

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

TOXICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA EM ABELHAS DO  
GÊNERO *Tetragonisca* APÓS A CONTAMINAÇÃO COM  
AGROTÓXICOS

Autora: Ana Lúcia Paz Barateiro Stuchi  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki  
Co-orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
dezembro – 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

TOXICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA EM ABELHAS DO  
GÊNERO *Tetragonisca* APÓS A CONTAMINAÇÃO COM  
AGROTÓXICOS

Autora: Ana Lúcia Paz Barateiro Stuchi  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki  
Co-orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração: Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
dezembro – 2009

### Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Stuchi, Ana Lúcia Paz Barateiro

S932t Toxicidade e expressão gênica em abelhas do gênero *Tetragonisca* após a contaminação com agrotóxicos / Ana Lúcia Paz Barateiro Stuchi. -- Maringá : [s.n.], 2009.

102 f.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

Tese (doutorado) - Departamento de Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá, 2009.

1. Abelhas. 2. Sem ferrão. 3. Bioindicador. 4. Bioenzimas. 5. Esterases. I. Título.

CDD 21.ed.638.1



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**TOXICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA EM ABELHAS  
DO GÊNERO *Tetragonisca* APÓS A CONTAMINAÇÃO  
COM AGROTÓXICOS**

Autora: Ana Lúcia Paz Barateiro Stuchi  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 09 de dezembro de 2009.

Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi

Prof. Dr. Wagner de Alencar  
Arnaud de Toledo

Prof. Dr. Hélio Conte

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Silvia Lapenta

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Cláudia Colla  
Ruvolo Takasusuki  
(Orientadora)

*“Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão, que o amor  
existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas.  
Que a vida é bela sim e que eu sempre dei o melhor de mim...  
E que valeu a pena!!!”*

*Mário Quintana*

Ao meu pai Victor Manuel Ribeiro Barateiro (*in memoriam*), por todo amor, carinho, dedicação, por me ensinar a vencer cada vez mais os desafios em minha vida. Pai, obrigado por tudo que você foi na minha vida, pelo incentivo em sempre continuar em frente, pela sua presença em todos os momentos da minha vida e, principalmente, por me ensinar a viver um dia de cada vez.

À minha mãe Jesusa Paz Barateiro, simplesmente por ser essa mulher forte e batalhadora, que sempre me incentivou a continuar.

Com muito amor, dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua bondade e proteção em todos os momentos.

À minha orientadora, Prof<sup>ta</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, pela dedicada orientação, paciência, atenção, carinho e, principalmente, pelos seus ensinamentos e por ser uma pessoa amiga em todos os momentos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo, pelo incentivo, amizade, atenção e, especialmente, por sempre estar ao meu lado quando precisei.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, em especial à professora Dr<sup>a</sup> Ana Silvia Lapenta, pelos preciosos ensinamentos durante o curso de Doutorado.

Ao professor Dr. José Ricardo Penteado Falco, pela grande e valiosa ajuda nas análises citoquímicas do trabalho e pelos seus ensinamentos.

Ao Sr. Ilton Claudio Stuchi que forneceu as colmeias de jataí, tão importantes para este estudo.

Ao Sr. João Aguinaldo Nunes e ao Sr. Celso Ademilson Vignoto que forneceram os inseticidas utilizados no presente estudo.

À grande “família” de alunos do laboratório, pela convivência, por todo carinho e pelos momentos de descontração, em especial aos amigos Aline Ribeiro Bronzato, Juliana Mosconi Magro, Maycon Beviláqua e Denis Bassi.

Às minhas grandes amigas Denise Alves Lopes, Juliana Bueno Ruiz, Liriana Belizário Cantagalli e Tatiane Vicente Baitala, pela ajuda, troca de ideias, por todo carinho e por sempre me ouvirem.

À aluna Simone Aparecida dos Santos, pela grande ajuda nas análises citoquímicas do trabalho.

Aos funcionários do laboratório Sérgio Luiz Calvi, Leila Andréia Frota e Rosângela Aparecida de Souza, pela sua colaboração.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade, e à Capes, pela bolsa de estudo concedida.

A toda a minha família, que foi indispensável neste momento da minha vida, em especial, ao meu pai Victor Manuel Ribeiro Barateiro (*in memoriam*), à minha mãe Jesusa Paz Barateiro, minha irmã Maria Rosa Paz Barateiro Vignoto, meu irmão Vitor Manuel Paz Barateiro, minha cunhada Ana Paula Ganem Rillo Paz Barateiro, meu cunhado Celso Ademilson Vignoto e os meus sobrinhos Carolina Paz Barateiro Vignoto, João Vitor Ganem Rillo Paz Barateiro e Letícia Ganem Rillo Paz Barateiro.

Ao meu marido Juliano Lucarelo Stuchi, por toda ajuda, amor, dedicação e paciência. À minha filhinha Juliana Paz Barateiro Stuchi, simplesmente por seu sorriso.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma maneira para realização de mais esta etapa da minha vida.



## BIOGRAFIA

ANA LÚCIA PAZ BARATEIRO STUCHI, filha de Victor Manuel Ribeiro Barateiro (in memoriam) e Jesusa Paz Barateiro, nasceu em Maringá – PR, em 08 de março de 1978.

Em março de 1996, iniciou o Curso de Graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá, o qual foi concluído em 2001.

Em 2004, ingressou no curso de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração: Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Apicultura.

No dia 12 de abril de 2006, submeteu-se à banca examinadora para defesa da Dissertação.

Em 2006, iniciou no Curso doutorado no mesmo curso de Pós-graduação e na mesma área.

No dia 9 de dezembro de 2009, submeteu-se à banca examinadora para defesa da Tese.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
I - INTRODUÇÃO GERAL .....	1
Referências .....	19
II - OBJETIVOS GERAIS .....	29
III - Marcador molecular para identificar duas espécies de jataí: <i>Tetragonisca angustula</i> e <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (Hymenoptera, Meliponinae) .....	30
Abstract.....	30
Introdução .....	31
Material e métodos .....	33
Resultados.....	34
Discussão .....	35
Agradecimentos.....	38
Resumo geral.....	38
Referências.....	39
IV - Alterações da expressão gênica em <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (Schwarz, 1938) após contaminação com agrotóxicos .....	46
Abstract.....	46
Introdução .....	47
Material e métodos .....	49

Resultados.....	52
Discussão.....	54
Agradecimentos.....	57
Resumo geral.....	58
Referências.....	59
V - Avaliação da toxicidade de agrotóxicos em <i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille, 1811).....	73
Abstract.....	73
Introdução.....	74
Material e métodos.....	76
Resultados.....	79
Discussão.....	80
Agradecimentos.....	84
Resumo geral.....	84
Referências.....	85
VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
VII - ARTIGO VULGARIZAÇÃO.....	99

## LISTA DE TABELAS

	Página	
<b>III.</b>	<b>Marcador molecular para identificar duas espécies de jataí: <i>Tetragonisca angustula</i> e <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (Hymenoptera, Meliponinae)</b>	
Tabela I.	Atividade e classificação das esterases com a utilização de inibidores em <i>Tetragonisca fiebrigi</i> e <i>Tetragonisca angustula</i> . (+) inibição, (-) não inibição.....	42
Tabela II.	Alteração na atividade das esterases de <i>Tetragonisca fiebrigi</i> e <i>Tetragonisca angustula</i> após aquecimento. (++) inibição total, (+) inibição parcial, (-) não inibição.....	43
<b>IV.</b>	<b>Alterações da expressão gênica em <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (Schwarz, 1938) após contaminação com agrotóxicos</b>	
Tabela I.	Concentrações letais a 50% (CL <sub>50</sub> ) das abelhas <i>Tetragonisca fiebrigi</i> submetidas ao fipronil, malathion, neem e thiamethoxam, tanto por contato (papel filtro) como por ingestão (alimento).....	62
Tabela II.	Inibição da atividade das esterases detectada em <i>Tetragonisca fiebrigi</i> após contato com fipronil, malathion e thiamethoxam. (-) ausência de inibição; (++) aumento de intensidade da banda.....	63
Tabela III.	Inibição da atividade das esterases detectada em <i>Tetragonisca fiebrigi</i> após ingestão de fipronil, malathion e thiamethoxam. (-) ausência de inibição; (+) inibição parcial.....	64
Tabela IV.	Respostas de basofilia nuclear da cromatina do cérebro de operárias de <i>Tetragonisca fiebrigi</i> após contaminação por contato e ingestão com o inseticida malathion, coradas com Azul de Toluidina (AT) 0,025% adicionado de MgCl <sub>2</sub> em diferentes concentrações.....	65

Tabela V.	Respostas de basofilia nuclear da cromatina do cérebro de operárias de <i>Tetragonisca fiebrigi</i> após contaminação por contato e ingestão com o inseticida thiamethoxam, coradas com Azul de Toluidina (AT) 0,025% adicionado de MgCl <sub>2</sub> em diferentes concentrações.....	66
<b>V.</b>	<b>Avaliação da toxicidade de agrotóxicos em <i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille, 1811)</b>	
Tabela I.	Concentrações letais a 50% (CL <sub>50</sub> ) das abelhas <i>Tetragonisca angustula</i> submetidas ao fipronil, malathion, neem e thiamethoxam, tanto por contato (papel filtro) como por ingestão (alimento).....	89
Tabela II.	Inibição da atividade das esterases detectada em <i>Tetragonisca angustula</i> após contato com malathion e thiamethoxam. (-) ausência de inibição; (+) inibição parcial.....	90
Tabela III.	Inibição da atividade das esterases detectada em <i>Tetragonisca angustula</i> após ingestão de malathion e thiamethoxam. (-) ausência de inibição; (+) inibição parcial.....	91
Tabela IV.	Respostas de basofilia nuclear da cromatina do cérebro de operárias de <i>Tetragonisca angustula</i> após contaminação por contato e ingestão com o inseticida malathion, coradas com Azul de Toluidina (AT) 0,025% adicionado de MgCl <sub>2</sub> em diferentes concentrações.....	92
Tabela V.	Respostas de basofilia nuclear da cromatina do cérebro de operárias de <i>Tetragonisca angustula</i> após contaminação por contato e ingestão com o inseticida thiamethoxam, coradas com Azul de Toluidina (AT) 0,025% adicionado de MgCl <sub>2</sub> em diferentes concentrações.....	93

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Vista lateral de tórax de <i>Tetragonisca angustula</i> (jataí). <b>A:</b> Mesepisterno preto de <i>T. a. angustula</i> Latreille. <b>B:</b> Mesepisterno amarelo de <i>T. a. fiebrigi</i> Schwarz. (Fotos de Eliana B. Castanheira).....	4
Figura 2. Vista da entrada do ninho de <i>Tetragonisca angustula</i> Latreille (jataí) (Foto de Juliano Lucarelo Stuchi).....	6
Figura 3. Favos de cria e a rainha de <i>Tetragonisca angustula</i> Latreille (jataí) (Kerr 1996).....	6
 <b>III. Marcador molecular para identificar duas espécies de jataí: <i>Tetragonisca angustula</i> e <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (Hymenoptera, Meliponinae)</b>	
Figura 1. Perfil eletroforético das esterases em gel de poliacrilamida. A = extratos de cabeça/tórax de operárias de <i>Tetragonisca fiebrigi</i> e B = extratos de cabeça/tórax de operárias de <i>Tetragonisca angustula</i> .....	44
Figura 2. Perfil eletroforético de esterases em teste de termoestabilidade. Amostras 1-2, 5-8 e 13-16 correspondem a extratos de cabeça/tórax de operárias de <i>Tetragonisca angustula</i> ; amostras 3-4, 9-12 e 17-20 correspondem a extratos de cabeça/tórax de <i>Tetragonisca fiebrigi</i> .....	45
 <b>IV Alterações da expressão gênica em <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (Schwarz, 1938) após contaminação com agrotóxicos</b>	
Figura 1. Curva de regressão (sigmoide) para os valores de mortalidade em diferentes concentrações dos inseticidas fipronil, malathion e thiamethoxam, na contaminação por contato. A = fipronil com $R^2 = 0,993$ ; B = malathion sem $R^2$ ; C = thiamethoxam com $R^2 = 0,682$ .....	67

Figura 2.	Curva de regressão (sigmoide) para os valores de mortalidade em diferentes concentrações dos inseticidas fipronil, malathion e thiamethoxam na contaminação por ingestão. A = fipronil com $R^2 = 0,728$ ; B = malathion com $R^2 = 0,639$ ; C = thiamethoxam com $R^2 = 0,902$ .....	68
Figura 3.	Perfil eletroforético das esterases de extratos de cabeça/tórax de <i>Tetragonisca fiebrigi</i> mostrando a EST-4 com aumento da intensidade da banda, após contaminação por contato com o inseticida thiamethoxam na concentração de 0,9%.....	69
Figura 4.	Perfil das proteínas totais de extratos de cabeça/tórax de <i>Tetragonisca fiebrigi</i> mostrando a região com redução da expressão da proteína p19 após contaminação por contato com o inseticida malathion na concentração de 0,0017%.....	70
Figura 5.	Células nervosas de <i>Tetragonisca fiebrigi</i> , contaminadas com o inseticida malathion por ingestão (0,4%), coradas com Azul de Toluidina na presença e ausência de cloreto de magnésio. Células com indício de apoptose. Microscópio óptico com aumento 1000x mais o aumento de 3x da máquina digital.....	71
Figura 6.	Células nervosas de <i>Tetragonisca fiebrigi</i> , contaminadas com o inseticida thiamethoxam por contato (0,85%), coradas com Azul de Toluidina na presença e ausência de cloreto de magnésio. A = controle (núcleos metacromáticos – violeta); B = ponto de CEC (ausência de metacromasia). Microscópio óptico com aumento 1000x mais o aumento de 3x da máquina digital.....	72
<b>V. Avaliação da toxicidade de agrotóxicos em <i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille, 1811)</b>		
Figura 1.	Curva de regressão (sigmoide) para os valores de mortalidade em diferentes concentrações dos inseticidas fipronil, malathion e thiamethoxam na contaminação por contato. A = fipronil com $R^2 = 0,957$ ; B = malathion com $R^2 = 0,644$ ; C = thiamethoxam com $R^2 = 0,948$ .....	94
Figura 2.	Curva de regressão (sigmoide) para os valores de mortalidade em diferentes concentrações dos inseticidas fipronil, malathion e thiamethoxam na contaminação por ingestão. A = fipronil com $R^2 = 0,997$ ; B = malathion com $R^2 = 0,976$ ; C = thiamethoxam com $R^2 = 0,876$ .....	95
Figura 3.	Perfil eletroforético das esterases de extratos de cabeça/tórax de <i>Tetragonisca angustula</i> , mostrando a inibição parcial da EST-3 e EST-4, após contaminação por contato com o inseticida malathion na concentração de 0,003%.....	96

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar alterações ocorridas na expressão gênica de abelhas do gênero *Tetragonisca* após contaminação com agrotóxicos para, posteriormente, utilizar esses insetos como bioindicadores de agrotóxicos. Nesse sentido, foi inicialmente estimada a  $CL_{50}$  e a correlação concentração-mortalidade para os inseticidas utilizados, com o intuito de empregar concentrações subletais nas análises posteriores. Em seguida, foi desenvolvida a caracterização bioquímica das esterases para entender alterações decorrentes da contaminação pelos agrotóxicos. Finalmente, foram realizados bioensaios para avaliação, por meio dos marcadores moleculares, das possíveis alterações ocorridas nas operárias de *Tetragonisca*. Os marcadores moleculares empregados foram as isoenzimas e proteínas totais, além disso, a técnica de CEC (concentração crítica de eletrólitos) foi utilizada para detectar alterações de expressão gênica. Os inseticidas utilizados foram fipronil, malathion, thiamethoxam e neem. Operárias das espécies *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi* foram coletadas em ninhos localizados na Universidade Estadual de Maringá. Com relação à caracterização bioquímica das esterases foi possível observar na espécie *T. fiebrigi* três regiões: EST-1 ( $\beta$ -esterase, colinesterase I), EST-2 ( $\alpha$ -esterase, colinesterase II) e EST-4 ( $\alpha\beta$ -esterase, carboxilesterase) e na espécie *T. angustula* foram observadas duas regiões esterásicas; EST-3 ( $\beta$ -esterase, acetilesterase) e EST-4 ( $\alpha\beta$ -esterase, carboxilesterase). EST-3 de *T. angustula* apresentou a maior termoestabilidade, pois sua atividade não foi mais detectada a partir de 54°C, enquanto em *T. fiebrigi* as EST-1 e EST-2 não foram detectadas a partir de 52°C. Nas duas espécies, a EST-4 parece ser codificada pelo mesmo gene, pois apresentou o mesmo perfil eletroforético, de inibição e de termoestabilidade. As outras esterases são espécies específicas, EST-1 e EST-2 somente foram observadas em *T. fiebrigi* e EST-3 em *T. angustula*. Esse estudo corrobora a ideia



de que o gênero *Tetragonisca* é composto pelas duas espécies. Os valores de  $CL_{50}$  mostraram alta toxicidade para o fipronil na contaminação por contato para a espécie *T. angustula* (0,00053%) e *T. fiebrigi* (0,00062%). Com relação às esterases, em *T. angustula* foram observadas inibições parciais da EST-3 e EST-4 com o inseticida malathion por contato na concentração 0,003% e com o thiamethoxam (0,1%), e apenas da EST-4 na concentração 0,0025% com malathion. Nessa espécie quando a contaminação foi realizada por ingestão, houve inibição parcial da EST-3 na concentração 1% e EST-4 nas concentrações 1% e 2%. Para *T. fiebrigi* foi detectado aumento na intensidade da EST-4 quando a contaminação foi realizada por contato a 0,9% com thiamethoxam. Ainda em *T. fiebrigi*, quando o malathion foi misturado ao alimento, nas concentrações 0,2% e 0,45%, foi observada inibição parcial da EST-4, porém quando o inseticida usado foi o fipronil, nas mesmas concentrações, além da EST-4 foi observada inibição parcial da EST-1 (0,0012%). Nas análises das proteínas totais, apenas em *T. fiebrigi*, foi detectada redução na expressão do peptídeo p19 (70-80 kDa), após contaminação por contato com o inseticida malathion na concentração de 0,0017%. Para o inseticida neem não foi observada mortalidade de abelhas nas concentrações utilizadas nas duas espécies estudadas. Na análise de CEC, após contaminação com malathion, foram detectadas diferentes formas de alteração da estrutura da cromatina em *T. fiebrigi*. Na contaminação por contato ocorreu relaxamento da cromatina indicando aumento de síntese de proteínas, e por ingestão houve maior condensação da cromatina. Nas *T. angustula* foi observada uma pequena alteração no valor de CEC quando a contaminação ocorreu na ingestão. O inseticida thiamethoxam promoveu pequena alteração na estrutura da cromatina das duas espécies na contaminação por ingestão. Nas análises de CEC, após contaminação com malathion por ingestão, foram detectados indícios de células em apoptose para as duas espécies, e nas *T. fiebrigi* foi observado também maior número de células com essas características. As alterações na atividade relativa das esterases, de proteínas totais e da estrutura de cromatina permitem concluir que as abelhas *T. angustula* e *T. fiebrigi* poderão ser utilizadas como bioindicadores da presença dos agrotóxicos fipronil, thiamethoxam e malathion e que os marcadores moleculares utilizados poderão se tornar ferramentas importantes para a detecção de resíduos desses compostos em agroecossistemas.

Palavras-chave: sem ferrão, jataí, bioindicador, isoenzimas, esterases, CEC,  $CL_{50}$

## ABSTRACT

**Toxicity and gene expression in stingless bees of the genus *Tetragonisca* after contamination with pesticides.** The goal of this study was to evaluate alterations on the gene expression of *Tetragonisca* bees after contamination with pesticides to subsequently use these insects as insecticide bioindicators. For that purpose, the LC<sub>50</sub> and the concentration-mortality correlation were initially estimated for the insecticides in order to use sub-lethal concentrations in further analyses. Next, it was developed the biochemical characterization of the esterases to understand alterations due to contamination by pesticides. Finally, experiments were conducted to evaluate possible alterations in *Tetragonisca* workers by means of molecular markers. Molecular markers used were esterase isoenzymes and total protein; in addition, the technique of CEC (critical electrolyte concentration) was used to detect alterations in gene expression. The insecticides used were fipronil, malathion, neem and thiamethoxam. *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi* workers were collected from nests at the State University of Maringá. As for the biochemical characterization of the esterases, three regions were observed in *T. fiebrigi*: EST-1 ( $\beta$ -esterase, cholinesterase I), EST-2 ( $\alpha$ -esterase, cholinesterase II) and EST-4 ( $\alpha\beta$ -esterase, carboxylesterase) and in *T. angustula* two esterase regions were observed: EST-3 ( $\beta$ -esterase, acetylesterase) and EST-4 ( $\alpha\beta$ -esterase, carboxylesterase). The EST-3 of *T. angustula* showed the highest thermostability, because its activity was detected up to 54°C, while in *T. fiebrigi* EST-1 and EST-2 were not detected above 52°C. In both species EST-4 is probably encoded by the same gene, and showed the same electrophoretic profile, inhibition and thermostability. The other esterases are species-specific: EST-1 and EST-2 were only observed in *T. fiebrigi* and EST-3 in *T. angustula*. This study supports the idea that the genus *Tetragonisca* consists of two species. The LC<sub>50</sub> values showed a high toxicity by

contact for fipronil in *T. angustula* (0.00053%) and *T. fiebrigi* (0.00062%). Regarding the esterases in *T. angustula*, it was observed partial inhibition of EST-3 and EST-4 by contact with the insecticide malathion at the 0.003% concentration and with thiamethoxam (0.1%), and only the EST-4 concentration 0.0025% with malathion. In the species where contamination occurred by ingestion, there was partial inhibition of EST-3 at 1% and EST-4 at concentrations of 1% and 2%. In *T. fiebrigi* it was detected an increase in the relative activity of EST-4 when the contamination was performed by contact with thiamethoxam (0.9%). In this species, when malathion was mixed with food, the concentrations of 0.2% and 0.45% caused partial inhibition of EST-4, but when the insecticide fipronil was used in the same concentrations, it was observed partial inhibition of EST-1 (0.0012%) in addition to EST-4. As for the analysis of total proteins, only *T. fiebrigi* showed reduced expression of p19 peptide (70-80 kDa) after contamination by contact with the insecticide malathion (0.0017%). For the neem insecticide, mortality was not observed in any of the species of bees at the concentrations used. In the analysis of CEC after contamination with malathion, different ways to modify the chromatin structure in *T. fiebrigi* were detected. Contamination by contact caused chromatin relaxation, indicating increased protein synthesis, while ingestion resulted in higher chromatin condensation. In *T. angustula* it was observed a slight alteration in the CEC value when the contamination occurred by ingestion. Thiamethoxam promoted the smallest alteration in chromatin structure of the two species in the contamination by ingestion. In the analysis of CEC after contamination with malathion by ingestion, evidence of apoptosis in cells of both species was detected, and in *T. fiebrigi* more cells with these characteristics were observed as well. The changes in the relative activity of esterases, total protein and chromatin structure lead to the conclusion that stingless bees *T. angustula* and *T. fiebrigi* could be used as indicators of the presence of the insecticides fipronil, thiamethoxam and malathion and the molecular markers used may become important tools for the detection of residues of these compounds in agroecosystems.

Keywords: stingless bee, jataí, bioindicator, isoenzymes, esterases, CEC, LC<sub>50</sub>

## I – INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas sem ferrão estão entre os polinizadores mais comuns nos ambientes tropicais e em determinadas regiões são as abelhas dominantes, visitando várias culturas (Macías-Macías et al., 2009). Estes insetos são um grupo diverso, o qual inclui mais de 400 espécies que mostram alta variabilidade na fisiologia, morfologia e tamanho, desde 0,2 mm no gênero *Trigonisca* a mais de 20 mm em algumas espécies de *Melipona* (Michener, 2000; Moure et al., 2007).

As abelhas do gênero *Tetragonisca* possuem destacada importância ecológica e econômica. O extrativismo de mel, cerume e resinas dessas abelhas é amplamente disseminado, principalmente, no Norte e Nordeste do Brasil (Menezes-Pedro e Camargo, 2000). Rica cultura com relação às abelhas sem ferrão pode ser encontrada, ainda hoje, entre os povos indígenas, como os índios Kayapó, por exemplo (Camargo e Possey, 1990).

A contribuição mais significativa, entretanto, está na atuação das abelhas como agentes polinizadores, peças-chave na manutenção da diversidade florística e do equilíbrio ecológico na maioria dos ecossistemas terrestres. Um dos efeitos diretos disso pode ser visto no aumento da produtividade de plantas cultivadas, por meio da introdução de ninhos de abelhas em áreas de cultivo (Menezes-Pedro e Camargo, 2000).

O trabalho polinizador das abelhas é de crescente importância para a produção de cereais, café, algodão e frutas de diferentes espécies. Sabe-se que mais de 40% da produção agrícola brasileira depende da polinização entomófila na qual as abelhas têm o maior destaque (Sommer, 1997).

Os polinizadores e a reprodução vegetal estão intensamente relacionados e a ação das abelhas como polinizadores torna-se o elemento crucial no funcionamento de quase todos os ecossistemas terrestres. Em um estudo com 186 espécies de plantas com flores,

46% mostraram-se limitadas reprodutivamente pela ausência ou insuficiência de agentes polinizadores, o que evidencia a grande importância dos mesmos em ambientes naturais (Nabhan e Buchmann, 1997; Orth e Matos, 2000; Malaspina et al., 2008). No entanto, o uso indiscriminado e irracional de agrotóxicos nos agroecossistemas, especialmente de inseticidas, pode ocasionar desequilíbrio da população de abelhas que visitam estes locais (Malaspina et al., 2008).

O estudo dos efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas é fundamental, uma vez que o agricultor deve saber selecionar e aplicar produtos fitossanitários, de forma tal a controlar as pragas e doenças sem colocar em risco a sobrevivência dos insetos benéficos (Wolff, 2000).

A presença de resíduos de pesticidas é usualmente determinada por métodos físicos, químicos e biológicos e a simplicidade dos bioensaios contribui para a aceitação da análise de resíduos no campo. Teoricamente, qualquer organismo que seja susceptível a um inseticida pode ser usado nestes bioensaios, em qualquer amostra ambiental, servindo como bioindicador para a detecção de certos poluentes. A susceptibilidade das abelhas a vários agrotóxicos, comumente usados na proteção de plantações, possibilitou que elas fossem usadas como um bioindicador para a determinação da presença de seus resíduos, bem como para detectar a toxicidade deles para as abelhas (Mansour, 1987).

A avaliação e a contribuição de possíveis efeitos subletais de pesticidas nas abelhas têm sido objeto de discussão por cientistas e órgãos reguladores (Thompson e Maus, 2007). Os efeitos considerados por esses autores incluem alterações no comportamento de aprendizagem e capacidade de orientação.

Aliado ao estudo de doses subletais de pesticidas, as alterações na expressão de isoenzimas como as esterases, que estariam atuando no metabolismo de xenobióticos das abelhas, é mais uma das maneiras de se utilizar esses insetos como bioindicadores.

Rossiter et al. (2001) sugerem que a eletroforese é uma ferramenta eficaz para uma detecção simples e rápida da resistência pela atividade esterásica, sendo mais eficiente do que a determinação quantitativa dessas enzimas pelo fato de sua capacidade para detectar tanto diferenças quantitativas quanto qualitativas.

