



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE
(PPGAA)

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO FIPRONIL E DIMETOATO EM LARVAS E PUPAS
DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA CRIADAS EM
CONDIÇÕES LABORATORIAIS**

CARINA APARECIDA DE SOUZA SILVA

**ARARAS
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRICULTURA E AMBIENTE**

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO FIPRONIL E DIMETOATO EM LARVAS E PUPAS DE
Apis mellifera L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA CRIADAS EM
CONDIÇÕES LABORATORIAIS**

CARINA APARECIDA DE SOUZA SILVA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Agricultura e Ambiente para a
obtenção do título de Mestre.**

**ARARAS
2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S586ae Silva, Carina Aparecida de Souza.
Análise dos efeitos do fipronil e dimetoato em larvas e pupas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) africanizada criadas em condições laboratoriais / Carina Aparecida de Souza Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2014. 62 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Abelha. 2. Metamorfose. 3. Ecotoxicologia. 4. Morfologia. 5. Histologia. I. Título.

CDD: 595.799 (20ª)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Carina Aparecida de Souza Silva, realizada em 05/12/2014:

Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli
UFSCar

Profa. Dra. Sandra Eloisi Denardi
UNESP

Profa. Dra. Graciela Dias de Campos Severi Aguiar
UNIARARAS

Dedico aos meus pais Valdivo e Rosmary, aos meus irmãos Camila e Renan, e as minhas sobrinhas Letícia e Beatriz, pessoas tão especiais que amo muito.

Agradecimentos

Agradeço todo o esforço desse trabalho primeiramente a Deus, que sempre me deu força, sabedoria e discernimento nas minhas ações;

Aos meus pais Valdivo e Rosmary, meus irmãos Camila e Renan, além das minhas sobrinhas Letícia e Beatriz. Agradeço a eles por todo o amor, carinho, incentivo, paciência e por me ensinarem a importância de uma família. Amo vocês!

A todos os meus familiares, meus avós Alvenise, Manoel Barreto, Lourdes (*in memoriam*) e Moacir (*in memoriam*). Aos tios, tias, primos e primas por todo o apoio e incentivo dado por eles.

A minha querida amiga e eterna orientadora, Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin, pela atenção e paciência ao me orientar, e a sua família, Giuliano e Beatriz por toda a ajuda prestada a mim durante esses anos. Obrigada pela amizade e companheirismo!

A minha orientadora Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, por toda atenção, paciência, companheirismo e sugestões prestadas no decorrer deste trabalho. Principalmente, pelo incentivo e amizade nesta etapa da minha vida. Obrigada!

Aos meus queridos amigos, Elisangela (Danda), Letícia, Mariana, Suelen, Paulo Liduário, Maria Estela, América, Carlos, Edson, Danielle, Francielly, Renata Cuba, Léo, Izabela Orzari, Larissa Víglio, Jacqueline, Grazielly Devitto, Larissa Costa, Cristiane, Márcia, Bruna, Paulo Vinicius (grafite), Vivian e outros, aos quais foi construído um sentimento de afeto e irmandade ao longo do período desta vida acadêmica.

Agradeço a todos do LABEF, Thamires, Caio e o Prof^o. Fábio Abdala, por toda colaboração dada a esse trabalho. Vocês foram fundamentais. Obrigada!

A todos do LECA, Hellen, Aline, Mariana, Tatiane, Adna, Rodrigo, Felipe, Priscila Friol, Sandra Denardi, Thaísa Roat, Priscila Cintra e principalmente o Prof^o. Osmar Malaspina, por todos esses anos de ensinamentos, incentivos e amizade prestados a mim. Obrigada!

Ao laboratório de macromorfologia da UNIARARAS, principalmente a Prof^a. Dr^a. Grasiela D. C. Severi-Aguiar e a técnica Renata Barbieri pela disponibilização de aparelhos, materiais e conselhos que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!

Ao técnico Gerson e todos do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências – UNESP – Rio Claro, pela disponibilidade dos laboratórios, equipamentos e materiais necessários.

Ao Beto, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e incentivando, agradeço pelo amor, companheirismo, carinho e atenção. Obrigada!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (CNPq) e ao Programa de Pós Graduação em Agricultura e Ambiente (PPGAA) pela concessão da bolsa e grande experiência durante a representação discente.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

RESUMO

SILVA, C. A. S. **Análise dos efeitos do fipronil e dimetoato em larvas e pupas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) africanizada criadas em condições laboratoriais.** 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2014.

A abelha *Apis mellifera* africanizada Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae), apesar de não ser nativa do Brasil, é muito importante tanto para o ambiente quanto para a economia. Porém, com o crescimento da produção de alimento e biocombustíveis, houve uma expansão das áreas de monocultura, conseqüentemente aumentou-se também o uso de fertilizantes e de defensivos agrícolas. Entretanto, alguns inseticidas, como o fipronil (utilizado em cana-de-açúcar) e o dimetoato (substância padrão em testes larvais padronizados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico e utilizado em culturas de algodão), são tóxicos para as abelhas. Diante disso o presente estudo teve como objetivo geral avaliar os efeitos biológicos e histológicos da toxicidade desses defensivos agrícolas no desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera* africanizada. Para isso, larvas de operárias de 1º ínstar foram coletadas de colônias saudáveis do apiário localizado na zona rural da cidade de Piedade/SP e foram transferidas para cúpulas de poliestireno esterilizadas, as quais continham dieta larval. Após a transferência, as cúpulas foram mantidas à temperatura de $34\pm 2^{\circ}$ C e UR de $85\pm 5^{\circ}$ %, sendo as larvas alimentadas diariamente do 1º ao 5º dia. No 4º dia, prepararam-se três concentrações (20, 5 e 0.5 ng i.a./ μ L) de fipronil e para o dimetoato uma concentração (200 ng i.a./ μ L).. Foi adicionado 1 μ L de cada concentração preparada (isolado) sob o tegumento da larva, chamado tratamento agudo. Os resultados evidenciaram que não houve mortalidade larval (72 horas) significativa entre os grupos ($p>0.20$) expostos com fipronil e o controle, porém na taxa de pupas anômalas ($p<0.03$) e de emergência ($p<0.04$) constatou-se diferença significativa. As anomalias mais comuns foram: pigmentação na parte superior e inferior do corpo, malformação na cabeça e ausência de membros; pupa de olho rosa (Pp) e pupa de olho branco (Pw) com malformação dos membros, tendo formado o olho e ainda com corpo larval. Supõe-se que pelo fipronil ser um composto neurotóxico, ele esteja agindo na regulação e liberação dos hormônios ecdisteróides que estão envolvidos na passagem de larva a adulto (processo metamórfico). Após o bioensaio com o dimetoato, foram coletadas pré-pupas (D9) para as análises morfológicas e histoquímica, tanto para os grupos expostos como para o controle. Pré-pupas foram processadas rotineiramente. As secções histológicas foram coradas com Hematoxilina-Eosina. Para a análise histoquímica utilizou-se as reações de Azul de Bromofenol, Ácido Periódico de Schiff e Feulgen. Através da análise morfológica e histoquímica, foram observadas alterações no tecido muscular, espaçamentos intracelular de trofócitos e enócitos, aumento na quantidade de proteínas e lipídios e ramificação nuclear nos trofócitos. A maioria dessas características descritas é de pupas, porém os indivíduos analisados estavam na fase de pré-pupa, ou seja, é provável que a substância estudada adiante o desenvolvimento das abelhas expostas ao inseticida. O dimetoato poderia ativar o sistema de desintoxicação celular pelas enzimas carboxilesterases e, por essa via, ocasionar a hidrólise do Hormônio Juvenil e, conseqüentemente, a aceleração das fases metamórficas. A alta taxa de anomalias na fase pupal e a diminuição da taxa de emergência em indivíduos expostos ao fipronil aumenta a preocupação com a diminuição da

produtividade nos apiários comerciais localizados nos agro-ecossistemas. Além disso, o adiantamento encontrado no presente trabalho chama atenção para danos na colônia, já que na natureza as fases da metamorfose têm uma determinada duração. Esse possível distúrbio fisiológico poderia causar de forma indireta prejuízos na cadeia da polinização realizada pelas abelhas.

Palavras-chave: abelhas, metamorfose, ecotoxicologia, morfologia, histologia.

ABSTRACT

SILVA, C. A. S. **Analysis of the effects of fipronil and dimethoate in larvae and pupae africanized *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) created under laboratory conditions.** 2014. 76 f. Dissertation (Master in Agriculture and Environment) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2014.

Africanized *Apis mellifera* bees Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae), although not native to Brazil, is very important both for the environment and for the economy. However, with the growth of food production and biofuels, there was an expansion of the areas of monoculture consequently was increased also the use of fertilizers and pesticides. Although some insecticides such a fipronil (used in sugar cane) and dimethoate (standard substance in larval tests standardized by the Organization for Economic Cooperation and Development and used in cotton crops), are toxic to bees. Thus the present study aimed to evaluate the biological and histological effects of toxicity of pesticides in the ontogenetic development of Africanized *A. mellifera*. For this, worker larvae of 1st instar were collected from healthy colonies of the apiary located in the rural town of Piedade/SP and transferred to sterile polystyrene cells, which contained larval diet. After the transfer, the cells were maintained at a temperature of $34\pm 2^\circ$ C and RH $85\pm 5\%$, the larvae fed daily from 1st to 5th day. On day 4, were prepared with three different concentrations (20, 5 and 0.5 ng a.i./ μ L) fipronil and dimethoate a concentration (200 ng a.i./ μ L) was added 1 μ L of each concentration prepared (isolated) under integument of the larva, called acute treatment. The results showed that there was no larval mortality (72 hours) significantly between groups ($p>0.20$), exposed to fipronil and control, but the pupae rate anomalous ($p<0.03$) and emergency ($p<0.04$) was found significant difference. The most common abnormalities were pigmentation on the upper and lower body, head and malformation in the absence of members; pink eye pupa (Pp) and white eyed pupae (Pw) with malformation of the limbs, having formed the eye and with larval body. It is assumed that the fipronil be a neurotoxic compound, he is acting in the regulation and release of Ecdysteroid hormones that are involved in the passage from larva to adult (metamorphic process). After the bioassay dimethoate, pre-pupae were collected (D9) for morphological and histochemical analysis for both treatment groups and for the control. Pre-pupae were processed routinely. Histological sections were stained with Hematoxylin-Eosin. For immunohistochemical analysis, we used the Bromophenol Blue reactions, Periodic Acid-Schiff and Feulgen. By morphological and histochemical analysis, changes were observed in muscle tissue, intracellular spacing of trophocytes and oenocytes, increase in the amount of proteins and lipids and nuclear branch in trophocytes. Most of these characteristics are described pupae, however individuals were analyzed in the pre-pupae stage, namely, and it is likely that the substance studied on the development of bees exposed to the insecticide. Dimethoate could activate the cellular detoxification system by carboxylesterases enzymes and, in this way, cause the hydrolysis of the Juvenile

Hormone and hence the acceleration of the metamorphic layers. The high rate of abnormalities in the pupal stage and decreased emergency rate in individuals exposed to fipronil raises concerns with decreasing productivity in commercial apiaries located in agro-ecosystems. In addition, the advance from the present study calls attention to damage in the colony, as in nature the metamorphosis of the phases have certain duration. This can cause physiological disorder could indirectly damage the chain pollination by bees.

Keywords: bees, metamorphosis, ecotoxicology, morphology, histology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Contextualização do problema	3
1.2. Características e aplicação dos defensivos agrícolas	4
1.2.1. Fipronil.....	4
1.2.2. Dimetoato	6
1.3. Fases e controle hormonal do desenvolvimento ontogenético de <i>Apis mellifera</i> africanizadas	7
1.4. Corpo gorduroso em <i>A. mellifera</i>	12
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivos Específicos	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Obtenção das Larvas	14
3.2. Preparo da dieta larval	14
3.3. Bioensaios toxicológicos	16
3.4. Análise do desenvolvimento pós-embrionário e morfologia externa dos indivíduos expostos ao fipronil	19
3.5. Análises estatísticas da taxa de mortalidade, incidência de anomalias e taxa de emergência	20
3.6. Coleta das pré-pupas (PP)	20
3.7. Análise Morfológica	20
3.7.1. Inclusão em historesina	20
3.7.2. Técnica Hematoxilina e Eosina (HE)	21
3.8. Análise histoquímica	21

3.8.1 Azul de Bromofenol.....	21
3.8.2. Ácido Periódico de Schiff (PAS)	21
3.8.3. Reação de Feulgen.....	22
4. RESULTADOS	22
4.1. Frequência de mortalidade e anomalias a exposição do fipronil	22
4.2. Análise do desenvolvimento ontogenético e morfologia externa dos indivíduos expostos ao fipronil	24
4.3. Morfologia interna das pupas anômalas.....	27
4.4. Análise morfológica	29
4.4.1. Análise da concatenação de secções histológicas de pré-pupa (PP) expostas ao dimetoato.....	29
4.4.2. Análise do Corpo Gorduroso de pré-pupa (PP)	30
4.5. Análise histoquímica	33
4.5.1. Azul de Bromofenol.....	33
4.5.2. Ácido Periódico de Schiff (PAS)	34
4.5.3. Reação de Feulgen.....	35
5. DISCUSSÃO	36
5.1. Efeitos do fipronil.....	36
5.2. Efeitos do dimetoato.....	41
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	45

1. INTRODUÇÃO GERAL

A fragmentação da floresta nativa e a expansão da agricultura podem ser alguns dos fatores relacionados à diminuição da população dos polinizadores, tais como as abelhas. Em consequência disso, é observada uma baixa produtividade de frutos e sementes de muitas espécies vegetais em diversas partes do mundo (VAISSIÈRE et al., 2011).

Desde que foi identificada a "crise de polinização", muitos esforços vem sendo realizados para conservar e gerir sustentavelmente os polinizadores. No entanto, é amplamente reconhecida a falta de conhecimento para propor ações efetivas e alcançar práticas de conservação e de gestão. O uso incorreto e intensivo de defensivos agrícolas pulverizados durante a floração em campos de cultivos comerciais contribui para o declínio da atividade de polinizadores nas culturas e ecossistemas em torno das plantações (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2006; UNEP, 2010). Além disso, esses produtos químicos poderiam contribuir para a morte das abelhas, e com o fenômeno conhecido como *Colony Collapse Disorder* (CCD), que é caracterizado por uma síndrome multifatorial que causa a morte maciça dos indivíduos da colônia e, conseqüentemente, a redução da polinização em culturas e paisagens (FRAZIER et al., 2008; ELLIS et al., 2010; NEUMANN, CARRECK, 2010).

Ainda que existam diversos trabalhos que têm por objetivo analisar os efeitos de determinados inseticidas, como fipronil, imidacloprido, tiametoxam e outros em abelhas adultas (YU et al., 1984; SMIRLE; WINSTON, 1988; DECOURTYE et al., 2002; DECOURTYE et al., 2005; JOHNSON et al., 2006; DECOURTYE et al., 2008; ALIOUANE et al., 2009; BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012; HENRY et al., 2012; CARVALHO et al., 2012; ROAT et al., 2013; DI PRISCO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; ROSSI et al., 2013; CATAE et al., 2014) ainda são poucas as pesquisas científicas em relação às larvas e pupas, que podem ser indiretamente contaminadas via contato com as operárias durante a alimentação larval.

Pesquisas atuais realizadas na Europa (HARDSTON e SCOTTS, 2010; VIDAU et al., 2011) revelaram uma alta mortalidade de abelhas quando realizada a sua aplicação de fipronil em culturas (COLIN, 2004). O fipronil é um defensivo agrícola aplicado no Brasil em diversas monoculturas para o controle de pragas,

como cupins e formigas. Porém, mesmo não sendo alvo destes defensivos agrícolas, as abelhas se contaminam durante o forrageamento. Devido ao efeito maléfico desse inseticida em importantes insetos polinizadores (GODOY, 2013) seu uso vem sendo avaliado e monitorado em diversos países europeus (Alemanha, Itália e Eslovênia) (AMARO e GODINHO, 2012). Entretanto, no Brasil sua aplicação é realizada em larga escala nas culturas de algodão, batata, milho, soja e cana-de-açúcar (AGROFIT, 2014).

Outro defensivo agrícola muito utilizado no Brasil em culturas de trigo, algodão, maçã, tomate (LIECHOSCKI, 2004) e citros é o dimetoato (NORTOX, 2014). Tal inseticida é da classe dos organofosforados de ação sistêmica (AGROFIT, 2014), e tem como alvo insetos-praga e ácaros. Além disso, o dimetoato é o inseticida padrão para uso em testes toxicológicos com larvas de abelhas, uma vez que a sua ação na taxa de mortalidade larval está bem definida (AUPINEL et al., 2007a; 2007b). O seu uso nos bioensaios *in vitro* é importante como parâmetro de comparação com os demais inseticidas cuja ação nas larvas é pouco conhecida.

Trabalhos recentes têm mostrado que as abelhas expostas a baixas quantidades de defensivos agrícolas não apresentam alta taxa de mortalidade e as modificações comportamentais são limitadas, o que dificulta o diagnóstico (PHAM-DELÈGUE et al., 2002; THOMPSON, 2003).

Segundo Malaspina e Silva-Zacarin (2006) a análise morfológica dos órgãos é uma das ferramentas que se enquadram na realização desses testes. Por esses motivos, estudos que analisam a morfologia de órgãos de larvas e pupas de abelhas expostas a inseticidas, tal como o corpo gorduroso são indispensáveis para investigar a ação dos xenobióticos durante a fase pós-embrionária de *A. mellifera*, pois esses compostos tóxicos podem atuar nas funções do órgão e suas vias de atuação (ISAC et al., 1982; HONDA et al., 2006; LYCETT et al., 2006; YANG, et al., 2001; MONGELLI, 2013).

São utilizados como parâmetros para a análise dessas exposições toxicológicas os biomarcadores, que são definidos como quaisquer respostas biológicas (celular, bioquímica ou tecidual) a um composto químico ambiental, no qual a mensuração ocorre em um determinado organismo ou em seus produtos (fluidos corpóreos), e que mostre um desvio da homeostase em nível fisiológico,

bioquímico, molecular, celular e/ou estrutural (VAN GESTEL e VAN BRUMMELEN, 1996).

Em adição, as análises histopatológicas do corpo gorduroso, que identificam biomarcadores de exposição e/ou citotoxicidade, associadas às análises morfológicas na metamorfose, tais como anomalias nas pupas e taxa de emergência, podem fornecer dados para a compreensão sobre a eventual queda de produtividade nas colônias localizadas no entorno de áreas agrícolas, visando melhorar o manejo dessas áreas de forma a atender tanto à necessidade dos apicultores quanto melhorar a produção agrícola potencializada pela polinização apícola.

1.1. Contextualização do problema

Com o aumento da produção de alimentos, houve uma expansão das áreas de monocultivo, e conseqüentemente do uso de fertilizantes e de defensivos agrícolas. Atualmente, o Brasil é o maior consumidor de pesticidas no mundo, sendo os inseticidas representantes de 34,7% das receitas totais (US \$ 2,94 bilhões) de vendas em 2011 (AUFAUVRE et al., 2012; NICODEMO et al., 2014).

Em meados de 2006, detectou-se nos Estados Unidos um fenômeno conhecido hoje por CCD, no qual os apicultores perderam de 50 a 90% do número de colônias de *A. mellifera* (COX-FOSTER et al., 2007; VanENGELSDORP et al., 2009). Porém, muitos pesquisadores ainda tentam buscar respostas para esse problema, mas acredita-se que o uso indiscriminado dos defensivos químicos para combater insetos-praga em áreas na produção agrícola, assim como aparecimento de patógenos (ácaros, fungos, bactérias e vírus) nas colônias poderia estar entre as principais causas (WESTIN, 2007).

A partir da constatação dos efeitos deletérios dos defensivos agrícolas tiametoxam, clotianidina, imidacloprido e fipronil sobre as abelhas, algumas ações tem procurado diminuir esse impacto. Em julho de 2012 foi publicado no Diário Oficial da União (DOU) que o IBAMA iniciou formalmente um processo de reavaliação dessas moléculas e sua aplicação de forma aérea. Essa iniciativa seguiu diretrizes de políticas públicas do Ministério do Meio Ambiente (MMA), voltadas à proteção de polinizadores. A decisão baseou-se em pesquisas científicas e em ações adotadas por outros países, que indicam que o uso excessivo de defensivos

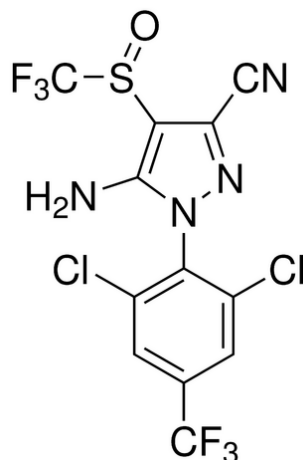
agrícolas é prejudicial para insetos polinizadores, em especial para as abelhas, podendo causar a morte ou alterações no comportamento (IBAMA, 2012).

