586	96	289
<b>03</b>	72	89	68	54	17	455	76	228
<b>04</b>	120	74	53	41	12	351	60	180
<b>05</b>	41	65	84	92	18	581	86	259
<b>06</b>	242	24	19	9	6	113	19	58
<b>07</b>	218	42	31	8	1	132	27	82
<b>08</b>	172	53	38	27	10	250	43	128
<b>09</b>	223	29	22	14	12	163	26	77
<b>10</b>	164	47	36	32	21	299	45	136
<b>11</b>	268	18	11	3	0	49	11	32
<b>MÉDIA</b>	<b>141,7</b>	<b>57,7</b>	<b>50,4</b>	<b>37,6</b>	<b>12,4</b>	<b>321,3</b>	<b>53%</b>	<b>158,2</b>

Fonte: Elaborado pela autora.

## APÊNDICE B

Análise de variância (ANOVA) referente ao Dano Total (DT) entre os grupos: Controle Experimental 1 (2,5 ppb) e Experimental 2 (3,5 ppb).

Ordinary one-way ANOVA ANOVA results					
1	Table Analyzed	Dano Total			
2	Data sets analyzed	A-C			
3					
4	<b>ANOVA summary</b>				
5	F	4.045			
6	P value	0.0278			
7	P value summary	*			
8	Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes			
9	R square	0.2124			
10					
11	<b>Brown-Forsythe test</b>				
12	F (DFn, DFd)	9.142 (2, 30)			
13	P value	0.0008			
14	P value summary	***			
15	Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes			
16					
17	<b>Bartlett's test</b>				
18	Bartlett's statistic (corrected)	18.25			
19	P value	0.0001			
20	P value summary	***			
21	Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes			
22					
23	<b>ANOVA table</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>
24	Treatment (between columns)	33105	2	16552	F (2, 30) = 4.045
25	Residual (within columns)	122760	30	4092	
26	Total	155865	32		
27					
28	<b>Data summary</b>				
29	Number of treatments (columns)	3			
30	Number of values (total)	33			

Fonte: Elaborado pela autora.

Análise estatística do teste de *Tukey* múltiplas comparações ao Dano Total (DT) do DNA no cérebro de *Bombus atratus*.

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons						
1	Number of families	1				
2	Number of comparisons per family	3				
3	Alpha	0.05				
4						
5	<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95.00% CI of diff.</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>
6	Ctr. vs. Exp. 1	-33.64	-100.9 to 33.61	No	ns	0.4434
7	Ctr. vs. Exp. 2	-77.36	-144.6 to -10.12	Yes	*	0.0215
8	Exp. 1 vs. Exp. 2	-43.73	-111.0 to 23.52	No	ns	0.2599
9						
10	<b>Test details</b>	<b>Mean 1</b>	<b>Mean 2</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>SE of diff.</b>	<b>n1</b>
11	Ctr. vs. Exp. 1	80.91	114.5	-33.64	27.28	11
12	Ctr. vs. Exp. 2	80.91	158.3	-77.36	27.28	11
13	Exp. 1 vs. Exp. 2	114.5	158.3	-43.73	27.28	11

Fonte: Elaborado pela autora.

Aplicação do Teste de Normalidade aos resultados obtidos de Dano Total (DT) no cérebro de *Bombus atratus* expostas às concentrações de 2,5 ppb e 3,5 ppb.

Normality and Lognormality Tests Tabular results		A	B	C
		Ctr.	Exp. 1	Exp. 2
1	<b>Test for normal distribution</b>			
2	<b>Anderson-Darling test</b>			
3	A2*	0.3448	0.1988	0.3472
4	P value	0.4150	0.8457	0.4093
5	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes
6	P value summary	ns	ns	ns
7				
8	<b>D'Agostino &amp; Pearson test</b>			
9	K2	3.243	0.6638	2.868
10	P value	0.1976	0.7176	0.2384
11	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes
12	P value summary	ns	ns	ns
13				
14	<b>Shapiro-Wilk test</b>			
15	W	0.9465	0.9645	0.9223
16	P value	0.5997	0.8262	0.3383
17	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes
18	P value summary	ns	ns	ns
19				
20	<b>Kolmogorov-Smirnov test</b>			
21	KS distance	0.1909	0.1041	0.1591
22	P value	>0.1000	>0.1000	>0.1000
23	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes
24	P value summary	ns	ns	ns
25				
26	<b>Number of values</b>	11	11	11

Fonte: Elaborado pela autora.