Pela importância das abelhas como polinizadores, o frequente convívio da apicultura com a agricultura, e a presença de áreas com matas naturais nas proximidades das agriculturáveis, torna-se necessário o estudo dos efeitos subletais que os pesticidas causam nas abelhas. Uma das maneiras de realizar este estudo é por meio de análises

eletroforéticas das esterases, verificando se há ausência de alguma região esterásica, sendo assim possível utilizar esta região como um marcador molecular para detectar a presença de determinado pesticida na região.

### ***Abelhas nativas sem ferrão***

As abelhas sociais nativas do Brasil, conhecidas popularmente por abelhas indígenas sem ferrão, encontram-se reunidas na superfamília Apoidea. Entre essas abelhas, as pertencentes à subfamília Meliponinae são as mais conhecidas (Nogueira-Neto, 1997).

Os meliponíneos tiveram origem na parte Oeste do continente Gondwana, hipótese que é sustentada pelos registros fósseis e pela biogeografia (Camargo e Menezes-Pedro, 1992). Estes ocupam grande parte das regiões de clima tropical e temperado subtropical do planeta (Nogueira-Neto, 1997). Ao Sul, sua distribuição chega até 35°S na Austrália e América do Sul, até 28°S na África e ao Norte, o limite de sua distribuição alcança o Trópico de Câncer (Michener, 2000).

No Brasil, o limite ao Sul está no Estado do Rio Grande do Sul, nas proximidades da fronteira com o Uruguai (Nogueira-Neto, 1997). No entanto, a maior abundância e diversidade dessas abelhas ocorrem nos neotrópicos (Camargo e Menezes-Pedro, 1992).

Um dos principais locais de ocorrência dos meliponíneos é o Brasil, sendo estes de grande importância para a ecologia de diversos ecossistemas, por exemplo, a polinização de grande parte da Mata Atlântica (Kerr et al., 1996). Conforme o ecossistema, essas abelhas são responsáveis por 40 a 90% da polinização das árvores nativas (Kerr, 1996).

As abelhas sem ferrão provêm evolutivamente de um grupo de vespas que deixaram de transmitir caracteres genéticos para a formação do ferrão a seus descendentes (Alonso, 1998). A explicação para a perda do ferrão neste grupo de abelhas, provavelmente, está relacionada ao fato da colônia não ficar exposta quando as abelhas enxameiam e a construção dos ninhos ocorrer, geralmente, em lugares bem protegidos (Alonso e Paim, 2001).

Segundo Moure (1961), na subfamília Meliponinae podem ser consideradas duas tribos: Meliponini e Trigonini. Os Meliponini se caracterizam por não construírem células reais, dessa forma, rainhas, operárias e machos nascem e desenvolvem-se até o

estágio adulto em células de cria de igual tamanho. Os Trigonini constituem um grupo muito diversificado, com dezenas de gêneros e constroem quase sempre células reais, maiores que as outras, de onde emergem as futuras rainhas (Nogueira-Neto, 1997).

As abelhas jataí podem ser classificadas com diferentes nomenclaturas dependendo do autor investigado. No estudo realizado por Castanheira (1995), a espécie *Tetragonisca angustula* seria composta por duas subespécies: *Tetragonisca angustula angustula* (Latreille, 1811) e *Tetragonisca angustula fiebrigi* (Schwarz, 1938). Estas duas subespécies podem ser separadas morfologicamente por meio da coloração do mesepisterno (Fig. 1), a subespécie *T. angustula angustula* possui o mesepisterno preto (Fig. 1A) e a *T. angustula fiebrigi* possui o mesepisterno amarelo (Fig. 1B).



**Figura 1.** Vista lateral de tórax de *Tetragonisca angustula* (jataí). **A:** Mesepisterno preto de *T. a. angustula* Latreille. **B:** Mesepisterno amarelo de *T. a. fiebrigi* Schwarz. (Fotos de Eliana B. Castanheira).

Contudo, Camargo e Pedro (2007) classificaram o gênero *Tetragonisca* em duas espécies *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi*. A jataí possui um nicho ecológico muito peculiar e convive bem nas Américas com muitos meliponíneos e com abelhas de outros grupos. Ela está bem adaptada, inclusive nas grandes cidades como São Paulo, onde há poucas abelhas nativas. Vive também, em lugares onde há muitas outras abelhas nativas e muitas colônias de *Apis mellifera*, como na região Sudeste do Brasil (Nogueira-Neto, 2001).

Esta abelha nidifica em cavidades de troncos vivos ou mortos, em paredes, no chão e em tubulações, sendo uma espécie que se adapta às diferentes condições de nidificação ocorrendo, frequentemente, em áreas antrópicas (Freitas e Soares, 2004).

A facilidade que a *T. angustula* tem para ocupar lugares variados para nidificação, adaptando-se às grandes cidades, influencia positivamente o sucesso evolutivo da espécie, mesmo com os grandes desmatamentos e as queimadas constantes nas florestas naturais do Brasil (Castanheira, 1995).

O enxame de *T. angustula* é constituído por uma rainha, responsável pelo desenvolvimento da colônia, realizando uma postura de até 50 ovos por dia na época de boa florada; zangões, que têm a função de fecundar a rainha na época de procriação e, pelas operárias que realizam todo o trabalho da colônia, semelhante às abelhas *A. mellifera* (Paty, 2003). As operárias de *T. angustula* em um enxame forte chegam ao número de 5.000 (Nogueira-Neto, 1951).

Estudos relativos ao comportamento dos meliponíneos demonstram que são capazes de defender suas colônias fechando a entrada do ninho quando são atacados por outros insetos e, mesmo possuindo ferrão atrofiado, podem atacar os invasores com as mandíbulas, enrolando-se nos pelos, envolvendo-os com geoprópolis ou penetrando em orifícios dos inimigos de maior porte (Nogueira-Neto, 1997).

A arquitetura e a organização do ninho da *T. angustula* são marcadas por características peculiares. A entrada do ninho é caracterizada por um tubo de cerume marrom-amarelado com a extremidade com bordas mais estreitas (Freitas e Soares, 2004). A sua entrada é guardada por abelhas (Fig. 2) que atacam inimigos que tentem invadi-la, especialmente, abelhas de outras colmeias e formigas. Em muitas espécies, esta entrada é circundada por uma resina pegajosa que dificulta seu acesso por formigas, enquanto outras espécies fecham a entrada do ninho quando são atacadas por esses insetos (Kerr, 1996).

A jataí possui favos horizontais que apresentam um invólucro de cerume formado por várias lamelas (Fig. 3), que tem função termorreguladora (Campos, 1980). Nestas abelhas, é comum encontrar depósitos de própolis dentro da colônia, que são utilizados, juntamente com a cera, para fechar buracos e para construir as paredes das células do ninho no qual ficam os ovos e os potes de alimento (Kerr, 1996).





**Figura 2.** Vista da entrada do ninho de *Tetragonisca angustula* Latreille (jataí) (Foto de Juliano Lucarelo Stuchi).



**Figura 3.** Favos de cria e a rainha de *Tetragonisca angustula* Latreille (jataí) (Kerr 1996).

A biologia, o comportamento, os aspectos morfológicos e os bioquímicos de *T. angustula* têm sido estudados desde o início do século XX (Oliveira et al., 2004). Os estudos com a abelha *T. angustula* tornam-se importantes por existirem aspectos dessa abelha que interessam não somente à ciência, mas à economia e à sociedade, em geral (Kerr et al., 1994).

Imperatriz-Fonseca et al. (1984) coletaram amostras de mel e pólen de colônias de *T. a. angustula* mantidas no campus da USP de São Paulo e, concluíram que estas abelhas visitaram 180 espécies vegetais pertencentes a 45 famílias distintas para a coleta do alimento. Malagodi-Braga e Kleinert (2002) encontraram diferença significativa na produção de morangos sob efeito da polinização por jataí, apresentando aumento no número de óvulos fecundados e frutos com maior peso.

Dentre os trigoníneos, a jataí produz o mel de sabor mais apreciado (Freitas e Soares, 2004) e considerado como tendo atribuições terapêuticas nos tratamentos de oftalmias e moléstias dos pulmões (Imperatriz-Fonseca et al., 1984). Em várias partes do Brasil, o mel das abelhas sem ferrão tem maior procura e preço mais alto em relação ao mel de *A. mellifera*; por exemplo, na região de Minas Gerais, São Paulo e Paraná há grande procura pelo mel de jataí e mandaçaia *Melipona quadrifasciata* (Kerr et al., 1994; Alonso, 1998).

A importância econômica da *A. mellifera*, na produção de mel e na polinização, é muito grande, sendo assim, a determinação da toxicidade de inseticidas para estas abelhas começou a ser estudada mesmo antes da introdução do DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) em 1942 (Macieira e Hebling-Beraldo, 1989). Contudo, estudos sobre a toxicidade de agentes químicos para meliponíneos são ainda relativamente escassos, já

que estas espécies não ocorrem em países de clima temperado, os quais são os principais realizadores deste tipo de estudo (Moraes et al., 2000).

Segundo Kerr et al. (1996), pelo menos 100 das mais de 400 espécies de meliponíneos conhecidas estão em perigo de extinção pela alteração de seu hábitat pelo homem. Tendo em vista a importância ecológica deste grupo, principalmente como polinizadores, e suas relações com o ambiente, o risco de extinção faz ressaltar a necessidade urgente de uma avaliação dos efeitos de inseticidas sobre estas abelhas (Moraes et al., 2000).

### ***Polinização e agrotóxicos - esterases e CL<sub>50</sub>***

De acordo com estimativas da FAO (2004), 73% das espécies vegetais cultivadas no mundo são polinizadas por alguma espécie de abelha, 19% por moscas, 6,5% por morcegos, 5% por vespas, 5% por besouros, 4% por borboletas e 4% por pássaros. Kevan e Phillips (2001), avaliando o potencial de organismos polinizadores, estimaram que somente o Canadá faturou 6 milhões de dólares com a produção de sementes de alfafa, oriundas da polinização realizada por *A. mellifera*. Em proporções mundiais, a contribuição para a economia, pela presença de polinizadores, foi estimada em torno de 54 bilhões de dólares por ano (Kenmore e Krell, 1998).

Diversas espécies de meliponíneos (Apidae, Meliponinae) são usadas na polinização de várias espécies vegetais. Na cultura do morangueiro, Kakutani et al. (1993) verificaram que algumas espécies de meliponíneos foram tão eficientes na polinização quanto a *A. mellifera*.

Em trabalhos realizados visando à polinização do morangueiro em ambiente protegido, Braga (2001) concluiu que a abelha jataí se adaptou bem às condições da cultura, temperatura e umidade relativa do ar no interior da estufa, assim como a quantidade limitada de alimento. Godoy e Barros (2004) verificaram que a polinização entomófila foi muito eficiente, aumentando o índice de frutos comerciáveis e diminuindo o de frutos defeituosos. Calvete et al. (2003) avaliaram duas cultivares de morangueiro (Oso Grande e Tudla) em ambiente protegido, utilizando a abelha jataí (*T. angustula* L.) como polinizadora. Constataram que a presença desta abelha apresentou efeito positivo em todas as variáveis estudadas (frutos comerciáveis, peso médio,

número total de frutos e produtividade), quando comparados com a testemunha (ausência de abelha), não diferindo as cultivares entre si.

A acerola é uma espécie dependente de polinização cruzada para produção satisfatória de frutos, sendo as abelhas importantes polinizadores desta cultura. Na Paraíba, Martins et al. (1999), conduzindo experimento em pomar de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) para avaliar o efeito do tipo de polinização na produção de frutos, mostraram que a maior ocorrência foi de Apoidea, principalmente, Anthophoridae e Apidae (Meliponinae). A abundância e o comportamento dos meliponíneos presentes na acerola destacam este grupo de abelhas como importantes polinizadores desta espécie, devendo-se mencionar também os gêneros de abelhas de maior velocidade de voo, *Epicharis* e *Centris*.

Na comunidade Europeia, Estados Unidos, Canadá, Austrália, Nova Zelândia, Colômbia e Chile, a utilização de abelhas dos gêneros *Bombus* e *Xylocopa* (Apidae) em programas de polinização comercial tem sido um dos principais responsáveis pela produtividade e rentabilidade da cultura do tomateiro em ambiente protegido (Freitas, 1998; Velthuis, 2002). Estas abelhas realizam a polinização por vibração das flores, diminuindo os custos de produção, e melhoram a produtividade e agregam valor ao fruto produzido (Hogendoorn et al., 2000; Richards e Kevan, 2002; Willians, 2002).

A polinização constitui-se em um fator de produção fundamental na condução de muitas culturas agrícolas ao redor do mundo e a diminuição da disponibilidade de polinizadores para as plantas que deles necessitam pode causar limitações na quantidade de frutos (Roubik, 2002), qualidade dos frutos (Wallace e Lee, 1999) e número de sementes (Kalinganire et al., 2001), constituindo-se em (um dos maiores) problema quando se trata de produção agrícola.

O declínio das populações de polinizadores (Kearns et al., 1998; Roubik, 2001) tem sido causado, principalmente, pelo uso não-sustentável dos ecossistemas para produção agrícola (Kremen et al, 2002; Richards e Kevan, 2002). Dentre os diversos aspectos relacionados ao uso não-sustentável, a utilização excessiva de inseticidas (Filgueira, 2003), com certeza impõe risco às populações de espécies de abelhas polinizadoras (Paschoal, 1979; Kevan, 1999).

Torna-se fundamental o estudo dos agrotóxicos sobre as abelhas, posto que o agricultor deve saber selecionar e aplicar produtos fitossanitários, de forma tal que controle às pragas e às doenças, sem colocar em risco à sobrevivência dos insetos benéficos (Wolff, 2000).

Os primeiros registros de que o homem utiliza inseticida, com objetivo de reduzir perdas pelo ataque dos insetos às suas culturas, datam de 1000 a.C. e o controle químico de pragas teve início no século XX, com o emprego do DDT (Ware, 1994).

Pela importância econômica das abelhas na produção de mel e na polinização, a determinação da toxicidade de inseticidas para *A. mellifera* tem sido bastante estudada, mesmo antes da introdução dos inseticidas orgânicos sintéticos no controle de pragas. Um dos primeiros trabalhos de revisão sobre toxicidade de inseticidas para abelhas foi publicado por Shaw (1941).

Metcalf e March (1949) estudaram o modo de ação do parathion (organofosforado) e seus derivados e sua toxicidade sobre alguns insetos, tendo obtido também dados toxicológicos para operárias de *A. mellifera*.

Batista et al. (1975) determinaram, em laboratório, a toxicidade de 17 inseticidas organofosforados, um carbamato e um acaricida para operárias de abelhas híbridas de *A. mellifera adansonii* e *A. mellifera ligustica*, tendo classificado os compostos como altamente e moderadamente tóxicos, de acordo com os valores de DL<sub>50</sub> determinados.

Atkins et al. (1981) avaliaram a toxicidade de 399 produtos às abelhas, e verificaram que 20% eram extremamente tóxicos, 15% moderadamente e 65% pouco ou não-tóxicos; porém, 50% dos compostos mais utilizados nas diversas culturas nos EUA foram considerados moderadamente e altamente tóxicos às abelhas. Produtos à base de captan e metil-parathion microencapsulado foram extremamente tóxicos quando fornecidos às larvas, dando origem a adultos deformados. Uma das estratégias utilizadas foi o uso associado do produto fitossanitário incorporado a um repelente, o que reduziu em 50% os riscos de contaminação e intoxicação das abelhas. Segundo esses autores, o horário de aplicação dos produtos também pode ser alterado, evitando os períodos de maior visitação dos polinizadores.

Experimentos realizados em laboratório sobre o efeito de inseticidas, utilizados na cultura de soja sobre a população de *A. mellifera*, demonstraram que os piretroides foram os mais prejudiciais (100% de mortalidade em 02 h após a pulverização), enquanto que os inseticidas pertencentes aos grupos dos carbamatos e organofosforados apresentaram 50% de mortalidade no mesmo período de avaliação (Rigotti, 2005).

Como as abelhas são suscetíveis a muitos inseticidas comumente utilizados para proteger o plantio de várias culturas, esses insetos podem ser utilizados como bioindicadores para a determinação de seus resíduos nas plantas, assim como para

detectar o nível de toxicidade perigosa para as abelhas frente aos agrotóxicos comumente utilizados (Accorti et al., 1992).

A maioria das bulas dos pesticidas apresenta as recomendações de uso com relação às abelhas, e testes com abelhas são exigidos para o registro de todos os inseticidas. Em algumas localidades existem leis que proíbem a aplicação de pesticidas nas culturas que estão florescendo (Kevan et al., 2007).

A maioria dos inseticidas não é altamente seletiva, e são geralmente tóxicos para a maioria das espécies, as quais não são seu alvo, incluindo o homem, animais, peixes e insetos que coexistem no ambiente (Murphy, 1986).

Pelo hábito alimentar das abelhas, aliado à dificuldade de se avaliar o efeito de produtos químicos sobre estes insetos nas fases embrionária e larval, vários pesquisadores procuram associar a alimentação com o fornecimento de pesticidas. Bendahou et al. (1999) forneceram diretamente às colônias, durante cinco meses consecutivos, xarope de açúcar contaminado com inseticida à base de cipermetrina. Durante as 18 semanas de tratamento, observou-se mortalidade de abelhas nas colmeias, mas também se evidenciou a presença de efeitos subletais quando realizados testes laboratoriais em amostras de abelhas, como glucosemia, alteração da atividade da enzima ATPase, além de outras perturbações fisiológicas e comportamentais.

Testando o efeito dos inseticidas endossulfan, deltametrina, baytroid e sevin, Abramson et al. (1999) concluíram que nenhum desses produtos apresentou efeito de repelência, quando fornecidos via alimento. Exceto deltametrina, os demais foram altamente tóxicos às abelhas, apresentando mortalidade 01 h após o fornecimento do alimento. Thompson (2003) verificou que deltametrina não provocou mortalidade de abelhas, mas causou efeito subletal em baixas concentrações, como hipotermia e perda de sentido, impossibilitando o retorno à colônia.

Sarto (2009) testou os inseticidas deltametrina, metamidofós e abamectina, via tópica, e observou que deltametrina e metamidofós mostraram-se atóxicos para as espécies *Melipona quadrifasciata* (DL<sub>50</sub> 129,17 – 296,60 µg i.a./abelha) e para *A. mellifera* (DL<sub>50</sub> 112,20 – 408,47 µg i.a./abelha). Apenas a abamectina (DL<sub>50</sub> 7,82 µg i.a./abelha) foi moderadamente tóxica para *A. mellifera*, e atóxica para *M. quadrifasciata*.

O efeito dos inseticidas sobre a fauna de polinizadores é diretamente o responsável pela redução das populações de abelhas e, indiretamente, pelas perdas econômicas

decorrentes do declínio das populações desses polinizadores (Kevan, 1999; Richards e Kevan, 2002).

Muitos inseticidas, mesmo em baixas concentrações, podem ser extremamente tóxicos para as abelhas (Gallo, 2003; Thompson, 2003; Rortais et al., 2005). Quando as abelhas são expostas, mesmo a baixas concentrações de inseticidas, os inseticidas podem desencadear efeitos subletais. A interferência na capacidade cognitiva das abelhas, na habilidade de orientação e no comportamento, por exemplo, afetam sua atividade de forrageamento (Pham-Delègue et al., 2002; Rortais et al., 2005).

Os pesticidas mais empregados são os organofosforados e os carbamatos cujos efeitos tóxicos resultam do acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, levando a uma estimulação excessiva dos receptores de acetilcolina, produzindo sintomas neurotóxicos (Stefanidou et al., 1996).

A maior parte da acetilcolinesterase está localizada na cabeça e, especialmente, nos olhos compostos e ocelos das abelhas (Kral, 1980; Kral e Schneider, 1981). A alta atividade da acetilcolinesterase nestes órgãos demonstra a presença do neurotransmissor acetilcolina com evidente função no sistema nervoso central e suporte na transmissão colinérgica (Lehman e Fibiger, 1979).

Pela detecção dos inseticidas anticolinesterases nas abelhas ser difícil pela sua rápida hidrólise, a inibição da atividade da acetilcolinesterase é um indicador bioquímico valioso da exposição aos inseticidas anticolinesterase. Para a avaliação da inibição da acetilcolinesterase em abelhas, a medida da acetilcolinesterase deve sempre ser comparada com valores normais de abelhas não expostas aos pesticidas anticolinesterase (Stefanidou et al., 1996).

De acordo com seu efeito tóxico, os compostos organofosforados podem ser subdivididos em três grupos: a) aqueles altamente tóxicos para as abelhas, tais como o metil-parathion, malathion e o azodrin entre outros, que não deveriam ser usados em plantações com floradas; b) aqueles altamente tóxicos, mas com baixa atividade residual, como o mevinfós, que poderiam ser aplicados quando as abelhas não estivessem coletando em suas flores; c) aqueles relativamente não-tóxicos às abelhas, como o ethion e o triclorfon (Anderson e Atkins Jr., 1968).

Os neonicotinoides são inseticidas amplamente utilizados na agricultura contra os insetos; porém eles podem também afetar os insetos que não são seu alvo, tais como as abelhas. Neonicotinoides nitrossubstitutos (imidaclopride e thiamethoxam) aplicados

topicamente são os mais tóxicos às abelhas, com valores de  $DL_{50}$  de contato em nanogramas por abelha (Iwasa et al., 2004).

Existe uma considerável evidência de que os alvos dos compostos neonicotinoides são os receptores nicotínicos da acetilcolina, aonde eles atuam como parcial ou completos agonistas (Déglise et al., 2002; Tomizawa e Casida, 2003).

Não apenas os inseticidas utilizados nas culturas podem ser tóxicos às abelhas, mas também aqueles utilizados na medicina veterinária podem ser prejudiciais aos insetos que não são seu alvo. O fipronil, inseticida da segunda geração dos fenilpirazóis, é excelente contra carrapatos quando aplicado em animais domésticos (Hainzl e Casida, 1996). Como o fipronil é também eficaz a baixas doses contra um grande número de insetos terrestres, tais como os insetos que atacam as culturas (Balanca e de Visscher, 1997), ele também é usado como um pesticida. Entretanto, o fipronil é altamente tóxico para os insetos que não são seu alvo, sendo a  $DL_{50}$  para abelhas muito baixa, 4 ng/abelha (Tingle et al., 2003).

O fipronil é um potente corrompedor do sistema nervoso central via interferência com a passagem dos íons cloro, inibindo o receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA). Sendo assim, o fipronil atua inibindo o GABA, um importante neurotransmissor nos invertebrados. A sua inibição causa hiperexcitação, convulsão e paralisias, conduzindo o inseto à morte (Tingle et al., 2003).

Diversos compostos de origem vegetal têm ação acaricida (Amer et al., 1989; El Gengaihi et al., 2000), destacando-se os da família Meliaceae, principalmente de *Azadirachta indica* A. Juss, conhecida no Brasil por neem, que possui, como principal metabólito secundário a azadiractina (Schmutterer, 1987; Rembold, 1989). Esse tetranortriterpenoide destaca-se pela elevada ação inseticida e acaricida, baixíssima toxicidade ao homem e animais domésticos, seletividade frequente aos inimigos naturais (Mansour et al., 1997; Momem et al., 1997), além de não prejudicar o ambiente (Neves e Nogueira, 1996).

Os inseticidas exercem suas funções biológicas, principalmente, por inibição de enzimas. As atividades metabólicas fundamentais para os organismos são muito similares e, muitas vezes, as enzimas que catalisam reações idênticas podem ser encontradas em diferentes organismos e/ou em diferentes tecidos, dentro do mesmo organismo. Porém, quando submetidas a testes físicos, químicos ou sorológicos, pode-se constatar a grande heterogeneidade destas preparações enzimáticas de diferentes organismos (Markert e Möller, 1959).

A evidência mais interessante desta diversidade é que várias enzimas existem em múltiplas formas moleculares, não apenas dentro de um mesmo organismo, mas também dentro de um tecido (Hunter e Markert, 1957). Desta forma, Markert e Möller (1959) propuseram o termo isozimas para descrever formas moleculares, nas quais estas proteínas podem existir com a mesma especificidade enzimática em diferentes organismos e/ou em diferentes tecidos de um mesmo organismo.

Existem evidências de que estas diferentes formas enzimáticas podem desempenhar papéis fisiológicos distintos nas células. As diversas formas de uma enzima em uma célula catalisam a mesma reação química, mas não necessariamente com a mesma eficiência catalítica ou sob as mesmas condições intracelulares. Constituem provas desta afirmativa a velocidade de renovação das diferentes enzimas que comumente diferem entre si e a variada estabilidade dessas enzimas, sob diferentes condições de pH e força iônica (Markert, 1968).

As esterases são isoenzimas que apresentam atividade hidrolítica multifuncional, e em comum, catalisam a hidrólise de um grande número de ésteres (Walker e Mackeness, 1983).

Em insetos, as esterases agem extensivamente sobre vários tipos de substratos (Turunen e Chippendale, 1976) e mostram alto polimorfismo (Mathiensen et al., 1993). As esterases têm sido caracterizadas e purificadas em uma variedade de organismos, incluindo leveduras (Lee et al., 1987), peixes (Leibel, 1988), insetos (Willadsen et al., 1987) e mamíferos (Deimiling e Wassmer, 1991).

Esterases em insetos, comparadas com as de mamíferos, não estão bem caracterizadas em termos genéticos e bioquímicos, e entre as mais estudadas estão as de dípteros. O papel fisiológico das esterases, nos insetos, permanece em grande parte ainda desconhecido. Contudo, elas participam da regulação dos níveis de hormônio juvenil (Yoo et al., 1996), de processos digestivos (Kapin e Ahmad, 1980), da degradação de inseticidas, bem como, na quimiotaxia (Prabhakaran e Kamble, 1995) e, em outros diferentes processos, incluindo o metabolismo de lipídeos (Zhu e Brindley, 1990).

Com base na sensibilidade aos substratos sintéticos que as esterases hidrolisam *in vitro*, dois grupos podem ser distinguidos nos insetos: as  $\alpha$ -esterases que hidrolisam preferencialmente o  $\alpha$ -naftil-acetato e as  $\beta$ -esterases que hidrolisam preferencialmente o  $\beta$ -naftil-acetato (Oakeshott et al., 1993). Também como critério classificatório, de acordo com a sensibilidade a diferentes inibidores da atividade enzimática e aos



resíduos de aminoácidos no seu sítio ativo, são reconhecidas quatro classes de esterases, as acetilesterases (E.C. 3.1.1.6), as arilesterases (E.C. 3.1.1.2), as carboxilesterases (E.C. 3.1.1.1) e as colinesterases que incluem as acetilcolinesterases (E.C. 3.1.1.7) e as pseudocolinesterases (E.C. 3.1.1.8) (Healy et al., 1991).

Duas classes estão envolvidas na resistência aos inseticidas, as carboxilesterases e as colinesterases. As carboxilesterases têm sido associadas, principalmente, à resistência aos inseticidas organofosforados. Essas esterases atuam por meio da detoxificação metabólica, mecanismo pelos quais os inseticidas são modificados para formas menos tóxicas ao inseto ou eliminados rapidamente, prevenindo a sua ação no sítio alvo (Beckel et al., 2006). De modo geral, os mecanismos de resistência que envolvem carboxilesterases são resultantes do aumento da atividade desta enzima em insetos resistentes, como demonstrado em linhagens de *Culex tarsalis* (Whyard et al., 1995) e *Oryzaephilus surinamensis* (Lee e Lees, 2001) resistentes ao malathion.