1.2. Características e aplicação dos defensivos agrícolas

Os inseticidas podem afetar as abelhas por 3 meios de contaminação: I) contato (durante o forrageamento, com partículas de inseticidas que ficaram depositadas nas flores), II) ingestão (através do pólen e néctar contaminados por meio do uso de inseticidas sistêmicos, que é absorvido pelo tecido vegetal) e III) fumigação (partículas suspensas de inseticidas que foram aplicados na área agrícola); os efeitos de toxicidade estão relacionados às concentrações administradas e seu tempo de exposição (MALASPINA, 1979). Esses efeitos tóxicos, dependendo da dose, podem diminuir a longevidade das abelhas, causando a morte e alterações fisiológicas (MALASPINA et al., 2008; PINHEIRO; FREITAS, 2010; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012). Segundo Devillers (2002) e Desneux et al. (2007) os efeitos subletais não provocam imediatamente a morte e nem graves indícios de intoxicação, porém comprometem a viabilidade, a sobrevivência e a população da colmeia, sendo assim se tornam efeitos imprevisíveis e de natureza bastante variável, fazendo com que dificulte sua avaliação e diagnose (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012).

1.2.1. Fipronil

O fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil) fenil]-4-[(trifluorometil) sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila) (Figura 1) pertence à classe dos fenilpirazóis de segunda geração, desenvolvido no fim da década de 80 (BOBÉ et al., 1998ab, MANRIQUE, 2009). É comercializado no Brasil com os nomes comerciais Blitz®, Standak®, Regent®, Klap®, podendo ser aplicado em tratamentos de sementes, e tanto por via terrestre quanto aérea. Este produto é empregado para controlar cupins, besouros, lagartas e brocas nas culturas de algodão, batata, milho e soja. No estado de São Paulo mais especificamente em cana-de-açúcar, tendo várias formas de aplicação (AGROFIT, 2014).

Figura 1. Formula estrutural do ingrediente ativo fipronil.

Fonte: Sigma-Aldrich, 2014.

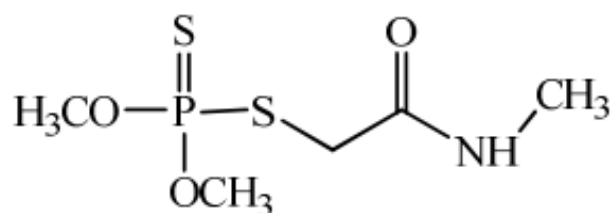
O fipronil tem pouca volatilização no ar, sendo considerado um composto com baixa pressão de vapor. No solo, o valor médio do coeficiente de adsorção do fipronil à matéria orgânica do solo (K_{oc}) é 803, que confere ao composto de baixa a moderada adsorção por área de superfície (MEDE; RHÔNE-POULENC AGRICULTURAL LIMITED, 1997; DPR, 2001; MANRIQUE, 2009). Em exposição à luz solar, a degradação do Fipronil no solo resulta no fotoproduto desulfínil, a oxidação produz sulfona, a hidrólise amida e o processo de redução forma sulfido, que é extremamente estável e mais tóxico que o composto original (FENET et al., 2001; NPTN, 2005; MANRIQUE, 2009).

O fipronil é uma molécula neurotóxica que atua diretamente no sistema nervoso central (SNC) dos insetos, bloqueando os canais de cloro e agindo sobre o receptor do ácido γ -aminobutírico (GABA). Dessa forma, não há inibição normal do impulso nervoso causando hiperexcitação, convulsões e paralisia, levando a morte do inseto (CONNELLY, 2001; TINGLE et al., 2003; NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER, 2009). O fipronil é altamente tóxico para insetos não-alvo, possuindo DL_{50} em adultos de *A. mellifera* africanizada de 1,9 ng i.a./ μ L/abelha (PEREIRA, 2010) e 1,06 ng i.a./ μ L/abelha (ROAT et al., 2013).

1.2.2. Dimetoato

O dimetoato (0,0-dimethyl S-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate) (Figura 2) pertence à família dos organofosforados caracterizado por várias substâncias químicas derivadas do ácido fosfórico, conhecidos como inibidores da acetilcolinesterase, anticolinesterásicos ou colinérgicos de ação indireta (FIKES, 1990; ROCHA e SPINOSA, 1992). Este grupo possui grande variedade de produtos agrícolas e sanitários, desde os extremamente tóxicos até aqueles com baixa toxicidade (CHAVASSE e YAP, 1997). Ele é comercializado no Brasil com os nomes comerciais Agritoato®, Dimexion® e Perfekthion®. O uso deste produto é empregado para controlar moscas domésticas, insetos e ácaros, nas culturas de algodão, citros, maçã, tomate e trigo (AGROFIT, 2014).

Figura 2. Formula estrutural do ingrediente ativo dimetoato.



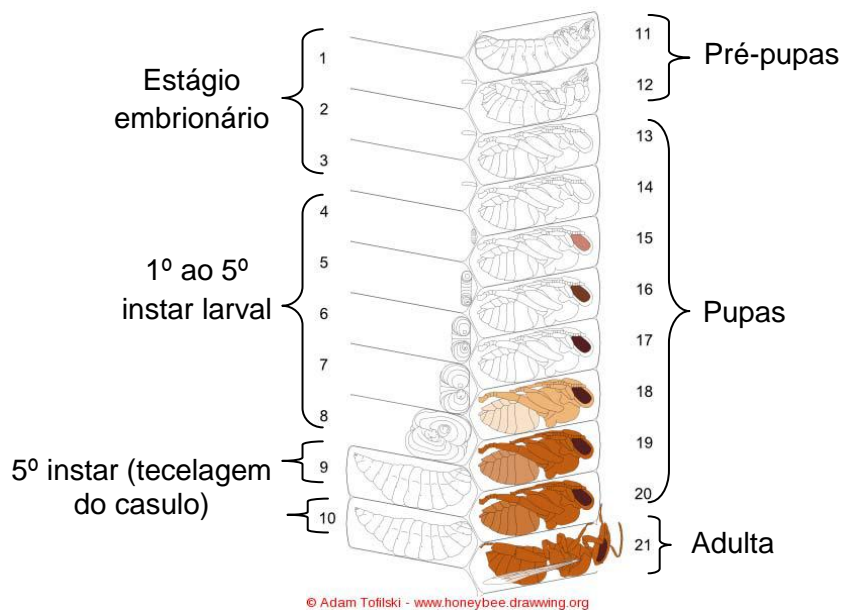
Fonte: SILVA, 2010.

O dimetoato é a substância química utilizada como referência/padrão nos bioensaios toxicológicos com larvas de *A. mellifera* para a avaliação de risco dos defensivos agrícolas nas abelhas pela OECD (2012). Essa escolha da OECD pelo dimetoato ocorreu devido à toxicidade por contato (DL) e oral (CL) aguda para abelhas operárias de *A. mellifera* europeia ter sido determinada entre maio e outubro por 12 anos consecutivos, 1981-1992 (63 testes de contato e 62 orais) usando métodos laboratoriais padronizados na Inglaterra e Alemanha (GOUGH et al., 1994). Além disso, as variações das CLs e DLs foram muito tênues (GOUGH et al., 1994).

1.3. Fases e controle hormonal do desenvolvimento ontogenético de *Apis mellifera* africanizadas

As abelhas assim como outros organismos da classe Insecta são holometábolos e, sendo assim, passam por um processo denominado metamorfose completa com quatro estágios distintos durante o desenvolvimento: embrionário, larval, pupal e adulto (Figura 3); sendo as três últimas separadas por mudas metamórficas (MICHELETTE et al., 1993).

Figura 3. Ciclo de vida das abelhas operárias *A. mellifera*. 1-3: estágio embrionário. 4-8: do 1º ao 5º instar larval, fase de alimentação. 9: 5º instar larval, fase de tecelagem do casulo. 10-12: pré-pupas. 13 e 20: pupas. 21: adulta recém-emergida (ecdise).



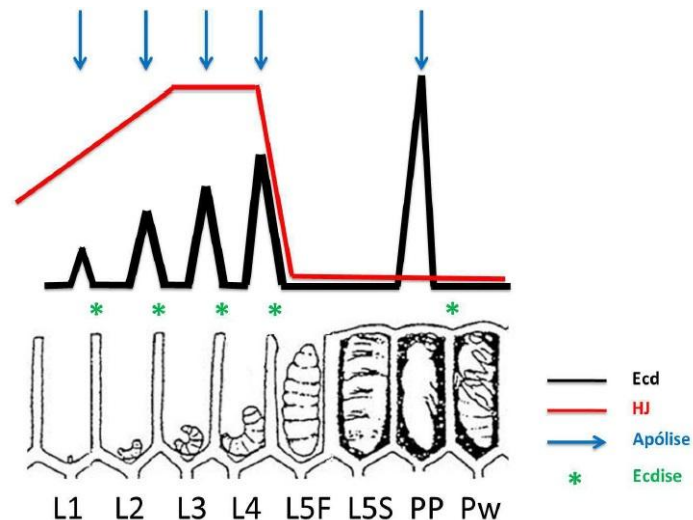
Fonte: Modificado de Winston (1991).

Segundo Nijhout e Wheeler (1982), os conjuntos de genes larvais, pupais e adultos seriam diferentemente sensíveis ao hormônio juvenil (HJ). Os genes larvais estariam ativos somente na presença de altos níveis de HJ. Com a diminuição do nível hormonal, no final da vida larval, os genes pupais seriam ativados pela ecdisona e, posteriormente, quando o hormônio juvenil praticamente desaparece, os genes do adulto passariam a se expressar.

A figura 4 apresenta o balanço entre os dois hormônios que definem cada etapa do desenvolvimento (DUBROVSKY, 2005). A presença do HJ direciona a

ação de ecdisteroides (Ecd) durante o desenvolvimento larval, promove o crescimento, mas mantém o organismo na forma de larva e, assim, impede que a muda metamórfica ocorra (NIJHOUT, 1994). Os ciclos de muda são, portanto, eventos que seguem um padrão cíclico, nos quais a nova cutícula é sintetizada sob a antiga, a qual é subseqüentemente eliminada. Essa etapa que marca o início da muda e que se caracteriza pelo desprendimento entre a epiderme (PRYOR, 1940; FRAENKEL e RUDALL, 1940; THOMPSON, 1978; HOPKINS e KRAMER, 1992; SUGUMARAN, 1998) e a cutícula velha é conhecida como apólise (NIJHOUT, 1994; ELIAS-NETO et al. 2009; HERNANDES, 2013).

Figura 4. Desenvolvimento pós-embriônico em abelhas *Apis mellifera*. O esquema ilustra a ocorrência de 4 mudas larvais (L1-L2, L2-L3, L3-L4, L4-L5F) e uma muda metamórfica (L5S-PP-Pw), moduladas pelo balanço entre ecdisteroides (Ecd) e hormônio juvenil (HJ). A amplitude dos picos hormonais não está em escala, ou seja, não correspondem necessariamente aos seus títulos *in vivo*. L1 a L5 correspondem aos cinco estágios larvais; L5F – larva de 5º estágio em fase de alimentação; L5S – larva de 5º estágio em fase de tecelagem de casulo; PP – Pré-pupa; Pw – pupa de olho branco.



Fonte: <http://www.aginclassroom.org/html/Newsletter/fall2007.html>; HERNANDES, 2013.

As abelhas possuem quatro diferentes fases (embrionária, larval, pupal e adulto), separadas por mudas metamórficas (REMBOLD et al., 1980). Os embriões se desenvolvem de ovos depositados nos alvéolos de cera dos favos, ou células de cria, construídos pelas abelhas operárias. Após três dias, as larvas eclodem dos ovos e iniciam a fase larval que é principalmente um período de alimentação e crescimento, e constituída por cinco instares larvais (L1, L2, L3, L4 e L5) que foram

determinados pelo estudo de Michelette e Soares (1993) (Figura 5), sendo que o 5º e último instar é subdividido em fases de acordo com as mudanças que ocorrem. Há três subfases neste último instar: I- *Feeding phase* ou Fase de alimentação, quando a larva está sendo alimentada, logo a célula do favo de cria ainda não foi operculada; II- *Spinning phase* ou fase de Tessitura, quando a célula do favo de cria foi operculada pelas operárias e a larva, em seu interior sintetiza e secreta a seda do seu casulo; III- *Prepupa phase* ou fase de pré-pupa, marcada pelo término da defecação. Na defecação ocorre à abertura da passagem do intestino médio (ventrículo) para o intestino posterior e a larva esvazia o mesmo (CRUZ-LANDIM, 2009). Adicionalmente, as posições e movimentos da larva dentro da cúpula, peso e diâmetro da cabeça são utilizados como parâmetros para a caracterização das subfases desse último instar (MICHELETTE e SOARES, 1993).

A fase pupal é caracterizada pela ecdise e a síntese da cutícula definitiva que caracterizam a sexta e última muda, imaginal, e finalmente a emergência da abelha adulta. Nesta fase de metamorfose, acontece a degeneração de alguns órgãos por meio de morte celular programada, e a reconstrução da musculatura e do canal alimentar, além do desenvolvimento dos órgãos reprodutivos (SNODGRASS, 1956; WINSTON, 2003; LOTERIO, 2011). As sucessivas fases de pupa (Tabela I) (Pupa de olho branco (Pw), Pupa de olho rosa (Pp), Pupa de olho rosa escuro (Pdp), Pupa de olho marrom sem pigmentação (Pb), Pupa de olho marrom com início da pigmentação da cutícula (Pbi) Pupa de olho marrom com pigmentação intermediária da cutícula (Pbm) e Pupa de olho marrom (Pbd) com pigmentação total da cutícula (Pbd)) foram classificados usando como parâmetros a cor do olho e a pigmentação da cutícula torácica (MICHELETTE e SOARES, 1993). Segundo Gallo et al. (2002) nesta fase é possível distinguir a cabeça, o tórax e o abdome, visualizando-se olhos, pernas, asas, antenas e partes bucais. Os olhos e o corpo passam por mudanças de coloração até a emergência da abelha adulta. A duração de cada uma das fases é diferenciada para cada casta.

Na classe Insecta os processos de mudas larvais, metamórfica e imaginal são regulados por ação de hormônios do sistema nervoso central e de glândulas prototorácicas (GILBERT, 2006; DAVIS et al., 2007; ZITNAN et al., 2007; ZITNAN e ADAMS, 2005; LOTERIO, 2011). Uma vez que as pupas não se alimentam, todo o alimento ingerido pelos insetos durante a fase larval serve como reserva de

nutrientes para a metamorfose, quando então o inseto permanece sem se alimentar (CONTE, 1994; CRUZ-LANDIM, 2004; FERREIRA, 2010). Proteínas produzidas durante o estágio larval e armazenadas na hemolinfa recebem a denominação geral de “proteínas de estocagem” (BURMESTER e SCHELLER, 1999). Algumas destas pertencem à classe das hexamerinas (TELFER e KUNKEL, 1991) e são sintetizadas em grandes quantidades pelo corpo gorduroso larval em resposta à intensa ingestão de alimento, e são secretadas na hemolinfa onde se acumulam (SCHELLER et al., 1990; HAUNERLAND, 1996). Essas proteínas serão utilizadas em processos do metabolismo intermediário no desenvolvimento pós-larval (LOCKE e COLLINS 1965, 1966, 1967, 1968; LEVENBOOK e BAUER, 1984; LOTERIO, 2011).

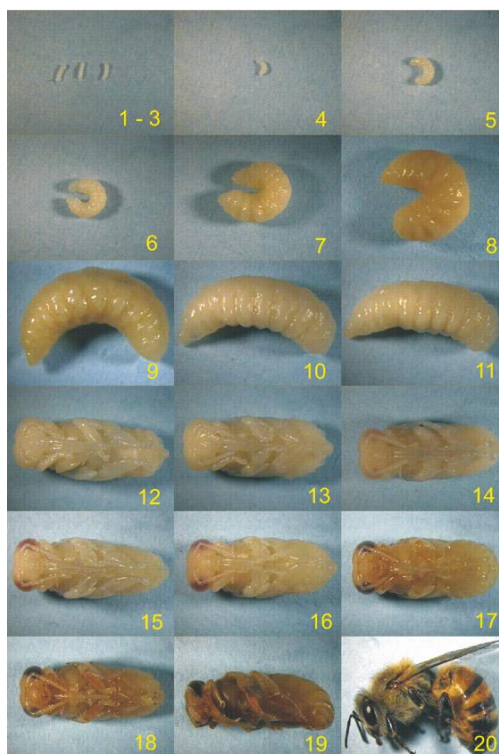
Tabela 1. Média dos pesos, mínimo (Min) e máximo (Max) em mg nos estágios do desenvolvimento ontogenético de operárias de *A. mellifera* africanizada.

Dias do desenvolvimento	Dias após eclosão do ovo	Min-Max (mg)	Estágios do desenvolvimento
1,2 e 3	-----	-----	Ovo
4	1	0.1-0.3	Larva (forma de C)
5	2	0.4-1.3	Larva (forma de C)
6	3	1.9-6.7	Larva (forma de C)
7	4	9.1-34.2	Larva (forma de C)
8	5	34.8-111.0	Larva (fase de alimentação)
9	6	81.5-130.1	Larva ficando em pé (fase de tessitura do casulo)
10	7	100.7-127.5	Pré-pupa (final da defecação)
11	8	93.7-129.2	Pré-pupa (PP)
12	9	93.0-121.0	Pupa de olho branco (Pw)
13	10	94.1-121.4	Pupa de olho branco (Pw)
14	11	92.1-122.3	Pupa de olho rosa (Pp)
15	12	92.7-116.9	Pupa de olho rosa escuro (Pdp)

Dias do desenvolvimento	Dias após eclosão do ovo	Min-Max (mg)	Estágios do desenvolvimento
16	13	85.8-121.5	Pupa de olho marrom sem pigmentação (Pb)
17	14	89.5-114.3	Pupa de olho marrom com início da pigmentação da cutícula (Pbl)
18	15	91.4-113.6	Pupa de olho marrom com pigmentação intermediária da cutícula (Pbm)
19	16	81.4-106.4	Pupa de olho marrom com pigmentação total da cutícula (Pbd)
20/21	17/18	54.7-102.6	Emergência

Fonte: Modificado de Michelette e Soares, 1993 e Nunes-Silva et al., 2006.

Figura 5. Desenvolvimento ontogenético das operárias de *A. mellifera* africanizada. Os números indicam dias após a postura dos ovos: Ovo (dias 1 a 3); larva (dias 4-9); pré-pupa (dia 10 e 11); pupa (dias 12 e 19); adulto (dia 20).



Fonte: NUNES-SILVA et al., 2006.

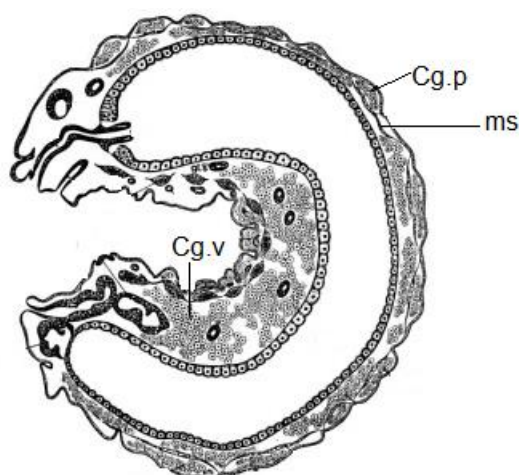
1.4. Corpo gorduroso em *A. mellifera*

O corpo gorduroso larval e pupal têm sido muito estudados nos diversos grupos de insetos, tanto em seus aspectos morfológicos e fisiológicos quanto bioquímicos (OLIVEIRA, 2005), sendo constituído de células com ampla funcionalidade, o que se deve à sua interface única com a hemolinfa, meio onde metabolizam, aumentam de volume e secretam. Sua estrutura principal é similar em muitos insetos (LOCKE; 1998), possuindo origem embrionária de uma parte do mesoderma somático, e estendendo-se por todo o comprimento do inseto, estando presente durante todo o período de vida (FERREIRA, 2010).

Ruvolo e Cruz-Landim (1995) descreveram o corpo gorduroso com destaque dentre os órgãos da larva que possui uma maior resposta à ação dos inseticidas análogos ao HJ, uma vez que o mesmo responde ao HJ endógeno (DANTAS, 2009).

Há dois grupos de corpo gorduroso em larvas de abelhas, sendo um denominado de parietal (Cg.p), o que se encontra junto aos músculos intersegmentares (ms), e o visceral (Cg.v), circundando os órgãos internos (Figura 6) (CRUZ-LANDIM, 2009). O corpo gorduroso desempenha diversas funções, como absorção de substâncias da hemolinfa e liberação de alguns compostos por ele produzidos (lipídios, carboidratos e proteínas). Esse órgão é praticamente constituído por dois tipos de células, sendo eles os trofócitos e enócitos (CRUZ-LANDIM, 2009).

Figura 6. Esquema ilustrativo da distribuição corpórea do corpo gorduroso larval. Cg.p: corpo gorduroso parietal; Cg.v: corpo gorduroso visceral; ms: músculo intersegmentar.



Fonte: Adaptado de Cruz-Landim (2009).

Os trofócitos são os maiores responsáveis pela síntese de proteínas da hemolinfa, assim realizam a regulação do meio interno do inseto, de modo que as trocas dos metabólitos sejam imediatas suprindo suas necessidades. Os enócitos são células responsáveis pela síntese lipídica e de hidrocarbonetos (CRUZ-LANDIM, 2009), que são constituintes da epicutícula e participam da produção de cera (NOIROT e QUENNEDEY, 1974; 1991; SANTOS et al., 2004; ABDALLA et al., 2005), sendo encontrado no abdome das operárias (SOARES, et al. 1992).

No final do estágio larval, a cutícula sofre apólise e o inseto permanece imóvel no interior da cutícula, sem se alimentar mais. Este estágio é denominado pré-pupa (PP) e tem duração variável nas diferentes espécies de abelhas (SNODGRSS, 1956; CRUZ-LANDIM, 2009). Durante esta fase do ciclo vital do inseto, que pode ser longa, é possível distinguir, através da cutícula larval apolisada, as mudanças que já ocorreram na forma do corpo da abelha (CRUZ-LANDIM, 2009).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral avaliar os efeitos biológicos e histológicos da toxicidade dos defensivos agrícolas fipronil e dimetoato no desenvolvimento ontogenético de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) africanizadas.

2.1. Objetivos Específicos

- ✓ Fipronil
 - Determinação da taxa de mortalidade larval, de pupas anômalas e de emergência;
 - Avaliação da morfologia externa de larvas e imaturos;
 - Análise da morfologia interna de pupas anômalas.
- ✓ Dimetoato
 - Avaliação da morfologia (histologia) e composição (histoquímica) dos grânulos intracelulares dos trofócitos do corpo gorduroso de pré-pupas (PP).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das Larvas

As larvas foram coletadas no apiário localizado na zona rural da cidade de Piedade, São Paulo, Brasil (23° 42' 41" S e 47° 25' 8" W), próximo ao Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) da UFSCar, Sorocaba/SP, onde foram selecionadas colônias saudáveis e em condições ideais para a coleta. Favos adicionais foram inseridos na colônia selecionada para a postura da rainha de maneira que se obtivesse quantidade suficiente de larvas de 1º instar (L1). As larvas (L1) foram transferidas para cúpulas de poliestireno contendo alimento previamente preparado e foram mantidas em condições controladas de temperatura e umidade (35±1°C e umidade relativa de 90±5 %).

3.2. Preparo da dieta larval

Todos os materiais utilizados nos procedimentos a seguir foram previamente esterilizados em autoclave e secos em estufa. A bancada de trabalho foi esterilizada com solução de álcool 70% antes do início do trabalho para diminuir a ocorrência de contaminação.

A dieta larval foi composta pelos açúcares D-glucose, D-frutose, extrato de levedura e geleia real, sendo a concentração variada conforme exigências do inseto nas diversas fases (AUPINEL et al. 2005, 2007), representada na Tabela 2.

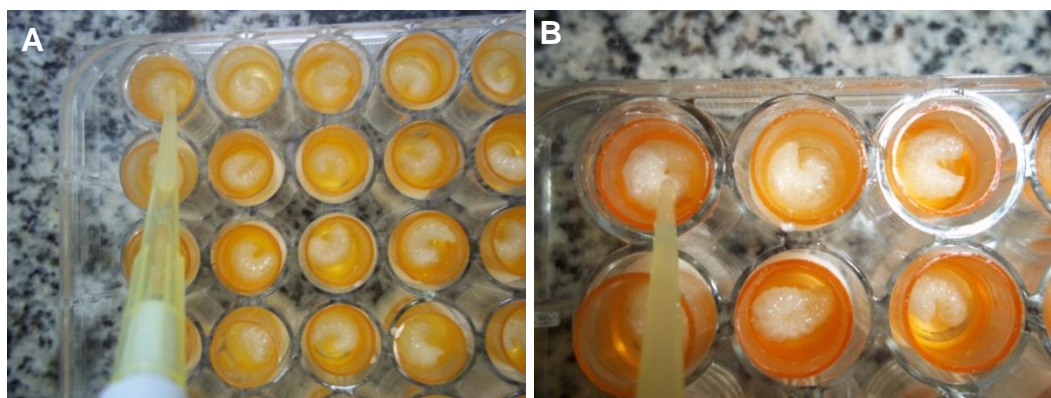
Todos os alimentos foram preparados em solução aquosa, e posteriormente filtrados usando filtro milipore. As larvas foram alimentadas com o auxílio de micropipetas (Figura 7) conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Cronograma de alimentação das larvas mantidas em estufa com temperatura e umidade controladas, segundo a metodologia proposta por Silva-Zacarin et al. (2011). Composição química e concentração dos alimentos empregados na criação *in vitro* de larvas de *A. mellifera*.

DIA	D1	D2	D3	D4	D5
Alimento	A	B	C	C	C
Volume por larva	20 μ L	20 μ L	30 μ L	40 μ L	50 μ L
Dieta artificial					
D-glucose	12 %	15 %	18 %	18 %	18 %
D-frutose	12 %	15 %	18 %	18 %	18 %
Extrato de levedura	2 %	3 %	4 %	4 %	4 %
Geleia real	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %

Composição das dietas: (A) 12% de D-glucose, 12% de D-frutose, 2% de extrato de levedura e 50% de geleia real; (B) 15% de D-glucose, 15% de D-frutose, 3% de extrato de levedura e 50% de geleia real e (C) 18% de D-glucose, 18% de D-frutose, 4% de extrato de levedura e 50% de geleia real. O asterisco (*) indica o dia da contaminação por contato das larvas com os i.a.s fipronil e dimetoato (isolados).

Figura 7. A. placas com as larvas sendo alimentadas segundo a metodologia de Apinel et al. (2005 e 2007) modificada por Silva-Zacarin et al. (2011), com auxílio de micropipetas. **B.** detalhe da larva sendo alimentada com auxílio de micropipeta.



3.3. Bioensaios toxicológicos

3.3.1. Exposição aguda por contato

Os bioensaios toxicológicos foram realizados de acordo com o método de Aupinel et al. (2005 e 2007) modificado por Silva-Zacarin et al. (2011). Para isto, foram utilizadas microplacas de cultivo celular com 48 poços, sendo que em cada um foi colocado um algodão dental esterilizado embebido com uma solução aquosa contendo 15% de glicerol e 0,2% de dicloroisocianurato de sódio.

As cúpulas foram previamente esterilizadas durante 30 minutos com uma solução aquosa de 0,2% dicloroisocianurato de sódio e secas em capela de fluxo laminar. Após secagem, as cúpulas ficaram acondicionadas nas microplacas de cultivo celular e posteriormente foi distribuída à dieta artificial. Para evitar o choque térmico no momento da transferência das larvas, as placas previamente preparadas foram colocadas numa caixa hermética dentro da B.O.D. (Figura 8) à temperatura de $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $90\pm 5\%$ durante 7 dias. Para a manutenção da umidade, uma bandeja contendo uma solução saturada de K_2SO_4 foi acondicionada no fundo da B.O.D. As larvas foram alimentadas do primeiro ao quinto dia.

Figura 8. Interior da estufa B.O.D. Eletrolab, com a caixa hermética no interior da qual são acondicionadas as placas de bioensaios.



3.3.1.1. Definição das doses a serem usadas na exposição aguda pelo Fipronil

Neste trabalho foram utilizadas doses de fipronil baseadas nos valores de DL_{50} encontrados por Tingle et al. (2003) - “4 ng/abelha” e “6,2 ng/abelha” por Decourtye (2002) para esse inseticida em operárias adultas de *A. mellifera* europeia. A partir de uma concentração de 1.000 ng/ μL realizou-se uma cascata de diluição

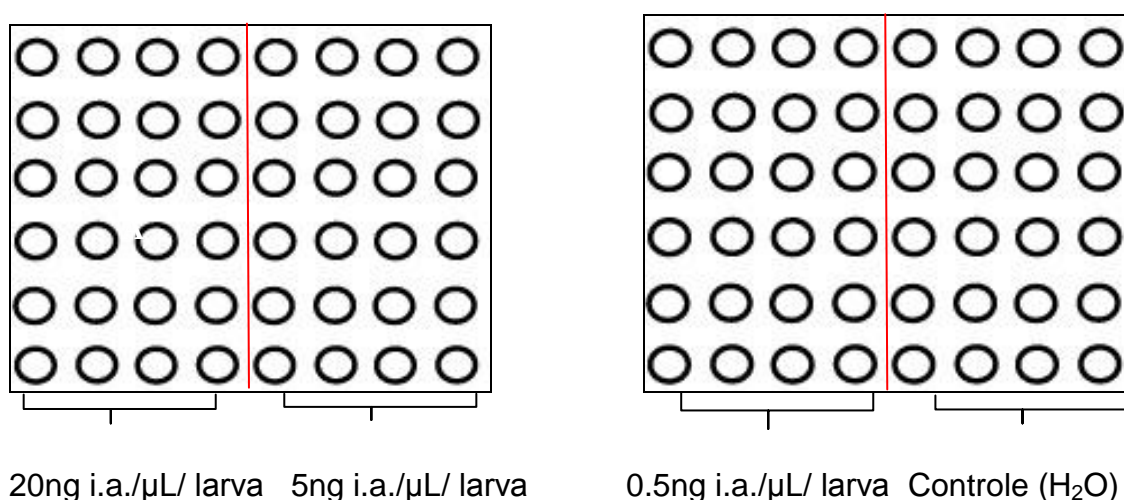
para se obter as seguintes concentrações acima da DL_{50} (20 ng i.a./ μ L/larva), próxima a DL_{50} (5 ng i.a./ μ L/larva) e abaixo da DL_{50} (0.5 ng i.a./ μ L/larva).

O fipronil utilizado foi obtido através da empresa Sigma–Aldrich, com 97% de pureza. A solução estoque foi preparada na concentração de 1.000 ng/ μ L, em solvente composto por água e acetona (1:1 v/v) devido à baixa solubilidade dessa molécula em água. Esta solução foi mantida em frasco totalmente escuro e em freezer comum (-15°C) com intuito de evitar a degradação do composto e a evaporação do solvente antes de realizar as diluições.

No quarto dia, as larvas receberam, com a ajuda de pipeta automática, 1 μ L das doses 20, 5 e 0.5 ng i.a./ μ L/larva (Figura 9) de fipronil via contato (Figura 10A), direto no tegumento. O mesmo procedimento foi realizado para o controle água e água com acetona. Realizaram-se triplicatas e utilizou-se 24 larvas para cada tratamento.

Neste trabalho, escolheu-se utilizar o método via contato, pois segundo Lindauer (1952) e Kaftanoglu et al. (2011) uma larva de operária é alimentada pelas abelhas nutridoras cerca de 143 vezes em toda a fase larval (3^o ao 5^o instar). Sendo assim, durante o processo de alimentação a abelha nutridora entra em contato com a larva e as paredes do alvéolo, podendo contaminá-las. Além disso, o alimento não ingerido fica depositado na célula, em contato com a larva.

Figura 9. Concentrações do fipronil utilizadas para exposição de larvas de *A. mellifera*, juntamente com a identificação das placas dos grupos expostos e controle.



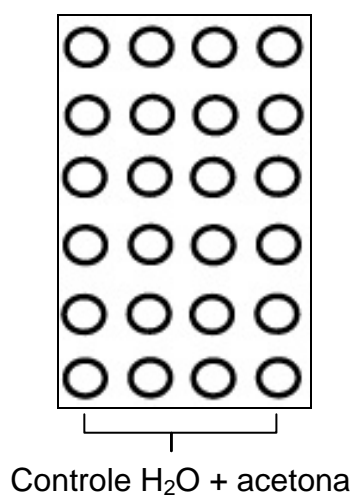
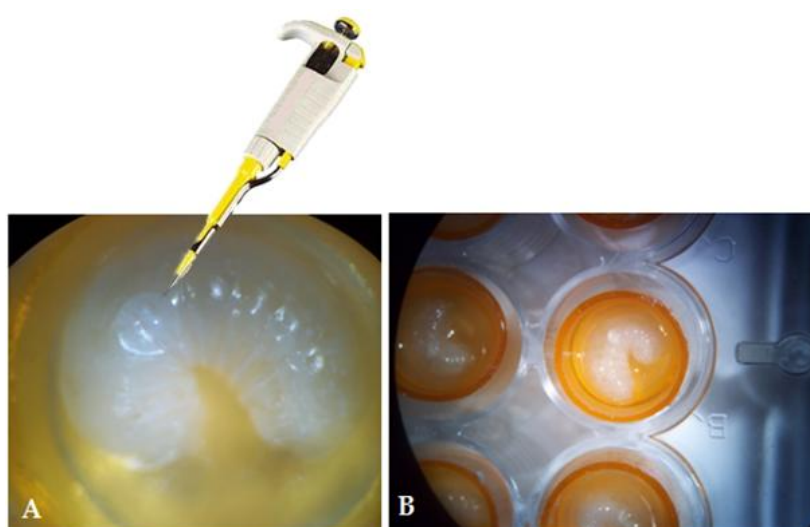


Figura 10. A. Larva de 4^o ínstar com a gota composta pelo inseticida na superfície do tegumento (exposição por contato). **B.** Larvas sendo expostas por contato (via tegumento) utilizada nos experimentos com o ingrediente ativo (fipronil e dimetoato).



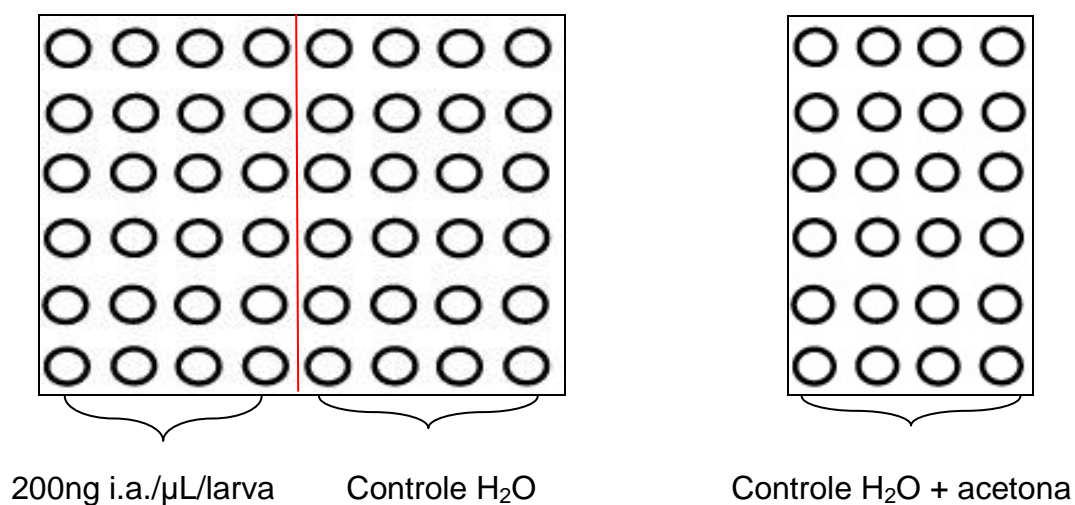
3.3.1.2. Definição da dose a ser usada na exposição aguda pelo dimetoato

Neste trabalho foi utilizada a dose de dimetoato baseada no valor da DL₅₀ encontrada por Aupinel et al. (2007) de 193 µg i.a./larva descrita para larvas *A. mellifera* europeia. Sendo assim, de uma solução com concentração 1.000 ng/µL realizou-se uma cascata de diluição para obter a concentração de 200 ng i.a./µL.

O dimetoato foi obtido da empresa Sigma–Aldrich, com 99,4% de pureza. A solução estoque foi preparada na concentração de 1.000 ng/ μ L, em solvente de água e acetona (1:1) devido à baixa solubilidade dessa molécula em água. Esta solução foi mantida em frasco totalmente escuro e em freezer comum (-15°C) a fim de evitar a degradação do composto e a evaporação do solvente antes de realizar as diluições.

No quarto dia, as larvas foram expostas, com a ajuda de pipeta automática, através de 1 μ L/larva às doses 200 ng i.a./ μ L/larva (Figura 11) de dimetoato via contato (Figura 10A), direto no tegumento a fim de testar a faixa de sensibilidade do princípio ativo. O mesmo procedimento foi realizado para o controle com água e água + acetona, utilizou-se 24 larvas para cada grupo experimental (Figura 11).

Figura 11. Concentração do dimetoato utilizada para exposição de larvas de *A. mellifera*, juntamente com a identificação da placa do grupo exposto e controle.



3.4. Análise do desenvolvimento pós-embrionário e morfologia externa dos indivíduos expostos ao fipronil

Foi observada a mortalidade acumulada após a exposição aguda entre os dias 5 (D5) e 7 (D7) do experimento, totalizando 72 horas; e também a emergência de indivíduos entre os dias 16 (D16) e 18 (D18) após a eclosão do ovo (MICHELETTE e SOARES, 1993; NUNES-SILVA et al., 2006)

Para avaliar as deformações foram realizadas observações nas fases de pré-pupa até a pupa de olho marrom com pigmentação da cutícula (Pbd) (MICHELETTE e SOARES, 1993). Durante as observações os indivíduos anômalos foram fotografados em estereomicroscópio e contabilizou-se a incidência das anomalias nas diferentes fases do desenvolvimento pupal.

3.5. Análises estatísticas da taxa de mortalidade, incidência de anomalias e taxa de emergência

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (20, 5 e 0.5 ng i.a./ μ L) e controle (água e água com acetona); com 3 parcelas (repetições).

Para a análise dos resultados, foi feito o teste de variância (ANOVA; teste F) e posteriormente o teste t de Student ($p < 0,05$), através do programa Assistat versão 7.7 beta (SILVA, 2014).

3.6. Coleta das pré-pupas (PP)

Os indivíduos foram coletados no dia 9 (D9) do experimento. O método escolhido para a coleta de pré-pupas (PP), no controle e no tratamento agudo com dimetoato foi realizado com base na classificação de Michelette e Soares (1993) e Nunes-Silva et al. (2006) para o desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera*.

3.7. Análise Morfológica

3.7.1. Inclusão em historesina

Os indivíduos (pupas anômalas e pré-pupas (PP)) foram anestesiadas por resfriamento a 4°C por alguns minutos e transferidas para uma placa de Petri à temperatura ambiente contendo solução de fixação (paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M – pH 7,4). Em seguida, foi realizado um corte longitudinal ao longo de todo o tegumento dorsal para penetração do fixador. Depois, os indivíduos de cada grupo (n= 2 para cada grupo) foram imersos em paraformaldeído 4% a 4°C por 48h. Posteriormente, o material foi lavado três vezes em tampão cacodilato 0,1M por 30 minutos (Silva-Zacarin et al., 2012) e desidratado em banhos de soluções

alcoólicas de concentrações crescentes de 15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100% por 1 hora cada, sendo a última concentração realizada por duas vezes consecutivas. Após este procedimento, o material foi incluído em historesina Leica, e foram feitas secções com 6,0 µm de espessura em micrótomo da Leica Microsystems® com navalha de tungstênio. As secções histológicas obtidas foram estendidas em lâminas de vidro, e secas à temperatura ambiente.

3.7.2. Técnica Hematoxilina e Eosina (HE)

As lâminas contendo as secções histológicas foram submetidas à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Inicialmente as lâminas contendo as secções histológicas foram hidratadas em água destilada, durante 1 minuto, posteriormente coradas em hematoxilina durante 10 minutos, lavadas em água e, em seguida, coradas em eosina durante 5 minutos. Ao final, as secções histológicas foram lavadas em água para retirar o excesso do corante. Após secas, as lâminas foram montadas, analisadas e fotodocumentadas ao microscópio de luz. Nesta última etapa, utilizou-se o programa Stchiff do microscópio Leica® - DM1000 para realizar a concatenação das fotos do material analisado.

3.8. Análise histoquímica

3.8.1 Azul de Bromofenol

A técnica de Azul de Bromofenol foi utilizada para detecção de proteínas totais (PEARSE, 1985). As lâminas contendo as secções histológicas das pré-pupas (PP) foram inicialmente coradas com solução de Azul de Bromofenol à temperatura ambiente durante 2 horas, sendo em seguida banhadas em solução aquosa de ácido acético 0.5%, durante 5 minutos. Logo após, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Em seguida, foram secas e montadas em Entelan (resina).

3.8.2. Ácido Periódico de Schiff (PAS)

A técnica de coloração por PAS (Ácido Periódico de Schiff) (PEARSE, 1956), permite a detecção de glicoconjugados neutros. As lâminas contendo as secções histológicas das pré-pupas (PP) foram inicialmente colocadas em ácido periódico por

10 minutos, seguido de água corrente durante 5 minutos. Em seguida, foram submersas em reagente de Schiff por 1 hora na ausência de luz. Posteriormente, essas lâminas foram lavadas em água corrente por 30 minutos. Em seguida, foram secas e montadas em Entelan (resina).

3.8.3. Reação de Feulgen

A técnica da reação de Feulgen (FEULGEN e ROSSENBECK, 1924), permite a detecção de DNA, por meio de duas etapas. Inicialmente foi feita a hidrólise ácida, com HCl 4N, para remoção das bases púricas (A e G), e por fim liberação do grupamento aldeído para reagir com o Reativo de Schiff. Após 1:30h na solução de HCl, as lâminas passaram na água corrente e o excesso de água foi removido, em seguida as secções histológicas permaneceram em reagente de Schiff por duas horas. Os radicais aldeídos ligam-se ao reativo de Schiff restaurando o grupamento cromóforo da molécula, produzindo um composto corado (magenta). Em seguida, foram secas e montadas em Entelan (resina).