Dentre as colinesterases envolvidas nos mecanismos de resistência, destaca-se a acetilcolinesterase, que é específica do sistema nervoso central dos insetos onde regula os níveis de acetilcolina nos terminais nervosos por catalisar a hidrólise deste neurotransmissor. Os inseticidas organofosforados e carbamatos têm estruturas análogas à acetilcolina, ligam-se covalentemente a um resíduo de serina no sítio ativo da acetilcolinesterase inibindo-a por fosforilação e carbamilação, respectivamente, conduzindo a um acúmulo de acetilcolina nas sinapses causando a morte dos insetos (Kono e Tomita, 2006).

A resistência a esta classe de inseticida, pode ser pela ocorrência de uma ou mais mutações de ponto na estrutura do gene que codifica a acetilcolinesterase, resultando na substituição de aminoácidos no seu sítio ativo (Hemingway, 2000), como demonstrado em populações de *Drosophila melanogaster* (Founier et al., 1993) e na mosca oriental *Bactrocera dorsalis* (Hsu et al., 2006). Também pode estar relacionada com um aumento na síntese desta esterase ou com nível de atividade mais elevado como observado em linhagens do coleóptero *Rhyzopertha dominica* resistentes aos organofosforados (Guedes et al., 1997).

Rossiter et al. (2001) sugerem que a eletroforese é uma ferramenta eficaz para uma detecção simples e rápida da resistência pela atividade esterásica, sendo mais eficiente do que a determinação quantitativa dessas enzimas pela sua capacidade para quantificar tanto diferenças quantitativas como qualitativas.

Hashimoto et al. (2003) observaram alterações na atividade das esterases 1 e 2 de 50%, em larvas de um e três dias de *A. mellifera*, após aplicação tópica do inseticida thiamethoxam. A esterase 5 apresentou atividade reduzida em 50%, 25% e não apresentou atividade em larvas com três, quatro e cinco dias, respectivamente. Segundo esses autores, essas regiões de atividade esterásica podem ser usadas para detectar a presença de resíduos do inseticida thiamethoxam.

Attencia et al. (2005) analisaram operárias de *A. mellifera* e detectaram que, na concentração de 0,01% do inseticida metil-parathion, a atividade da esterase-1 foi reduzida em 75%, 14 e 21 dias após a introdução do inseticida. Uma inibição de 50% foi encontrada para esterases 3 e 4, um dia após a introdução do inseticida. Diante estes resultados, os autores sugeriram que as esterases 3 e 4 podem ser usadas para detectar a presença de resíduos de metil-parathion nas culturas.

Fora o perigo direto dos pesticidas aplicados às culturas, têm-se os problemas associados com os resíduos dos pesticidas contaminando os produtos da colmeia. Assim, substâncias químicas que vão das altamente tóxicas até as não-tóxicas para as abelhas podem ser encontradas dentro das colmeias, colocando em risco a qualidade dos produtos apícolas (Kevan et al., 2007).

O risco às abelhas está ligado ao grau de toxicidade do composto e o modo de aplicação. A toxicidade dos inseticidas, geralmente, é medida utilizando a  $DL_{50}$  (dose letal que proporciona a morte de 50% da população) ou a  $CL_{50}$  (concentração letal a 50% das abelhas). Conceitualmente, os agrotóxicos são divididos em quatro classes distintas, conforme a  $DL_{50}$ : classe 1 (extremamente tóxico), com  $DL_{50}$  menor que  $2\mu\text{g}/\text{abelha}$ , classe 2 (altamente tóxicos), com  $DL_{50}$  entre  $22\mu\text{g}$  e  $10,99\mu\text{g}/\text{abelha}$ , classe 3 (moderadamente tóxicos), com  $DL_{50}$  entre  $11\mu\text{g}$  e  $100\mu\text{g}/\text{abelha}$  e, classe 4 (pouco tóxicos), com  $DL_{50}$  maior que  $100\mu\text{g}/\text{abelha}$  (Larini, 1999; Hunt, 2000).

Hashimoto et al. (2003), trabalhando com o inseticida thiamethoxam, verificaram que a maior toxicidade foi observada nas operárias recém-emergidas e a menor nas abelhas com 21 dias, tanto com inseticida no alimento como por contato.

Os resíduos de inseticidas podem, ainda, causar alterações na cromatina das células do cérebro dos insetos. Essas modificações podem ser detectadas pela análise da concentração crítica de eletrólitos (CEC), técnica que foi desenvolvida por Vidal e Mello (1989).

## ***O cérebro das abelhas e a análise citoquímica***

O sistema nervoso central dos insetos é constituído pelo cérebro, localizado dorsalmente ao tubo digestivo e uma cadeia nervosa ventral, composta por uma série de gânglios, interligados por conectivos entre si e ao cérebro (Roat, 2008).

O cérebro é o principal centro de associação do inseto, e recebe os impulsos sensoriais vindos dos órgãos dos sentidos da cabeça e dos gânglios da cadeia nervosa ventral, por meio de interneurônios ascendentes. Do cérebro emanam ordens motoras para os músculos das antenas e para as partes posteriores do corpo, passando pelas vias descendentes, pré-motoras, que vão aos gânglios da cadeia nervosa ventral. Portanto, a maioria dos corpos celulares presentes no cérebro é de interneurônios e grande parte de sua massa é constituída por seus prolongamentos. O cérebro é, por isso, a sede da integração das atividades, que produzem os padrões organizados do comportamento de longa duração, governando suas modificações pela aprendizagem (Snodgrass, 1956; Chapman, 1998).

O cérebro dos insetos está dividido em três regiões: protocérebro, deutero cérebro e tritocérebro. O protocérebro constitui a maior parte de massa cerebral, inclui os lobos ópticos, um par latero-dorsal de corpos pedunculados, a ponte cerebral e o corpo central; o deutero cérebro é a parte do cérebro que contém os centros olfatórios antenais, e os corpos celulares dos nervos motores dos músculos das antenas e, geralmente, forma um par de lobos laterais distintos. O tritocérebro é muito pequeno nos insetos, constituindo-se de dois pequenos lobos posteriores ao deutero cérebro ligados pelas comissuras circum-esofageanas ao gânglio subesofageano. Anteriormente, esta região conecta-se, por meio de nervos, com a região oral e com gânglios do sistema nervoso estomogástrico (Roat, 2008).

Em geral, células de organismos eucariontes apresentam seus núcleos constituídos por uma solução aquosa de proteínas, RNAs, nucleosídeos, nucleotídeos e íons, onde estão mergulhados nucléolos e cromatina. A maioria das proteínas presentes no nucleoplasma são enzimas envolvidas com a transcrição e com a duplicação do DNA, como as DNA-polimerases, topoisomerases, helicases, entre outras (Junqueira e Carneiro, 2000).

A cromatina designa o material que se cora e é visível ao microscópio óptico. Em células eucarióticas, o DNA está complexado com proteínas específicas, constituindo a

cromatina (proteínas histonas e não-histonas). Essas promovem os estágios de enovelamento da cromatina, que são os indicadores de estágio funcional e de diferenciação em que se encontra a célula. De acordo com a compactação, a cromatina encontra-se estruturalmente como repetição de nucleossomos, solenoide ou cromossomo (Griffiths et al., 2001).

A massa de histonas é aproximadamente igual à massa de DNA do núcleo, mas como as histonas têm baixo peso molecular e apresenta forte caráter básico (são ricas em aminoácidos básicos, carga positiva, arginina e lisina) influencia as ligações no DNA. Elas se ligam ao DNA graças à interação de seus radicais amino com os radicais fosfato do DNA. No entanto, nem todos os radicais fosfatos estão neutralizados pelas histonas, o que confere caráter ácido, isto é, capacidade para ser corado por corantes básicos, o que caracteriza a basofilia (Griffiths et al., 2001).

Grande parte dos estudos de basofilia nuclear destinados a levantar conhecimentos sobre os níveis de complexação DNA-proteína na cromatina, e mesmo estado de conformação do DNA e da cromatina, tem se baseado na utilização do Azul de Toluidina (AT) como corante catiônico (Vidal, 1987).

De um modo geral, a basofilia é pela ligação de um corante catiônico a moléculas aniônicas de um substrato. A basofilia nuclear é pela presença de grupos fosfatos disponíveis no DNA e RNA, quando se utilizam soluções de AT em pH 3,6-4,0 (Lison, 1960).

A basofilia pode ser metacromática, dependendo do grau de empilhamento e proximidade das moléculas de AT entre si. Quanto mais próxima e maior for seu empilhamento, maior será a interação de seus elétrons  $\pi$ , conseqüentemente, sendo maior o deslocamento de seu máximo de absorção para comprimentos de onda mais curtos (efeito hipsocrômico), e simultâneo hipocromismo no pico da região de comprimentos de onda longos, o que define o fenômeno de metacromasia (revisão em Mello, 1976; Vidal, 1987; Chayen e Bitensky, 1991).

DNA não complexado à proteína, e complexos DNA-proteína em cromatina de células somáticas geralmente exibem metacromasia (cor violeta), quando corados com soluções de azul de toluidina nas condições acima descritas (Mello, 1997).

Se a uma solução de AT forem adicionados cátions inorgânicos (por exemplo,  $Mg^{2+}$ ) ocorrerá competição entre estes e o dipolo do corante de carga semelhante, pelas cargas negativas do substrato polianiônico. Numa certa concentração do cátion inorgânico, a coloração do ácido nucleico poderá deixar de ser metacromática. Esta

concentração foi denominada por Vidal e Mello (1989) de CEC (concentração crítica de eletrólitos), sendo expressa em molaridade do sal utilizado, à semelhança de proposições de Scott (1960) para componentes de matriz extracelular, usando-se azul de alcian como corante.

As moléculas do corante catiônico e os cátions inorgânicos competem pelas cargas negativas dos fosfatos livres do DNA não-ligados a proteínas. Quando se utilizam soluções de AT na ausência de  $Mg^{2+}$ , ou com concentrações de  $Mg^{2+}$  inferiores àquela exigida para o ponto de CEC, o DNA se cora em violeta (metacromasia). Com a utilização de uma concentração de  $Mg^{2+}$  correspondente ao valor de CEC, a metacromasia do DNA será totalmente abolida e a cor exibida será verde (Vidal e Mello, 1989).

A pesquisa de CEC, usando-se AT como corante e  $Mg^{2+}$  como íon inorgânico, inicialmente idealizada para modelos de DNA-proteína *in vitro* (Vidal e Mello, 1989), mostrou-se sensível para diferenciar tipos de complexos DNA-proteínas em cromatina *in situ*. A competição entre o azul de Toluidina e o cátion inorgânico pelos sítios de ligação na cromatina varia quando são comparadas heterocromatina e eucromatina, espermatozoides de diferentes espécies animais, puffs de DNA e RNA, bandas de cromossomos politênicos, e um mesmo núcleo em diferentes condições fisiológicas ou do desenvolvimento (Mello e Vidal, 1989; Falco, 1995; Mello e Falco, 1996; Monteiro e Mello, 1998).

As abelhas são os polinizadores mais valiosos na agricultura, principalmente, pelo seu hábito de visitar centenas de flores durante cada viagem ao campo (Freitas, 1998). Ao mesmo tempo, são extremamente sensíveis aos inseticidas, podendo ser utilizadas como bioindicadores para a determinação de resíduos destes produtos nas plantas (Porrini et al., 1998).

A análise de CEC permite verificar se está ocorrendo alteração na expressão gênica após a contaminação com inseticidas, levando a alterações no valor de CEC, pois pode ocorrer a inativação ou ativação de genes após a contaminação. Portanto, também é uma técnica que pode ser empregada para detectar a presença de resíduos de pesticidas.

## REFERÊNCIAS

- Abramson C.I., Aquino I.S., Ramalho F.S., Price J.M. (1999) The effect of insecticides on learning in the africanized honey bee (*Apis mellifera* L.), Arch. Envi. Cont. Tox. 37, 529-535.
- Accorti M., Guarcini R., Oddo L.P. (1992) The bee as a biological indicator and test insect, Red. 74, 1-5.
- Alonso W.J. (1998) Abelhas sem ferrão: centenas de espécies para polinização, produção de mel, lazer e educação. Artigos técnicos. Animais de criação – Abelhas. 626, [online] [http://www.snagricultura.org.br/artitec\\_abelhas.htm](http://www.snagricultura.org.br/artitec_abelhas.htm) (acesso em 01 dezembro 2008).
- Alonso W.J., Paim C.S. (2001) As abelhas sem ferrão, [online] <http://www.unifap.br/abelhas> (acesso em 01 dezembro 2008).
- Amer S.A.A., Reda A.S., Dimetry N.Z. (1989) Activity of *Abrus precatorius* L. extracts against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), Acarol. 30, 209-215.
- Anderson L.D., Atkins Jr. E.L. (1968) Pesticides usage in relation to beekeeping, Annu. Rev. Entomol. 13, 213-237.
- Atkins E.L., Kellum D., Atkins K.W. (1981) Reducing pesticides hazardous to honeybees. Mortality prediction techniques and integrated management strategies. Berkeley: University of Califórnia.
- Attencia V.M., Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Toledo V.A.A. (2005) Esterase activity in *Apis mellifera* after exposure to organophosphate insecticides (Hymenoptera: Apoidae), Sociobiol. 45, 587-595.
- Balanca G., de Visscher M. (1997) Impacts on non-target of a new insecticide compound used against the desert locust *Schistocerca gregária* (Forskal 1775), Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32, 58-62.

Batista G.C., Amaral E., Passarela-Neto A. (1975) Toxicidade de alguns inseticidas e acaricidas para operárias de *Apis mellifera ligustica* L. e *Apis mellifera adansonii* L. (Hymenoptera: Apidae), Anais Soc. Ent. Bras. 4, 73-77.

Beckel H.S., Lorini I., Lazzari S.M.N. (2006) Efeito do sinergista butóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitrotrion, Rev. Bras. Entomol. 50, 110-114.

Bendahou N., Fleche C., Bounias M. (1999) Biological and biochemical effects of chronic exposure to very low levels of dietary cypermethrin (cymbush) on honeybees colonies (Hymenoptera: Apidae), Ecot. Env. Saf. 44, 147-153.

Braga K.S.M. (2001) Abelhas melhoram qualidade de morangos, [online] <http://www.uol.com.br/cienciahoje/chdia/n444.htm> (acesso em 11 dezembro 2008).

Calvete E.O., Rocha H.C., Cechetti D., Maran R.E., Carli W. (2003) Polinização entomófila de morangueiro cultivado em ambiente protegido, Hort. Bras. 21, 281.

Camargo J.M.F., Possey D.A. (1990) O conhecimento dos Kayapó sobre as abelhas sociais sem ferrão (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera): Notas adicionais, Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, nova ser. Zool. 6, 17-42.

Camargo J.M.F., Menezes-Pedro S.R. (1992) Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review, Apidol. 23, 509-522.

Camargo J.M.F., Pedro S.R.M. (2007) Meliponini Lepeletier, 1836, in: Moure J.S., Urban D., Melo G.A.R. (Orgs.). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia, pp. 272-578.

Campos M.J.O. (1980) Aspectos da sociologia e fenologia de *Pereirapis semiauratus* (Hymenoptera, Halictidae, Augochlorini). Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 189p.

Castanheira E.B. (1995) Marcadores genéticos e sua utilização em estudos populacionais em *Tetragonisca angustula* e *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Tese de Doutorado em Ciências Genéticas. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. 80p.

Chapman R.F. (1998) The insects: structure and function. New York, Cambridge University Press.

Chayen J., Bitensky L. (1991) Analysis of chemical components of cell and tissues. Reactions for acids and polyphosphate, in: Chayen J., Bitensky L. Practical histochemistry. 2<sup>a</sup> Ed. New York. John Wiley & Sons.

Déglise P., Grünewald B., Gauthier M. (2002) The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells, Neurosci. Lett. 321, 13-16.

Deimiling O., Wassmer B. (1991) Genetic characterization of esterase-28 (ES-28) of the house mouse, Biochem. Genet. 29, 55-64.

El Gengaihi S., Dimetry N.Z., Amer S.A.A., Mohamed S.M. (2000) Acaricidal activity of lipoidal matter of different plant extracts against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch, Insec. Sci. Applic. 20, 191-194.

Falco, J.R.P. (1995) Alterações celulares pós-fecundação e com o envelhecimento em glândulas de espermateca de rainhas de *Apis mellifera*. Tese de doutorado. Campinas UNICAMP/IB.

FAO (2004) Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture – the international response, in: Freitas B.M., Pereira J.O.P. (ed.). Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza, Brasil: Imprensa Universitária, pp. 19-22.

Filgueira F.A.R. (2003) Novo manual de olericultura – agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças, Ed. Universidade Federal de Viçosa.

Fournier D., Mutero A., Pralavorio M., Bride J.M. (1993) *Drosophila* acetylcholinesterase mechanisms of resistance to organophosphates, Chem. Biol. Inter. 87, 233-238.

Freitas B.M. (1998) Uso de programas racionais de polinização em áreas agrícolas, Mensag. Doce. 46, 1-6.

Freitas G.S., Soares A.E.E. (2004) Procurando Irá: um passeio ecológico. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Gallo M.A. (2003) History and scope of toxicology, in: Klaassen C.D., Watkins J.B. (eds.), Essentials of toxicology. Nova York, McGraw-Hill, pp. 3-4.

Godoy W.I, Barros I.B.I. (2004) Levantamento da presença de insetos com potencial polinizador na cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.), in: Simpósio Nacional do Morango, 2. Anais... Pelotas: Embrapa Cima Temperado, pp. 56-59.

Griffiths A.J.F., Gelbart W.M., Miller J.H, Lewontin R.C. (2001) Genética Moderna. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Guedes R.N.C., Kambhampati S., Dover B.A., Zhu K.Y. (1997) Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) populations from the United States and Brazil, Bull. Entomol. Res. 87, 581-586.

Hainzl D., Casida J.E. (1996) Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 12764-12767.

Hashimoto J.H., Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Toledo V.A.A. (2003) Evaluation of the use of the inhibition esterase activity on *Apis mellifera* as bioindicators of insecticide thiamethoxam pesticide residues, Sociobiol. 42, 693-699.



- Healy M.J., Dumancic M.M., Oakeshott J.G. (1991) Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*, *Bioch. Genet.* 29, 365-387.
- Hemingway J. (2000) The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance, *Insect Bioch. Mol. Biol.* 30, 1009-1015.
- Hogendoorn K., Steen Z., Schwarz M.P. (2000) Native Australian carpenter bees as a potential alternative to introducing bumblebees for tomato pollination in greenhouses, *J. Api. Res.* 39, 67-74.
- Hsu J.C., Haymer D.S., Wu W.J., Feng H.T. (2006) Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated to organophosphorus insecticides, *Insec. Bioch. Mol. Biol.* 36, 396-402.
- Hunter R.L., Markert C.L. (1957) Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels, *Scienc.* 125, 1294-1295.
- Hunt G.J. (2000) Using honey bees in pollination. Purdue University.
- Imperatriz-Fonseca V.L., Kleinert-Giovannini A., Cortopassi-Laurino M., Ramalho M. (1984) Hábitos de coleta de *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae), *Bolm. Zool. Univ. S. Paulo.* 8, 115-131.
- Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J.T., Roe R.M. (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*, *Crop Protec.* 23, 371-378.
- Junqueira L.C.U., Carneiro J. (2000) *Biologia celular e molecular*. Guanabara-Koogan.
- Kalanganire A., Harwood C.E., Slee M.U., Simons A.J. (2001) Pollination and fruit-set of *Grevillea robusta* in western Kenya, *Austral. Ecol.* 26, 637-648.
- Kakutani T., Inovet T., Tezkat E.A. (1993) Pollination of strawberry by the stingless bee, *Trigona minangkabau*, and the honey bee, *Apis mellifera*: experimental study of fertilization efficiency, *Res. Pop. Ecol.* 35, 95-111.
- Kapin M.A., Ahmad S. (1980) Esterases in larval tissue of gypsy moth *Lymantria dispar* L.: Optimun assay conditions, quantification and characterization, *Insect Biochem.* 10, 331-337.
- Kearns C.A., Inouye D.W., Waser N.M. (1998) Endangered mutualisms; the conservation of plant-pollinator interactions, *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29, 83-112.
- Kenmore P., Krell R. (1998) Global perspectives on pollination in agriculture and agroecosystem management, in: *International Workshop on Conservation and Sustainable use of Pollinators in Agriculture: with Emphasis on Bees*. São Paulo, Brasil.
- Kerr W.E., Nascimento V.A., Carvalho G.A. (1994) Há salvação para os Meliponíneos? in: *1º Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto*. Proceedings. Ribeirão Preto: 60-66.

Kerr W.E., Carvalho G.A., Nascimento V.A. (1996) Abelha Uruçu: Biologia, manejo e conservação, Belo Horizonte: Acangaú.

Kerr W.E. (1996) Biologia e manejo de Meliponinae, [online] <http://www.ufv.br/dbg/bee/abelhsf.htm> (acesso em: 01 dezembro 2008).

Kevan P.G. (1999) Pollinators as bioindicators of the state of environment: species, activity and biodiversity, *Agric. Ecosys. Environ.* 74, 373-393.

Kevan P.G., Phillips T.P. (2001) The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences, *Conserv. Ecol.* 5, 8. [online] <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art8> (acesso em: janeiro 2009).

Kevan P.G., Eisikowitch D., Kinuthia W., Martin P., Mussen E.C., Partap U., Taylor O.R., Thomas V.G., Thorp R.W., Vergara C.H., Winter K. (2007) High quality bee products are important to agriculture: why, and what needs to be done, *J. Apic. Res.* 6, 59-64.

Kono Y., Tomita T. (2006) Amino acid conferring insecticide insensitivity in *Ace*-paralogous acetylcholinesterase, *Pest. Bioch. Phys.* 85, 123-132.

Kral K. (1980) Acetylcholinesterase in the ocellus of *Apis mellifera*, *J. Ins. Physiol.* 26, 807-809.

Kral K., Schneider L. (1981) Fine structural localization of acetylcholinesterase activity in the compound eye of the honeybee (*Apis mellifera* L.), *Cell Tissue Res.* 221, 351-359.

Kremen C, Williams N.M., Thorp R.W. (2002) Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification, *Proceed. Natin. Acad. Scie. Unit. Stat. Amer.* 99, 16812-16816.

Larini L. (1999) Toxicologia dos Praguicidas. São Paulo: Manole.

Lee H., Rebecca J.B., Latta R.K., Biely P., Schneider H. (1987) Some properties of extracellular acetylxyylan esterase produced by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*, *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2831-2834.

Lee S.E., Lees E.M. (2001) Biochemical mechanisms of resistance in strains of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) resistant to malathion and chlorpyrifos-methyl, *J. Econ. Entom.* 94, 706-713.

Lehman J., Fibiger H.C. (1979) Acetylcholinesterase and the cholinergic neuron, *Life Scien.* 25, 1939-1947.

Leibel W.S. (1988) An analysis of esterase activities from surgeonfish tissues yields evidence of atypical pseudocholinesterase, *Comp. Biochem. Physiol.* 91, 437-447.

Lison L. (1960) Histochemie et cytochimie anymales. Paris, Gauthier-Villars.

- Macías-Macías O., Chuc J., Ancona-Xiu P., Cauich O., Quezada-Euán J.J.G. (2009) Contribution of native bees and Africanized honey bees (Hymenoptera: Apoidea) to solanaceae crop pollination in tropical México, *J. Appl. Entomol.* 133, 456-465.
- Macieira O.J.D., Hebling-Beraldo M.J.A. (1989) Laboratory toxicity of insecticides to workers of *Trigona spinipes* (F., 1793) (Hymenoptera - Apidae), *J. Apic. Res.* 28, 3-6.
- Malagodi-Braga K.S., Kleinert A.M.P. (2002) A produção de morangos sob efeito da polinização por jataí (*Tetragonisca angustula*), in: Encontro sobre Abelhas, 5, Ribeirão Preto. Anais... Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, p. 338.
- Malaspina O., Souza T.F., Zacarin E.C., Cruz A.S., Jesus D. (2008) Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil, in: Encontro Sobre Abelhas, 8, Ribeirão Preto, SP, Anais... 2008. CD-ROM.
- Mansour S.A. (1987) Is it possible to use the honey bee adult as a bioindicator for the detection of pesticide residues in plants?, *Act. Biol. Hung.* 38, 69-76.
- Mansour F.A., Ascher K.R.S., Abo-Moch F. (1997) Effects of neemgard on phytophagous and predacious mites and on spiders, *Phytopar.* 25, 333-336.
- Markert C.L. (1968) The molecular basis of enzymes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151, 14-40.
- Markert C.L., Möller F. (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 45, 753-763.
- Martins C.G.M., Lorenzon M.C.A., Baptista J.L. (1999) Eficiência de tipos de polinização em acerola, *Caatinga.* 12, 55-59.
- Matthiensen A.E., Tellechea E., Levy J.A. (1993) Biochemical characterization for the genetic interpretation of esterase isozymes in *Micropogonias furnieri* (Pisces, Sciaenidae) in the south of Brazil, *Comp. Biochem. Physiol.* 104, 349-352.
- Mello M.L.S. (1976) Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero- e eucromatinas. Tese Livre Docência. UNICAMP/IB, Campinas.
- Mello M.L.S., Vidal B.C. (1989) Critical electrolyte concentration of the heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*, *Cytob.* 59, 87-93.
- Mello M.L.S., Falco J.R.P. (1996) Critical electrolyte concentration of DNA-protein complexes in spermatozoal and somatic cell nuclei of the honey bee, *Apis mellifera*, *Insec. Biochem. Mol. Biol.* 26, 793-795.
- Mello M.L.S. (1997) Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins, *Braz. J. Genet.*, 20:2, 257-264.

- Menezes-Pedro S.R., Camargo J.F.M. (2000) Biodiversidade do estado de São Paulo: síntese do conhecimento ao final do século XX. Apoidea, Apiformes, in: Brandão C. R., Cancellato E.M. Inv. Terrestres. São Paulo – FAPESP, 193-211.
- Metcalf R.L., March R.B. (1949) Studies of the mode of action of parathion and its derivatives, and their toxicity to insects, J. Econ. Entomol. 42, 721-728.
- Michener C.D. (2000) The bees of the world. The John Hopkins University, Baltimore, MD.
- Momen F.M., Reda A.S., Amer S.A.A. (1997) Effect of neem azal-F on *Tetranychus urticae* and three predacious mites of the family Phytoseiidae, Act. Phytopathol. Entomol. Hungar. 32, 355-362.
- Monteiro A.L.P., Mello M.L.S. (1998) Critical electrolyte concentration of chromatin in polytene chromosomes of *Trichosia pubescens* (Diptera, Sciaridae), Genet. Mol. Biol. 21, 185-190.
- Moraes S.S., Bautista A.R.L., Viana B.F. (2000) Avaliação da toxicidade aguda DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): Via de contato, An. Soc. Entomol. Brasil, 29, 31-37.
- Moure J.S. (1961) A preliminary supra-specific classification of the Old World Meliponine bees (Hymenoptera, Apoidea), Stud. Entomol. 4, 181-242.
- Moure J.S., Urban D., Melo G.A.R. (2007) Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region, Soc. Bras. Entomol. Curitiba, Brasil.
- Murphy S.D. (1986) Pesticides, in: Klaassen C.D., Amdur M., Doull J. (eds) Casarett e Doull's Toxicology, The basic science of poisons, 3<sup>o</sup> ed. Macmillan Publishing Co, New York.
- Nabhan G.P., Buchmann S.I. (1997) Services provided by pollinators. Nature's services: societal dependence on natural ecosystems. Washington: Island Press: 133-150.
- Neves B.P., Nogueira J.C.M. (1996) Cultivo e utilização do nim indiano, Goiânia, EMBRAPA-CNPAP.
- Nogueira-Neto P. (1951) Stingless bees and their study, Bee World. 32, 73-76.
- Nogueira-Neto P. (1997) Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis.
- Nogueira-Neto P. (2001) Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão, [online] <http://eco.ib.usp.br/beelab/vida.htm> (acesso em 01 dezembro 2008).
- Oakeshott J.G., Papenrecht E.A., Boyce T.M., Healy M.J., Russell R.J. (1993) Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases, Genet. 90, 239-268.