4. RESULTADOS

4.1. Frequência de mortalidade e anomalias a exposição do fipronil

Ao comparar os quatro grupos (controle, 20, 5 e 0.5 ng i.a./ μ L/larva) quanto às médias da mortalidade larval (Tabela 3), constatou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,2045$) (Tabela 3) segundo o ANOVA (teste F; 1,9226) e o teste t de Student a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Análise de variância (teste F) e valores médios da mortalidade larval indivíduos expostos com fipronil.

Médias de tratamento		F	P
Controle	3.66667 a	1,9226 ns	0.2045
20 [#]	7.33333 a		
5 [#]	4.00000 a		
0,5 [#]	6.00000 a		

[#]ng i.a./ μ L/larva.

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de T ao nível de 5% de probabilidade.

ANOVA (Teste F) \rightarrow ns= não significativo ($p \geq 0,05$).

No entanto, para a variável das anomalias pupais, houve diferença significativa (teste t de Student; $p < 0,0349$ e teste F; 4.7347) (Tabela 4) entre o grupo controle e os tratamentos com 20 e 5 ng i.a./ μL /larva (Tabela 4), que diferiram também do tratamento com 0.5 ng i.a./ μL /larva (Tabela 4). Este resultado confirma o efeito negativo no desenvolvimento das abelhas a exposição de larvas ao fipronil.

Tabela 4. Análise de variância (teste F) e valores médios das anomalias na fase pupal em larvas tratadas com fipronil.

Médias de tratamento		F	P
Controle	0.33333 c	4.7347 *	0.0349
20 [#]	5.33333 a		
5 [#]	4.33333 ab		
0.5 [#]	0.66667 bc		

[#]ng i.a./ μL /larva.

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de T ao nível de 5% de probabilidade.

ANOVA (Teste F) → * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0.05$).

Na fase de pupa, a presença de indivíduos com pigmentação na parte superior e inferior do corpo, malformação na cabeça e sem membros (Figura 13L) foi à anomalia mais comum, que ocorreu frequentemente na dose de 20 ng i.a./ μL /larva. Em todas as concentrações (20, 5, 0.5 e 0 ng i.a./ μL /larva) ocorreram anormalidades como: pupa de olho rosa (Pp) e pupa de olho branco (Pw) com malformação dos membros (Figura 13D, 13F e 13J), tendo formado os olho e continuado com corpo larval (Figura 13H), porém as frequências variaram de acordo com a dose aplicada (Tabela 4).

Na tabela 5 é possível observar que houve diferença significativa na taxa de emergência (teste t de Student; $p < 0.0413$ e teste F; 4.4162), entre o grupo controle e os tratamentos com 20 e 5 ng i.a./ μL /larva (Tabela 5), diferindo também do tratamento com 0.5 ng i.a./ μL /larva (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância (Teste F) e valores médios da taxa de emergência em indivíduos expostos com fipronil.

Médias de tratamento		F	P
Controle	14.66667 a	4.4162 *	0.0413
20 [#]	0.00000 b		
5 [#]	3.00000 b		
0.5 [#]	9.00000 ab		

[#]ng i.a./μL/larva.

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de T ao nível de 5% de probabilidade.

ANOVA (Teste F) →* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0.05$).

4.2. Análise do desenvolvimento ontogenético e morfologia externa dos indivíduos expostos ao fipronil

Nesta análise observaram-se diversas anomalias e graus de frequência, durante a metamorfose em *A. mellifera*. Atentou-se para a posição dos indivíduos anômalos dentro das cúpulas; elas ficavam deitadas no fundo do recipiente, enquanto que as normais ficavam em pé (Figura 13A, 13C, 13E, 13G, 13I), como em condições naturais (Figura 15). As anomalias mais frequentes durante o desenvolvimento pupal foram: pupa de olho branco (Pw) anômala com malformação na cabeça e sem formação de membros (Fig. 13D); pupa de olho rosa (Pp) anômala sem formação dos membros (Fig. 13F); pupa de olho rosa (Pp) anômala sem formação de membros, com olho e corpo de larva (Figura 13H; 14A e 14B); pupa de olho rosa escuro (Pdp) anômala sem formação de membros (Fig. 13J); pupas anômalas com pigmentação na parte superior e inferior do corpo, malformação na cabeça e ausência membros (Figura 13K).

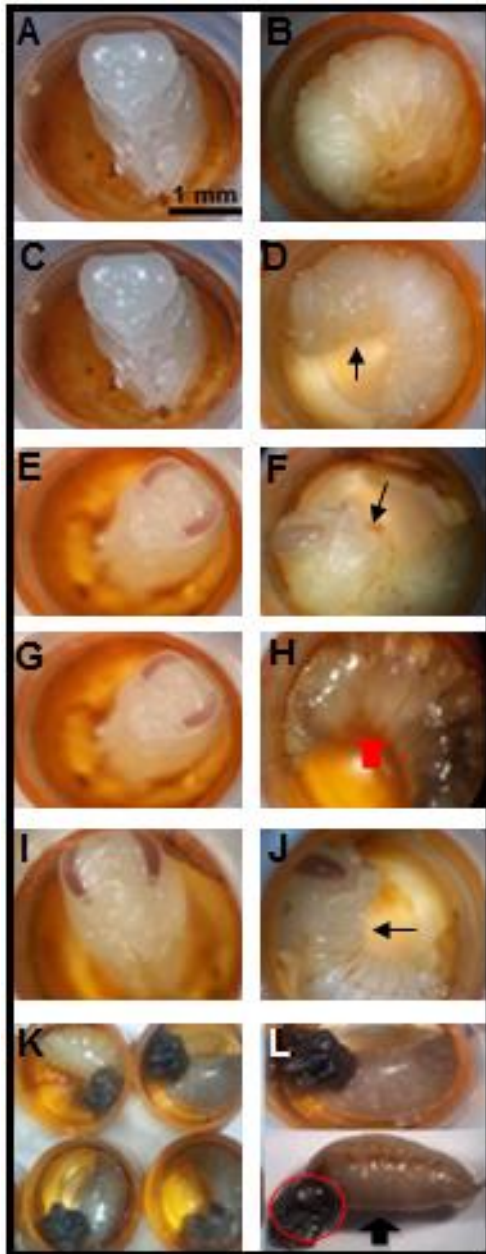


Figura 13. **A e C.** Pupa de olho branco (Pw) normal (controle); **B.** Pupa de olho branco (Pw) deitada no fundo da cúpula; **D.** Pupa de olho branco (Pw) anômala com má formação na cabeça e sem formação de membros (seta); **E e G.** Pupa de olho rosa (Pp) normal; **F.** Pupa de olho rosa (Pp) anômala sem formação dos membros (seta); **H.** Pupa de olho rosa (Pp) anômala sem formação de membros, com olho e corpo de larva (seta vermelha); **I.** Pupa de olho rosa escuro (Pdp) normal; **J.** Pupa de olho rosa escuro (Pdp) anômala sem formação de membros; **K.** Pupas anômalas com pigmentação na parte superior e inferior do corpo, má formação na cabeça e sem membros; **L.** Detalhes de pupas anômalas evidenciando a cabeça (circulo vermelho) e o abdome deformado (seta larga preta). Barra: 1 mm.

Figura 14. **A.** Pupa de olho rosa com corpo de larva; **B.** Aumento do corpo da pupa com anomalias morfológicas, evidenciando o olho e abdômen.

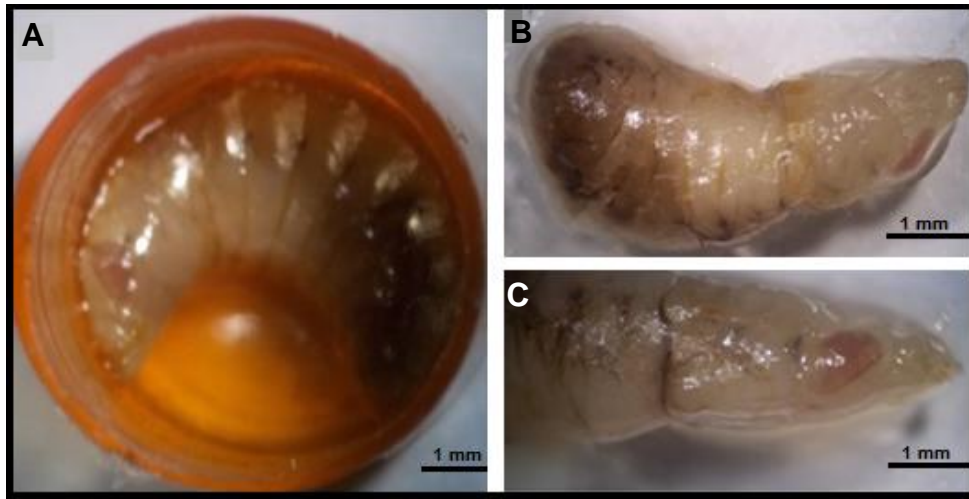
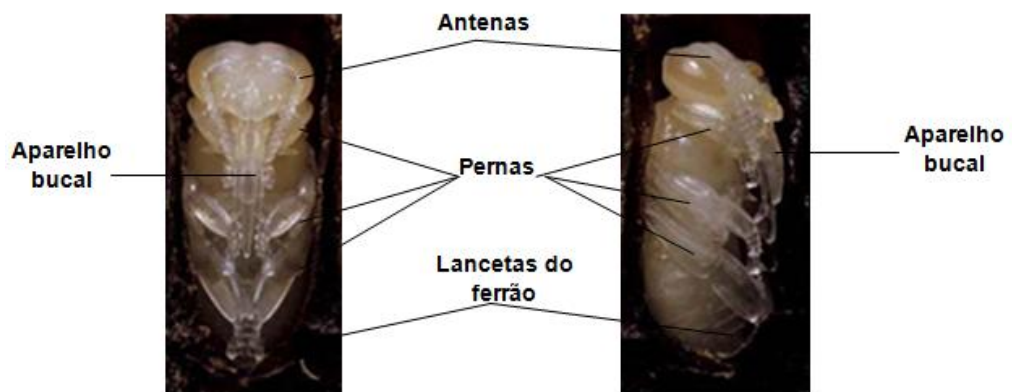


Figura 15. Morfologia externa de pupas de olho rosa (Pp) de *A. mellifera* criadas em condições naturais. Em detalhe, seus apêndices.



Fonte: Modificado de STAROSTA, 2007; RAMOS e CARVALHO, 2007.

4.3. Morfologia interna das pupas anômalas

Nas figuras 16 e 17 foi realizada a concatenação das secções histológicas de pupas anômalas contaminadas com fipronil. A figura 16 evidencia uma anomalia recorrente em pupa de olho rosa (Pp): cabeça e tórax de pupa e abdome de larva: esses indivíduos possuem cutícula larval pouco espessa recobrimdo a cutícula pupal, presença de apêndices não evertidos, o ventrículo e os túbulos de Malpighi estão em início do processo de degeneração metamórfica, porém fezes podem ser observadas no lúmen ventricular. Pode-se observar também enócitos periviscerais larvais presentes e trofócitos esparsos (típicos da fase pupal), desenvolvimento do tecido muscular de adulto. As anomalias em pupas de *A. mellifera* afetam a passagem de um instar para outro, como estágio larval para o pupal, uma vez que essa fase é marcada pela desobstrução intestinal e consequente defecação, o que não foi observado nos presentes resultados.

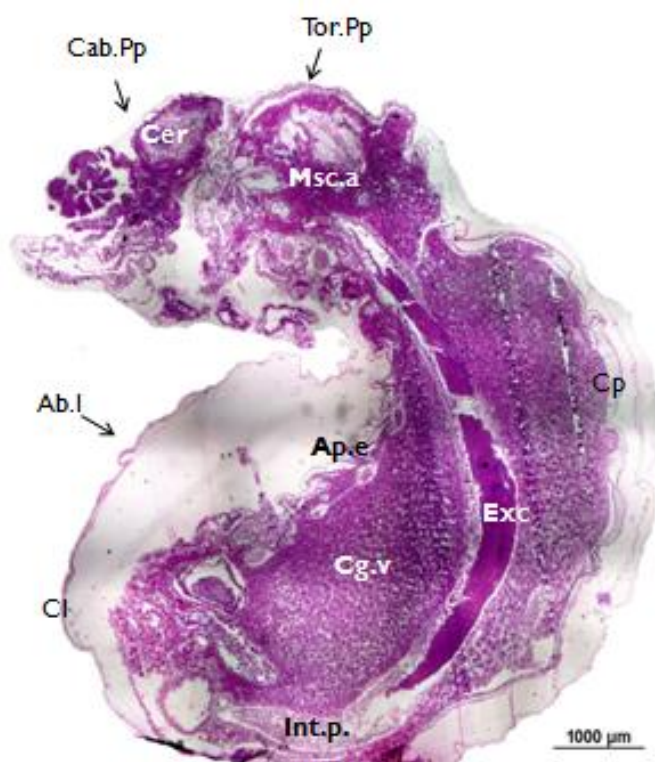


Figura 16. Concatenação de Pupa de olho rosa (**Pp**) anômala. **Cab.Pp.** cabeça de pupa de olho rosa; **Tor.Pp.** tórax de pupa de olho rosa; **Ab.l.** abdômen de larva; **Cl.** cutícula larval; **Cp.** cutícula pupal; **Ap.e.** apêndices pouco evertidos; **Int.p.** Intestino posterior; **Exc.** fezes; **Cg.v.** enócitos e trofócitos do corpo gorduroso visceral larval; **Msc.a.** desenvolvimento do tecido muscular de adulto; **Cer.** cérebro



A figura 17 evidência uma anomalia em que o indivíduo possuía corpo de larva com olho rosa: olho em desenvolvimento e pigmentado, possui a região da cabeça e dos apêndices com cutícula larval e cutícula da pupa, enquanto que a região abdominal possui somente a cutícula larval; o ventrículo e os túbulos de Malpighi estão em início do processo de degeneração metamórfica, porém há fezes no lúmen ventricular.

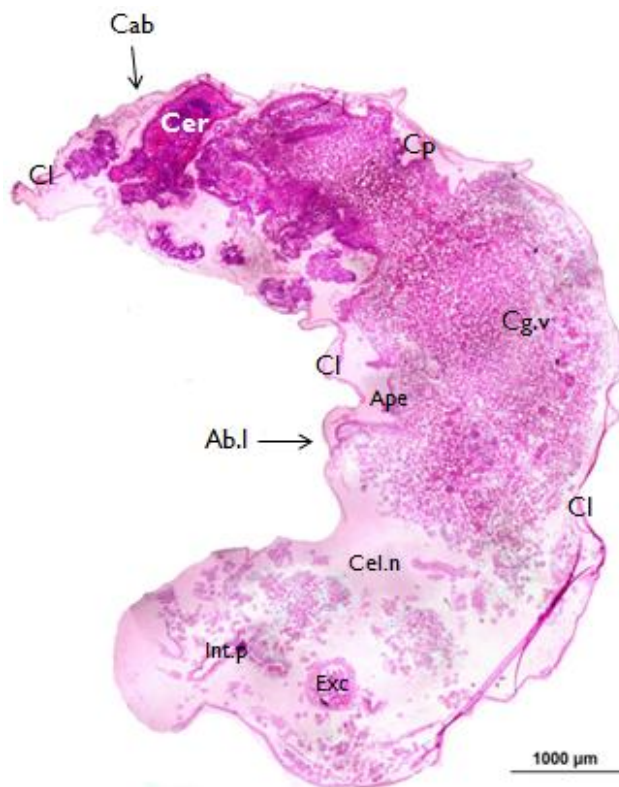
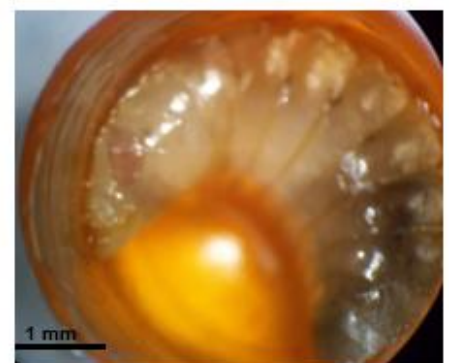


Figura 17. Concatenação Pupa de olho rosa (**Pp**) anômala. **Cab.** cabeça de larva; **Ape.** Apêndices; **Cl.** cutícula larval; **Cp.** cutícula da pupa; **Ab.l.** abdome de larva; **Cg.v.** enócitos e trofócitos do corpo gorduroso visceral; **Int.p.** Intestino posterior; **Exc.** fezes; **Cer.** Cérebro; **Cel.n.** espaçamento de células necrosadas.

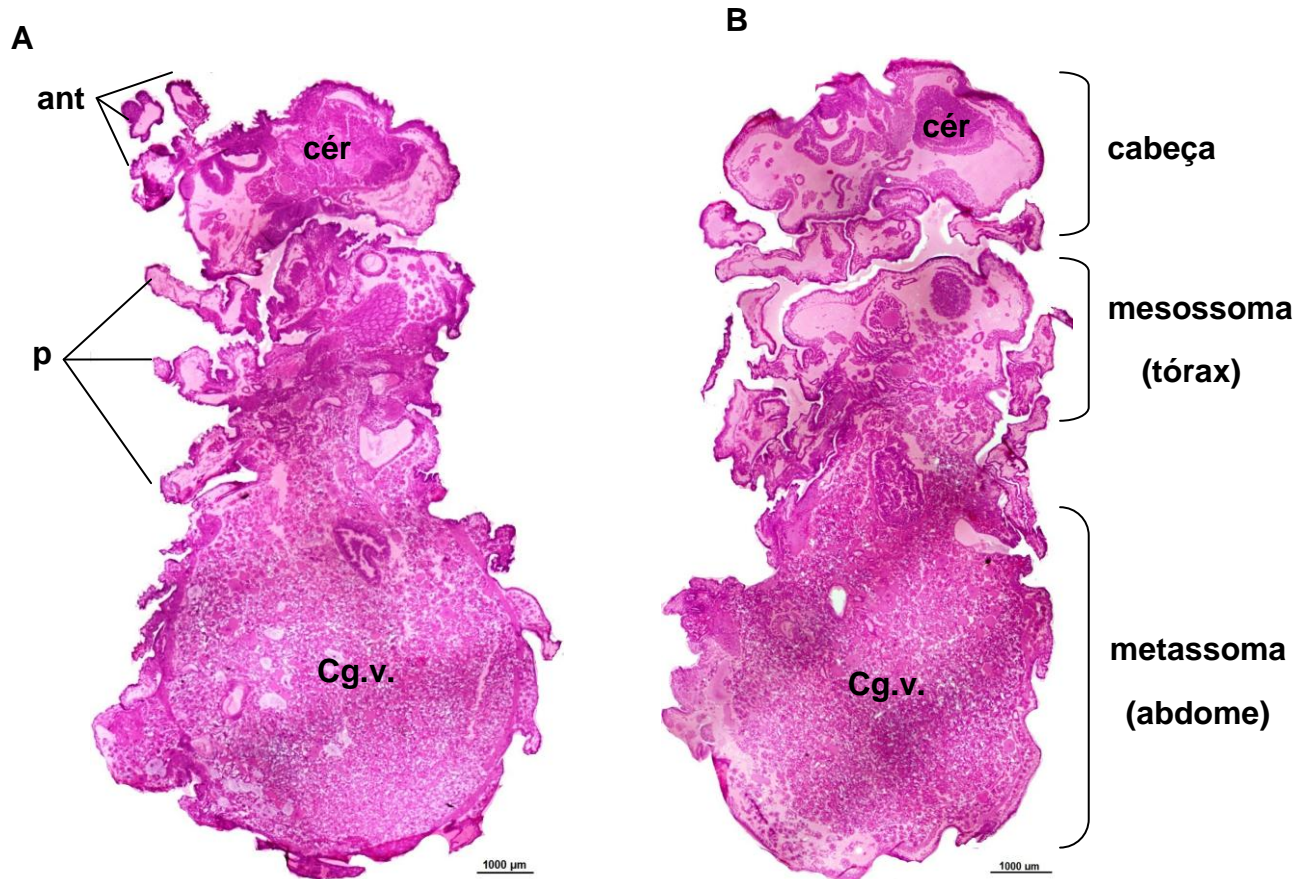


4.4. Análise morfológica

4.4.1. Análise da concatenação de secções histológicas de pré-pupa (PP) expostas ao dimetoato

Nesta técnica foi possível realizar a concatenação das secções histológicas de pré-pupas de *A. mellifera* africanizada (Figura 18), para visualizar panoramicamente o organismo. Em comparação ao grupo controle (Figura 18A), a morfologia dos órgãos de pré-pupas (PP) de *A. mellifera* mostrou-se alterada no grupo exposto (Figura 18B). No controle observam-se os apêndices da cabeça (antenas) e do tórax (pernas), um estreitamento separando mesossoma e metassoma, maior volume de células (corpo gorduroso) em todo indivíduo, inclusive na cabeça (cérebro) (Figura 4A), enquanto que em pré-pupas expostas ao dimetoato (Figura 18B) a distribuição de células pelo corpo apresentaram-se irregulares, com diversos espaçamentos e não se observou apêndices da cabeça e os torácicos formados (Figura 18B).

Figura 18. Concatenação das secções histológicas coradas com HE dos órgãos de *A. mellifera*. Comparação morfológica entre pré-pupas (PP) de abelhas do grupo controle (A) e expostas ao dimetoato (200 ng i.a./ μ L/larva) (B). **ant:** antena; **p:** pernas; **Cg.v:** corpo gorduroso parietal; **cer:** cérebro.