Oliveira R.C., Nunes F.M.F., Campos A.P.S., Vasconcelos S.M., Roubik D., Goulart L.R., Kerr W.E. (2004) Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on RAPD markers, *Genetic. Mol. Biol.* 27, 181-186.

Orth A.I., Matos J.Z. (2000) O declínio dos polinizadores no mundo: recomendações para reverter o quadro atual, in: Congresso Brasileiro de Apicultura, 13, Florianópolis, SC, Anais.... CD-ROM.

Paschoal A.D. (1979) Pragas, praguicidas e a crise ambiental: problemas e soluções, Fundação Getúlio Vargas.

Paty (2003) Jataí- Características gerais, [online] <http://paty.guiliani.vilabol.uol.com.br/jatai.htm> (acesso em 2 novembro 2008).

Pham-Delègue M.H., Decourtye A., Kaiser L., Devillers J. (2002) Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees, *Apidol.* 33, 425-432.

Porrini C., Celli G., Radeghieri P. (1998) Monitoring of pesticides through the use of honeybees as bioindicators of the Emili-Romagna coastline (1995-1996), *Annali di Chemic.* 88, 243-252.

Prabhakaran S., Kamble S.T. (1995) Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of German cockroach, *Blattella germanica* L., *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 519-524.

Rembold H. (1989) Azadirachtins: their structure and mode of action, in: Arnason J.T., Philogène B.J.R., Morand P. (eds.), *Insecticides of plant origin*. Washington, American Chemical Society, pp. 150-163.

Richards K.W., Kevan P.G. (2002) Aspects of bee biodiversity, crop pollination, and conservation in Canada, in: Kevan P.G., Imperatriz-Fonseca V.L. (eds.) – *Pollinating Bees – The conservation link between agriculture and nature* – Ministry of Environment/Brasília, pp. 77-94.

Rigotti M. (2005) Efeito da pulverização de inseticidas utilizados na cultura de soja sobre adultos de *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera, Apidae) em condições de laboratório. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS. 34p.

Roat T.C. (2008) Diferenciação do cérebro de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose: estudo comparativo entre castas e sexos. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP. 183p.

Rortais A., Arnould G., Halm M., Touffet-Briens F. (2005) Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees, *Apidol.* 36, 71-83.

Rossiter L.C., Gunning R.V., Rose H.A. (2001) The use of polyacrylamide gel electrophoresis for the investigation and detection of fenitrothion and clorpyrifos-

methyl resistance in *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae), Pest. Biochem. Physiol. 69, 27-34.

Roubik D.W. (2001) Ups and downs in pollinator populations: when is there a decline?, Conserv. Ecol. 5, 2-AD.

Roubik D.W. (2002) The value of bees to the coffee harvest, Nat. 417, 708.

Sarto M.C.L. (2009) Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 64p.

Schmutterer H. (1987) Insect growth-disrupting and fecundity-reducing ingredients from the neem and chinaberry trees, in: Morgan E.D., Mandava N.B. (eds.), CRC handbook of natural pesticides. Florida, CRC series in naturally occurring pesticides, pp. 119-170.

Scott J.E. (1960) Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues, in: Methods of Biochemical Analysis. Interscience Publ. New York.

Shaw F.R. (1941) Bee poisoning. Review of more important literature, J. Econ. Ent. 34, 16-21.

Snodgrass R.E. (1956) Anatomy of the honeybee. Comstock Publis. Ass. Ithaca.

Sommer P.G. (1997) Aspectos da apicultura brasileira, in: Simpósio Paranaense de Apicultura, 12, Guarapuava. Anais... Guarapuava: Federação Paranaense de Apicultura: 17-19.

Stefanidou M., Koutselinis A., Pappas F., Methenitou G. (1996) Bee head acetylcholinesterase as an indicator of exposure to organophosphate and carbamate insecticides, Vet. Human Toxicol. 38, 420-422.

Thompson H.M. (2003) Behavioural effects of pesticides in bees – their potential for use in risk assessment, Ecot. 12, 317-330.

Thompson H.M., Maus C. (2007) The relevance of sublethal effects in honey bee testing for pesticide risk assessment, Pest. Manag. Sci. 63, 1058-1061.

Tingle C.C., Rother J.A., Dewhust C.F., Lauer S., King W.J. (2003) Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 176, 1-66.

Tomizawa M., Casida J.E. (2003) Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors, Annu. Rev. Entomol. 48, 339-364.

Turunen S., Chippendale G.M. (1976) Esterase and lipase activity in the midgut of *Diatraea grandiosella*: Digestive functions and distribution, Insect Biochem. 7, 67-71.

- Velthuis H.H.W. (2002) The historical background of the domestication of the bumblebee, *Bombus terrestris*, and its introduction in agriculture, in: Kevan P.G., Imperatriz-Fonseca V.L. (eds.), Pollinating Bees – The conservation link between agriculture and nature – Ministry of Environment/Brasília, pp. 177-184.
- Vidal B.C. (1987) Métodos em Biologia Celular, in: Vidal B.C., Mello M.L.S. Biologia Celular. Rio de Janeiro. Atheneu.
- Vidal B.C., Mello M.L.S. (1989) Critical electrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes in vitro, Acta. Histochem. Cytochem. 22, 471-478.
- Yoo C.M., Chun B.B., Hyung C.L. (1996) Substrate and inhibitor specificities of esterase in *Lucilia illustris*, Korean J. Zool. 39, 110-117.
- Walker C.H., Mackeness M.I. (1983) Esterases: problems of identification and classification, Bioch. Pharm. 32, 3265-3269.
- Wallace H.M., Lee L.S. (1999) Pollen source, fruit set and xenia in mandarins, J. Hort. Sci. Biotechn. 74, 82-86.
- Ware G.W. (1994) The pesticide book. 4ª edição, Fresno, Califórnia.
- Whyard S., Downe A.E., Walker V.K. (1995) Characterization of a novel esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*, Arch. Insec. Bioch. Phys. 29, 329-342.
- Willadsen P., Mckenna R.V., Riding G.A. (1987) Purification and characterization of an esterase from the tick *Boophilus microplus*, Insect Biochem. 17, 659-664.
- Willians I.H. (2002) Insect pollination and crop production: a European perspective, in: Kevan P.G., Imperatriz-Fonseca V.L. (eds.), Pollinating Bees – The conservation link between agriculture and nature – Ministry of Environment/Brasília, pp. 59-65.
- Wolff L.F.B. (2000) Efeitos dos agrotóxicos sobre a apicultura e a polinização de soja, citros e macieira, in: Congresso Brasileiro de Apicultura, XIII, Florianópolis. Anais... Florianópolis: Confed. Brás. Apic.: 1-10.
- Zhu K.Y., Brindley W.A. (1990) Properties of esterases from *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) and the roles of the esterases in insecticide resistance, J. Econ. Entomol. 83, 725-727.

## II – OBJETIVOS GERAIS

Esse estudo pretendeu avaliar as alterações ocorridas na expressão gênica em abelhas jataí após contaminação com agrotóxicos para detectar os possíveis efeitos destes compostos na expressão de isoenzimas e na atividade gênica, bem como obter marcadores moleculares para a utilização dessas abelhas como bioindicadoras da presença de agrotóxicos.

Com o intuito de atingir esses objetivos, a primeira etapa desenvolvida foi a caracterização bioquímica das isoenzimas esterases das duas espécies de abelhas jataí (*T. angustula* e *T. fiebrigi*).

Na segunda etapa, foi estabelecida a CL<sub>50</sub> por contato e ingestão, para os inseticidas: fipronil, malathion, thiamethoxam e neem.

Após a contaminação com doses subletais dos inseticidas, foram realizadas análises eletroforéticas para avaliar as alterações na atividade relativa das esterases e alteração no número de peptídeos em eletroforese SDS-PAGE.

A técnica de CEC foi empregada para avaliar a alteração, em nível de cérebro, da cromatina após a contaminação pelos inseticidas malathion e thiamethoxam.



**III – Marcador molecular para identificar duas espécies de jataí: *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera, Meliponinae)**

Título abreviado: **Diferenciação entre as duas espécies de jataí**

**ABSTRACT**

*Tetragonisca angustula* and *T. fiebrigi* esterases were biochemically characterized by their inhibition pattern and thermostability. Workers of both species were collected from nests at the State University of Maringá. In *T. fiebrigi* three esterases were observed: EST-1 ( $\beta$ -esterase, cholinesterase I), EST-2 ( $\alpha$ -esterase, cholinesterase II) and EST-4 ( $\alpha\beta$ -esterase, carboxylesterase). In *T. angustula* two esterases were detected: EST-3 ( $\beta$ -esterase, acetylerase) e EST-4 ( $\alpha\beta$ -esterase, carboxylesterase). *T. angustula* EST-3 showed the highest thermostability, and it was not observed above 54°C, while in *T. fiebrigi* EST-1 and EST-2 were not detected above 52°C. Through this characterization, it was observed that EST-4 of *T. angustula* and *T. fiebrigi* showed identical biochemical characteristics, and probably those esterases are encoded by the same gene in the two species. Together, the biochemical characterization and molecular markers show that the two species are differentiated and secondary contact between the populations can still be occurring.

**Keywords** – stingless bee, isoenzyme, inhibition, thermostability, taxonomy

## 1. INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão provêm evolutivamente de um grupo de vespas que deixaram de transmitir caracteres genéticos para a formação do ferrão a seus descendentes (Alonso, 1998). A explicação para a perda do ferrão neste grupo de abelhas, provavelmente, está relacionada ao fato da colônia não ficar exposta quando as abelhas enxameiam e ocorrer a construção dos ninhos, geralmente, em lugares bem protegidos (Alonso e Paim, 2001).

As abelhas sem ferrão estão entre os polinizadores mais comum nos ambientes tropicais e em determinadas regiões são as abelhas dominantes, visitando várias culturas (Macías-Macías et al., 2009). Estes insetos são um grupo diverso, o qual inclui mais de 400 espécies que mostram alta variabilidade na fisiologia, morfologia e tamanho, indo de 0,2 mm no gênero *Trigonisca* a mais de 20 mm em algumas espécies de *Melipona* (Michener, 2000; Moure et al., 2007).

Os meliponíneos tiveram origem na parte Oeste do continente Gondwana, hipótese que é sustentada pelos registros fósseis e pela biogeografia (Camargo e Menezes-Pedro, 1992). Estes ocupam grande parte das regiões de clima tropical e temperado subtropical do planeta (Nogueira-Neto, 1997).

Segundo Moure (1961), na subfamília Meliponinae podem ser consideradas duas tribos: Meliponini e Trigonini. Os Meliponini se caracterizam por não construírem células reais; dessa forma, rainhas, operárias e machos nascem e desenvolvem-se até o estágio adulto em células de cria de igual tamanho. Os Trigonini constituem um grupo muito diversificado, com dezenas de gêneros e constroem quase sempre células reais, maiores que as outras, de onde emergem as futuras rainhas (Nogueira-Neto, 1997).

De acordo com Castanheira e Contel (2005), dentro da espécie *Tetragonisca angustula*, pertencente à tribo Trigonini, são conhecidas duas subespécies, as quais são diferenciadas por meio da coloração do mesepisterno. *T. angustula angustula* possui o mesepisterno preto, enquanto que a *T. angustula fiebrigi* possui mesepisterno na cor amarelo. Porém, de acordo com Camargo e Pedro (2007), taxonomicamente, elas foram consideradas como duas espécies distintas, denominadas de *T. angustula* e *T. fiebrigi*.

Tendo em vista que ainda há desacordo quanto à classificação dessas abelhas em espécies ou subespécies, torna-se essencial desenvolver novos estudos para detectar a ocorrência de marcadores que permitam identificação correta dessas abelhas.

A distribuição geográfica para *T. angustula fiebrigi* foi descrita primeiramente por Schwarz (1938) e Nogueira-Neto (1970). Esta subespécie está presente no Brasil no Estado do Mato Grosso, na bacia do rio Paraná e ainda no Paraguai e Argentina. Em 2005, Castanheira e Contel (2005) relataram a ocorrência de *T. angustula fiebrigi* na região Noroeste do Paraná, Londrina e Maringá. Essa subespécie foi coletada também em Altônia, no Estado do Paraná (Ruiz, 2006; Alves, 2006).

A subespécie *T. angustula angustula* está distribuída na maioria dos Estados do Brasil (Iwama e Melhem, 1979; Camargo e Posey, 1990), bem como no Panamá (Roubik, 1983), Venezuela (Vit et al., 1994) e Costa Rica (van Veen e Sommeijer, 2000a,b).

Com relação aos estudos de genética de populações e a diferenciação entre as duas espécies, Oliveira et al. (2004), empregando o marcador molecular RAPD, identificaram um marcador para as subespécies de *Tetragonisca*, o *primer* OPL-11. Posteriormente, Baitala et al. (2006) mostraram que com a utilização de marcadores RAPD é possível apenas separar populações de *Tetragonisca*, não tendo sido detectado marcador para subespécies, mesmo utilizando o *primer* mencionado anteriormente.

Dentre os marcadores moleculares isoenzimas, podemos destacar as esterases que apresentam atividade hidrolítica multifuncional e catalisam a hidrólise de um grande número de ésteres (Walker e Mackeness, 1983). Com base na sensibilidade aos substratos sintéticos que essas enzimas hidrolisam *in vitro*, dois grupos podem ser distinguidos nos insetos, as  $\alpha$ -esterases que hidrolisam preferencialmente o  $\alpha$ -naftil-acetato e as  $\beta$ -esterases que hidrolisam preferencialmente o  $\beta$ -naftil-acetato (Oakeshott et al., 1993). Também como critério classificatório, e de acordo com a sensibilidade a diferentes inibidores da atividade enzimática e aos resíduos de aminoácidos no seu sítio ativo, são reconhecidas quatro classes de esterases, as acetilesterases (E.C. 3.1.1.6), as arilesterases (E.C. 3.1.1.2), as carboxilesterases (E.C. 3.1.1.1) e as colinesterases que incluem as acetilcolinesterases (E.C. 3.1.1.7) e as pseudocolinesterases (E.C. 3.1.1.8) (Healy et al., 1991).

Pouco se conhece sobre as esterases de *T. angustula* e *T. fiebrigi*, mais conhecidas popularmente como abelhas jataí. Ruvolo-Takasusuki et al. (2006) caracterizaram as regiões de atividade esterásica em *T. angustula*, e estes autores encontraram duas regiões, as quais foram denominadas de EST-1 (uma  $\beta$ -esterase) e EST-2 (uma  $\alpha\beta$ -esterase).

Neste contexto, foi realizado o presente estudo com o objetivo de se identificar um marcador bioquímico para diferenciar as duas espécies de jataí, *T. angustula* e *T. fiebrigi*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Material

As operárias adultas de jataí foram provenientes de dois ninhos naturais localizados no campus da Universidade Estadual de Maringá, Paraná (23°24'40'' S; 51°56'23'' W), e um ninho era da espécie *T. angustula* e o outro da espécie *T. fiebrigi*. Após a coleta, as abelhas foram sacrificadas e estocadas em frascos devidamente identificados e numerados, a -20°C.

### Preparo das amostras e eletroforese PAGE

De cada operária foi retirada sua cabeça/tórax e homogeneizada individualmente em tubos de propileno 1,5 mL contendo 35µL da solução de 2-mercaptoetanol mais glicerol a 10%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 56.000G por 10 min., a temperatura de 4°C.

Eletroforeses no sentido vertical foram realizadas utilizando géis PAGE a 8% de concentração e gel de empilhamento com concentração de 5%. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Glicina 0,1M pH 8,3. Os géis foram submetidos à eletroforese em voltagem de aproximadamente 200V por 5 h.

Para a realização da coloração, primeiramente, o gel foi incubado por 30 min em 50 mL da solução de tampão fosfato (0,1M pH 6,2). Em seguida, o tampão foi descartado e acrescentou-se a solução de coloração, a qual consistia de: 50 mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,2; 0,03 g de  $\alpha$ -naftil acetato; 0,03 g de  $\beta$ -naftil acetato; 0,06 g do corante Fast Blue RR Salt. O gel foi incubado até o aparecimento das bandas.

Posteriormente, os géis permaneceram em solução conservante (ácido acético a 75% e glicerol a 10%, dissolvidos em 1000 mL de água destilada) por pelo menos 24 h. Em seguida, foram embebidos em gelatina a 5% e colocados entre duas folhas de papel celofane molhado, esticados, prensados e mantidos em temperatura ambiente até a secagem completa (Ceron et al., 1992).

### Testes de inibição

Os extratos de cabeça/tórax de cada operária foram utilizados duas vezes no mesmo gel PAGE, a primeira como controle e a segunda vez para o teste de inibição.

Para a realização da coloração, primeiramente, o gel foi cortado e separado em duas partes: controle e inibição. Cada parte, separadamente, foi incubada por 30 min em 50 mL da solução de tampão fosfato (0,1M pH 6,2). No tampão de incubação para o gel do teste foi acrescentado o inibidor a ser testado (organofosforado - 60µL, paracloromercuriobenzoato (p-CMB) – 0,01 g ou sulfato de eserina – 0,06 g). Após o período de incubação, o tampão foi descartado e acrescentou-se a solução de coloração como descrita anteriormente, e para o teste foi acrescentado o inibidor nas quantidades citadas acima.

Após a visualização das bandas no gel-controle foi realizada a comparação com o gel que continha inibidor e elaborada uma tabela de inibição.

### Termoestabilidade

O teste de termoestabilidade para as esterases foi realizado por meio da pré-incubação das amostras por 05 min a uma temperatura que variou de 52 a 58°C. Após a incubação, 10µL do sobrenadante foi aplicado no gel PAGE e submetido à corrida eletroforética.

Como controle, foram utilizados extratos de cabeça/tórax de *T. angustula* e *T. fiebrigi* que não foram submetidos ao aquecimento.

Após o tempo de corrida, os géis foram corados para visualização das esterases como descrito anteriormente.

## **3. RESULTADOS**

Nas análises eletroforéticas das esterases foram detectadas várias diferenças em relação ao número de esterases observadas, padrão de migração, afinidade ao substrato e termoestabilidade que permitiram demonstrar que o gênero *Tetragonisca* possui duas espécies *T. fiebrigi* e *T. angustula*, como sugerido por Camargo e Pedro (2007).

O número de regiões com atividade esterásica variou de acordo com a espécie; em extratos de *T. fiebrigi* foram observadas três esterases as quais foram denominadas de EST-1 (mais anódica), EST-2 (intermediária) e EST-4 (menos anódica), enquanto que em extratos de *T. angustula* foram observadas duas regiões de atividade esterásica:

EST-3 (mais anódica) e EST-4 (menos anódica). Esses resultados podem ser observados na Fig. 1.

De acordo com a especificidade aos substratos  $\alpha$ -naftilacetato e  $\beta$ -naftilacetato em *T. fiebrigi* a EST-1 foi classificada como uma  $\beta$ -esterase, EST-2 como  $\alpha$ -esterase e EST-4 uma  $\alpha\beta$ -esterase (Fig. 1).

As características bioquímicas descritas acima permitiram identificar a EST-1 e EST-2 como marcadores moleculares para *T. fiebrigi*, e a EST-3, da *T. angustula*, uma  $\beta$ -esterase, como marcador molecular para esta espécie.

As esterases nos insetos têm sido divididas em quatro classes baseadas na sua sensibilidade a três grupos de inibidores: organofosforados, sulfato de eserina e reagentes sulfidríla (Healy et al., 1991). No presente estudo, extratos de cabeça/tórax de operárias, após a corrida eletroforética, foram submetidos aos três grupos de inibidores, os resultados com relação ao padrão de inibição podem ser observados na Tab. I.

De acordo com seu padrão de inibição frente aos inibidores utilizados, em *T. fiebrigi* EST-1 e EST-2 podem ser classificadas como colinesterases, e a EST-1 é uma colinesterase do tipo I, enquanto que EST-2 é uma colinesterase do tipo II. A EST-4, de ambas as espécies, é uma carboxilesterase (Tab. I). Em *T. angustula*, EST-3 é uma acetilesterase.

Os testes de termoestabilidade mostraram que há diferenças na inibição das esterases dependendo da temperatura a que são submetidas. Em *T. fiebrigi*, quando os extratos de cabeça/tórax foram submetidos a uma temperatura de 52°C, a EST-4 teve redução parcial da sua atividade, enquanto que EST-1 e EST-2 tiveram uma inibição total. Com relação a *T. angustula* foi observada uma inibição parcial para EST-4, enquanto que EST-3 não foi inibida, na mesma temperatura. Entretanto, a partir de 54°C, todas as esterases perderam a sua atividade (Fig. 2 e Tab. II).

#### 4. DISCUSSÃO

Ruvolo-Takasusuki et al. (2006) e Stuchi et al. (2008) denominaram as esterases de *T. angustula* de acordo com o seu padrão de migração da seguinte maneira: EST-1 (mais anódica) e EST-2 (menos anódica). Contudo, frente aos resultados obtidos no presente estudo, essas esterases passam agora a serem denominadas de EST-3 (mais anódica) e EST-4 (menos anódica), e a EST-3 é uma região específica de *T. angustula* (Fig. 1).

O padrão de inibição das esterases analisado mostrou que *T. angustula* apresenta duas colinesterases e uma carboxilesterase e que *T. fiebrigi* apresenta uma carboxilesterase (Tab. I). As carboxilesterases e as colinesterases são isoenzimas bastante frequentes em insetos, possivelmente porque desempenham papéis fundamentais na detoxificação de compostos xenobióticos, participando da resistência aos inseticidas em diversos representantes desta classe. Com relação aos organofosforados, esses mecanismos envolvem o aumento na detoxificação metabólica por hidrólise ou sequestro destes compostos (Hemingway, 2000; Lee e Lees, 2001; Cui et al., 2007) ou alterações estruturais na acetilcolinesterase, alvo primário para esta classe de inseticida (Hsu et al., 2006).

Dessa maneira, as abelhas do gênero *Tetragonisca* poderão ser empregadas em estudos futuros para a utilização dessas abelhas como bioindicadoras da presença de agrotóxicos em áreas cultivadas e naturais.

Com relação à termoestabilidade foi possível observar que a EST-4 da *T. fiebrigi* e EST-3 e EST-4 da *T. angustula* são mais termoestáveis do que a EST-1a de *Apis mellifera*. Ruvolo-Takasusuki et al. (1997) observaram que não havia atividade da EST-1a de *A. mellifera* quando extratos abdominais foram previamente incubados a 50°C ou mais por 04 min, enquanto que as de *T. angustula* e *T. fiebrigi* foram submetidas à temperatura de 52°C por 05 min e ainda permaneceram em atividade (Tab. II).

EST-3 da espécie *T. angustula* foi a esterase que apresentou a termoestabilidade mais alta (Fig. 2), perdendo sua atividade apenas aos 54°C. Ruvolo-Takasusuki et al. (1998) observaram alta termoestabilidade para EST-2 de *A. mellifera*, a qual apresentou atividade após pré-incubação a 60°C por 08 min.

A caracterização bioquímica das esterases mostrou que apenas a EST-4 é comum às duas espécies. As EST-1 (*T. fiebrigi*) e EST-3 (*T. angustula*) provavelmente se diferenciaram por mutações ao longo da evolução das duas espécies, e a EST-2 (*T. fiebrigi*) pode ter originado por duplicação e mutações posteriores.

A utilização do marcador molecular RAPD permitiu que Oliveira et al. (2004) observassem que *T. a. angustula* e *T. a. fiebrigi* podem ser separadas em dois grupos considerando as subespécies. A utilização de RAPD por Baitala et al. (2006), em cinco populações de *T. a. angustula* e *T. a. fiebrigi* provenientes de Junqueirópolis (SP), Maringá (PR) e Cianorte (PR), não permitiu separar as duas subespécies, apenas populações provenientes do Estado de São Paulo e do Paraná.

Alves (2006) empregou RAPD para a análise de três populações de jataí no Noroeste do Paraná, Ivatuba, Umuarama e Altônia, e em Ivatuba foram coletadas apenas *T. a. angustula* e em Umuarama e Altônia apenas *T. a. fiebrigi*. Os seus resultados mostraram que as duas espécies de abelhas estão separadas com valores de distância genética que justificam a sua taxonomia, pois entre *T. a. angustula* e *T. a. fiebrigi* o valor de distância genética de acordo com Nei (1978) foi 0,23 e entre as duas populações de *T. a. fiebrigi* foi de 0,0507.

Castanheira e Contel (2005) realizaram a análise morfométrica da asa, coloração do mesepisterno e polimorfismo da hexoquinase de abelhas *T. a. angustula* e *T. a. fiebrigi* de várias localidades dos Estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. A coloração do mesepisterno e a frequência do alelo  $HK^{88}$  permitiram às autoras sugerirem que há uma distribuição clinal ou mistura racial entre as duas subespécies. Foi observada uma alta correlação entre a cor amarela do mesepisterno e a frequência do alelo  $HK^{88}$ .

Diniz-Filho et al. (1998) realizaram análise morfométrica de *T. angustula* das regiões Central e Sudeste do Brasil. As variações obtidas puderam ser explicadas por contato secundário entre as raças anteriormente isoladas.

A controvérsia sobre a ocorrência de duas espécies de *Tetragonisca* ou de duas subespécies parece estar sendo solucionada, pois o perfil eletroforético e a caracterização bioquímica das esterases dessas abelhas sem ferrão mostraram que há duas espécies distintas. Assim, os resultados obtidos com a caracterização bioquímica das esterases mostraram que existem diferenças nesses *locos* entre as duas espécies que justificam a sua classificação de acordo com Camargo e Pedro (2007).

Esses resultados mostram que as abelhas jataí são um grupo importante para o estudo de especiação. Provavelmente, as duas espécies originaram de uma única que pode ter se diferenciado por isolamento geográfico. Contudo, a ação antrópica e o pequeno tempo de isolamento podem estar colocando as duas espécies em contato novamente o que poderia ocasionar a hibridação detectada no estudo de Castanheira e Contel (2005). As similaridades observadas com o marcador RAPD podem ser decorrentes da utilização de *primers* inespecíficos e do pequeno tempo de separação das duas espécies.

Marcadores moleculares como PCR-RFLP poderão contribuir com novas análises sobre a taxonomia e sistemática dessas espécies de abelhas nativas sem ferrão.



Finalmente, pode-se concluir que os resultados apresentados não deixam dúvidas de que as abelhas jataí são duas espécies *T. fiebrigi* e *T. angustula* e que as EST-1, EST-2 e EST-3 são marcadores moleculares que as identificam de forma simples e eficiente.