4.4.2. Análise do Corpo Gorduroso de pré-pupa (PP)

Nas figuras 19E e 19G (controle) mostram os trofócitos, células com morfologia tipicamente de células de reserva, pois é possível observar vacúolos, em forma, tamanho e quantidades variáveis, predominante em toda a região citoplasmática. Os núcleos geralmente são esféricos e centrais em relação aos limites celulares, porém, às vezes os vacúolos chegam a comprimi-los contra a membrana plasmática deixando-os marginais. Esse fato deve-se ao acúmulo de substâncias no interior dos vacúolos dos trofócitos, gerando vacúolos coalescentes, ou seja, a fusão de um ou mais vacúolos.

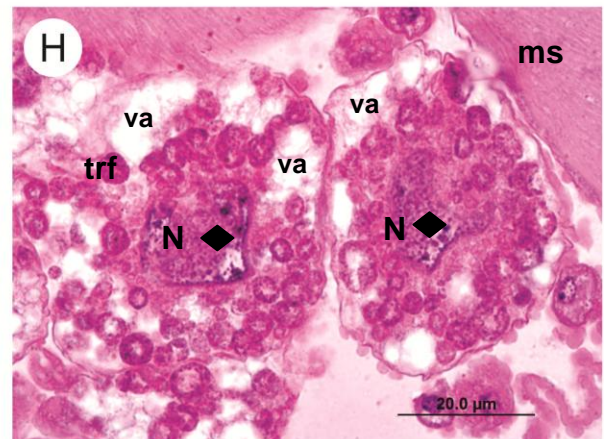
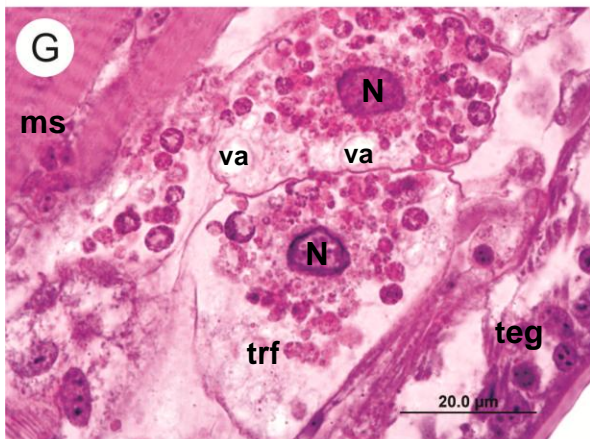
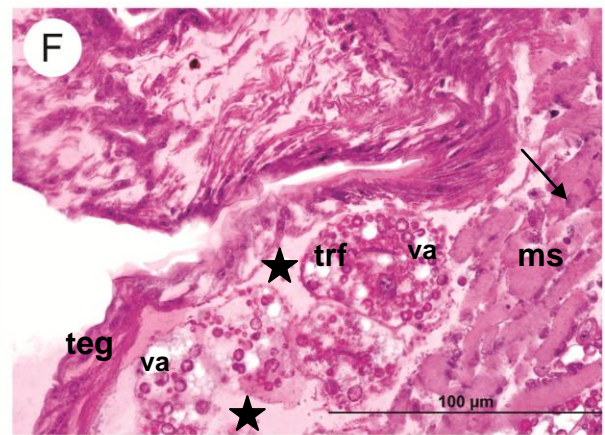
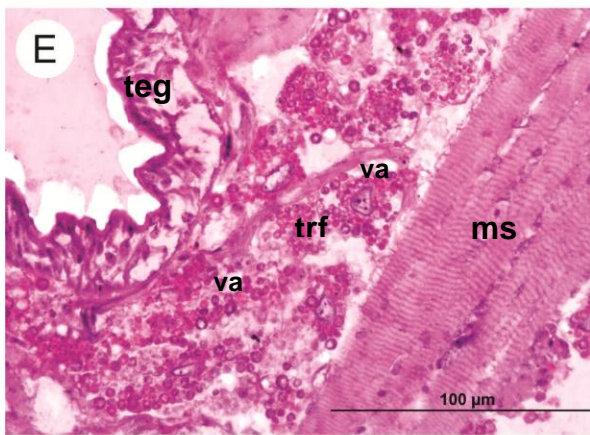
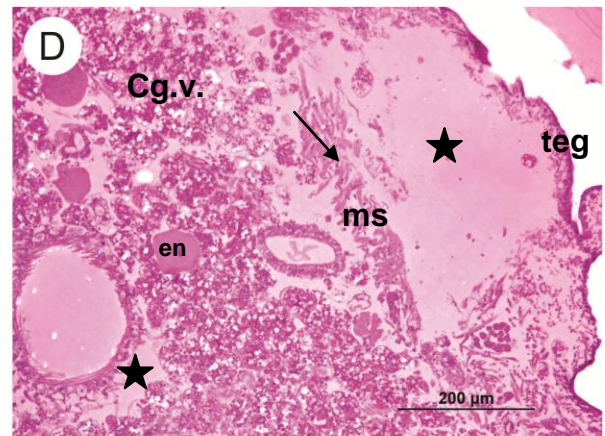
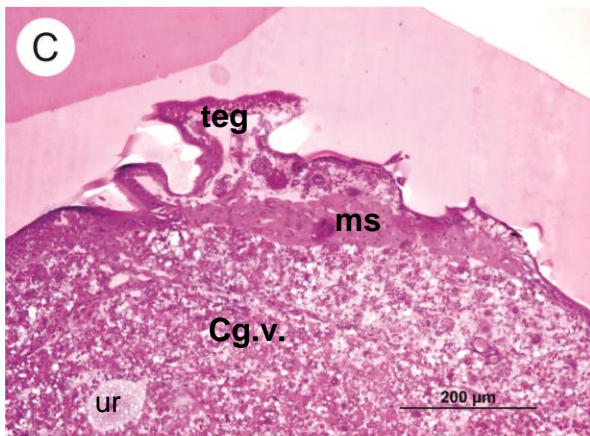
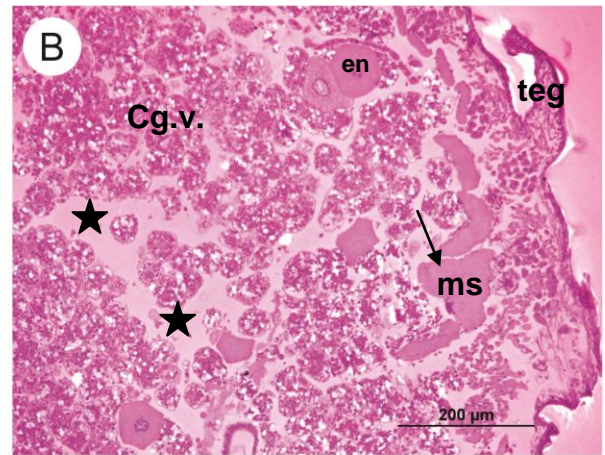
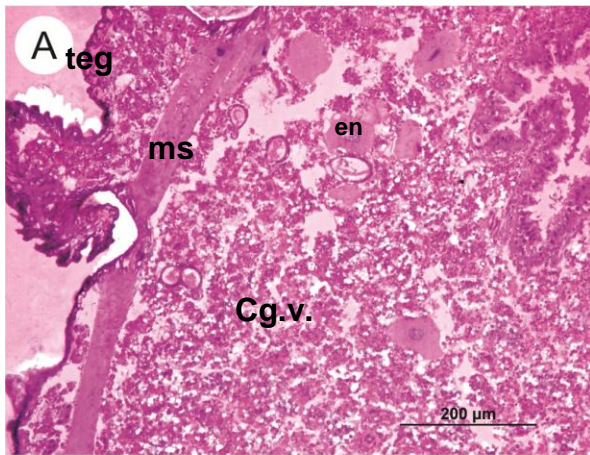
A figura 19A, 19B, 19C e 19D também mostram a dispersão dos enócitos e a dispersão deles entre os trofócitos (Cg.v) na camada visceral. Os trofócitos do grupo controle apresentam limites celulares muito bem definidos (Figura 19G), assim como, núcleo e citoplasma (Figura 19G), porém, o grupo exposto apresenta sutil

diferença, com núcleos irregulares dos trofócitos, bem maior em relação ao citoplasma (Figura 19H).

No grupo exposto com dimetoato não há homogeneidade na distribuição das células do corpo gorduroso visceral, com grandes espaços intercelulares (Figura 19B e 19D). No grupo controle as células estão mais intimamente associadas (Figura 19A e 19C).

A musculatura segmentar também se mostrou alterada no grupo exposto (Figura 19B, 19D, 19F e 19H) não acompanhando o tegumento (Figura 19B e 19D); as fibras musculares se apresentaram mais curtas, com o padrão de estriação desorganizados, onde se encontram os núcleos desarranjados (Figura 19F).

Figura 19. Secções histológicas coradas com HE. Comparação morfológica entre dos órgãos de pré-pupas de *A. mellifera* do grupo controle (**A, C, E e G**) e expostas ao inseticida dimetoato (200 ng i.a./ μ L/larva) de forma aguda (**B, D, F e H**). Observe o **teg**: tegumento; **ms**: músculo segmentar; **seta**: músculo segmentar desarranjado; **Cg.v**: corpo gorduroso visceral; **estrela**: espaçamentos intercelulares; **va**: vacúolos; **trf**: trofócitos; **en**: enócitos; **n**: núcleo; **losango**: núcleo grande e irregular, **ur**: urócito.



4.5. Análise histoquímica

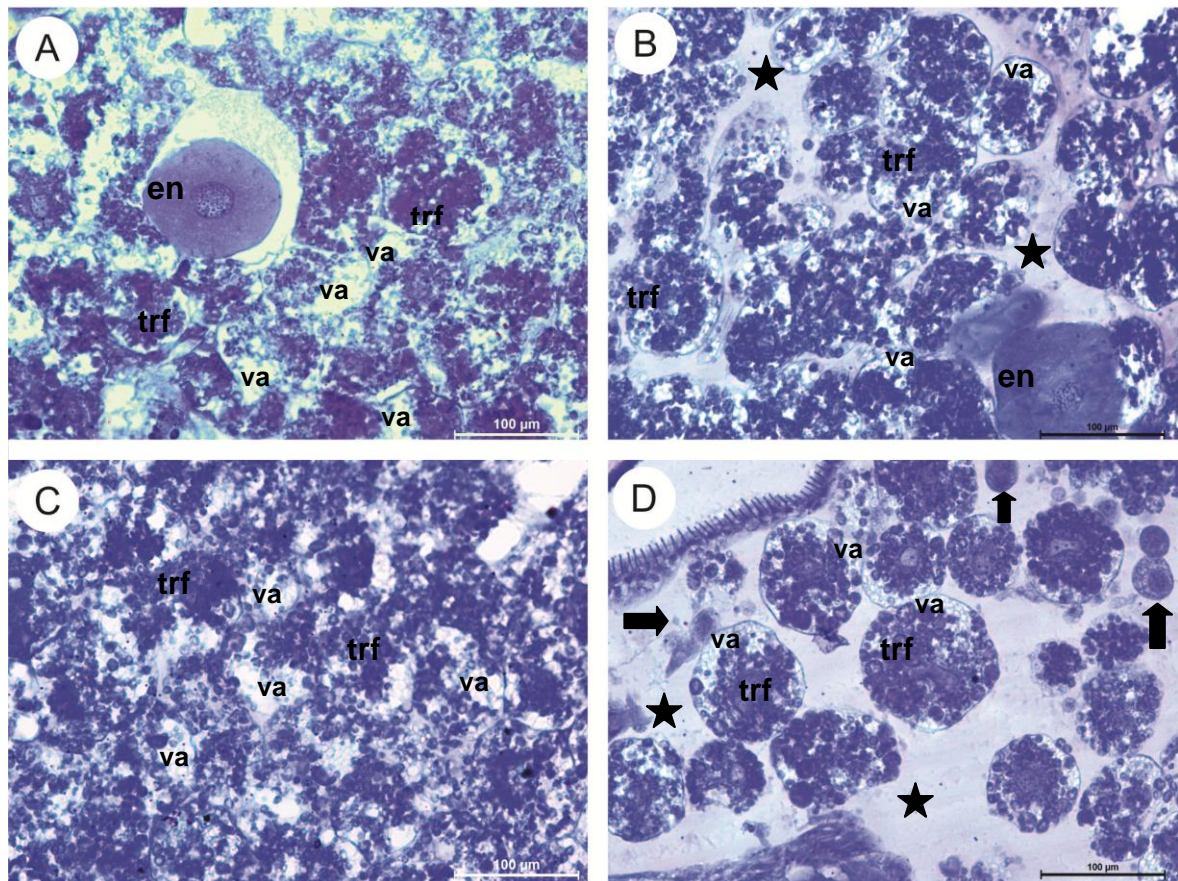
4.5.1. Azul de Bromofenol

Neste teste, o corpo gorduroso do grupo exposto (Figura 20B e 20D) e do grupo controle (Figura 20A e 20C) reagiu positivamente, corando-se em azul escuro. Observou-se também o acúmulo de grânulos proteicos (detecção de proteínas totais) nos dois grupos. Entretanto, há presença de áreas negativas ao Azul de Bromofenol, provavelmente são as áreas de vacúolos citoplasmáticos com lipídios.

No grupo exposto (Figura 20B e 20D) constatou-se distanciamento entre os trófcitos e a presença de pequenas células do sistema imunitário, conhecidas como hemócitos (Figura 20D). Em relação aos enócitos não foram detectadas alterações em nenhum dos grupos de tratamento comparado ao grupo controle (Figura 20A e 20C).

Nesta técnica pode-se constatar alta quantidade de grânulos de proteínas (Figura 20B e 20D) no grupo exposto, bem como de gotículas lipídicas, que deverão ser comprovadas por testes adicionais.

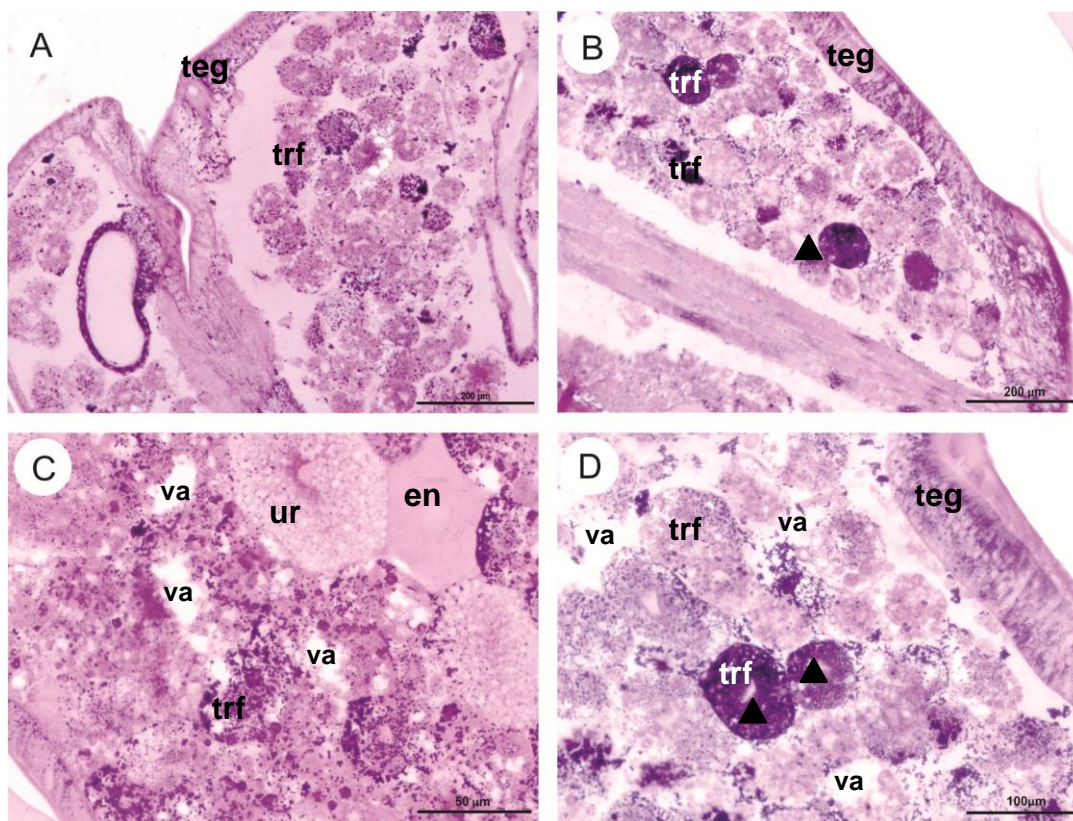
Figura 20. Testes histoquímicos pela reação do Azul de Bromofenol no corpo gorduroso de pré-pupas de *A. mellifera*. Células do grupo controle (**A** e **C**) e do grupo exposto ao dimetoato (200 ng i.a./ μ L/larva) (**B** e **D**). Observa-se: **trf**: trófcitos; **en**: enócitos; **seta**: hemócitos; **estrela**: espaçamentos intercelulares, **va**: vacúolos.



4.5.2. Ácido Periódico de Schiff (PAS)

No corpo gorduroso do grupo exposto ao dimetoato (Figura 21B e 21D) e do grupo controle (Figura 21A e 21B) o citoplasma dos trofócitos apresentaram regiões positivas, indicando acúmulo de glicogênio e glicoconjugados neutros nos grânulos, por meio da detecção histoquímica com Ácido Periódico de Schiff (PAS). O acúmulo de glicogênio é comum nos trofócitos, o que pode ser visualizado pela granulação fina PAS-positiva. Entretanto, no grupo exposto (Figura 21B e 21D) observou-se maior quantidade de células do corpo gorduroso que apresentaram reação fortemente positiva o PAS por todo o citoplasma do trofócito, adquirindo uma coloração púrpura mais escura (Figura 21B e 21D), o que evidencia maior concentração de polissacarídeos.

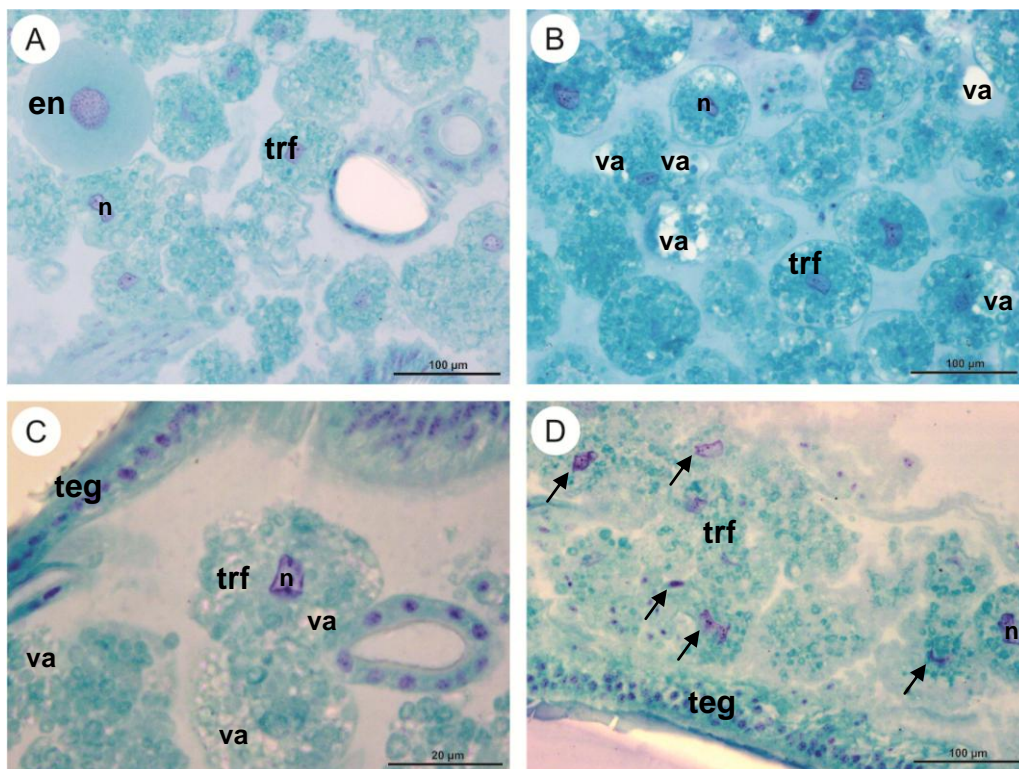
Figura 21. Testes histoquímicos pela reação PAS de órgãos de pré-pupas de *A. mellifera* do grupo controle (**A** e **C**) e exposto ao dimetoato (200 ng i.a./ μ L/larva) (**B** e **D**). Observa-se: **trf**: trofócitos; **en**: enócitos; **teg**: tegumento; **ur**: urócito; **triângulo**: evidenciando coloração mais escura; **va**: vacúolos.



4.5.3. Reação de Feulgen

A técnica de Feulgen permitiu identificar que as pré-pupas do grupo exposto (Figura 22B e 22D) apresentaram cromatina mais condensada e maior frequência de núcleos irregulares em relação ao controle (Figura 22A e 22C), o que indica maior área de troca entre o citoplasma e o núcleo (atividade nuclear).

Figura 22. Testes histoquímicos pela reação de Feulgen contracorada com Schiff do corpo gorduroso de pré-pupas de *A. mellifera*. Abelhas do grupo controle e (B e D) e abelha tratada ao dimetoato (200 ng i.a./ μ L/larva) (A e C). Observa-se: **teg**: tegumento; **trf**: trofócitos, **en**: enócitos; **n**: núcleo; **seta**: núcleos ramificados; **va**: vacúolos.



5. DISCUSSÃO

5.1. Efeitos do fipronil

No presente estudo, nós verificamos que quando houve aplicação ou contato das larvas de *A. mellifera* africanizada com doses do defensivo agrícola fipronil, obteve-se baixa taxa de mortalidade, mesmo nas concentrações mais elevadas. Esses dados nos sugerem que as larvas de abelhas são mais tolerantes ao inseticida que as abelhas adultas.

Pereira (2010) e Roat et al. (2013) determinaram o valor da DL_{50} para operárias de *A. mellifera* africanizada de 1,9 ng/abelha e 1,0 ng/abelha,

respectivamente. Pereira (2010) constatou que a DL_{50} do Fipronil é o mais baixo valor entre os diversos ingredientes ativos testados (tiametoxam o valor de 17 ng/abelha e acetamiprido o valor de 9.300 ng/abelha). Dessa forma, o fipronil apresentou uma toxicidade 4.895 maior que o acetamiprido e 8,9 vezes maior que o tiametoxam. Porém, mesmo o fipronil apresentando alta toxicidade aos indivíduos adultos, no presente trabalho, isso não foi verificado, ou seja, as larvas de *A. mellifera* africanizada não demonstraram mortalidade para doses que são extremamente tóxicas para as adultas.

Segundo o trabalho realizado por Yang et al. (2012), a dose de imidacloprido capaz de matar 50% das larvas de operárias de *A. mellifera* foi de aproximadamente 1400 ng/larva. Esta dose é muito maior do que as encontradas na literatura para as abelhas adultas, as quais compreendem o valor de 3,7 a 80,9 ng/abelha (SCHMUCK et al., 2001; NAUEN et al., 2001; SUCHAIL et al., 2004; ROSSI et al., 2013).

Corroborando os dados desse trabalho, estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa com os inseticidas tiametoxam e imidacloprido também mostraram essa resposta diferenciada das larvas aos defensivos agrícolas (TAVARES et al., 2013; SOARES et al., 2014).

Essa tolerância pode ser explicada pela presença do corpo gorduroso bem desenvolvido das larvas (CONTE; CRUZ-LANDIM, 1992; CRUZ-LANDIM, 2009). O corpo gorduroso é um local de desintoxicação, e pelo fato do fipronil ser um composto moderadamente lipofílico (GUNASEKARA e TROUNG, 2007; ALVES, 2010), este poderia entrar nos trofócitos e ser metabolizado. Essa metabolização do inseticida no corpo gorduroso da larva poderia atrapalhar a chegada do composto ao seu alvo no sistema nervoso. Além disso, o fato das estruturas cerebrais estarem em formação nas larvas também pode contribuir com a diminuição do potencial neurotóxico do inseticida (SOARES, 2014).

Supõe-se que o corpo gorduroso também esteja relacionado com a alta taxa de anomalias apresentada por indivíduos expostos ao fipronil no desenvolvimento larval. Segundo Martins (2012) esse tecido possui proteínas relacionadas ao transporte de hormônios importantes para o processo de metamorfose.

O tecido básico encontrado no abdome de larvas e pré-pupas de abelhas é o corpo gorduroso. Sendo constituído principalmente por dois tipos celulares: trofócitos, com diferenciações funcionais, e os enócitos. As células deste tecido

possuem ampla plasticidade, o que é demonstrado pelas múltiplas funções que desempenham, e pelo fato do corpo gorduroso ser alvo dos hormônios morfogenéticos dos insetos (LOCKE, 1998; OLIVEIRA, 2005; CRUZ-LANDIM, 2009).

Jenkins et al. (1992 *apud* ELIAS-NETO, 2008) constaram que ao cultivar *Aedes aegypti* em condições laboratoriais, houve síntese *de novo* ecdisteróides no abdome destes organismos e, propuseram a presença de fonte abdominal desses hormônios uniformemente distribuída.

Segundo Barbosa-Hetem et al. (1998) o aumento dos títulos de 20-hidroxiecdisona (20E) induz maior acúmulo de grânulos proteicos nos trofócitos do corpo gorduroso de *A. mellifera* cultivados em condições laboratoriais, e que há uma relação deste hormônio com o final da fase larval dos insetos (LOCKE et al., 1965, MONGELLI, 2013).

Além de atuar na aquisição de grânulos proteicos nos trofócitos, os títulos de ecdisona e de HJ em *A. mellifera* estão relacionados com a determinação das castas nesta espécie de abelha. Na larva da rainha o aumento progressivo do título de ecdisteróide começa entre o terceiro e quarto instares, mas em abelhas operária ele começa apenas na fase de tessitura do casulo, no 5º instar larval (RACHINSKY et al., 1990; FEUDLAUFER et al., 1985). Portanto, o pico de ecdisteróide na larva de rainha é responsável pelo encurtamento do tempo de desenvolvimento, o que não acontece na larva de operária (MONGELLI, 2013).

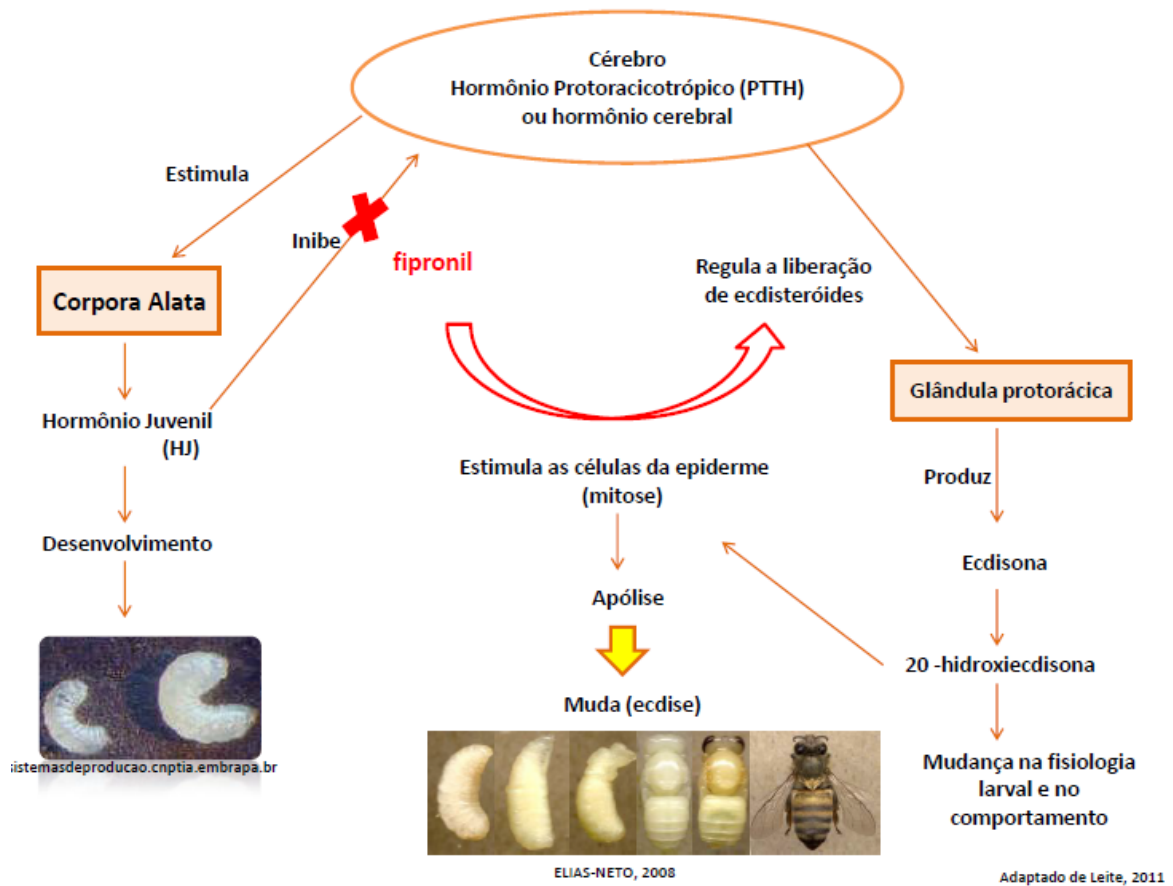
Dentre as diversas formas de HJ (HJ 0, HJ I, HJ II e HJ III, HJ B3, MF) detectado nos insetos, o único tipo presente nas abelhas é HJ III (TRAUTMANN et al., 1974; HUANG et al., 1991). O HJ é sintetizado por um par de glândulas do complexo retrocerebral comandado pelo sistema nervoso central e localizado no tórax, denominada *corpora allata* (CA) (GILBERT et al., 2000) e que também inclui as glândulas prototorácicas, onde os ecdisteróides são produzidos (NIJHOUT e WHEELER, 1982; De WILDE e BEETSMA, 1982; REMBOLD, 1987b; RACHINSKY et al., 1990; SCHMIDT-CAPELLA e HARTFELDER, 1998, LOTERIO, 2011). Como constatado neste estudo, a maioria dos indivíduos anômalos havia formado o tórax, que está relacionado ao local de produção do HJ nesses indivíduos.

Além disso, o HJ atua no controle do estoque de grânulos proteicos pelos trofócitos, tendo relação na produção e também no controle dos níveis da proteína ligante de HJ na hemolinfa, tendo seu pico de síntese em larvas de operárias no

meio do estágio do 5º instar (ADAMSKI et al., 1996; RACHINSKY et al., 1990; TAUCHMAN, 2007). Os hormônios ecdisteróides estão envolvidos na passagem de larva a adulto (processo metamórfico), de forma que ao final do 5º instar em larvas de operárias, os títulos de ecdisteróide começam a aumentar (RACHINSKY et al., 1990). Os nossos resultados indicam que os indivíduos não estão completando a muda do último instar larval provavelmente por manter um título mais alto de HJ na região abdominal, e não realizar a ativação dos genes pupais pela ecdisona e conseqüentemente, os genes do adulto não passam a se expressar (NIJHOUT e WHEELER, 1982, NOCELLI, 2003).

Outra hipótese para a ocorrência de anomalias em pupas de *A. mellifera* cotaminadas pelo fipronil na fase larval, está relacionada com a produção do HJ pela *corpora allata* (CA) (GILBER et al., 2000) sendo esta estimulada e controlada pelo neuro-hormônio protoracicotrópico (PTTH) (BOLLENBACHER et al., 1981). Quando o HJ é liberado na hemolinfa e alcança um alto nível (estimula e mantém o funcionamento dos genes responsáveis pelas características larvais) (WIGGLESWORTH 1965; GÄDE et al., 1997) ele participa de uma reação de *feedback* negativo, que regula a produção deste e outros hormônio (Figura 23). Pressupõe-se que, pelo fipronil ser um composto neurotóxico, ele esteja agindo no feedback e não permitindo a ocorrência da inibição da produção do HJ pelo PTTH (Figura 23). Essa interferência do fipronil pode afetar de alguma forma, ainda não elucidada, negativamente a regulação e liberação de ecdisteróides pelas glândulas protorácicas (Figura 23), essas responsáveis por produzir o hormônio de muda (mudança na fisiologia larval e no comportamento) denominado ecdisona (20E) (NIJHOUT e WHEELER, 1982; DE WILDE e BEETSMA, 1982; REMBOLD, 1987b; RACHINSKY et al., 1990; SCHMIDT-CAPELLA e HARTFELDER, 1998).

Figura 23. Esquema representando o processo neuro-endócrino no desenvolvimento nos insetos e a possível ação do fipronil (neurotóxico).



Fonte: Adaptado de LEITE, 2011.

Os resultados evidenciaram que os indivíduos anômalos mesmo estando em fase de pupa, possuíam cutícula larval. Resultados estes, que corroborados pelos estudos de Denneulin et al. (1977), que evidenciaram que os pesticidas podem atuar como inibidor da síntese de quitina reduzindo assim, a produção de polissacarídeos, o que consequentemente induz perturbações na formação da cutícula (MONGELLI, 2013). Entretanto não há relatos na literatura sobre esse efeito do fipronil em larvas de abelhas.

Além disso, durante o período larval, a presença do hormônio juvenil, juntamente com a ecdisona, induz as células epidermais a produzirem cutícula larval. Quando ocorre a redução do hormônio juvenil circulante, no final do período larval, acontece a metamorfose e a pupação (WIGGLESWORTH, 1985; NOCELLI, 2003). Logo, intensa síntese de nova cutícula é necessária antes da apólise da

cutícula larval que ocorre na pré-pupa. Porém, no presente trabalho foi observado pupas anômalas com cutícula de larva, não ocorrendo a apólise necessária da cutícula no processo metamórfico.

Outro resultado importante encontrado no presente estudo é a evidente a diminuição da taxa de emergência em indivíduos de *A. mellifera* expostos ao fipronil na fase larval. Esse dado corrobora com pesquisas recentes que expõem preocupação e discutem a relação da contaminação das larvas por pesticidas com a diminuição da produtividade nos apiários comerciais localizados nos agroecossistemas (CHAUZAT et al., 2006).

5.2. Efeitos do dimetoato

O sistema nervoso é o alvo do dimetoato, porém, sua absorção pode ser facilmente realizada por todos os tecidos do organismo, podendo atingir em altas concentrações, órgãos responsáveis pela metabolização de xenobióticos, como o corpo gorduroso em abelhas. Em vista dos poucos estudos sobre ações do dimetoato no desenvolvimento ontogenético de *A. mellifera* há necessidade de se conhecer os efeitos desse i.a. nos órgãos desta espécie de abelha.

Neste trabalho pode-se observar que indivíduos expostos ao dimetoato na fase larval não apresentaram em pré-pupa o desenvolvimento de discos imaginiais, que vão originar as pernas, antenas e outros apêndices. Os mesmos resultados foram encontrados por Atkins e Kellum (1986), que verificaram que dimetoato e malatiom podem causar defeitos morfogênicos em adultos de *A. mellifera* expostos na fase de larva, tais como pequeno tamanho do corpo, malformação ou diminuição do tamanho das asas, deformação das pernas e das asas.

Os discos imaginiais são grupamentos de células embrionárias indiferenciadas, derivadas de uma pequena população de células fundadoras no embrião, que funcionam, segundo Gehring e Nothiger (1973), como grupos especiais de células que foram determinadas geneticamente durante o período embrionário, mas que foram reservadas para desempenhar seu papel, no desenvolvimento, apenas numa fase posterior. Svácha (1992), no entanto, questiona a postulada característica de células indiferenciadas para os discos imaginiais, uma

vez que, trabalhando com os discos imaginais antenais de *Bombyx mori*, verificou que os mesmos são parte integrante do corpo da larva, e não um grupo indiferenciado de células, esperando o início da metamorfose para se manifestarem, tendo, inclusive, atividade secretora, produzindo cutícula. Para Rachinsky et al. (1990) o desenvolvimento dos discos imaginais, é controlado pelos níveis de hormônio juvenil circulante, que pode estar relacionado com o CG (NOCELLI, 2003).

Assim como em condições naturais, neste estudo as pré-pupas do grupo controle apresentam pequenos pontos translúcidos com localização fixa. Divisões celulares promovem o crescimento dos discos durante a fase larval (NEVES, 1984; OBERLANDER, 1985; NOCELLI, 2003).

Além da participação dos hormônios relacionados com a metamorfose no desenvolvimento dos discos imaginais, o hormônio 20-hidroxiecdisona (20E), quando em títulos maiores, atua nos trofócitos do corpo gorduroso de *A. mellifera* induzindo aumento de grânulos proteicos e vacúolos citoplasmáticos (BARBOSA-HETEM et al., 1998; GALLUZZI et al., 2012), que foram evidenciadas nos resultados deste estudo.

Os tecidos pupais refletem a complexidade do processo de metamorfose que as larvas sofrem para atingir a fase adulta. Órgãos como o intestino e a musculatura passam por processos de reestruturação. Sabe-se que ao final do estágio larval é comum e necessária a ocorrência de morte celular programada no corpo gorduroso visceral e outros órgãos dos insetos, e pouco antes da pupação as células que compõem o corpo gorduroso têm sua morfologia alterada (CRUZ-LANDIM, 2009; LIU et al., 2009), o que pode explicar os trofócitos esparsos sendo característicos da fase pupal em abelhas e observados neste estudo na fase larval.

A hipótese para as larvas expostas com o dimetoato estarem com características histológicas de pupas, quando estão na fase de pré-pupa, ou seja, adiantando o seu desenvolvimento, seria que o inseticida em doses mais baixas pode estar afetando sua metamorfose, pois no final desta fase é normal o início da degeneração de alguns órgãos. O dimetoato poderia estar ativando o sistema de desintoxicação celular pelas enzimas carboxilesterases e, por essa via, ocasionar a hidrólise do HJ. Sabe-se que tais enzimas podem hidrolisar o HJ apenas se este estiver disponível na hemolinfa (HAMMOCK et al., 1975). As carboxilesterases agem no metabolismo de inseticidas (HASHIMOTO et al., 2003) e de lipídios endógenos

(YANG et al., 2001). Nos insetos, tais enzimas ocorrem no corpo gorduroso, e possuem também ação de esterases, relacionando-se por isto a conversão do HJ em ácido diol, que passa a ser armazenado no corpo gorduroso, e desta forma torna-se indisponível na hemolinfa (HAMMOCK et al., 1975; MONGELLI, 2013). Carvalho (2009) relata a ocorrência do aumento na atividade das enzimas carboxilesterases em adultos de *A. mellifera* expostos às doses subletais de tiametoxam.

O trabalho realizado por Tavares (2011) para analisar o efeito do inseticida tiametoxam em larvas de 5^o instar de *A. mellifera*, propôs que a substância ativa a hidrólise do HJ pelas carboxilesterases e, conseqüentemente, o aumento no título de ecdisona, que segundo Gäde et al., (1997) atua no aparecimento das características do adulto. Sendo que nesse trabalho, os resultados mostraram que as pré-pupas analisadas expostas ao dimetoato possuíam características de pupas, como espaçamento entre as células e a grande quantidade de proteínas.

O corpo gorduroso dos insetos pode ser comparado com as células hepáticas dos mamíferos, pois ambas são responsáveis por diversas funções essenciais para a sobrevivência da espécie, além de realizarem importante papel no metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos. As células desses tecidos, também servem como sítios de armazenamento para muitos nutrientes, como a glicose e desintoxicam o organismo (KUMAR e ANSARI, 1986). Esse processo de metabolização e desintoxicação realizado pelo corpo gorduroso das abelhas supõe-se que esteja relacionado com a alta quantidade de glicogênio observada pela reação citoquímica de PAS nos grupos expostos com dimetoato neste trabalho.

Uma suposição para esse resultado, é que a intoxicação pelo dimetoato pode estar bloqueando a glicogenólise, sendo assim, provocando uma redução ou suspensão das vias metabólicas que degradariam o glicogênio (CORI e CORI, 1952). A inibição desse processo deixa inativa as rotas do metabolismo de carboidratos, interrompendo diretamente a produção energética do organismo exposto (GAL et al. 1956; OMARA e SISODIA, 1990) e conseqüentemente ocasionando o acúmulo de glicogênio nas células do corpo gorduroso (trofócitos).

Ainda que existam indícios na literatura sobre a atuação dos enócitos no processo de desintoxicação a xenobióticos, eles são baseados em dados bioquímicos e não em dados morfológicos. No entanto, sabe-se que respostas e

efeitos bioquímicos precedem os efeitos fisiológicos e morfológicos, desta forma, pode-se inferir que enzimas atuam como possível mecanismo de desintoxicação, uma vez que alterações morfológicas foram detectadas (AZEVEDO et al., 2003; MONGELLI, 2013).

A avaliação histopatológica dos trofócitos e enócitos de pré-pupas (PP) de *A. mellifera*, expostas na fase larval aos inseticidas, pode ser importante para compreender a ação destes compostos químicos na larva e seus efeitos biológicos na metamorfose.

Nos resultados, atentou-se para a observação de diferentes tipos celulares nos espaçamentos entre os trofócitos e enócitos nos indivíduos expostos ao dimetoato. Tais células são denominadas plasmatócitos, sendo o tipo celular mais frequente dos hemócitos. Hemócitos são células de defesa encontradas nos invertebrados que podem variar em número e tipo, de espécie para espécie. Sabe-se que estas células originam-se da mesoderme (NELSON, 1915; SHAFIQ, 1954; BRONSKILL, 1959; FAROOGI, 1963) e, após o desenvolvimento embrionário, novos hemócitos surgem por divisão celular dos pré-existentes (FEIR e MCCLAIN, 1968; FEIR, 1979). Essa observação dos hemócitos ocorre como resposta imunológica dos indivíduos expostos ao inseticida dimetoato.