## 5. AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia e ao Laboratório de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá, por tornar possível a realização do presente trabalho.

Ao Programa de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo de doutorado.

## 6. RESUMO GERAL

Entre as abelhas sociais brasileiras, as pertencentes à subfamília Meliponinae denominadas popularmente de abelhas indígenas sem ferrão, são as mais conhecidas. Com mais de 200 espécies diferentes, algumas das quais frequentemente são criadas para a produção de mel. O presente estudo teve como objetivo identificar um marcador bioquímico para diferenciar as duas espécies de jataí, *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi*. Operárias de ambas as espécies foram coletadas em ninhos localizados na Universidade Estadual de Maringá. As amostras foram homogeneizadas em solução de 2-mercaptoetanol com glicerol 10%. O tampão de corrida utilizado foi o tris-glicina pH 8,3 e a solução de coloração era constituída de tampão fosfato pH 6,2, os substratos  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil acetato e o corante Fast Blue RR Salt. Para *T. fiebrigi* foram observadas três esterases: EST-1 ( $\beta$ -esterase, colinesterase I), EST-2 ( $\alpha$ -esterase, colinesterase II) e EST-4 ( $\alpha\beta$ -esterase, carboxilesterase). Já para a espécie *T. angustula* foram detectadas duas esterases: EST-3 ( $\beta$ -esterase, acetilesterase) e EST-4 ( $\alpha\beta$ -esterase, carboxilesterase). A EST-3 da *T. angustula* mostrou a termoestabilidade mais alta, não sendo observada a partir de 54°C, enquanto que para espécie *T. fiebrigi* as EST-1 e EST-2 não foram observadas a partir de 52°C. Por meio desta caracterização foi possível observar que a EST-4 de *T. angustula* e *T. fiebrigi* mostraram características bioquímicas iguais, sendo assim estas esterases podem ser codificadas pelo mesmo gene nas duas espécies. A caracterização bioquímica e os marcadores moleculares juntos mostraram que as duas espécies estão diferenciadas.

## 7. REFERÊNCIAS

Alves D.J. (2006) Uso do marcador molecular RAPD para estudo de polimorfismos em populações de *Tetragonisca angustula* L. (Apidae: Meliponinae). Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. 45p.

Alonso W.J. (1998) Abelhas sem ferrão: centenas de espécies para polinização, produção de mel, lazer e educação. Artigos técnicos. Animais de criação – Abelhas. 626. [online] [http://www.snagricultura.org.br/artitec\\_abelhas.htm](http://www.snagricultura.org.br/artitec_abelhas.htm) (acesso em 01 dezembro 2008).

Alonso W.J., Paim C.S. (2001) As abelhas sem ferrão. [online] <http://www.unifap.br/abelhas> (acesso em 01 dezembro 2008).

Baitala T.V., Mangolin C.A., Toledo V.A.A., Ruvolo-Takasusuki M.C.C. (2006) RAPD polymorphism in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera; Meliponinae, Trigonini) populations, Sociobiol. 48, 861-873.

Camargo J.M.F., Menezes-Pedro S.R. (1992) Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review, Apidol. 23, 509-522.

Camargo J.M.F., Pedro S.R.M. (2007) Meliponini Lepeletier, 1836, in: Moure J.S., Urban, D. e Melo G.A.R. (Orgs.). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia, pp. 272-578.

Camargo J.M.F., Possey D.A. (1990) O conhecimento dos Kayapó sobre as abelhas sociais sem ferrão (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera): Notas adicionais, Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, nova ser. Zool. 6, 17-42.

Castanheira E.B., Contel E.P.B. (2005) Geographic variation in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Mliponinae), J. Apic. Res. 44, 101-105.

Ceron C.R., Santos J.R., Campos Bicudo H.E.M.C. (1992) The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop, Braz. J. Genet. 15, 201-203.

Cui F., Qu H., Cong J., Liu X. L., Qiao C.L. (2007) Do mosquitoes acquire organophosphate resistance by functional changes in carboxylesterases?, FASEB J. 21, 3584-3591.

Diniz-Filho J.A.F., Balestra R., Rodrigues F.M., Araújo E.D. (1998) Geographic variation of *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Hymenoptera, Meliponinae) in Central and Southeastern Brazil, Natur. 23, 193-208.

Healy M.J., Dumancic M.M., Oakeshott J.G. (1991) Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*, Bioch. Genet. 29, 365-387.

Hemingway J. (2000) The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance, Insec. Bioch. Mol. Biol. 30, 1009-1015.

- Hsu J.C., Haymer D.S., Wu J.W., Feng H.T. (2006) Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated to organophosphorus insecticides, *Insec. Bioch. Mol. Biol.* 36, 396-402.
- Iwama S., Melhem T.S. (1979) The pollen spectrum of the honey of *Tetragonisca angustula angustula*, Latreille (Apidae, Meliponinae), *Apidol.* 10, 275-295.
- Lee S.E., Lees E.M. (2001) Biochemical mechanisms of resistance in strains of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) resistant to malathion and chlorpyrifos-methyl, *J. Econ. Ent.* 94, 706-713.
- Macías-Macías O., Chuc J., Ancona-Xiu P., Cauich O., Quezada-Euán J.J.G. (2009) Contribution of native bees and Africanized honey bees (Hymenoptera: Apoidea) to solanaceae crop pollination in tropical México, *J. Appl. Entomol.* 133, 456-465.
- Michener C.D. (2000) *The bees of the world*. The John Hopkins University, Baltimore, MD.
- Moure J.S. (1961) A preliminary supra-specific classification of the Old World Meliponine bees (Hymenoptera, Apoidea), *Stud. Entomol.* 4, 181-242.
- Moure J.S., Urban D., Melo G.A.R. (2007) Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region, *Soc. Bras. Entomol. Curitiba, Brasil*.
- Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, *Genetics.* 89, 583-590.
- Nogueira-Neto P. (1970) *A criação das abelhas indígenas sem ferrão*. 2. ed. São Paulo: Chácaras e Quintais.
- Nogueira-Neto P. (1997) *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. São Paulo: Nogueirapis.
- Oakeshott J.G., Papenrecht E.A., Boyce T.M., Healy M.J., Russel R.J. (1993) Evolutionary genetics of *Drosophila esterases*, *Genet.* 90, 239-268.
- Oliveira R.C., Nunes F.M.F., Campos A.P.S., Vasconcelos S.M., Roubik D., Goulart L.R., Kerr W. E. (2004) Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on RAPD markers, *Genet. Mol. Biol.* 27, 181-186.
- Roubik D.W. (1983) Nest and colony characteristics of stingless bees from Panamá (Hymenoptera: Apidae), *J. Kansas Entomol. Soc.* 56, 327-355.
- Ruiz J.B. (2006) Análise genética de populações em *Tetragonisca angustula* na região noroeste do Paraná por meio de isoenzimas. Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. 59p.
- Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Del Lama M.A., Soares A.E.E. (1997) Genetic characterization of a new *Apis mellifera* esterase, *Apidol.* 28, 259-267.

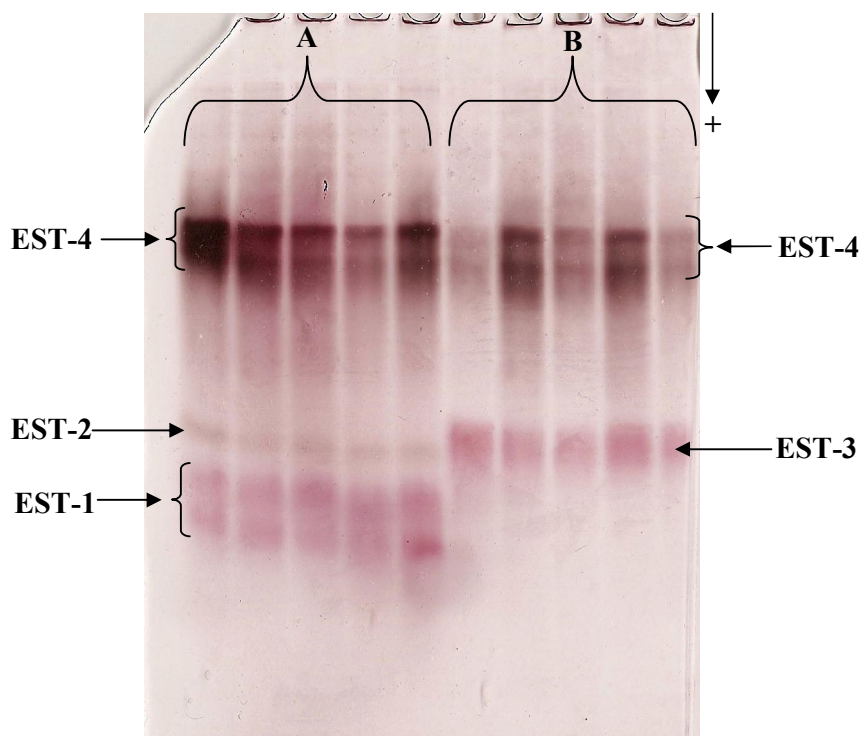
- Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Del Lama M.A., Soares A.E.E. (1998) Esterase-2 polymorphism in *Apis mellifera*, J. Apic. Res. 37, 17-22.
- Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Viana L.H.O., Baitala T.V., Nicolin K.C., Toledo V.A.A. (2006) Characterization of esterases in *Tetragonisca angustula* and *Tetragona clavipes* (Hymenoptera; Meliponinae), Braz. J. Morph. Sci. 23, 431-434.
- Stuchi A.L.P.B., Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Toledo V.A.A. (2008) Análise da genética de populações em abelhas jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille) por meio de isoenzimas, Magist. 20, 68-77.
- Schwarz H.F. (1938) The stingless bees (Meliponidae) of British Guiana and some related forms, Bull. Americ. Mus. Nat. Hist. 74, 437-508.
- Veen J.W. van, Sommeijer M.J. (2000a) Observation of gynes and drones around nuptial flights in the stingless bees *Tetragonisca angustula* and *Melipona beecheii* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae), Apidol. 31, 47-54.
- Veen J.W. van, Sommeijer M.J. (2000b) Colony reproduction in *Tetragonisca angustula* (Apidae, Meliponini), Insect. Soci. 47, 70-75.
- Vit P., Bogdanov S., Kilchenmann V. (1994) Composition of Venezuelan honeys from stingless bees (Apidae: Meliponinae) and *Apis mellifera* L., Apidol. 25, 278-288.
- Walker C.H., Mackness M.I. (1983) Esterases: problems of identification and classification, Bioch. Pharm. 32, 3265-3269.

**Tabela I.** Atividade e classificação das esterases com a utilização de inibidores em *Tetragonisca fiebrigi* e *Tetragonisca angustula*. (+) inibição, (-) não inibição

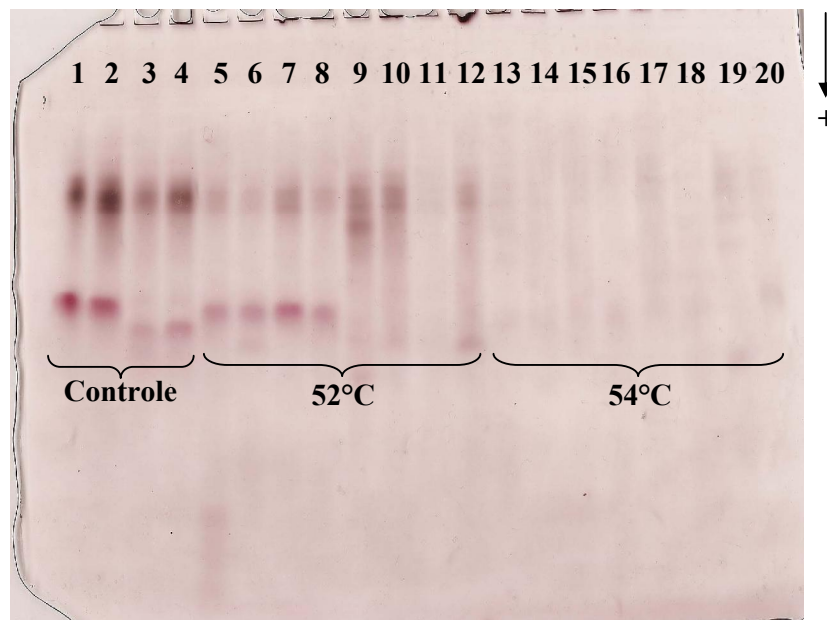
<i>Esterases</i>	<i>Malathion</i>	<i>p-CMB</i>	<i>Sulfato de eserina</i>	<i>Classificação</i>
<i>T. fiebrigi</i>				
EST-1	+	-	+	Colinesterase (I)
EST-2	+	+	+	Colinesterase (II)
EST-4	+	+	-	Carboxilesterase
<i>T. angustula</i>				
EST-3	-	-	-	Acetilesterase
EST-4	+	+	-	Carboxilesterase

**Tabela II.** Alteração na atividade das esterases de *Tetragonisca fiebrigi* e *Tetragonisca angustula* após aquecimento. (++) inibição total, (+) inibição parcial, (-) não inibição

<i>Temperatura</i>	<i>T. fiebrigi</i>			<i>T. angustula</i>	
	EST-1	EST-2	EST-4	EST-3	EST-4
52°C	++	++	+	-	+
54°C	++	++	++	++	++



**Figura 1.** Perfil eletroforético das esterases em gel de poliacrilamida. A = extratos de cabeça/tórax de operárias de *Tetragonisca fiebrigi* e B = extratos de cabeça/tórax de operárias de *Tetragonisca angustula*.



**Figura 2.** Perfil eletroforético de esterases em teste de termoestabilidade. Amostras 1-2, 5-8 e 13-16 correspondem a extratos de cabeça/tórax de operárias de *Tetragonisca angustula*; amostras 3-4, 9-12 e 17-20 correspondem a extratos de cabeça/tórax de *Tetragonisca fiebrigi*.



**IV - Alterações da expressão gênica em *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938) após  
contaminação com agrotóxicos**

Título abreviado: **Abelha jataí como bioindicador**

**ABSTRACT**

The stingless bee *T. fiebrigi* was evaluated with the purpose of employing it as a pesticide bioindicator in the environment. The parameters analyzed were alterations in the esterase expression, total protein and the chromatin in brain cells after contamination with the insecticides fipronil, malathion, neem and thiamethoxam. The LC<sub>50</sub> values showed a high toxicity of the contamination by contact for the insecticide fipronil. Electrophoretic analysis of *T. fiebrigi* showed partial inhibition of EST-1 and EST-4 with malathion and fipronil in the food and increase in the intensity of EST-4 with thiamethoxam after contact. The CEC analysis showed significant alteration after contamination by contact with malathion (0.15M) and evidence of apoptotic cells even when the insecticide was provided in the food. These results showed that *T. fiebrigi* bees can be used as bioindicators to detect the presence of insecticide residues.

**Keywords** – stingless bee, LC<sub>50</sub>, esterases, CEC, fipronil, malathion, thiamethoxam

## 1. INTRODUÇÃO

A polinização é essencial para o bom desenvolvimento da agricultura com abrangência global. Contudo, há evidências de que os polinizadores estão declinando como resultado da degradação ambiental local e global (Biesmeijer et al., 2006). Aizen et al. (2008) desenvolveram um estudo global sobre a dependência da agricultura com polinizadores. Esses autores verificaram que desde 1961 a produção agrícola global (Mt/ha) tem aumentado a taxa de crescimento anual de ~1,5%, a área ocupada por agricultura expandiu cerca de 23% no mesmo período. As maiores proporções de aumento dessas áreas podem ser atribuídas a culturas dependentes de polinizadores; nos países desenvolvidos esse aumento foi de 70% e nos países em desenvolvimento ocorreu um aumento de 9,4%, considerando o período de 1961 a 2006 (Aizen et al., 2008). Esse estudo mostra, ainda, que no futuro as áreas agrícolas poderão se tornar ainda mais dependentes de polinizadores pelas mudanças nos hábitos alimentares (árvores e arbustos frutíferos) e produção de óleos como canola e palma (dependentes de polinizadores) para produção de biodiesel.

O Brasil possui dezenas de espécies de abelhas nativas (ou indígenas) que exercem, entre outros, importante papel na fecundação de inúmeras espécies vegetais originais de nossa flora. Entretanto, a destruição indiscriminada de matas naturais e o extrativismo sem reposição de colônias na natureza, além do aumento das áreas agriculturáveis contribuem para a redução da diversidade dessas abelhas eussociais.

Entre as abelhas sociais brasileiras, as pertencentes à subfamília Meliponinae, chamadas popularmente de abelhas indígenas sem ferrão, são as mais conhecidas (Nogueira-Neto, 1970). As do gênero *Tetragonisca*, em especial *Tetragonisca fiebrigi*, pertencentes à tribo Trigonini (abelhas que utilizam cera) são conhecidas popularmente como jataí. É uma espécie de abelhas sem ferrão mais comum da região neotropical e que se adapta com certa facilidade às diferentes condições de nidificação, como ocos de muros, de pedras, troncos de árvores, caixa de luz etc., o que torna mais fácil a disseminação da meliponicultura (Moure, 1961).

Como as abelhas são suscetíveis a muitos inseticidas comumente utilizados para proteger o plantio de várias culturas, esses insetos podem ser utilizados como bioindicadores para a determinação de resíduos de alguns inseticidas nas plantas, assim como para detectar o nível de toxicidade perigosa para as abelhas frente a inseticidas

comumente utilizados (Accorti et al., 1992), sendo assim, as abelhas podem ser utilizadas como bioindicadores da presença desses resíduos no ambiente.

Diversos agrotóxicos são utilizados nas culturas, dentre eles têm-se: o malathion, um organofosforado (Op), o qual atua diretamente sobre a acetilcolinesterase, uma importante enzima regulatória responsável pelo controle da transmissão neural nas sinapses por meio da hidrólise da acetilcolina (Xu e Bull, 1994); o fipronil, inseticida da segunda geração dos fenilpirazóis, é altamente tóxico para os insetos que não são seu alvo, sendo a  $DL_{50}$  para abelhas muito baixa, 4 ng/abelha (Tingle et al., 2003), esse inseticida atua na interrupção do fluxo dos íons cloreto inibindo o receptor do ácido gama aminobutírico (GABA) no sistema nervoso central (Grant et al., 1998; Ozoe et al., 2000); o thiamethoxam, inseticida da segunda geração dos neonicotinoides, é caracterizado como altamente tóxico para as abelhas com  $DL_{50}$  30ng/abelha (Iwasa et al., 2004), o mesmo age interferindo com os receptores pós-sináptico da acetilcolina (Antunes-Kenyon e Kennedy, 2001).

Compostos de origem vegetal possuem ação acaricida (Amer et al., 1989; El Gengaihi et al., 2000), destacando-se os da família Meliaceae, principalmente de *Azadirachta indica* A. Juss, conhecida no Brasil por neem, que possui, como principal metabólito secundário a azadiractina (Schmutterer, 1987; Rembold, 1989). Extratos de óleo de neem controlam várias espécies de carrapatos parasitas e doenças das abelhas, reduzindo o número de produtos químicos usados nas colmeias, sem prejudicar as abelhas (Melathopoulos et al., 2000).

As análises eletroforéticas da atividade das esterases de abelhas é um caminho para usar esses insetos como bioindicadores. As alterações na sua expressão pela contaminação por inseticidas poderiam ser empregadas na detecção desses compostos no ambiente.

Hashimoto et al. (2003) utilizaram extratos de operárias adultas de abelhas *Apis mellifera* submetidas à eletroforese, para verificar a ação do inseticida thiamethoxam sobre as esterases, após 24 h de sua aplicação no alimento e por contato. Os autores verificaram que as esterases 1, 2, 4 e 5 tiveram suas atividades parcialmente inibidas, tanto nas aplicações no alimento, quanto por contato em operárias com 0, 7, 14 e 21 dias. Os autores concluíram que a alteração dessas regiões pode ser usada como indicadores da presença de resíduos do inseticida estudado.

Outra forma de se detectar a presença de resíduos de inseticidas no ambiente é por meio de estudos da alteração da cromatina; tal alteração pode ser detectada pela análise

da concentração crítica de eletrólitos (CEC), técnica desenvolvida por Vidal e Mello (1989).

Grande parte dos estudos de basofilia nuclear destinados a levantar conhecimentos sobre os níveis de complexação DNA-proteína na cromatina, e mesmo o estado de conformação do DNA e cromatina, tem se baseado na utilização do azul de toluidina (AT) como corante catiônico (Vidal, 1987).

A análise de CEC permite verificar se está ocorrendo alterações na expressão gênica após a contaminação com inseticida, levando a alterações no valor de CEC, pois pode ocorrer a inativação ou ativação de genes após a contaminação.

Pela importância das abelhas nativas sem ferrão e de obter bioindicadores para contaminação ambiental por agrotóxicos, esse estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a sensibilidade da espécie *Tetragonisca fiebrigi*, a contaminação pelos inseticidas fipronil, malathion, neem e thiamethoxam, a mortalidade decorrente da contaminação, as alterações na atividade relativa das esterases e proteínas totais e as alterações, em nível de cérebro, da cromatina, para que essas abelhas possam ser empregadas como bioindicadores da presença desses inseticidas no ambiente.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das abelhas

Foram coletados indivíduos adultos de abelhas *T. fiebrigi*, provenientes de cinco colmeias localizadas no campus da Universidade Estadual de Maringá, Paraná (23°24'40'' S; 51°56'23'' W). Após a coleta, as abelhas foram submetidas aos bioensaios com os inseticidas fipronil (fenilpirazol), malathion (organofosforado), neem (azadiractina) e thiamethoxam (neonicotinoide).

### Montagem dos bioensaios

As abelhas foram coletadas em garrafas plásticas e colocadas em freezer por aproximadamente 1 min, apenas para serem anestesiadas; em seguida, as mesmas foram colocadas nas placas de petri, previamente montadas. Foram realizados dois bioensaios como segue:

- Primeiro bioensaio (contaminação por contato) → As abelhas foram acondicionadas em placas de petri (150x20 mm) contendo alimento (Candi) e papel filtro (15 cm de diâmetro) embebido em 1 mL da solução contendo o

inseticida. Foram colocadas 20 abelhas por placa, e foram utilizadas quatro placas, três repetições e uma placa-controle, que possuía alimento e papel filtro embebido em água. As abelhas foram deixadas nas placas por um período de 24 h, sendo então realizada a contagem das abelhas mortas e retiradas as vivas, as quais foram sacrificadas para a análise eletroforética.

O inseticida comercial foi diluído como descrito na bula para aplicação na cultura. Posteriormente, a partir dessas soluções foram realizadas diluições dos inseticidas e preparadas soluções aquosas nas seguintes concentrações:

- Fipronil: 0,0001; 0,0005; 0,0006; 0,0007 e 0,0011%.
- Malathion: 0,0017; 0,0018; 0,0019; 0,002 e 0,004%.
- Neem: 75 e 100%.
- Thiamethoxam: 0,7; 0,8; 0,85; 0,9 e 1%.
- Segundo bioensaio (contaminação por ingestão) → As abelhas foram acondicionadas em placas de petri (150x20 mm) contendo papel filtro embebido em água e um recipiente com inseticida misturado ao alimento (Candi). Todo procedimento restante foi o mesmo do primeiro bioensaio.

Assim como no bioensaio anterior, o inseticida comercial foi diluído como descrito na bula para aplicação na cultura e a partir dessas soluções foram realizadas diluições e preparadas soluções aquosas nas seguintes concentrações:

- Fipronil: 0,0011; 0,0012; 0,00125; 0,0025 e 0,025%.
- Malathion: 0,2; 0,3; 0,4; 0,45 e 0,5%.
- Neem: 75 e 100%.
- Thiamethoxam: 0,15; 0,2; 0,22; 0,24 e 0,5%.

Os resultados dos dois bioensaios foram submetidos ao programa estatístico SPSS 13.0, para análise da  $CL_{50}$  e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) dose-resposta.

#### Preparo das amostras e eletroforese PAGE e SDS-PAGE

Após os bioensaios, as abelhas vivas foram estocadas em frascos devidamente identificados e numerados, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , pelo menor espaço de tempo possível. Para análise foram utilizados dez indivíduos contaminados e dez controle. Pelo abdome apresentar algumas proteases que podem degradar as esterases, para análise das mesmas foram utilizados apenas a cabeça e o tórax dos insetos.

As amostras foram homogeneizadas individualmente em tubos de propileno 1,5 mL, contendo 35µL da solução de 2-mercaptoetanol mais glicerol a 10%. Em seguida, foram centrifugadas a 56.000G por 10 min., a uma temperatura de 4°C.

Nos géis PAGE foram aplicados 10µL do sobrenadante. Nas eletroforeses SDS-PAGE, 15µL do sobrenadante foram transferidos para tubos de 200µL e acrescentado 10µL de tampão Tris-HCl (1,5M, pH 8,8) contendo SDS 10%, 2-mercaptoetanol, glicerol e azul de bromofenol. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 100°C por 03 min em banho-maria e 20µL foram aplicados no gel para corrida eletroforética.

Eletroforeses no sentido vertical foram realizadas utilizando géis PAGE a 8% de concentração e gel de empilhamento com concentração de 5% para detecção das esterases, e géis SDS-PAGE a 7% de concentração e gel de empilhamento com concentração de 5% para detecção das proteínas totais. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Glicina 0,1M pH 8,3 para esterase e Tris-Glicina 0,1M pH8,3 + SDS 10%, para proteína total. Os géis foram submetidos à eletroforese em uma voltagem de aproximadamente 200V por 05 h para esterase e 90V até a saída do front para proteína total.

Para a realização da coloração para esterase, primeiramente, o gel foi incubado por 30 min em 50 mL da solução de tampão fosfato (0,1M, pH 6,2). Em seguida, o tampão foi descartado e acrescentou-se a solução de coloração, a qual consistia de: 50 mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,2; 0,03 g de  $\alpha$ -naftil acetato; 0,03 g de  $\beta$ -naftil acetato; 0,06 g do corante Fast Blue RR Salt. O gel foi incubado até o aparecimento das bandas.

A coloração das proteínas totais foi realizada incubando os géis em uma solução com 100 mg de azul brilhante de comassie e 100 mL da solução PAGE (45% de etanol, 10% de ácido acético glacial em 45% de água destilada), por um período de três dias. Após esse período, os géis foram então descorados após lavagens sucessivas com a solução PAGE, até a completa visualização das bandas.

Posteriormente, todos os géis permaneceram em solução conservante (ácido acético a 75% e glicerol a 10%, dissolvidos em 1000 mL de água destilada) por pelo menos 24 h. Em seguida, foram embebidos em gelatina a 5% e colocados entre duas folhas de papel celofane molhado, esticados, prensados e mantidos em temperatura ambiente até a secagem completa (Ceron et al., 1992).

### Análise citoquímica

Nas análises citoquímicas, foram utilizados dois inseticidas, malathion e thiamethoxam, e foram utilizadas duas concentrações de cada inseticida, a que mais se aproximou da  $CL_{50}$  e uma subletal.

Para o malathion, foram utilizadas as concentrações 0,0019% (contato); 0,4% e 0,45% (ingestão). Para o thiamethoxam as concentrações foram 0,85% e 0,8% (contato); 0,22% e 0,2% (ingestão).

As abelhas foram mantidas nos bioensaios, como descrito anteriormente, porém após as 24 h as abelhas vivas foram retiradas das placas e procedeu-se a análise citoquímica.

Primeiramente, com o auxílio de uma lupa, a cabeça das abelhas foi dissecada e o cérebro retirado e colocado em lâmina contendo ácido acético (45%); em seguida, o material foi coberto por uma lamínula e realizou-se o esmagamento. Com uma pinça, a lâmina foi congelada em nitrogênio líquido, a lamínula retirada e a lâmina fixada em solução de etanol:ácido acético por 02 min; após esse período, a mesma foi lavada em etanol 70% por 05 min.

Para coloração foram utilizadas oito cubetas com diferentes concentrações de magnésio (0,02; 0,05; 0,08; 0,10; 0,12; 0,15; 0,20 e 0,30M) mais o corante azul de toluidina. Uma cubeta-controle, apenas com azul de toluidina, também foi utilizada. As lâminas ficaram no corante por 20 min e, em seguida, foram lavadas em água destilada e colocadas no porta-lâmina para secar à temperatura ambiente.

Após secagem, as lâminas foram mergulhadas em cubeta com xylol por 15 min e montadas com entellan e lamínula. As lâminas foram observadas com o auxílio de um microscópio ótico para poder detectar alterações em nível de cérebro da cromatina.

### **3. RESULTADOS**

Os valores de  $CL_{50}$  para *T. fiebrig*, mostraram que a maior toxicidade foi observada quando as abelhas foram contaminadas por contato com o inseticida fipronil, na concentração de 0,00062%, e a menor toxicidade foi observada na contaminação por contato com thiamethoxam, apresentando uma  $CL_{50}$  de 0,79% (Tab. I).

Nas Figs. 1 e 2 pode ser observado que há correlação entre o aumento da concentração do inseticida fipronil e a mortalidade das abelhas *T. fiebrigi* tanto na contaminação por contato (Fig. 1A) como na contaminação por ingestão (Fig. 2A).

Quando o inseticida utilizado foi o malathion, observou-se que não existe correlação entre o aumento da concentração do inseticida e a mortalidade na contaminação por contato (Fig. 1B), pois em todos os testes realizados ou as abelhas não eram afetadas pelo organofosforado ou todas morriam. Já na contaminação por ingestão, foi possível observar correlação (Fig. 2B).

O inseticida thiamethoxam apresentou correlação para os dois tipos de contaminação (Figs. 1C e 2C), e o maior coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi observado na contaminação por ingestão, com valor de 0,902.

As análises eletroforéticas das abelhas *T. fiebrigi* não mostraram inibição das regiões esterásicas, quando o fipronil e o malathion foram fornecidos às abelhas por contato. No entanto, quando o inseticida utilizado foi o thiamethoxam, foi possível observar aumento na intensidade da região EST-4 na concentração 0,9% (Tab. II e Fig. 3).

Após a ingestão do fipronil pelas operárias de *T. fiebrigi*, a análise eletroforética de extratos de cabeça/tórax mostrou alteração das regiões esterásicas EST-1 e EST-4, na concentração 0,0012% (Tab. III), porém quando o inseticida utilizado foi o malathion, foi possível observar a inibição parcial da EST-4 nas concentrações 0,2% e 0,45%. Para o thiamethoxam não foi observada inibição das regiões de atividade esterásica (Tab. III).

Os bioensaios realizados com o neem mostraram que esse inseticida não provoca mortalidade da espécie em estudo, sendo este o motivo pelo qual não foi possível calcular um valor de  $CL_{50}$  para este inseticida.

No perfil eletroforético das proteínas foram observados 23 peptídeos de acordo com a migração e peso molecular como pode ser observado na Fig. 4. O tamanho variou de 20 a 120kDa . De todas as análises realizadas apenas uma região da proteína apresentou grande redução após contaminação por contato com o inseticida malathion na concentração de 0,0017%, para a espécie *T. fiebrigi* (Fig. 4), região esta que possui peso molecular entre 70-80 kDa e que foi denominada de p19.

As análises citoquímicas mostraram que as abelhas que não foram tratadas com inseticida (controle) tiveram seus valores de CEC dentro do intervalo  $0,20M < CEC < 0,30M$  (Tabs. IV e V).

Quando as abelhas foram submetidas ao inseticida malathion na contaminação por ingestão, os valores de CEC ficaram em 0,30M, para as duas concentrações analisadas (Tab. IV). Na contaminação por contato, o valor de CEC ficou em 0,15M, ocorrendo



portanto um relaxamento da cromatina (Tab. IV). Porém, quando o inseticida foi adicionado ao alimento e ingerido pelas abelhas *T. fiebrigi*, foi observado início de células em apoptose (Fig. 5).

Os valores de CEC para *T. fiebrigi*, quando o inseticida utilizado foi o thiamethoxam por contato, foram 0,30M na concentração 0,8% e 0,20M na concentração 0,85% (Fig. 6). Na contaminação por ingestão o valor de CEC foi 0,20M para concentração 0,2% e ficou no intervalo entre  $0,20M < CEC < 0,30M$  para concentração 0,22% (Tab. V).

Os resultados obtidos com o inseticida thiamethoxam, tanto por contato como por ingestão, não diferiram muito dos resultados obtidos com o controle, e o valor de CEC para o controle ficou no intervalo  $0,20M < CEC < 0,30M$ .

#### 4. DISCUSSÃO

O fipronil é um inseticida, que teve seu primeiro registro em 1996. Ampla variedade de formulações está disponível e é usada tanto nas culturas de milho e arroz, como para matar baratas, formigas e carrapatos. Este inseticida é um membro da nova classe de inseticidas denominados fenilpirazóis, que atua bloqueando os canais clorídricos dos receptores ácido gama-aminobutíricos (GABA), no sistema nervoso central, conduzindo a uma excitação neural e consequente morte do organismo (Key et al., 2003).

Como foi possível observar no presente trabalho, este inseticida foi o que apresentou a maior toxicidade, com valor de  $CL_{50}$  em 0,00062%, e a alta toxicidade deste inseticida, para as abelhas já foi descrita anteriormente por Tingle et al. (2003). Esses autores encontraram um valor de  $DL_{50}$  para abelhas de 4ng/abelha.

A toxicidade do fipronil está bem documentada, no entanto, pouco se conhece sobre os efeitos fisiológicos e comportamentais das suas doses subletais sobre as abelhas. Este tem sido o maior interesse no Sul da França, uma vez que foi detectada a diminuição no número de operárias nas colmeias após as abelhas terem forrageado em flores de plantas, que tiveram suas sementes tratadas com fipronil (Hassani et al., 2005).

Os inseticidas neonicotinoides podem acumular no pólen e no néctar, pois são sistêmicos (Aliouane et al., 2009); assim, a abelha pode levar resíduos desses inseticidas para a colmeia, contaminar seus produtos, cria, rainha e as outras operárias. Esses

inseticidas podem afetar o comportamento das abelhas incluindo falta de orientação para forrageamento. Contudo, as informações existentes até o momento são decorrentes de estudos realizados com *Apis mellifera*.

De maneira geral, os inseticidas neonicotinoides como o thiamethoxam têm o mesmo alvo em nível celular, agindo principalmente como agonista dos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) (Matsuda et al., 2001). Pelo menos dois tipos de nAChRs têm sido descritos no cérebro de *A. mellifera* (Gauthier et al., 2006), que estão envolvidos no aprendizado tátil e olfatório e com a memória (Cano et al., 1996; Thany e Gauthier, 2005), os quais são essenciais para o comportamento de forrageamento.

Aliouane et al. (2009) observaram diminuição da memória após 24 h da aprendizagem em *A. mellifera* após contato com thiamethoxam (0,1ng/abelha), seguida por uma recuperação após 48 h sem prejuízo da memória de longo prazo. Houve ainda a diminuição na performance do aprendizado e funções comportamentais após tratamento com exposição crônica com dose de 1 ng/abelha, não ocorrendo repercussões significativas na memória olfativa.

Hashimoto et al. (2003) determinaram a  $CL_{50}$  para abelhas *A. mellifera* recém-emergidas e com 21 dias de idade após submetê-las ao inseticida thiamethoxam, os autores também observaram maior toxicidade para as abelhas mais jovens com  $CL_{50}$   $4,7 \times 10^{-5}$  mg/mL após a ingestão e 3,21 mg/mL após o contato.

Moraes et al. (2000) avaliaram a toxicidade de alguns inseticidas para *Scaptotrigona tubiba*, os autores observaram que essas abelhas apresentaram-se mais suscetíveis ao malathion ( $DL_{50} > 0,04$  mg/abelha) do que *Trigona spinipes* ( $DL_{50}$  0,26 mg/abelha) (Macieira e Hebling-Beraldo, 1989) e *A. mellifera* (0,18 mg/abelha) (Batista et al., 1975). No presente estudo também foi possível observar essa alta suscetibilidade das abelhas *T. fiebrigi*, uma vez que seus valores de  $CL_{50}$  na contaminação por ingestão foi de 0,38% e na contaminação por contato não foi possível obter um valor de  $CL_{50}$ , uma vez que todas as abelhas morriam ou não eram afetadas pelo inseticida.

A EST-1 é uma colinesterase (I) e a EST-4 é uma carboxilesterase de acordo com o padrão de inibição detectado por Stuchi et al. (*dados não publicados*); portanto essas isoenzimas podem estar hidrolisando o inseticida malathion ou este pode se ligar ao sítio catalítico da enzima e inibir sua atividade. Esse fato é decorrente do modo de ação do inseticida.

As carboxilesterases parecem atuar principalmente na pronta resposta dos insetos à exposição ao malathion, por meio da detoxificação metabólica. Por meio deste

mecanismo, a carboxilesterase hidrolisa as ligações ésteres nas moléculas do inseticida, convertendo-o em uma forma menos tóxica que é facilmente excretada como ácido carboxílico (Price, 1984). Consequentemente, ocorre redução na hidrólise de substratos alternativos, tais como naftil ésteres, o que explica a inibição desta esterase nos insetos que foram expostos ao malathion.

Attencia et al. (2005), em estudo com *A. mellifera*, observaram várias diferenças em relação à atividade relativa das esterases quando expostas a diferentes concentrações de Ops. Quando uma concentração de 0,01% de metil-parathion foi empregada, a atividade da EST-1 foi reduzida em 75%, 14 e 21 dias após a introdução do inseticida. Uma inibição de 50% foi detectada para EST-3 e EST-4 um dia após a introdução do inseticida malathion.

A molécula de thiamethoxam mimetiza a acetilcolina e se liga ao sítio receptor. Este sítio de ligação é mais abundante em insetos do que em animais de sangue-quente tornando-o seletivamente mais tóxico para insetos que para esses animais. Este bloqueio leva ao acúmulo de acetilcolina resultando em paralisia e morte do inseto (Rancan et al., 2006).

Hashimoto et al. (2003), trabalhando com thiamethoxam tanto por contato como por ingestão com *A. mellifera*, observaram alterações nas esterases 1, 2, 4 e 5. Esses autores concluíram que estas alterações podem ser usadas para detectar a presença de resíduos de thiamethoxam no ambiente.

De maneira geral, a mortalidade de *T. fiebrigi* está correlacionada com concentração de fipronil, thiamethoxam e malathion empregados nesse estudo. Apesar de não terem sido realizados experimentos de campo, a observação de aumento de mortalidade dessas abelhas pode ser indicativo de contaminação com resíduos desses inseticidas e, portanto, pode ser utilizada como bioindicador da sua presença.

As alterações observadas na intensidade das bandas das esterases 1 e 4, especialmente a EST-4 são indicativos de que a expressão dessas isoenzimas pode ser alterada após a contaminação das abelhas com o neonicotinoide e o organofosforado. Dessa maneira, as esterases têm potencial para se tornarem marcadores moleculares da presença desses inseticidas na natureza. Porém, ainda será necessário o desenvolvimento de experimentos de campo para que tal fato seja confirmado.

O inseticida organofosforado malathion promoveu diferentes formas de alteração na estrutura da cromatina da *T. fiebrigi*. Quando a contaminação ocorreu por contato, houve um relaxamento na estrutura, indicando que nesse caso, provavelmente, há

aumento na síntese de polipeptídeos, provavelmente que atuarão na detoxificação do organismo desses insetos. De maneira contrária, quando houve contaminação por ingestão, a cromatina tornou-se mais condensada, indicando que nesse caso não houve aumento da síntese de proteínas.

Nas análises das células do cérebro de *T. fiebrigi*, após a contaminação por ingestão com o malathion, foi detectada a presença de células com indício de apoptose (morte celular programada). Esse mecanismo, provavelmente, foi outro tipo de resposta apresentado por essas células para a detoxificação desse organofosforado. Contudo, estudos posteriores precisam ser realizados para confirmar a ocorrência de morte celular programada e para o entendimento desse tipo de resposta.

O termo apoptose surgiu em 1971 (Kerr et al., 1972). Apoptose é um tipo de morte celular que se diferencia da necrose por fatores bioquímicos e ultraestruturais, e é caracterizada pela redução no tamanho da célula, condensação da cromatina, geralmente com fragmentação do núcleo e do DNA e perda da integridade da membrana plasmática (Schulze-Osthof et al., 1994).

Os resultados obtidos nas análises em laboratório com as abelhas jataí permitem concluir que essas abelhas poderão se tornar bons bioindicadores da contaminação ambiental, com especial ênfase nos agroecossistemas e áreas de preservação, pois foi detectada inibição parcial de esterases e suscetibilidade à contaminação por vários tipos de inseticidas neonicotinoides, organofosforados e fenilpirazol. Vale salientar que o inseticida neem até o momento não levou a alterações nessas abelhas nas análises *in vitro*.

## 5. AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia e ao Laboratório de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá, por tornar possível a realização do presente trabalho.

Ao Programa de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo de doutorado.

## 6. RESUMO GERAL

As abelhas são susceptíveis a muitos inseticidas comumente utilizados para proteger o plantio de várias culturas. Esses insetos podem ser utilizados como bioindicadores para a determinação de resíduos de alguns inseticidas nas plantas. As abelhas *T. fiebrigi* são abelhas nativas sem ferrão endêmicas de regiões tropicais, são polinizadoras de plantas nativas e cultivadas, tendo, portanto, importante papel nos agroecossistemas. Contudo, não há informações científicas sobre a toxicidade de agrotóxicos para esses insetos benéficos. No presente estudo, as abelhas sem ferrão *T. fiebrigi* foram avaliadas com o objetivo de serem empregadas como bioindicadores da presença de agrotóxicos no ambiente. Os parâmetros analisados foram as alterações na expressão das esterases, proteínas totais e em nível de cérebro, da cromatina após contaminação com os inseticidas fipronil, malathion, neem e thiamethoxam. Foram coletadas operárias de cinco ninhos na Universidade Estadual de Maringá, submetidas a dois bioensaios: contaminação por contato e por ingestão (alimento). Após 24 h, as abelhas sobreviventes foram sacrificadas. Extratos de cabeça/tórax foram submetidos à eletroforese PAGE (esterases) e SDS-PAGE (proteínas totais). O cérebro foi retirado e utilizando-se a técnica de esmagamento com ácido acético, lâmina e lamínula, as lâminas foram preparadas. A coloração das lâminas foi feita utilizando-se a técnica de CEC. Os valores de  $CL_{50}$  mostraram maior toxicidade para o fipronil quando administrado por contato (0,00062%) e a menor foi observada com a contaminação por ingestão pelo inseticida thiamethoxam (0,79%). Para todos os inseticidas, nos dois bioensaios, foi observado que existe correlação entre o aumento da concentração do inseticida e a mortalidade, com exceção do inseticida malathion por contato. Com relação às esterases foi observado aumento na intensidade da região EST-4 quando da contaminação com thiamethoxam por contato. Houve inibição parcial da EST-1 por ingestão de fipronil a 0,012%, e da EST-4 por ingestão de fipronil a 0,0012% e malathion a 0,2% e 0,45%. Nas análises eletroforéticas SDS-PAGE, foram detectados 23 peptídeos (20-120kDa) e apenas um, peptídeo p19 (70-80kDa), apresentou redução quase completa após contaminação por contato com o inseticida malathion na concentração 0,0017%. A análise de CEC mostrou que na contaminação por contato com o inseticida malathion, o valor de CEC ficou em 0,15M, ocorrendo um relaxamento da cromatina. Quando o mesmo inseticida foi fornecido no alimento, foi observado início de células em apoptose. As alterações da atividade relativa das EST-1

e EST-4 de *T. fiebrigi* têm potencial para serem empregadas como bioindicadores da presença de resíduos de fipronil, malathion e thiamethoxam, e a utilização da técnica de CEC poderá se tornar uma ferramenta importante para detecção de resíduos de malathion e thiamethoxam.

## 7. REFERÊNCIAS

Accorti M., Guarcini R., Oddo L.P. (1992) The bee as a biological indicator and test insect, *Redia*. 74, 1-5.

Aizen M.A., Garibaldi L.A., Cunningham S.A., Klein A.M. (2008) Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency, *Curr. Biol.* 18, 1-4.

Aliouane, Y., El Hassani A.K., Gary V., Armengaud C., Lambin M., Gauthier M. (2009) Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: Effects on behavior, *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 113–122.

Amer S.A.A., Reda A.S., Dimetry N.Z. (1989) Activity of *Abrus precatorius* L. extracts against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), *Acarol.* 30, 209-215.

Antunes-Kenyon S.E., Kennedy G. (2001) Thiamethoxam a new active ingredient review. Massachusetts Pesticide Bureau, Depart. Food Agri. 37p.

Attencia V.M., Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Toledo V.A.A. (2005) Esterase activity in *Apis mellifera* after exposure to organophosphate insecticides (Hymenoptera: Apidae), *Sociobiol.* 45, 587-595.

Batista G.C., Amaral E., Passarela-Neto A. (1975) Toxicidade de alguns inseticidas e acaricidas para operárias de *Apis mellifera ligustica* L. e *Apis mellifera adansonii* L. (Hymenoptera: Apidae), *Anais Soc. Ent. Bras.* 4, 73-77.

Biesmeijer J.C., Roberts S.P.M., Reemer M., Ohlemuller R., Edwards M., Peeters T., Schaffers A.P., Potts S.G., Kleukers R., Thomas C.D. (2006) Parallel declines in pollinators and insect pollinated plants in Britain and the Netherlands, *Scie.* 313, 351–354.

Cano L.V., Bonnard E., Gauthier M., Richard D. (1996) Mecamylamine-induced impairment of acquisition and retrieval of olfactory conditioning in the honeybee, *Behav. Brain. Res.* 81, 215–222.

Ceron C.R., Santos J.R., Campos Bicudo H.E.M.C. (1992) The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop, *Braz. J. Genet.* 15, 201-203.

El Gengaihi S., Dimetry N.Z., Amer S.A.A., Mohamed S.M. (2000) Acaricidal activity of lipoidal matter of different plant extracts against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch, *Insect Sci. Applic.* 20, 191-194.

- Gauthier M., Dacher M., Thany S.H., Niggebrugge C., Deglise P., Kljucovic P., Armengaud C., Gruñewald B. (2006) Involvement of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*), *Neurobiol. Learn. Mem.* 86, 164–174.
- Grant D.B., Chalmers A.E., Wolff M.A., Hoffman H.B., Bushey D.F. (1998) Fipronil: action at the GABA receptor, *Rev. Toxicol.* 2, 147-156.
- Hashimoto J.H., Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Toledo V.A.A. (2003) Evaluation of the use of the inhibition esterases activity on *Apis mellifera* as bioindicators of insecticide thiamethoxam pesticide residues, *Sociobiol.* 42, 693-699.
- Hassani A.K., Dacher M., Gauthier M., Armengaud C. (2005) Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*), *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, 30-39.
- Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J.T., Roe R.M. (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*, *Crop Protec.* 23, 371-378.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Key P.B., Chung K.W., Opatkiewicz A.D., Wirth E.F., Fulton M.H. (2003) Toxicity of the insecticides fipronil and endosulfan to selected life stages of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 533-540.
- Macieira O.J.D., Hebling-Beraldo M.J.A. (1989) Laboratory toxicity of insecticides to workers of *Trigona spinipes* (F., 1793) (Hymenoptera - Apidae), *J. Apic. Res.* 28, 3-6.
- Matsuda K, Buckingham S.D., Kleier D., Rauh J.J., Grauso M., Sattelle D.B. (2001) Neonicotinoid insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors, *Trend. Pharmacol. Sci.* 22, 573–580.
- Melathopoulos A. P., Winston M. L., Whittington R., Smith T., Lindberg C., Mukai A., Moore M. (2000) Comparative laboratory toxicity of neem pesticides to honey bees (Hymenoptera: Apidae), their mite parasites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae), and brood pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, *J. Econ. Entomol.* 199-209.
- Moraes S.S., Bautista A.R.L., Viana B.F. (2000) Avaliação da toxicidade aguda DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): Via de contato, *An. Soc. Entomol. Brasil*, 29, 31-37.
- Moure J.S. (1961) A preliminary supra-specific classification of the Old World Meliponine bees (Hymenoptera, Apoidea), *Stud. Entomol.* 4, 181-242.
- Nogueira-Neto P. 1970. A criação das abelhas indígenas sem ferrão. 2. ed. São Paulo: Chácaras e Quintais.

- Ozoe Y.K., Yagi K., Nakamura M., Akamatsu M., Miyake T., Matsumura F. (2000) Fipronil-related heterocyclic compounds: Structure-activity relationships for interaction with aminobutyric acid- and voltage-gated ion channels and insecticidal action, *Pestic. Biochem. Physiol.* 66, 92-104.
- Price N.R. (1984) Carboxyesterase degradation of malathion in vitro by susceptible and resistant strains of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae), *Comp. Bioch. Physiol.* 77, 95-98.
- Rancan M., Rossi S., Sabatini A.G. (2006) Determination of Thiamethoxam residues in honeybees by high performance liquid chromatography with an electrochemical detector and post-column photochemical reactor, *J. Chromatogr. A* 1123, 60–65.
- Rembold H. (1989) Azadirachtins: their structure and mode of action, in: Arnason J.T., Philogène B.J.R., Morand P. (eds.), *Insecticides of plant origin*. Washington, American Chemical Society, pp. 150-163.
- Schmutterer H. (1987) Insect growth-disrupting and fecundity-reducing ingredients from the neem and chinaberry trees, in: Morgan E.D., Mandava N.B. (eds.), *CRC handbook of natural pesticides*. Florida, CRC series in naturally occurring pesticides, pp. 119-170.
- Schulze-Osthoff K., Walczak H., Droge W., Krammer P.H. (1994) Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis, *J. Cell. Biol.* 127, 15-20.
- Stuchi A.L.P.B., Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Toledo V.A.A. (2009) Marcador molecular para identificar duas espécies de jataí: *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera, Meliponinae). Dados não publicados.
- Thany S.H., Gauthier M. (2005) Nicotine injected into the antennal lobes induces a rapid modulation of sucrose threshold and improves short-term memory in the honeybee *Apis mellifera*, *Brain. Res.* 1039, 216–219.
- Tingle C.C., Rother J.A., Dewhust C.F., Lauer S., King W.J. (2003) Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 176, 1-66.
- Vidal B.C. (1987) Métodos em Biologia Celular, in: Vidal B.C., Mello M.L.S. *Biologia Celular*. Rio de Janeiro. Atheneu.
- Vidal B.C., Mello M.L.S. (1989) Critical electrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes in vitro, *Acta. Histochem. Cytochem.* 22, 471-478.
- Xu G., Bull D.L. (1994) Acetylcholinesterase from the horn fly (Diptera: muscidae) II. Biochemical and molecular properties, *Arch. Insec. Bioch. Physiol.* 27, 109-121.