Os dados deste trabalho sobre os efeitos biológicos da exposição de *A. mellifera* africanizada a defensivos agrícolas corroboram com a hipótese que relaciona a intoxicação das abelhas como uma das diversas causas (ácaros, fungos, bactérias, vírus e outros) da CCD, responsável por perdas de mais de 45% das colônias de *A. mellifera* nos Estados Unidos (COX-FOSTER et al., 2007) e, alta mortalidade em algumas regiões do Brasil (MALASPINA, dados pessoais). Sendo assim, esse declínio na população de abelhas pode causar prejuízos na cadeia da polinização realizada por esses insetos.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O fipronil não induziu alteração significativa na taxa de mortalidade larval em indivíduos de *A. mellifera* africanizada;
- ✓ A exposição larval ao fipronil mostrou-se extremamente deletéria às pupas;
- ✓ Houve baixa taxa de emergência de adultos expostos ao fipronil na fase larval;
- ✓ Após exposição ao dimetoato foram observadas características da fase pupal no corpo gorduroso de indivíduos d pré-pupa;
- ✓ A exposição larval de *A. mellifera* africanizada ao dimetoato indicou possível alteração no desenvolvimento ontogenético desses indivíduos;

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABDALLA, F.C.; CRUZ-LANDIM, C.; GRACIOLI, L.F.. Tegumentary Epithelial Glands in the Abdomen of Virgin and Physogastric Queens of the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille (Meliponini:Trigonina). **Neotropical Entomology**, v.34, n.1, p.041-045, 2005.

ADAMSKI, J.J.; FESCEMYER, H.W.; HECKEL, D.G.; GAHAR, L.I.; DAVIS, R.E.; KELLY, T.J. Sex-specific and hormone controlled expression of a vitellogenin encoding gene in the gypsy moth. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.31, n.3, p.237-256, 1996.

ADAMSKI, Z., BANASZKIEWICZ, M., ZIEMNICKI, K. Ultrastructural alterations induced by fenitrothion on fat body cells and midgut cells of *Tenebrio molitor* L. (Insecta, Coleoptera) larvae. **Journal of Biological Research**, v.3, p.15-22, 2005.

AGROFIT. **Consulta de Produtos Formulados**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 05 de março de 2014.

ALIOUANE, Y; EI HASSANI, AK; GARY, V; ARMENGAUD, C; LAMBIN, M; GAUTHIER, M. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environ Toxicol Chem**, v.28, p.113–122, 2009.

ALVES, H.C. **Estudo biológico de linhagens do protozoário ciliado *Paramecium Caudatum* Ehrenberg, 1833 e avaliação experimental do efeito tóxico do**

agrotóxico Fipronil. 2011. 67 f. Dissertação de mestrado (Biotecnologia) apresentada à Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

AMARO, P.; GODINHO, J. Pesticidas e Abelhas. **Revista de Ciências Agrárias**, v.35, n.2, p.53-62, 2012.

ATKINS, E.L.; KELLUM, D. Comparative morphogenic and toxicity studies on the effect of pesticides on honeybee brood. **Journal of Apicultural Research**, v.25, p. 242-255, 1986.

AUFAUVRE, J.; BIRON, D.G.; VIDAU, C.; FONTBONNE, R.; ROUDEL, M.; DIOGON, M.; VIGUÈS, B.; BELZUNCES, L.P.; DELBAC, F. BLOT, N.. Parasite–insecticide interactions: A case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. **Sci Rep.**, n.2326, p.1–7, 2012.

AUPINEL, P.; FORTINI D.; DUFOUR, H.; TASEI, J-N.; MICHAUD, B.; ODOUX, J-F.; PHAM -DELÈGUE, M-H. **Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae.** Bulletin of Insectology, v.58, n.2, p.107-111, 2005.

_____. Toxicity of dimetoate and fenoxycarb to honeybee brood (*Apis mellifera*) using a new in vitro standardized feeding method. **Pest Management Science**, v.63, p.1090-1094, 2007a.

_____; MEDRZYCKI, P.; FORTINI, D.; MICHAUD, B.; TASEI, J.N.; ODOUX, J.F.. A new larval in vitro rearing method to test effects of pesticides on honey bee brood. **Redia**, v.90, p.91-94, 2007b.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. **RiMa/Intertox**, p.322, 2003.

BABENDRIER, D.; KALBERGER, N.; ROMEIS, J.; FLURI, P.; BIGLER, F.. Pollen consumption in honeybee larvae, a step forward in the risk assessment of transgenic plants. **Apidologie**, v.35, p.293-300, 2004.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A.; CARVALHO, S.M.; BRUNE, J.L.; CARVALHO, G.A.; BULETÉ, A.; GIROUD, B. et al.. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honeybee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v.82, p.22–31, 2012.

BARBOSA-HETEM, J.M.N.; SIMÕES, Z.L.P.; BITONDI, M.M.G.. Ultrastructural study of the effects of juvenile hormone and 20 – Hydroxyecdysone on the late larval fat body of africanized bees (*Apis mellifera* L.), after *in vitro* incubation. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v.15, n.2, p.191-201, 1998.

BARISIC, D.; LAZARIC, K.; LULIC, S.; VERTACNIK, A.; DRAZIC, M.; KEZIC, N. The role of honey bees in environmental monitoring in Croatia. In: DEVILLE, J.; PHAM -DELÈGUE. (eds). Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. London, UK: **Taylor e Francis**, p.160-185, 2002.

BAWA, K.S.. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. **Annu. Rev. Ecol. Sys.**, v.21, p.399-422, 1990.

BLACQUIERE T., SMAGGHE G., VAN GESTEL C. A. M., MOMMAERT V. Neonicotinoids in bees: A Review on concentrations, side-effects and Risk Assessment. **Ecotoxicology**, 2012.

BOBÉ, A.; COOPER, J.F.; COSTE, C.M.; MULLER, M. A. Behavior of Fipronil in Soil under Sahelian Plain Field Conditions. **Pestic Sci.**, v.52, p.275-281, 1998a.

BOBÉ, A.; COSTE C.M.; COOPER, J.. Factors Influencing the Adsorption of Fipronil on Soils. **J. Agric. Food Chem.**, v.45, p.4861-4865, 1997.

_____; MEALLIER P.; COOPER J.; COSTE C.M. Kinetics and Mechanisms of Abiotic Degradation of Fipronil. **J Agric. Food Chem.**, v.46, n.7, p.2834-2839, 1998b.

BOLLENBACHER, W.E.; SMITH, S.L.; GOODMAN, W.; GILBERT, L.I.. Ecdysteroid titer during larval-pupal-adult development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Gen. comp. Endocr.**, v.44, p.302-306, 1981.

BRAUN, R.P.; WYATT, G.R. Sequence of the hexameric juvenile hormone binding protein from the hemolymph of *Locusta migratoria*. **J. Biol. Chem.** 271, 31756–31762, 1996.

BURMESTER, T.; SCHELLER, K. Ligands and receptors: common theme in insect storage protein transport. **Naturwissenschaften**, v.86, p.468-474, 1999.

CALABRESE, E.J.. Hormesis: why it is importante to toxicology and toxicologists. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.27, n.7, p.1451-1474, 2008.

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

CATAE, A.F., ROAT, T.C., OLIVEIRA, R.A., NOCELLI, R.C.F.; MALASPINA, O.. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microsc. Res. Techniq**, v.77, p.274-281, 2014.

CHAN, Q. W. T; MUTTI, N.S; FOSTER, L. J; KOCHER, S.D; AMDAM, G.V; WOLSCHIN, F. The Worker Honeybee Fat Body Proteome Is Extensively Remodeled Preceding a Major Life-History Transition, **PLoS ONE**, v. 6 n. 9, set. 2011.

CHASIN, A. A. M.; AZEVEDO, F.A. Intoxicação e avaliação da toxicidade. In: AZEVEDO, F.A., CHASIN, A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. Editora: RiMa/Intertox, pp. 127-163, 2003.

CHAUZAT, M.P.; FAUCON, J.P.; MARTEL, A.C.; LACHAIZE, J.; COUGOULE, N.; AUBERT, M. A survey of Pesticide Residues in Pollen Loads by Honeybees in France. **J. Econ. Entomol.**, v.99, n.2, p.253-262. 2006.

CHAVASSE, D.C.; Yap, H.H.. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. **Geneva: WHO**, p.129, 2007.

COLIN, M.E. Un medio ambiente que mata las abejas. Estudios de imidacloprid y fipronil en Europa. **Vida Apícola**, v.128, 2004.

CONNELLY, P. Environmental fate of fipronil: California Environmental Protection Agency, **Department of Pesticide Regulation**. 2001. Disponível em: <<http://la.water.usgs.gov/pdfs/NAWQA-fipronil.pdf>>. Acesso em: maio 2014.

CONTE, H. **Morfologia do corpo gorduroso em larvas de *Diatrea saccharalis* (Lepidóptera: Pyralidae) não parasitadas e parasitadas pelo *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)** Rio Claro: Inst. de Biociências, UNESP, 1994. 77p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). 1994.

CORI, G.T.; CORI, C.F.. Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. **J Biol Chem.**, v.7, p.199-661, 1952.

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

COX-FOSTER, D.L.; CONLAN, S.; HOLMES, E.C.; PALACIOS, G.; EVANS, J.D.; MORAN, N.A.; LAN QUAN, P.; BRIESE, T.; HORNIG, M.; GEISER, D.M.; MARTINSON, V.; VANENGELSDORP, D.; KALKSTEIN, A.L.; DRYSDALE, A.; HUI, J.; ZHAI, J.; CUI, L.; HUTCHISON, S.K.; SIMONS, J.F.; EGHOLM, M.; PETTIS, J.S.; LIPKIN, W.I.. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. **Science**, v.318, p.283-287, 2007.

CRISTINO, A.S. **Aspectos reprodutivos envolvidos no processo de africanização das abelhas *Apis mellifera* no Brasil**. 2003. 99f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

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

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. Editora UNESP, São Paulo, p.109-181, 2009.

DANTAS, T.A. **Análise morfológica da ação de inseticidas nos discos imaginais e corpo gorduroso parietal de *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE).** 2009 63f. Trabalho de Conclusão do Curso em Ciências Biológicas (Bacharelado) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2009.

DAVIS, M.; O'KEEFE, S.L.; PRIMROSE, D.A.; HODGETTS, R.B.. A neuropeptide hormone cascade controls the precise onset of post-eclosion cuticular tanning in *Drosophila melanogaster*. **Development**. 134, 4395-4404, 2007.

De WILDE, J.; BEETSMA, J. The physiology of caste development in social insects. **Adv. Insect Physiol.** n.16, p.167-256, 1982.

DECOURTYE, A. **Etude de l'impact des produits phytopharmaceutiques sur la survie et l'apprentissage associatif chez l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.).** PhD Thesis University Paris, XI, d'Orsay 2002.

_____; DEVILLERS, J; GENEQUE, E.; LE MENACH, K.; BUDZINSKI, H.; CLUZEAU, S.; PHAM-DELE`GUE, M.H. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Arch Environ Con Tox**, n. 48, p. 242–250, 2005.

_____; ODOUX, J.F.; CLUZEAU- MOULAY,S. Influence des aménagements floristiques sur lesabeilles, **Bull. Tech. Apic.** n.35, p.114–123, 2008.

DENNEULIN J.C.; LAMY, M. Effects of Dimilin, a chitin inhibitor 1 (4 chlorophenyl) 3 (2-6 difluorobenzoyl) urea on oenocytes and molting in the processionary caterpillar (*Thaumetopoea pityocampa* Schi.) (Lepidoptera). **Ann Endocrinol**, v.38, n.6, p.405-406, 1977.

DPR, Department of Pesticide Regulation, Sacramento-California. Dissipation. Rhône-Poulenc Agricultural Limited. Data Package ID n.169043-45 DPR Document N. 52062-240 Pt.1, 2001.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annu Rev Entomol.** n. 52, p. 81–106, 2007.

DUBROVSKY, E.B. Hormonal cross talk in insect development. **Trends Endocrinology Metabolism**, v.16, p.6–11, 2005.

ELIAS-NETO, M. **Morfogênese do tegumento em *Apis mellifera*: construindo o exoesqueleto adulto.** 2008. 70f. Dissertação de mestrado - Programa de pós-graduação em Biologia Comparada. Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Departamento de Biologia. Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, 2008.

ELLIS, E. C. K.; KLEIN GOLDEWIJK, S.; SIEBERT, D.; Lightman, and N. Ramankutty. Anthropogenic transformation of the biomes, 1700 to 2000. **Global Ecology and Biogeography.** n.19, p.589-606, 2010.

ENDERLE, U.; KAUSER, G.; REUM, K.; SCHELLER, K.; KOOLMAN, J. In: Scheller K (Eds). The larval serum proteins of insects. **Stuttgart: Thieme-Stratton**. p. 40-49, 1983.

FAROOGI, M.M. The embryology of mustard sawfly *Athalia proxima* Klug (Tenthredinidae, Hymenoptera). **Aligarh Muslim Univ. Publ. Zool.**, Ser. v.6, p.1-68, 1963.

FEIR, D. Multiplication of hemocytes. In: GUPTA, A.P. (Ed). **Insect hemocyte**. Cambridge: Cambridge University Press, p.165-53, 1979.

_____; MCCLAIN, E. Induced changes in the mitotic activity of hemocytes of large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. **Ann. Entomol. Soc. Amer.**, v.61, p.413-6, 1968a.

FENET, H.; BELTRAN, E.; GADJI, B.; COOPER, J.F.; COSTE, C.M. Fate of a phenilpyrazole in vegetation and soil under tropical Field conditions. **J. Agric. Food Chem.**, n. 49, p.1293-1297, 2001.

FERREIRA, R.A.C. **Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de Malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico**. 2010. 83f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2010.

_____; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; MALASPINA, O.; BUENO, O.C.; TOMOTAKE, M.E.M.; PEREIRA, A.M. Cellular responses in the Malpighian tubules of *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) exposed to low doses of fipronil and boric acid. **Micron** (Oxford. 1993), v.1, p.1916, 2013.

FEUDLAUFER, M.F.; HERBERT, E.W. J.R.; SVOBODA, J.A.; THOMPSON, M. J.; LUSBY W.R. Makisterone A: the major ecdysteroid from pupa of the honey bee, *Apis mellifera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.15, p.597-600, 1985.

FIKES, J.D. Organophosphorus and carbamate insecticides. **Veterinary Clinics North American: Small Animal Practice**, v.20, n.2, p.353-367, 1990.

FRAENKEL, G.; RUDALL, K.M.. A study of the physical and chemical properties of the insect cuticle. **Proceedings of the Royal Society of London – Series B**, v.129, p1-35, 1940.

FRANCO, E.L.; NEVES S.P.S.; MACHADO, C.S.. Aspectos da biologia floral de *Cambessedesia wurdackii* (A. B. Martins) (Melastomataceae) e registro da atividade dos visitantes florais. **Biologia e ecologia da polinização**, EDUFBA: Rede Baiana de Polinizadores–Salvador/BA, v.2, p.45-49, 2010.

FRAZIER, M.; MULLIN, C.; FRAZIER, J.; ASHCRAFT, S. What have pesticides got to do with it? **Am. Bee J.**, n.148, p.521–523, 2008.

GÄDE, G.; HOFFMANN, K. H.; SPRING, J. H. Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. **Physiological Reviews**, n.77, p.963–1032, 1997.

GALLAI, N.; SALLES, J.M.; SETTELE, J.; VAISSIÈRE, B.E.. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, Amsterdam, v.68, p.810–821, 2009.

GALLO, D. et al. Toxicologia de inseticidas. In: GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, Cap. 11, p.361-398, 2002.

GALLUZZI, L; VITALE, I; ABRAMS, J. M; ALNEMRI, E. S; BAEHRECKE, E. H; BLAGOSKLONNY, M. V; DAWSON, T.M; DAWSON, V.L; EL-DEIRY, W. S; FULDA, S; GOTTLIEB, E; GREEN, D. R; HENGARTNER, M.O; KEPP, O; KNIGHT, R.A; KUMAR, S; LIPTON, S. A; LU, X; MADEO, F; MALORNI, W; MEHLEN, P; NUÑEZ, G; PETER, M. E; PIACENTINI, M; RUBINSZTEIN, D.C; SHI, Y; SIMON, H-U; VANDENABEELE, P; WHITE, E; YUAN, J; ZHIVOTOVSKY, B; MELINO, G; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death and Differentiation**, v.19, p.107–120, 2012.

GEHRING, W.J.; NÖTHIGER, R. The imaginal disc of *Drosophila*. In: COUNCE, S.J.; WADDINGTON, C.H. **Developmental systems: Insects**. Academic Press, London, p.21-289, 1973.

GILBERT, L.I.; GRANGER, N.A.; ROE, R.M. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. **Insect Biochem. Mol. Biol.** n.30, p.617–644, 2000.

_____; IATROU, K.; GILL, S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect*. GILBERT, S.F. *Developmental biology*. **Sinauer Associates Inc.** Estados Unidos, n.8, 2006.

GODOY, J. **Alarme por inseticidas assassinos de abelhas**. Disponível em: <www.tierramerica.net/2004/0313/pacentos.shtml>. Acesso em 16 de abril 2013.

GONÇALVES, J.A.M.. A carreira das professoras do ensino primário. In: NÓVOA, A. (org.) **Vidas de professores**. Porto:Porto, 1992.

GOUGH, H.J.; MC INDOE, E.C.; LEWIS, G.B.. The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity test on honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Apicultural Research**, v.33, n.119, p.15-25, 1994.

GOULSON, D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **J Appl Ecol**, n.50, v.4, p.977–987, 2013.

GUNASEKARA, A.S.; TROUNG, T. Environmental Fate of Fipronil. **California Environmental Protection Agency**. p.28, 2007.

HAINZL, D.; COLE, L.M.; CASIDA, J. E. Mechanisms for Selective Toxicity of Fipronil Insecticide and its Sulfone Metabolite and Desulfinyl Photoproduct. **Chemical Research in Toxicology**, v.11, n.12, p.1529-1535, 1998.

HAMMOCK, B.; NOWOCK, J.; GOODMAN, W.; STAMOUDIS, V.; GILBERT, L.I.. The influence of hemolymph-binding protein on juvenile hormone stability and distribution in *Manduca sexta* fat body and imaginal discs in vitro. **Molecular Cell Endocrinology**, v.3, n.3, p.167-184,1975.

HANSEN, S.R. M.; SCHAFER I.; SCHELLER K. Interaction of the anterior fat body protein with the hexamerin receptor in the blowfly *Calliphora vicina* Immo A. **European Journal of Biochemistry**, n.269, p.954-960, 2002.

HARDSTON, M.C.; SCOTTS, J.G.. Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects?. **Pest Manag Sci.**, v.66, p.1171–1180, 2010.

HASHIMOTO, J.H.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; TOLEDO, E.A.A.. Evaluation of the use of the inhibition esterases activity on *Apis mellifera* as bioindicators of insecticide thiamethoxam Pesticide Residues. **Sociobiology**, v.42, n.3, p.693-699, 2003.

HAUNERLAND, N. H. Insect storage proteins: gene families and receptors. **Insect Biochem. Mol. Biol**, n. 26, p. 755-765, 1996.

HENRY, M.; BÉGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J.F; AUPINEL, P.; APTEL, J.; TCHAMITCHIAN, S.; DECOURTYE, A. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. **Science**, v.336, n.6079, p. 348-350, 2012.

HONDA, H.; TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid metabolic activation and inactivation established with coupled nicotinic receptor-CYP3A4 and aldehyde oxidase systems. **Toxicology Letters**, n.161, p.108–114, 2006.

HOPKINS, M.J.G.; FORTUNE-HOPKINS, H.C.; SOTHERS, C.A.. Nocturnal pollination of *Parkia velutina* by Megalopta bees in Amazonia and its possible significance in the evolution of chiropterophily. **J. Trop. Ecol.**, v.16, p.733-746, 2000.

HOPKINS, T.L.; KRAMER, K. J..1992. Insect cuticle sclerotization. **Annual Review of Entomology**, v.37, p.273-302, 1992.

HUANG, Z. Y.; ROBINSON, G. E.; TOBE, S. S.; YAGI, K. J.; STRAMBI, C.; STRAMBI,A.; STAY, B. Hormonal regulation of behavioral development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. **J. Insect Physiol.** n. 37,p. 733-741, 1991.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CANHOS D. A. L.; ALVES, D. A.; SARAIVA A. M.; **Polinizadores no Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais.**, 1. Ed. São Paulo: EDUSP, 25 – 45, 2012.

_____; De JONG, D.; SARAIVA. A.M. (eds.). Bees as Pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting the best practices. Holos, Ribeirão Preto, p.114, 2006

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DE RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). 2012. **Avaliação de risco ambiental de agrotóxicos nas abelhas**. Available in: <<http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/avaliacao-de-risco-ambiental-de-agrotoxicos-no-ibama/pagina-20>> accessed date: 1 Agosto, 2014.

ISAC, P.G.; BOWNES, M. Ovarian and fat body vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. **European Journal of Biochemistry**, v.123, p.527-534, 1982.

JENKINS, S.P.; BROWN, M.R.; LEA, A.O. Inactive prothoracic glands in larvae and pupae of *Aedes aegypti*: ecdysteroid release by tissues in the thorax and abdomen. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, n.22, p.553-559, 1992.

JOHNSON, M.R.; WEN, Z.; SCHULER, M.A.; BEREMBAUM, M.R. Mediation of Pyrethroid Insecticide Toxicity to Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) by Cytochrome P450 Monooxygenases. **Journal Economical Entomology**, v.99, n.4, p.1046-1050. 2006.

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

KAFTANOGLU, O.; LINKSVAYER, T.A.; PAGE, R.E. Rearing honey bees (*Apis mellifera* L.) in vitro: effects of feeding intervals on survival and development. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v.49, n.4, p.311-3117, 2010.

KEVAN, P.G.. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species activity and diversity. **Agricult. Ecosyst. Environ.**, v.74, p.373-393, 1999.

KLEIN, A.M.; VAISSIÈRE, B.E.; CANE, J.H.; DEWENTER, I.S.; CUNMIGHAM, S.A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T.. Importance of crop pollinators in changing landscape for world crops. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v.274, n.7, p.303-313, 2007.

KREMEN, C.; WILLIAMS, N.M.; AIZEN, M.A.; HERREN, B.G.; LEBUHN, G.; MINCKLEY, R.; PACKER, L.; POTTS, S.G.; ROULSTON, T.; DEWENTER, I.S.; VÁSQUEZ, D.P.; WINFREE, R.; ADAMS, L.; CRONE, E.E.; GREENLEAF, S.S.; KEITT, T.H.; KLEIN, A.M.; REGETZ, J.; RICKETTS, T.H. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organism: a conceptual framework for the effects of land-use change. **Ecology Letters**, v.10, n.4, p.299-314, 2007.

KUMAR, K.; ANSARI, B. A. Malathion toxicity: effect on the liver of the fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v.12, p.199–205, 1986.

LEITE, G.L.D.. Entomologia Básica. **Apostila de Entomologia Básica**, Instituto De Ciências Agrárias - Universidade Federal De Minas Gerais (UFMG), p.1-46, 2011.

LEVENBOOK, L.; BAUER, A. C.. The fate of the larval storage protein calliphorin during adult development of *Calliphora vicina*. **Insect Biochem**, v.14, p.77-86, 1984.

LIECHOSCKI, D.A.. **Contribuição dos sistemas da qualidade para o controle de riscos à saúde e ao meio ambiente pelo uso de agrotóxicos.** Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro, 2004.

LINDAUER, M.. Ein Beitrag zur frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. **Zeitschrift fur Vergleichende Physiologie**, v.34, p.299-345, 1952.

LIU, Y; LIU, H; LIU, S; WANG, S; JIANG, R; LI, S. Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. **Archives of insect Biochemistry and Physiology**, v.71, n.1, p.16–30, 2009.

LOCKE, M. COLLINS, J.V. The structure and formation of protein granules in the fat body of an insect. **Journal Cell Biology**, 1965.

_____. The fat body. Microscopy Anatomy of Invertebrates. **Insecta**, n.11B, p.641-686, 1998.

_____. The molt-intermolt cycles in the epidermis and other tissues of an insect *Calpodex ethlius* (Lepidoptera, Hesperidae). **Tissue & Cell**, n.2, p.197-223, 1970.

LOCKE, M.; COLLINS, J.V. Protein uptake in multi vesicular bodies in the moltintermolt cycle of an insect. **Science**, n.158, p.467-469, 1967.

_____. Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. **J. Cell Biol**, n.36, p.153-183, 1968.

_____. Sequestration of protein by the fat body of an insect. **Nature**, n.210, p.552-553, 1966.

LOTERIO, G.A.. **Os genes codificadores de glutationa S-transferases na abelha *Apis mellifera*: expressão, regulação e função durante e após a metamorfose.** 2011. 93 p. Dissertação de Mestrado (Genética) apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

LOURENÇO, C.T.; CARVALHO, S.M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R.C.F. Oral Toxicity of Fipronil Insecticide Against the Stingless Bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.89, p.921-924, 2012.

MAGEE J.; KRAYNACK N.; MASSEY, HCJr.; TELFER, WH. Properties and significance of a riboflavin-binding hexamerin in the hemolymph of *Hyalophora cecropia*. **Arch Insect Biochem Physiol**, n.25, p.137-157, 1994.

MALAGODI-BRAGA, K.S.; KLEINERT, A.D.P. Could *Tetragonisca Angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be effective as strawberry pollinator in greenhouses?. **Aust. J. Agr. Res.**, v.55, p.771-773, 2004.

MALASPINA, O. **Estudo genético da resistência ao DDT e relação com outros caracteres em *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae).** Dissertação de mestrado - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 1979.

_____; SILVA-ZACARIN, E.C.M.. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v.23, p.129-136, 2006.

_____; SOUZA, T.F. Reflexos das aplicações de agrotóxicos nos campos de cultivo para a apicultura brasileira. In: **Anais de XXVII Congresso Brasileiro de Apicultura e III de Meliponicultura**. Belo horizonte, Minas Gerais, CD-ROM, 2008.

_____; STORT, A.C. Sucrose syrup-collecting behavior in Africanized and Caucasian bees and in the descendants of their crossings. **Revista Brasileira de Genética**, v.10, n.3, p.459-469, 1987.

MANRIQUE, W.G.. **Toxicidade aguda, risco ambiental do fipronil para o guarú (*Poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático**. 2009, 56 f.. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

MARTINS, J.R.; NUNES, F. M.F.; CRISTINO, A. S.; SIMÕES, Z.L.P.; BITONDI, M.M.G. The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. **BMC Molecular Biology**, v.11, n.23, 2010.

_____. **Genes de hexamerinas em *Apis mellifera*: busca de funções alternativas durante o desenvolvimento**. 2012.189f. Tese de Doutorado (Genética) apresentada á Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto– Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

MEDE, K. Fipronil: Aquatic Field Dissipation. **Rhône-Poulenc Agricultural Limited**, v.52062, p.240, 1997.

MESSAGE, D. **Principais problemas sanitários em apiários no Brasil**. Disponível em: <<http://hbjunior19.files.wordpress.com/2011/09/djair.pdf>>. Acesso em junho de 2013.

MICHELETTE E.R.F.; SOARES, A.E.E.. Characterization of preimaginal developmentalstages in Africanized honeybee workers (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v.24, p.431-440, 1993.

MICHENER, C.D.. The bees of the world. Baltimore: **The Johns Hopkins University Press**, p.992, 2000.

MOMMAERTS, V.; REYNDERS, S.; BOULET, J.; BESARD, L.; STERK, G.; SMAGGHE, G. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. **Ecotoxicology**. n.19, p.207–215, 2010.

MONGELLI, B.M.. **Análise Morfológica, Histoquímica e Imunoistoquímica do corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) Africanizada expostas ao Inseticida tiametoxam**. 2013. 91 f. Trabalho de Conclusão do Curso em Ciências Biológicas (Bacharelado), Sorocaba, 2013.

MORETI, A.C. et al. Aumento na produção de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) pela ação de insetos polinizadores. **Science Agricultural**, v.53, p.2-3, 1996.

MORSE, R.A.; CALDERONE, N.W.. The value of honeybees as pollinators of U.S. **Bee Culture**, v.128, p.1-15, 2000.

NAGAMANJU, P.; HANSEN, I.A.; BURMESTER T.; MEYER, S, R.; SCHELLER, K.; DUTTA-GUPTA, A. Complete sequence, expression and evolution of two members of the hexamerin protein family during the larval development of the rice moth, *Coccyra cephalonica*. **Insect Biochem Mol Biol**. n. 33, p.73-80, 2003.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER - NPIC. **Fipronil: Technical fact sheet**. 11p., jan. 2009. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/fiptech.pdf>>. Acesso em agosto de 2014.

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

NELSON, J.A.. The embryology of the honey bee. **Nova York: Princeton University Press**, p.282, 1915.

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

NEVES, N. A. **Desenvolvimento dos discos imaginais de operárias de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae) durante a fase larval**. 1984. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Zoologia). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1984.

NICODEMO, D.; MAIOLI, M.; MEDEIROS, H.; GUELFY, M.; BALIEIRA, K.; DE JONG, D.; MINGATTO F.. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.33, p.2070-2075, 2014.

NIJHOUT, H.F.; WHEELER, D. E. Juvenile hormone and physiological basis of insect polymorphism. **Q. Rev. Biol.** n. 57, p.109-133, 1982.

_____. **Insect Hormones**. Princeton, Princeton University Press, 1994.

NOCELLI, R. C. F. **Contribuição à análise do processo de africanização de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae): características do desenvolvimento das glândulas de veneno**. Rio Claro, 2003. 104f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

NOIROT, C.; A. QUENNEDEY.. Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. **Annales dela Société Entomologique de France**, v.2, n.27, p.123-128, 1991.

_____. Fine structure of insect epidermal glands. **Annual Review of Entomology**, v.19, p.61-80, 1974.

NORTOX. **Dimetoato**. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/DIMETOATO500ECNORTOX.pdf>>. Acesso abril de 2014.

NUNES-SILVA, P.; GONÇALVES, L.S.; FRANCOY, T.M.; De JONG, D.. Rate of growth and development time of africanized honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers during ontogenetic development. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v.23, p.325-332, 2006.

OBERLANDER, H. The imaginal discs. In: KERKUT, G.A; GILBERT, L.I. (eds.) **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Pergamon Press, v.2, p.151-182, 1985.

OECD GUIDELINES FOR TESTING CHEMICALS. Honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, single exposure. **Draft**, 2012.

OLIVEIRA, R.A.; ROAT, T.C.; CARVALHO, S.M.; MALASPINA, O.. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology** (Print), v.1, pp.n/a-n/a, 2013.

OLIVEIRA, V.T.P. **Relação entre o corpo gorduroso e a vitelogênese em fêmeas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep.** 2005. 114f. (Doutorado em Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2005.

PAGE, R.E.; SCHEINER, R.; ERBER, J.; AMDAM, G.V.. The development and evolution of division of labour and foraging specialization in a social insect (*Apis mellifera* L.). **Current Topics in Developmental Biology**, v.74, p.253–286, 2006.

PAN, **Pesticide Action Network**. Disponível em: < www.pan-international.org.> Acesso em 25 maio de 2013.

PEARSE, A.G.E. Histochemistry Theoretical and Applied. **London: Jet. Churchill Ltda**, p.965, 1960.

_____. Histochemistry: Theoretical and Applied. **Analytical Technology**, v.2, n.4, p.441-1055, 1985.

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

PHAM-DELÉGUE, M.; DECOURTYE, A.; KAISER, L.; DEVILLERS, J.. Behavioral methods to assess the effects of pesticides on honey bee. **Apidologie**, v.33, n.5, p.425-432, 2002.

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

PORRINI, C.; GHINI, S.; GIROTTI, S.; SABATINI, A. G.; GATTAVECCHIA, E.; CELLI, R. Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. In: J. DEVILLERS; M. H. PHAM-DELÈGUE (eds). **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals**. London, UK: Taylor e Francis, p.187-247, 2002.

PRYOR, M.G.M.. On the hardening of the cuticle of insects. **Proceedings of the Royal Society of London – Series B**, v.128, p.393-407, 1940.

RACHINSKY A.; STRAMBI C.; STRAMBI A.; HARTFELDER K. Caste and Metamorphosis: Hemolymph Titters of Juvenile Hormone and Ecdysteroids in Last Instar Honeybee Larvae. **General and Comparative Endocrinology**, v.79, p.31-38, 1990.

RAMOS, J.M.; CARVALHO, N.C. Estudo Morfológico e Biológico das Fases de Desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v.6, n.10, 2007.

REMBOLD, H. Caste differentiation of the honey bee - fourteen years of biochemical research at Martinsried. In: EDER, J. REMBOLD, H. (Eds.), **Chemistry and Biology of Social Insects**, Peperny, München, 1987b.

_____; KREMER, J.P.; ULRICH, G.M. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honeybee, *Apis mellifera* L. **Apidologie**, n.11, p.29-38, 1980.

ROAT, T.C.; CARVALHO, S.M.; NOCELLI, R.C.F.; SILVA ZACARIN, E.C.M.; PALMA, M.S.; MALASPINA, O. Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of africanized honeybees. **Arch. Environ. Com. Tox.** n. 63, p.1-11, 2013.

ROCHA, L.C.S.; SPINOSA, H.S.. Praguicidas organofosforados e carbamatos: algumas considerações. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.16, n. 1/2, p.41-44, 1992.

ROESSINK, I.; STEEN, J.V.D.; KASINA, M.; GIKUNGU, M.; NOCELLI, R.C.F.. Is the European honeybee (*Apis mellifera mellifera*) a good representative for other pollinators species? In: **SETAC Europe annual meeting**, p 3–35, 2011.

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

ROSSI, C.A.; ROAT, T.C.; TAVARES, D.A.; CINTRA-SOCELOWSKI, P.; MALASPINA, O. Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v.76, p.n/a-n/a, 2013.

ROUBIK, D.W.. Ecology and natural history of tropical bees. **New York, Cambridge Univ. Press**, p.514, 1989.

RUVOLO, M.C.C.; CRUZ-LANDIM, C. Quantitative analysis of the relative volume occupied by oenocytes in the parietal fat body and wax epithelium development in *Apis mellifera* workers. **Revista. Bras. Ent.**, v.39, p.111-114, 1995.

RUVOLO, M.C.C.; CRUZ-LANDIM, C. Oenocytes of honey bee queen (Hymenoptera, Apidae): relationships with ovarian development. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.39, p.297-301, 1995.

SANCHEZ-JUNIOR, J.L.B.; MALERBO-SOUZA, D.T.. Frequência dos insetos na polinização e produção de algodão. **Acta Sci-Agron**, v.26, p.461-465, 2004.

SHELLER K.; FISHER B.; SCHENKEL H. 1990. Molecular properties, functions and developmentally regulated biosynthesis of arylphorin in *Calliphora vicina*. In: HAGERDORN, H. H.; HILDEBRAND, J. G.; KIDWELL, M. G.; LAW, J. H.; (Eds.), **Mol. Insect Sci. Plenum**, 1990.

SCHMIDT-CAPELLA, I.C.; HARTFELDER, K. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. **J. Insect Physiol**, n. 44, p.385–391, 1998.

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

SILVA, J.C. **Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Determinação de Microcistina - LR e Agrotóxicos em Águas Superficiais utilizando as Técnicas de Cromatografia Líquida e Cromatografia Gasosa acopladas a Espectrometria de Massas**. 2010. 170f. Tese de Mestrado apresentada a Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

SILVA, F.A.S.. ASSISTAT 7.7. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2014.

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

_____; SILVA, C.A.S.; TAVARES, D.A.; FERNANDEZ, F.; CARVALHO, S.M.; ROAT, T.C.; MALASPINA, O. Modifications of Aupinel's method for rearing Africanized honeybee brood in laboratory conditions. **Anais do 42º Congresso Internacional de Apicultura (APIMONDIA)**, Buenos Aires, Argentina, 2011.

SMIRLE, J.S.; WINSTON, M.L. Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: an adaptation for foraging in contaminated ecosystems. **Canadian Journal of Zoology**, v.66, p.138-142, 1988.

SNODGRASS, R. E. From germ cells to adults. In: Anatomy of the honey bee. **Comstock Publishing Associates**. Cornell University Press, London, 1956.

SOARES, A.E.E.; De JONG, D.; KERR, W.E. Pesquisas com abelhas no Brasil (Brazilian bee research). **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, p.680, 1992.

SOARES, H.M.; TAVARES, D.A; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; NOCELLI, R.C.F; MALASPINA, O. Mortality of africanized honeybees *Apis mellifera* contaminated with the insecticide imidacloprid. In: **XIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, Guarapari-ES, 2014.

_____. Efeitos sinérgicos entre *Nosema* sp. e o inseticida imidacloprido sobre abelhas *Apis mellifera* africanizada. Relatório científico parcial, processo Fapesp nº2013/09555-5, p.1-39, 2014.

STAROSTA, P.; **Photograph naturalist**, 2007. Disponível em: <http://www.paulstarosta.com/gallery.asp?photo_id=68653>. Acesso em julho de 2014.

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

SUGUMARAN, M.. Molecular mechanisms of cuticular sclerotization. **Advances in Insect Physiology**, v.21, p.179-231, 1998.

SVÁCHA, P. What are and what are not imaginal discs: reevaluation of some concepts (Insect, Holometabola). **Developmental Biology**, New York, US: Academic Press, v.154, p.101-117, 1992.

TAUCHMAN, S, J.; LORCH, J, M.; ORTH, A, P.; GOODMAN, W, G. Effects of stress on the hemolymph juvenile hormone binding protein titers of *Manduca sexta*. **Insect Biochemical Molecular Biology** v. 37, n.8, p.847-854, 2007.

TAVARES, D.A. **Análise morfológica e imunocitoquímica do cérebro de larvas de operárias de *Apis mellifera* submetida aos bioensaios toxicológicos com o inseticida tiametoxam**. 2010. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2011.

_____; SOARES, H.M.; ROAT, T.C.; CARVALHO, S.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; MALASPINA, O. Larval mortality of africanized honey bee *Apis mellifera* after exposition to thiamethoxam. In: **International Conference on Pollinator Biology, Health and Policy**, Pensilvânia- Estados Unidos, 2013.

TELFER, W. H.; KUNKEL, J. G. The function and evolution of insect storage hexamers. **Ann. Rev. Entomol**, n. 36, p. 205-228. 1991.

THOMPSON, H.M. Behavioural effects of pesticides in bees- their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, v.12, p.317-300, 2003.

THOMPSON, P.R.. Histological development of cuticle in the worker honeybee, *Apis mellifera adansonii*. **Journal of Apicultural Research**, v.17, p.32-40, 1978.

TINGLE, C.C.; ROTHER, J.A.; DEWHURST, C.F.; LAUER, S.; KING, W.J. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v.176, pp.1-66, 2003.

TRAUTMANN, K. H.; MASNER, P.; SCHULER, A.; SUCHI, M.; WIPF, H. K. Evidence of the JH methyl (20E, 6E-10,11-epoxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadienoate (JHIII) in insects of 4 orders. **Z. Naturforsch**, n. 29c, p.161-168, 1974.

TREMOLADA, P.; BERNARDINELLI, I.; COLOMBO, M.; SPREAFICO, M.; VIGHI, M.. Coumaphos distribution in the hive ecosystem: case study for modeling applications. **Ecotoxicology**, v.13, n.6, p.589-601, 2004.

TSIGOURI, A.D.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U.; THASYVOULOU, A.; DIAMANTIDIS, G.. Fluvinate residues in honey and bees wax after different colony treatments. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.72, p.975-982, 2004.

UNITED NATIONS ENVIRONMENTAL PROGRAMME – UNEP. **Green economy report: a preview.** 2010. Disponível em: <http://www.unep.org/pdf/GreenEconomyReportPreview_v2.0.pdf>. Acessado em 10 de outubro de 2014.

VAISSIÈRE, B.E.; FREITAS B.M.; GEMMILL-HERREN, B. Protocol to detect and assess pollination déficits in crops: a handbook for its use. **(FAO) Food and Agriculture Organization**, Roma, IT, 2011.

Van GESTEL, C.A.M; Van BRUMMELEN, T.C.. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, n.5, p.217-225, 1996.

VanENGELSDORP, D.; EVANS, J.D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D.R.; PETTIS, J.S.. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. **PLoS ONE**, v.4, p.e6481, 2009.

VIDAU, C.; DIOGON, M.; AUFAUVRE, J.; FONTBONNE, R.; VIGUES, B.; BRUNET, J.-L.; TEXIER, C.; BIRON, B.G.; BLOT, N.; EL ALAOU, H.; BELZUNCES, L.P.; DELBAC, F. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. **PLoS ONE**, v.6, n.6, 2011.

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

WIGGLESWORTH, V. B. Hormones controlling growth and development in insects. In: GOODWIN, J. W. **Aspects of insect biochemistry**. New York: Academic Press, p.79-82, 1965.

WILKINS, S.; JARRATT, N.; HARKIN, S.; THOMPSON, H.; COULSON, M. Effects of solvent on the toxicity of dimethoate in a honey bee *in vitro* larval study. **Pest Manag Sci.**, v.69,n.4, p.462-463, 2013.

WINSTON, M.L. The Biology of the honey bee. **Harvard University Press**, p.4-109, 1991.

_____. **A Biologia da Abelha**. Porto Alegre: Ed. Magister LTDA, 2003.

YANG D.; LI, Y.; YUAN, X.; MATONEY, L.; YAN, B. Regulation of rat carboxylesterase expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): a dose-dependent decrease in mRNA levels but a biphasic change in protein levels and activity. **Toxicology Science** v. 64, n.1, p.20-27, 2001.

YU, S.J.; ROBINSON, F.A.; NATION, J.L. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.22, n.3, p.360-368, 1984.

ZALEWSKA, M.; KOCHMAN, A.; ESTÈVE, J,P.; LOPEZ, F.; CHAOUI, K.; SUSINI, C.; OZYHAR, A.; KOCHMAN, M. Juvenile hormone binding protein traffic – interaction with ATP synthase and lipid transfer proteins. **Biochim Biophys Acta**, n. 1788, p. 1695-1705, 2009.

ZITNAN, D.; ADAMS, M.E.. Neuroendocrine Regulation of Insect Ecdysis. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. (Eds.), **Comprehensive Molecular Insect Science**, v.4, 2005.

_____; KIM, Y.J.; ZITNANOVÁ, I.; ROLLER, L.; ADAMS, M.E.. Complex steroid-peptide-receptor cascade controls insect ecdysis. **Gen. Comp. Endocrinol**, n.153, p.88-96, 2007.