**Tabela I.** Concentrações letais a 50% (CL<sub>50</sub>) das abelhas *Tetragonisca fiebrigi* submetidas ao fipronil, malathion, neem e thiamethoxam, tanto por contato (papel filtro) como por ingestão (alimento)

<i>Agroquímico</i>	<i>CL<sub>50</sub> (%)</i>	<i>95% Limite de confiança</i>
Fipronil – contato	0,00062	0,00053 – 0,00075
Fipronil – ingestão	0,00123	0,00121 – 0,00127
Malathion – contato	0,50	-----
Malathion – ingestão	0,38	0,22 – 0,55
Neem - contato	-----	-----
Neem - ingestão	-----	-----
Thiamethoxam - contato	0,79	0,61 – 1,04
Thiamethoxam – ingestão	0,21	0,17 – 0,27

**Tabela II.** Inibição da atividade das esterasas detectada em *Tetragonisca fiebrigi* após contato com fipronil, malathion e thiamethoxam. (-) ausência de inibição; (++) aumento de intensidade da banda

<i>Concentrações</i>	<i>Esterases</i>		
	<i>EST-1</i>	<i>EST-2</i>	<i>EST-4</i>
<b><i>Fipronil (%)</i></b>			
0,0001	-	-	-
0,0005	-	-	-
0,0006	-	-	-
0,0007	-	-	-
0,0011	-	-	-
<b><i>Malathion (%)</i></b>			
0,0017	-	-	-
0,0018	-	-	-
0,0019	-	-	-
0,002	-	-	-
0,004	-	-	-
<b><i>Thiamethoxam (%)</i></b>			
0,7	-	-	-
0,8	-	-	-
0,85	-	-	-
0,9	-	-	++
1	-	-	-

**Tabela III.** Inibição da atividade das esterasas detectada em *Tetragonisca fiebrigi* após ingestão de fipronil, malathion e thiamethoxam. (-) ausência de inibição; (+) inibição parcial

<i>Concentrações</i>	<i>Esterases</i>		
	<i>EST-1</i>	<i>EST-2</i>	<i>EST-4</i>
<b><i>Fipronil (%)</i></b>			
0,0011	-	-	-
0,0012	+	-	+
0,00125	-	-	-
0,0025	-	-	-
0,025	-	-	-
<b><i>Malathion (%)</i></b>			
0,2	-	-	+
0,3	-	-	-
0,4	-	-	-
0,45	-	-	+
0,5	-	-	-
<b><i>Thiamethoxam (%)</i></b>			
0,15	-	-	-
0,2	-	-	-
0,22	-	-	-
0,24	-	-	-
0,5	-	-	-

**Tabela IV.** Respostas de basofilia nuclear da cromatina do cérebro de operárias de *Tetragonisca fiebrigi* após contaminação por contato e ingestão com o inseticida malathion, coradas com Azul de Toluidina (AT) 0,025% adicionado de MgCl<sub>2</sub> em diferentes concentrações

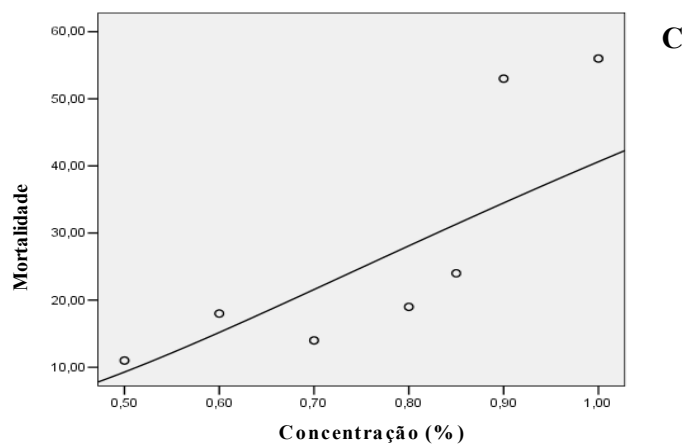
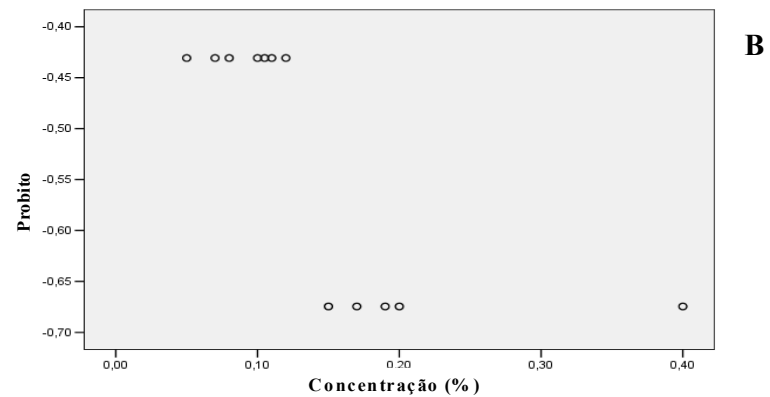
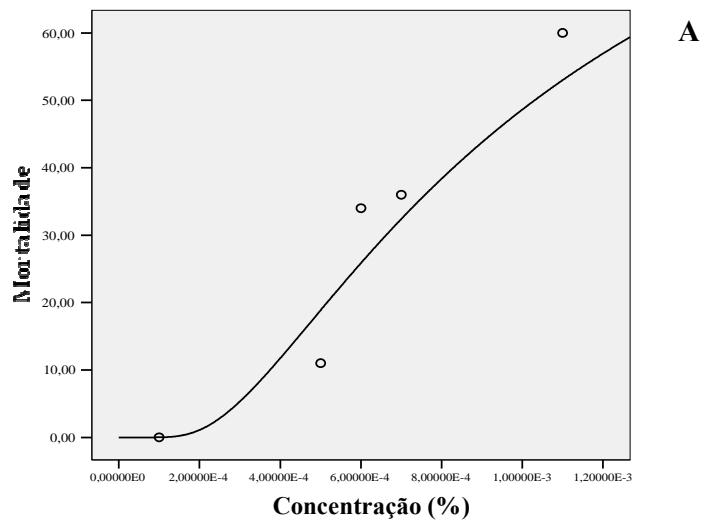
<i>Concentração corante</i>	<i>Controle</i>	<i>Malathion (contato)</i>	<i>Malathion (ingestão)</i>	
		<i>0,0019%</i>	<i>0,4%</i>	<i>0,45%</i>
AT controle	Vi	Vi	Vi	Vi
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,02M	Vi	Vi	Vi	Vi
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,05M	Vi/Az	Vi	Vi/Az	Vi
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,08M	Vi/Az	Vi	Vi/Az	Vi/Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,10M	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,12M	Vi/Az	Az	Az	Vi/Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,15M	Az	<i>Ve</i>	Az	Vi/Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,20M	<i>Az/Ve</i>	Az	Az	Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,30M	<i>Ve</i>	Az	<i>Ve</i>	<i>Ve</i>
<b>Valor de CEC (M)</b>	<b>0,20&lt;CEC&lt;0,30</b>	<b>0,15</b>	<b>0,30</b>	<b>0,30</b>

Vi: violeta. Az: azul. Ve: verde

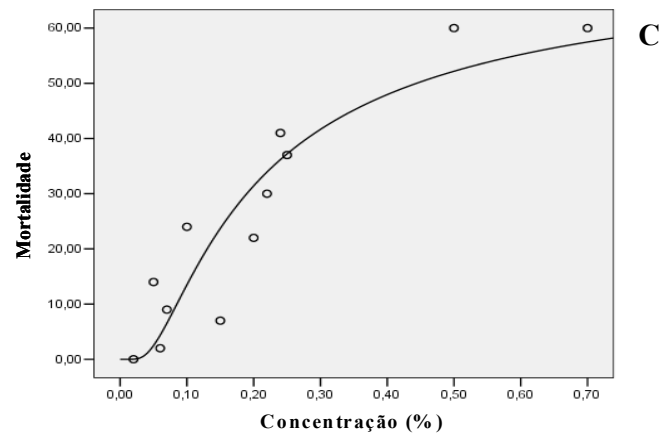
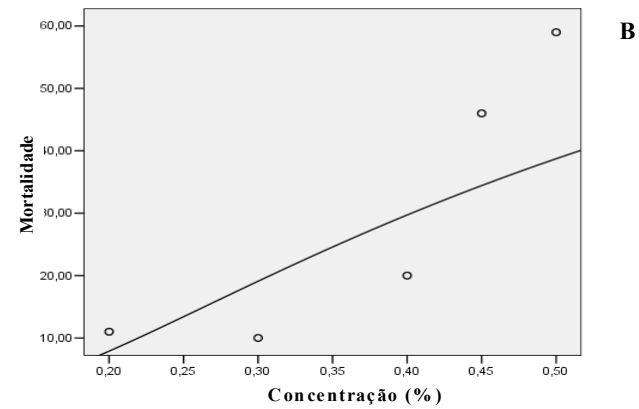
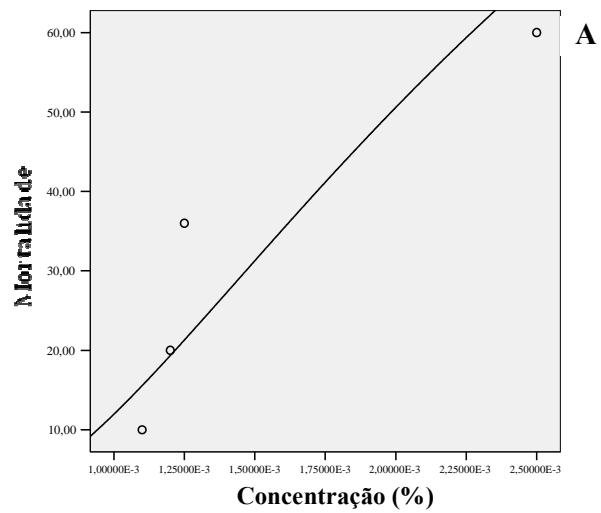
**Tabela V.** Respostas de basofilia nuclear da cromatina do cérebro de operárias de *Tetragonisca fiebrigi* após contaminação por contato e ingestão com o inseticida thiamethoxam, coradas com Azul de Toluidina (AT) 0,025% adicionado de MgCl<sub>2</sub> em diferentes concentrações

<i>Concentração corante</i>	<i>Controle</i>	<i>Thiamethoxam (contato)</i>		<i>Thiamethoxam (ingestão)</i>	
		<i>0,8%</i>	<i>0,85%</i>	<i>0,2%</i>	<i>0,22%</i>
AT controle	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,02M	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi/Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,05M	Vi/Az	Vi/Az	Vi	Vi/Az	Vi/Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,08M	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Az	Vi/Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,10M	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Az	Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,12M	Vi/Az	Az	Az	Az/Ve	Az/Ve
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,15M	Az	Az	Az/Ve	Az/Ve	Az/Ve
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,20M	<i>Az/Ve</i>	Az/Ve	<i>Ve</i>	<i>Ve</i>	<i>Az/Ve</i>
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,30M	<i>Ve</i>	<i>Ve</i>	Ve	Ve	<i>Ve</i>
<b>Valor de CEC (M)</b>	<b>0,20&lt;CEC&lt;0,30</b>	<b>0,30</b>	<b>0,20</b>	<b>0,20</b>	<b>0,20≤CEC&lt;0,30</b>

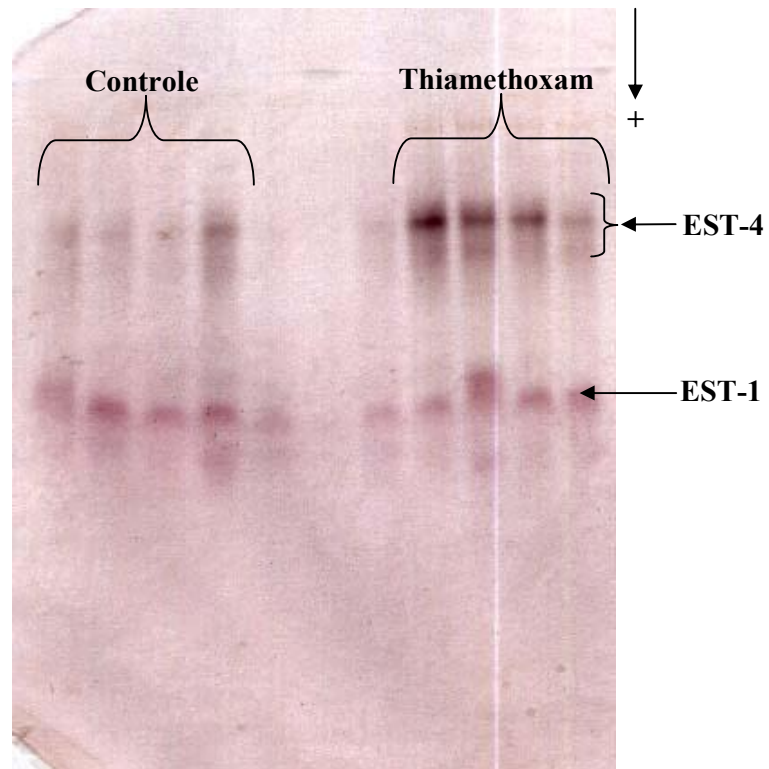
Vi: violeta. Az: azul. Ve: verde



**Figura 1.** Curva de regressão (sigmoide) para os valores de mortalidade em diferentes concentrações dos inseticidas fipronil, malathion e thiamethoxam, na contaminação por contato. A = fipronil com  $R^2 = 0,993$ ; B = malathion sem  $R^2$ ; C = thiamethoxam com  $R^2 = 0,682$ .

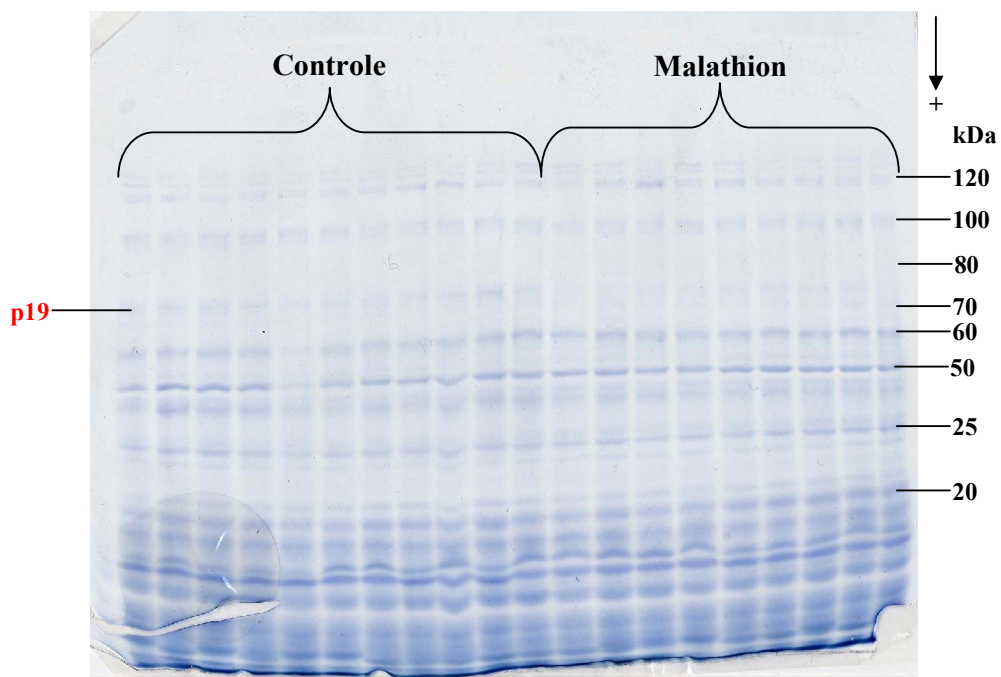


**Figura 2.** Curva de regressão (sigmoide) para os valores de mortalidade em diferentes concentrações dos inseticidas fipronil, malathion e thiamethoxam na contaminação por ingestão. A = fipronil com  $R^2 = 0,728$ ; B = malathion com  $R^2 = 0,639$ ; C = thiamethoxam com  $R^2 = 0,902$ .

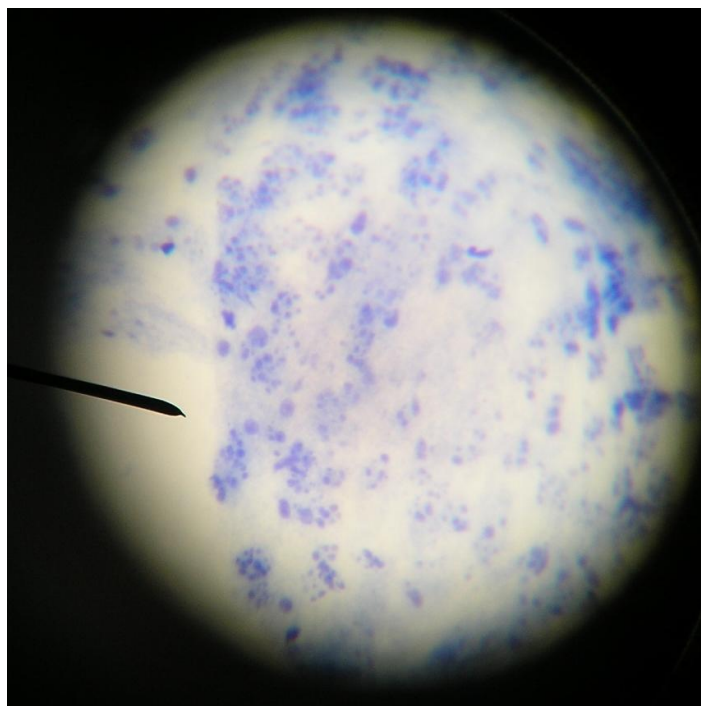


**Figura 3.** Perfil eletroforético das esterases de extratos de cabeça/tórax de *Tetragnisca fiebrigi* mostrando a EST-4 com aumento da intensidade da banda, após contaminação por contato com o inseticida thiamethoxam na concentração de 0,9%.

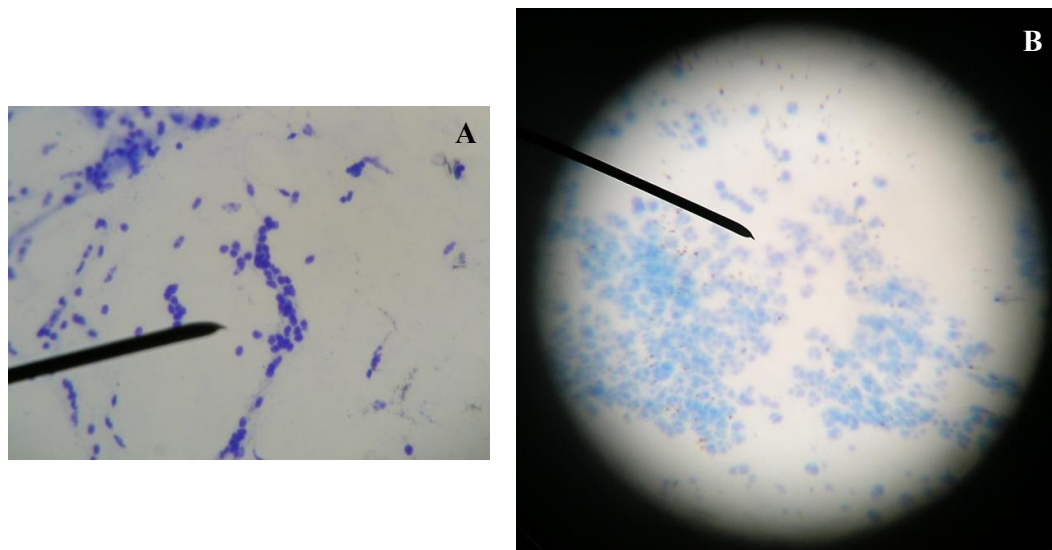




**Figura 4.** Perfil das proteínas totais de extratos de cabeça/tórax de *Tetragnisca fiebrigi* mostrando a região com redução da expressão da proteína p19 após contaminação por contato com o inseticida malathion na concentração de 0,0017%.



**Figura 5.** Células nervosas de *Tetragonisca fiebrigi*, contaminadas com o inseticida malathion por ingestão (0,4%), coradas com Azul de Toluidina na presença e ausência de cloreto de magnésio. Células com indício de apoptose. Microscópio óptico com aumento 1000x mais o aumento de 3x da máquina digital.



**Figura 6.** Células nervosas de *Tetragonisca fiebrigi*, contaminadas com o inseticida thiamethoxam por contato (0,85%), coradas com Azul de Toluidina na presença e ausência de cloreto de magnésio. **A** = controle (núcleos metacromáticos – violeta); **B** = ponto de CEC (ausência de metacromasia). Microscópio óptico com aumento 1000x mais o aumento de 3x da máquina digital.

**V – Avaliação da toxicidade de agrotóxicos em *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811)**

Título abreviado: **Avaliação da toxicidade em jataí**

**ABSTRACT**

The stingless bee *T. angustula* was evaluated with the aim of using it as a pesticide bioindicator in the environment. The parameters analyzed were alterations in the esterase expression, total protein and the chromatin in brain cells after contamination with the insecticides fipronil, malathion, neem and thiamethoxam. The LC<sub>50</sub> values showed greater toxicity after contamination by contact with fipronil (0.00053%), and lower toxicity after contamination by ingestion of malathion (1.33%). The EST-3 and EST-4 were partially inhibited after contamination by contact and ingestion of malathion and contamination by contact with thiamethoxam. The lowest CEC was found after contamination by malathion ingestion (0.15M). These analyses also detected cells with evidence of apoptosis. The observed alterations in the intensity of EST-3 and EST-4 and the chromatin structure showed that *T. angustula* bees are potential bioindicators of pesticide residues.

**Keywords** – stingless bee, isoenzymes, esterases, CEC, LC<sub>50</sub>, fipronil, malathion, azadiractina, thiamethoxam

## 1. INTRODUÇÃO

A *Tetragonica angustula* possui destacada importância ecológica e econômica. O extrativismo de mel, cerume e resinas dessas abelhas é amplamente disseminado, principalmente, no Norte e Nordeste do Brasil (Menezes-Pedro e Camargo, 2000).

A contribuição mais significativa, entretanto, está na atuação das abelhas como agentes polinizadores, peças-chave na manutenção da diversidade florística e do equilíbrio ecológico na maioria dos ecossistemas terrestres. Um dos efeitos diretos dessa habilidade pode ser visto no aumento da produtividade de plantas cultivadas, por meio da introdução de ninhos de abelhas em áreas de cultivo (Menezes-Pedro e Camargo, 2000).

O trabalho polinizador das abelhas é de crescente importância para a produção de cereais, café, algodão e frutas de diferentes espécies. Sabe-se que mais de 40% da produção agrícola brasileira depende da polinização entomófila na qual as abelhas têm o maior destaque (Sommer, 1997).

A polinização é um fator de produção fundamental na condução de muitas culturas agrícolas ao redor do mundo e a diminuição da disponibilidade de polinizadores para as plantas que deles necessitam pode causar limitações na quantidade de frutos (Roubik, 2002), qualidade dos frutos (Wallace e Lee, 1999) e número de sementes (Kalinganire et al., 2001), constituindo-se em um dos maiores problemas quando se trata de produção agrícola.

O declínio das populações de polinizadores (Kearns et al., 1998; Roubik, 2001) tem sido causado principalmente pelo uso não-sustentável dos ecossistemas para produção agrícola (Kremen et al., 2002; Richards e Kevan, 2002). Dentre os diversos aspectos relacionados ao uso não-sustentável de agroecossistemas, a utilização excessiva de inseticidas (Filgueira, 2003), com certeza impõe risco às populações de espécies de abelhas polinizadoras (Paschoal, 1979; Kevan, 1999).

Os estudos sobre a toxicidade de inseticidas na fauna de abelhas tropicais, no caso dos meliponíneos, ainda são relativamente escassos, já que estas espécies não ocorrem em países de clima temperado (Moraes et al., 2000; Pinheiro-Machado et al., 2002).

Os inseticidas mais empregados são os organofosforados e os carbamatos cujos efeitos tóxicos resultam do acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, levando a uma estimulação excessiva dos receptores de acetilcolina, produzindo sintomas neurotóxicos (Stefanidou et al., 1996).

Outra classe de inseticidas amplamente utilizados na agricultura contra os insetos são os neonicotinoides, porém eles podem também afetar os insetos que não são seu alvo, tais como as abelhas. Neonicotinoides nitrossubstituídos (imidaclopride e thiamethoxam) aplicados topicamente são os mais tóxicos às abelhas, com valores de  $DL_{50}$  de contato em nanogramas por abelha (Iwasa et al., 2004).

O fipronil, inseticida da segunda geração dos fenilpirazóis, é altamente tóxico para os insetos que não são seu alvo, sendo a  $DL_{50}$  para abelhas muito baixa, 4 ng/abelha (Tingle et al., 2003). Ele é aplicado no solo em culturas de batata, cana-de-açúcar e milho, em folhas nas culturas de algodão, arroz, cana-de-açúcar, milho e soja, em sementes de arroz, cevada, soja e feijão (Coutinho et al., 2005). Esse inseticida atua na interrupção do fluxo dos íons cloreto inibindo o receptor do ácido gama aminobutírico (GABA) no sistema nervoso central (Grant et al., 1998; Ozoe et al., 2000).

Os apicultores têm se tornado altamente dependentes do uso de pesticidas para combater as doenças das abelhas, conduzindo a vários problemas, incluindo o aumento dos custos do tratamento e trabalho, os perigos toxicológicos aos apicultores e às abelhas (Marchetti et al., 1987; Peng et al., 1992; Westcott e Winston, 1999), os riscos de contaminação dos produtos da colmeia (Lehnert e Shimanuki, 1981) e a vulnerabilidade para a evolução da resistência aos pesticidas causado pelo número limitado de agentes de controle disponíveis (Milani, 1999).

Extratos de óleo de neem têm sido consideravelmente eficientes contra grande número insetos e patógenos e podem controlar várias espécies de parasitas das abelhas, simultaneamente reduzindo o uso de produtos químicos nas colmeias (Quarles, 1994; Schmutterer, 1995). O pesticida neem possui baixa persistência ambiental (Sundaram e Curry, 1994), não induz à resistência nos insetos (Feng e Isman, 1995) e é relativamente não-tóxico (Jacobson, 1995).

Análises eletroforéticas da atividade das esterases das abelhas é um caminho para usar esses insetos como bioindicadores. Estas enzimas são altamente eficientes em catalisar a hidrólise de uma ampla variedade de ésteres alifáticos e aromáticos, bem como amidas e tioésteres e são importantes em vários processos diferentes, incluindo quimiotaxia e o metabolismo de drogas e inseticidas (Krisch, 1971; Oppenoorth, 1985). Alterações na sua expressão pela contaminação por inseticidas poderiam ser empregadas na detecção desses compostos no ambiente.

Outra forma de se avaliar a presença de resíduos de inseticidas no ambiente, seria avaliar as alterações causadas por eles na cromatina das células do cérebro das abelhas.

Essas modificações podem ser detectadas pela análise da concentração crítica de eletrólitos (CEC), técnica que foi desenvolvida por Vidal e Mello (1989).

Assim, esse estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a sensibilidade das abelhas nativas sem ferrão da espécie *Tetragonisca angustula* à contaminação por inseticidas, a mortalidade decorrente da contaminação, as alterações na atividade relativa das esterases e avaliar, em nível de cérebro, a alteração da cromatina, para que essas abelhas possam ser empregadas como biomarcadores da presença desses inseticidas no ambiente.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das abelhas

Foram coletados indivíduos adultos de abelhas *T. angustula*, provenientes de duas colmeias localizadas no campus da Universidade Estadual de Maringá, Paraná (23°24'40'' S; 51°56'23'' W). Após a coleta, as abelhas foram submetidas aos bioensaios com os inseticidas fipronil (fenilpirazol), malathion (organofosforado), neem (azadiractina) e thiamethoxam (neonicotinoide).

### Montagem dos bioensaios

As abelhas foram coletadas em garrafas plásticas e colocadas em freezer por aproximadamente 01 min, apenas para serem anestesiadas; em seguida, as mesmas foram colocadas nas placas de petri, previamente montadas. Foram realizados dois bioensaios como segue.

- Primeiro bioensaio (contaminação por contato) → As abelhas foram acondicionadas em placas de petri (150x20 mm) contendo alimento (Candi) e papel filtro (15 cm de diâmetro) embebido em 1 mL da solução contendo o inseticida. Foram colocadas 20 abelhas por placa, e foram utilizadas quatro placas, três repetições e uma placa-controle, a qual possuía alimento e papel filtro embebido em água. As abelhas foram deixadas nas placas por um período de 24 h, sendo então realizada a contagem das abelhas mortas e retiradas as vivas, as quais foram sacrificadas para a análise eletroforética.

O inseticida comercial foi diluído como descrito na bula para aplicação na cultura. Posteriormente, a partir dessas soluções foram realizadas diluições dos inseticidas e preparadas soluções aquosas nas seguintes concentrações:

- Fipronil: 0,0001; 0,0005; 0,0006; 0,0007 e 0,008%.
- Malathion: 0,0025; 0,0028; 0,003; 0,004 e 0,1%.
- Neem: 75 e 100%.
- Thiamethoxam: 0,05; 0,07; 0,1; 0,2 e 0,3%.
- Segundo bioensaio (contaminação por ingestão) → As abelhas foram acondicionadas em placas de petri (150x20 mm) contendo papel filtro embebido em água e um recipiente com inseticida misturado ao alimento (Candi). Todo procedimento restante foi o mesmo do primeiro bioensaio.

Assim como no bioensaio anterior, o inseticida comercial foi diluído como descrito na bula para aplicação na cultura e a partir dessas soluções foram realizadas diluições e preparadas soluções aquosas nas seguintes concentrações:

- Fipronil: 0,0001; 0,0005; 0,00055; 0,0006 e 0,0007%.
- Malathion: 0,4; 0,6; 1; 2 e 3%.
- Neem: 75 e 100%.
- Thiamethoxam: 0,005; 0,008; 0,01; 0,02 e 0,03%.

Os resultados foram submetidos ao programa estatístico SPSS 13.0, para análise da  $CL_{50}$  e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) dose-resposta.

#### Preparo das amostras e eletroforese PAGE e SDS-PAGE

Após os bioensaios, as abelhas foram estocadas em frascos devidamente identificados e numerados, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , pelo menor espaço de tempo possível. Para análise foram utilizados dez indivíduos contaminados e dez controle. Pelo abdome apresentar algumas proteases que podem degradar as esterases, para análise das mesmas foram utilizados apenas a cabeça e o tórax dos animais.

As amostras foram homogeneizadas individualmente em tubos de propileno 1,5 mL, contendo 35 $\mu\text{L}$  da solução de 2-mercaptoetanol mais glicerol a 10%. Em seguida, foram centrifugadas a 56.000G por 10 min., a uma temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ .

Nos géis PAGE foram aplicados 10 $\mu\text{L}$  do sobrenadante. Nas eletroforeses SDS-PAGE, 15 $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para tubos de 200 $\mu\text{L}$  e acrescentado 10 $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl (1,5M, pH 8,8) contendo SDS 10%, 2-mercaptoetanol, glicerol e azul de bromofenol. Em seguida, os tubos foram aquecidos a  $100^{\circ}\text{C}$  por 03 min em banho-maria e 20 $\mu\text{L}$  foram aplicados no gel para corrida eletroforética.



Eletroforeses, no sentido vertical, foram realizadas utilizando géis PAGE a 8% de concentração e gel de empilhamento com concentração de 5% para detecção das esterases, e géis SDS-PAGE a 7% de concentração e gel de empilhamento com concentração de 5% para detecção das proteínas totais. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Glicina 0,1M pH 8,3 para esterase e Tris-Glicina 0,1M pH8,3 + SDS 10%, para proteína total. Os géis foram submetidos à eletroforese em uma voltagem de aproximadamente 200V por 05 h para esterase e 90V até a saída do front para proteína total.

Para a realização da coloração para esterase, primeiramente, o gel foi incubado por 30 min em 50 mL da solução de tampão fosfato (0,1M pH 6,2). Em seguida, o tampão foi descartado e acrescentou-se a solução de coloração, a qual consistia de: 50 mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,2; 0,03 g de  $\alpha$ -naftil acetato; 0,03 g de  $\beta$ -naftil acetato; 0,06 g do corante Fast Blue RR Salt. O gel foi incubado até o aparecimento das bandas.

A coloração das proteínas totais foi realizada incubando os géis em uma solução com 100 mg de azul brilhante de comassie e 100 mL da solução PAGE (45% de etanol, 10% de ácido acético glacial em 45% de água destilada), por um período de três dias. Após esse período, os géis foram então descorados após lavagens sucessivas com a solução PAGE, até a completa visualização das bandas.

Posteriormente, todos os géis permaneceram em solução conservante (ácido acético a 75% e glicerol a 10%, dissolvidos em 1000 mL de água destilada) por pelo menos 24 h. Em seguida, foram embebidos em gelatina a 5% e colocados entre duas folhas de papel celofane molhado, esticados, prensados e mantidos em temperatura ambiente até a secagem completa (Ceron et al., 1992).

### Análise citoquímica

Nas análises citoquímicas, foram utilizados dois inseticidas, malathion e thiamethoxam, e foram utilizadas duas concentrações de cada inseticida, a que mais se aproximou da  $CL_{50}$  e uma subletal.

Para o malathion, foram utilizadas as concentrações 0,002% (contato); 0,6% e 1% (ingestão). Para o thiamethoxam, as concentrações foram 0,07% e 0,1% (contato); 0,008% e 0,01% (ingestão).

As abelhas foram mantidas nos bioensaios, como descrito anteriormente, porém após as 24 h as abelhas vivas foram retiradas das placas e procedeu-se a análise citoquímica.

Primeiramente, com o auxílio de uma lupa, a cabeça das abelhas foi dissecada e o cérebro retirado e colocado em lâmina contendo ácido acético (45%); em seguida, o material foi coberto por uma lamínula e realizou-se o esmagamento. Com uma pinça, a lâmina foi congelada em nitrogênio líquido, a lamínula retirada e a lâmina fixada em solução de etanol:ácido acético por 02 min; após esse período, a mesma foi lavada em etanol 70% por 05 min.

Para coloração foram utilizadas oito cubetas com diferentes concentrações de magnésio (0,02; 0,05; 0,08; 0,10; 0,12; 0,15; 0,20 e 0,30M) mais o corante azul de toluidina. Uma cubeta-controle, apenas com azul de toluidina, também foi utilizada. As lâminas ficaram no corante por 20 min e, em seguida, foram lavadas em água destilada e colocadas no porta-lâmina para secar à temperatura ambiente.

Após secagem, as lâminas foram mergulhadas em cubeta com xilol por 15 min e montadas com entellan e lamínula. As lâminas foram observadas com o auxílio de um microscópio óptico para poder detectar alterações em nível de cérebro da cromatina.

### 3. RESULTADOS

A análise dos valores de  $CL_{50}$  para a espécie *T. angustula* demonstrou que a maior toxicidade foi observada quando o inseticida fipronil foi utilizado na contaminação por contato (0,00053%). Já a menor toxicidade foi observada na contaminação por ingestão com o inseticida malathion, com valor de  $CL_{50}$  de 1,33% (Tab. I).

Nas Figs. 1 e 2, pode ser observado que existe correlação entre o aumento da concentração do inseticida e a mortalidade das abelhas *T. angustula*, para os três inseticidas testados, tanto na contaminação por contato (Fig. 1) como na contaminação por ingestão (Fig. 2).

As análises eletroforéticas das abelhas *T. angustula* mostraram algumas alterações na intensidade das regiões esterásicas. Quando da contaminação por contato com malathion, a eletroforese mostrou uma redução na intensidade das bandas EST-3 na concentração 0,003% e EST-4, nas concentrações 0,0025% e 0,003% (Tab. II). Na Fig. 3 é possível visualizar a inibição das regiões EST-3 e EST-4 na concentração 0,003%.

A eletroforese dos indivíduos submetidos ao inseticida thiamethoxam por contato mostrou inibição parcial da EST-3 e EST-4 na concentração de 0,1% (Tab. II).

Na contaminação por ingestão com o inseticida malathion, as análises eletroforéticas detectaram inibição parcial da região EST-3 na concentração 1% e da

região EST-4 nas concentrações 1% e 2% (Tab. III). Para o inseticida thiamethoxam não foi observada alteração das esterases.

Os bioensaios com o inseticida neem mostraram que o mesmo não provoca mortalidade das abelhas *T. angustula*, portanto não foi possível realizar o cálculo de  $CL_{50}$  e nem a análise de correlação.

Nos extratos de abelhas submetidos à eletroforese SDS-PAGE foram detectados 23 peptídeos, de acordo com o padrão de migração e peso molecular. O tamanho dos fragmentos variaram de 15 a 120kDa; no entanto nenhuma alteração foi observada após a contaminação das abelhas com os inseticidas malathion e thiamethoxam, tanto no contato como na ingestão.

Com relação aos dados da análise citoquímica, para as abelhas mantidas no controle (sem presença dos inseticidas), os valores de CEC ficaram dentro do intervalo  $0,20M < CEC < 0,30M$  (Tabs. IV e V).

Para as abelhas *T. angustula* contaminadas com malathion por ingestão, na concentração 1% e na contaminação por contato (0,002%) o valor de CEC ficou em 0,20M (Tab. IV), não diferindo muito do valor de CEC das abelhas do controle. Já quando as abelhas foram submetidas ao malathion, por ingestão, na concentração 0,6%, o valor de CEC observado ficou em 0,15M (Tab. IV), ocorrendo, portanto uma condensação da cromatina.

Foi observado indício de células em apoptose, quando da contaminação com o inseticida malathion por ingestão, nas duas concentrações testadas.

Quando o inseticida utilizado foi o thiamethoxam, tanto na contaminação por contato, como na contaminação por ingestão, não foi observada alteração significativa nos valores de CEC, quando em comparação com o controle (Tab. V).

#### **4. DISCUSSÃO**

Estudo realizado na França por Chauzat et al. (2006) mostrou que o pólen coletado pelas colônias continha resíduos de pesticidas, incluindo fipronil. Além disso, os inseticidas podem deixar resíduos de mais de 1 ppm no néctar por um período de duas semanas (Barker et al., 1980). Isto pode causar problemas aos polinizadores, os quais levam o alimento contaminado para a colmeia, afetando grande número de indivíduos, e para aqueles que irão consumir seu produto final, o mel. Diminuição no número de polinizadores pode causar danos irreversíveis ao ambiente (Kerr et al., 1994).

Comparando os resultados de  $CL_{50}$  quando os inseticidas foram fornecidos por contato (papel filtro) e por ingestão (comida), a maior toxicidade foi detectada com o fipronil, por contato (0,00053%). Este inseticida é tóxico às abelhas, com  $DL_{50}$  de 0,004 $\mu$ g/abelha (Rhône-Poulenc, 1995) e não deve ser aplicado à vegetação quando as abelhas estão forrageando.

O fipronil possui ampla variedade de formulações, as quais são usadas tanto nas culturas de milho e arroz, como para matar baratas, formigas e carrapatos. Este inseticida é um membro da nova classe de inseticidas denominados fenilpirazóis, os quais atuam bloqueando os canais clorídricos dos receptores ácido gama-aminobutíricos (GABA), no sistema nervoso central, conduzindo a uma excitação neural e consequente morte do organismo (Key et al., 2003).

Os neonicotinoides são inseticidas amplamente utilizados na agricultura contra os insetos; entretanto, eles podem também afetar os insetos que não são seu alvo, tais como as abelhas. Neonicotinoides nitrossubstitutos, como o thiamethoxam, aplicados topicamente, são os mais tóxicos às abelhas, com  $DL_{50}$  de contato em nanogramas por abelha (Iwasa et al., 2004).

Existe uma considerável evidência de que o alvo dos compostos neonicotinoides são os receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs), aonde eles atuam como parciais ou completos agonistas (Déglise et al., 2002; Tomizawa e Casida, 2003). Pelo menos dois tipos de nAChRs têm sido descritos no cérebro de *Apis mellifera* (Gauthier et al., 2006), que estão envolvidos no aprendizado tátil e olfatório e com a memória (Cano et al., 1996; Thany e Gauthier, 2005), os quais são essenciais para o comportamento de forrageamento.

Hashimoto et al. (2003) determinaram a  $CL_{50}$  para as abelhas *A. mellifera* recém-emergidas e com 21 dias de idade após submetê-las ao inseticida thiamethoxam, os autores observaram maior toxicidade para as abelhas mais jovens com  $CL_{50}$   $4,7 \times 10^{-5}$  mg/mL após a ingestão e 3,21 mg/mL após o contato.

Moraes et al. (2000) avaliaram a toxicidade aguda de alguns inseticidas para *Scaptotrigona tubiba*, dentre eles o malathion. Os autores encontraram uma  $DL_{50}$  superior a 0,04mg/abelha, uma vez que nessa concentração apenas 30% dos indivíduos morreram, entretanto a  $CL_{50}$  encontrada foi de 0,015 ppm.

Apicultores têm se tornado altamente dependentes do uso de pesticidas para combater algumas doenças das abelhas, tais como os parasitas *Varroa jacobsoni* e *Acarapis woodi*, conduzindo a vários problemas, incluindo o aumento dos custos do

tratamento, perigos de toxicidade aos apicultores e às abelhas (Marchetti et al., 1987; Peng et al., 1992; Westcott e Winston, 1999) e os riscos de contaminação aos produtos da colmeia (Lehnert e Shimanuki, 1981).

O óleo da semente da árvore de neem, *Azadirachta indica* A. Juss., pode oferecer uma solução para estes problemas. Extratos de óleo de neem possuem considerável espectro de toxicidade contra patógenos da agricultura (Quarles, 1994; Schmutterer, 1995) e pode controlar várias espécies de parasitas e doenças das abelhas, assim reduzindo o número de produtos químicos usados nas colmeias. Embora as larvas de abelhas sejam susceptíveis ao neem (Rembold et al., 1980; Naumann e Isman, 1996), elas são menos susceptíveis do que as outras espécies de insetos, sugerindo que o neem pode ser eficiente para matar os patógenos das abelhas em concentrações seguras para estes insetos (Mordue e Blackwell, 1993). No presente estudo foi possível observar que, realmente, o óleo de neem não causou mortalidade de abelhas, mesmo na mais alta concentração (100%).

Nas análises eletroforéticas, observou-se redução na atividade das esterases EST-3 e EST-4 quando o inseticida thiamethoxam foi utilizado na contaminação por contato. Pode-se sugerir, então, que estas regiões podem ser utilizadas como bioindicadores da presença dos resíduos deste inseticida no ambiente. O mesmo foi observado por Hashimoto et al. (2003), trabalhando com thiamethoxam tanto por contato como por ingestão com *A. mellifera*. Os autores observaram alterações nas esterases 1, 2, 4 e 5.

Attencia et al. (2005), em estudos com *A. mellifera*, observaram várias diferenças em relação à atividade relativa das esterases quando expostas a diferentes concentrações de organofosforados. Quando uma concentração de 0,01% de metil-parathion foi empregada, a atividade da EST-1 foi reduzida em 75%, 14 e 21 dias após a introdução do inseticida. Uma inibição de 50% foi detectada para EST-3 e EST-4 um dia após a introdução do inseticida malathion. Para *T. angustula* também foi observada uma inibição das regiões de atividade esterásica, EST-3 e EST-4, tanto na contaminação por contato como na contaminação por ingestão, quando o malathion foi utilizado.

A região EST-4 é uma carboxilesterase de acordo com o padrão de inibição detectado por Stuchi et al. (*dados não publicados*); portanto essa isoenzima pode estar hidrolisando o inseticida malathion ou este pode se ligar ao sítio catalítico da enzima e inibir sua atividade. Esse fato é decorrente do modo de ação do inseticida. As carboxilesterases parecem atuar principalmente na pronta resposta dos insetos à exposição ao malathion, por meio da detoxificação metabólica. Por este mecanismo, a

carboxilesterase hidrolisa as ligações ésteres nas moléculas do inseticida, convertendo-o em uma forma menos tóxica que é facilmente excretada como ácido carboxílico (Price, 1984).

Nas análises do cérebro de *T. angustula*, após a contaminação com os dois inseticidas, malathion e thiamethoxam, não foi possível observar diferentes valores de CEC, a não ser quando o inseticida malathion foi utilizado misturado ao alimento, em que o valor de CEC ficou em 0,15M. Foram observadas células com indício de apoptose quando o malathion foi fornecido no alimento.

Apoptose é um tipo de morte celular que se diferencia da necrose por fatores bioquímicos e ultraestruturais, e é caracterizada pela redução no tamanho da célula, condensação da cromatina, geralmente com fragmentação do núcleo e do DNA e perda da integridade da membrana plasmática (Schulze-Osthof et al., 1994). As análises por meio da técnica de CEC permitiram detectar essas características em algumas células do cérebro de abelhas *T. angustula* após a contaminação com o organofosforado malathion. Contudo, serão necessários estudos mais detalhados de apoptose, como colorações específicas e microscopia eletrônica por transmissão, para certificar a sua ocorrência após a contaminação por organofosforado.

A utilização da técnica de CEC poderá se tornar uma ferramenta importante para a detecção de resíduos de pesticidas em abelhas jataí, as quais têm demonstrado bom potencial para serem utilizadas como bioindicadores de agrotóxicos.

As alterações observadas na intensidade das bandas das esterases 3 e 4 são indicativos de que a expressão dessas isoenzimas pode ser alterada após a contaminação das abelhas com malathion e thiamethoxam. Dessa maneira, as esterases também têm potencial para se tornarem marcadores moleculares da presença desses inseticidas na natureza.

## 5. AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e ao Laboratório de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá, por tornar possível a realização do presente trabalho.

Ao Programa de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo de doutorado.

## 6. RESUMO GERAL

A espécie *Tetragonisca angustula* pertencente à tribo Trigonini (abelhas que utilizam cera), conhecida popularmente como jataí, é uma das abelhas sem ferrão mais comum da região neotropical. Tendo em vista a importância dessas abelhas no processo de polinização, deve-se prever que ocorra um convívio gradualmente maior entre apicultura e agricultura, com benefícios recíprocos, desde que não ocorra o emprego indiscriminado de pesticidas. O presente estudo teve por objetivo avaliar a sensibilidade das abelhas nativas sem ferrão *T. angustula* à contaminação pelos inseticidas fipronil, malathion, neem e thiamethoxam, a mortalidade decorrente da contaminação, as alterações na expressão das esterases e na cromatina, em nível de cérebro para que essas abelhas possam ser empregadas como biomarcadores da presença desses inseticidas no ambiente. Foram coletadas operárias de duas colmeias na Universidade Estadual de Maringá, submetidas a dois bioensaios: mortalidade após contaminação com inseticida por contato e no alimento. Após 24 h as abelhas sobreviventes foram sacrificadas. Extratos de cabeça/tórax foram submetidos à eletroforese PAGE (esterases) e SDS-PAGE (proteínas totais). O cérebro foi retirado e as lâminas foram preparadas utilizando-se a técnica de esmagamento com ácido acético, lâmina e lamínula. A coloração das lâminas foi feita utilizando-se a técnica de CEC. Os valores de  $CL_{50}$  mostraram maior toxicidade para o fipronil quando administrado por contato (0,00053%) e a menor toxicidade foi observada com a contaminação por ingestão pelo inseticida malathion (1,33%). Com relação às esterases foi observada inibição parcial para EST-3, quando malathion foi administrado por contato (0,003%) e por ingestão (1% e 3%) e para EST-4 por contato (0,0025% e 0,003%) e por ingestão (1%, 2% e 3%). Após a contaminação de operárias de *T. angustula* com thiamethoxam foi observada redução na atividade das esterases EST-3 e EST-4 na contaminação por contato. Com relação aos dados de CEC, o malathion na contaminação por ingestão foi o que apresentou o menor valor (0,15M), porém para o mesmo inseticida no contato e o thiamethoxam por contato e ingestão, não foram observadas variações significativas. Células com indício de apoptose estavam presentes nas abelhas submetidas ao inseticida malathion na contaminação por ingestão. As alterações observadas na intensidade das regiões EST-3 e EST-4 bem como na estrutura da cromatina poderão ser marcadores moleculares importantes para a detecção de resíduos de agrotóxicos em abelhas jataí, as

quais têm demonstrado bom potencial para serem utilizadas como bioindicadores de agrotóxicos.

## 7. REFERÊNCIAS

Attencia V.M., Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Toledo V.A.A. (2005) Esterase activity in *Apis mellifera* after exposure to organophosphate insecticides (Hymenoptera: Apoidea), Sociobiol. 45, 587-595.

Barker R.J., Lehner Y., Kunzman M.R. (1980) Pesticides and honeybees: nectar and pollen contamination in alfafa treated with dimethoate, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 9, 125-133.

Cano L.V., Bonnard E., Gauthier M., Richard D. (1996) Mecamylamine-induced impairment of acquisition and retrieval of olfactory conditioning in the honeybee, Behav. Brain. Res. 81, 215–222.

Ceron C.R., Santos J.R., Campos Bicudo H.E.M.C. (1992) The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop, Braz. J. Genet. 15, 201-203.

Chauzat M.P., Faucon J.P., Martel A.C., Lachaize J., Cougoule N., Aubert M. (2006) A survey of pesticides residues in pollen loads by honeybees in France, J. Econ. Entomol. 99, 253-262.

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. (2005) Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez, Pest.: r. ecotoxicol. meio amb. 15, 65-72.

Déglise P., Grünewald B., Gauthier M. (2002) The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells, Neurosci. Lett. 321, 13-16.

Feng R., Isman M.B. (1995) Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*, Experient. 51, 831-833.

Filgueira F.A.R. (2003) Novo manual de olericultura – agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças, Ed. Universidade Federal de Viçosa.

Gauthier M., Dacher M., Thany S.H., Niggebrugge C., Deglise P., Kljucevic P., Armengaud C., Grünewald B. (2006) Involvement of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*), Neurobiol. Learn. Mem. 86, 164–174.

Grant D.B., Chalmers A.E., Wolff M.A., Hoffman H.B., Bushey D.F. (1998) Fipronil: action at the GABA receptor, Rev. Toxicol. 2, 147-156.

Hashimoto J.H., Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Toledo V.A.A. (2003) Evaluation of the use of the inhibition esterases activity on *Apis mellifera* as bioindicators of insecticide thiamethoxam pesticide residues, Sociobiol. 42, 693-699.



- Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J.T., Roe R.M. (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*, *Crop Protec.* 23, 371-378.
- Jacobson M. (1995) Toxicity of neem to vertebrates and side effects on beneficial and other ecologically important nontarget organisms: toxicity to vertebrates, in: Schmutterer (Ed.), *The neem tree: source of unique products for integrated pest management, medicine, industry, and other purposes.* Weinheim, New York, pp. 484-495.
- Kalanganire A., Harwood C.E., Slee M.U., Simons A.J. (2001) Pollination and fruit-set of *Grevillea robusta* in western Kenya, *Austral. Ecol.* 26, 637-648.
- Kearns C.A., Inouye D.W., Waser N.M. (1998) Endangered mutualisms; the conservation of plant-pollinator interactions, *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29, 83-112.
- Kerr W.E., Nascimento V.A., Carvalho G.A. (1994) Há salvação para os Meliponíneos? in: 1º Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto. *Proceedings.* Ribeirão Preto: 60-66.
- Key P.B., Chung K.W., Opatkiewicz A.D., Wirth E.F., Fulton M.H. (2003) Toxicity of the insecticides fipronil and endosulfan to selected life stages of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 533-540.
- Kevan P.G. (1999) Pollinators as bioindicators of the state of environment: species, activity and biodiversity, *Agric. Ecosys. Environ.* 74, 373-393.
- Kremen C, Williams N.M., Thorp R.W. (2002) Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification, *Proceed. Natin. Acad. Scie. Unit. Stat. Amer.* 99, 16812-16816.
- Krisch K. (1971) Carboxyl and hydrolases, in: Boyer P.D. *The enzymes.* New York: Academic Press. 5, pp. 43-69.
- Lehnert T., Shimanuki H. (1981) Oxytetracycline residues in honey following three different methods of administering the antibiotic, *Apidol.* 12, 133-136.
- Marchetti S., Chiesa F., D'Agaro M.D. (1987) Bee mortality following treatment with Perzin in colonies of *Apis mellifera carnica* x *A. m. ligustica*, *Apic.* 2, 67-76.
- Menezes-Pedro S.R., Camargo J.F.M. (2000) Biodiversidade do estado de São Paulo: síntese do conhecimento ao final do século XX. Apoidea, Apiformes, in: Brandão C.R., Cancellato E.M. *Inv. Terrestres.* São Paulo – FAPESP, 193-211.
- Milani N. (1999) The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides, *Apidol.* 30, 229-234.
- Moraes S.S., Bautista A.R.L., Viana B.F. (2000) Avaliação da toxicidade aguda DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): Via de contato, *An. Soc. Entomol. Brasil*, 29, 31-37.

- Mordue A.J., Blackwell A. (1993) Azadirachtin: an update, *J. Insect Physiol.* 39, 903-924.
- Naumann K., Isman M.B. (1996) Toxicity of a neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) insecticide to larval honey bees, *Am. Bee J.* 36, 518-520.
- Oppenoorth F.J. (1985) Biochemistry and genetics of insecticidal resistance, in: Kerkut G.S., Gilbert L.G. *Comprehensive insect physiology: biochemistry and pharmacology.* Oxford: Pergamon Press. 12, pp.731-756.
- Ozoe Y.K., Yagi K., Nakamura M., Akamatsu M., Miyake T., Matsumura F. (2000) Fipronil-related heterocyclic compounds: Structure-activity relationships for interaction with aminobutyric acid- and voltage-gated ion channels and insecticidal action, *Pestic. Biochem. Physiol.* 66, 92-104.
- Paschoal A.D. (1979) *Pragas, praguicidas e a crise ambiental: problemas e soluções*, Fundação Getúlio Vargas.
- Peng Y.S.C., Mussen E., Fong A., Montigue M.A., Tyler T. (1992) Effects of chlortetracycline on honey bee worker larvae reared in vitro, *J. Invertebr. Pathol.* 60, 127-133.
- Pinheiro-Machado C.A., Alves-dos-Santos I., Silveira F.A., Kleinert A.M.P., Imperatriz-Fonseca V.L. (2002) Brazilian bee surveys: state of knowledge, conservation and sustainable use, in: Kevan P.G., Imperatriz-Fonseca V.L. (eds.) - *Pollinating Bees – The conservation link between agriculture and nature – Ministry of Environment/Brasília*, pp. 115-129.
- Price N.R. (1984) Carboxyesterase degradation of malathion in vitro by susceptible and resistant strains of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae), *Comp. Bioch. Physiol.* 77, 95-98.
- Quarles W. (1994) Neem tree pesticides protect ornamental plants, *The IPM Pract.* 16, 1-13.
- Rembold H., Sharma G.K., Czoppelt Ch., Schmutterer H. (1980) Evidence of growth disruption in insects without feeding inhibition by neem seed fractions, *Z. Pflanznr. Pflanzenschutz.* 87, 290-297.
- Rhône-Poulenc. (1995) *Atelier International Fipronil/lute antiacidiennne*. Unpublished report. Rhône-Poulenc Agrochimie, Lyon, France.
- Richards K.W., Kevan P.G. (2002) Aspects of bee biodiversity, crop pollination, and conservation in Canada, in: Kevan P.G., Imperatriz-Fonseca V.L. (eds.) – *Pollinating Bees – The conservation link between agriculture and nature – Ministry of Environment/Brasília*, pp. 77-94.
- Roubik D.W. (2001) Ups and downs in pollinator populations: when is there a decline?, *Conserv. Ecol.* 5, 2-AD.
- Roubik D.W. (2002) The value of bees to the coffee harvest, *Nat.* 417, 708.

Schmutterer H. (1995) The neem tree: source of unique products for integrated pest management, medicine, industry, and other purposes. Weinheim, New York.

Schulze-Osthoff K., Walczak H., Droge W., Krammer P.H. (1994) Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis, *J. Cell. Biol.* 127, 15-20.

Sommer P.G. (1997) Aspectos da apicultura brasileira, in: Simpósio Paranaense de Apicultura, 12, Guarapuava. Anais... Guarapuava: Federação Paranaense de Apicultura: 17-19.

Stefanidou M., Koutselinis A., Pappas F., Methenitou G. (1996) Bee head acetylcholinesterase as an indicator of exposure to organophosphate and carbamate insecticides, *Vet. Human Toxicol.* 38, 420-422.

Stuchi A.L.P.B., Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Toledo V.A.A. (2009) Marcador molecular para identificar duas espécies de jataí: *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera, Meliponinae). Dados não publicados.

Sundaram M.S., Curry J. (1994) Initial deposits and persistence of azadirachtin in fir and oak foliage after spray application of 'Margosan-O' formulation, *Pestic. Sci.* 41, 129-138.

Thany S.H., Gauthier M. (2005) Nicotine injected into the antennal lobes induces a rapid modulation of sucrose threshold and improves short-term memory in the honeybee *Apis mellifera*, *Brain. Res.* 1039, 216-219.

Tingle C.C., Rother J.A., Dewhust C.F., Lauer S., King W.J. (2003) Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 176, 1-66.

Tomizawa M., Casida J.E. (2003) Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors, *Annu. Rev. Entomol.* 48, 339-364.

Vidal B.C., Mello M.L.S. (1989) Critical electrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes in vitro, *Acta. Histochem. Cytochem.* 22, 471-478.

Wallace H.M., Lee L.S. (1999) Pollen source, fruit set and xenia in mandarins, *J. Hort. Sci. Biotechn.* 74, 82-86.

Westcott L.C., Winston M.L. (1999) Chemical acaricides in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies; do they cause nonlethal effects?, *Can. Entomol.* 131, 1-9.

**Tabela I.** Concentrações letais a 50% ( $CL_{50}$ ) das abelhas *Tetragonisca angustula* submetidas ao fipronil, malathion, neem e thiamethoxam, tanto por contato (papel filtro) como por ingestão (alimento)

<i>Agroquímico</i>	<i>CL<sub>50</sub> (%)</i>	<i>95% Limite de confiança</i>
Fipronil – contato	0,00053	0,00024 – 0,00064
Fipronil – ingestão	0,00056	0,00053 – 0,00059
Malathion – contato	0,00315	-----
Malathion – ingestão	1,33	0,54467 – 2,18486
Neem – contato	-----	-----
Neem – ingestão	-----	-----
Thiamethoxam - contato	0,1622	0,06343 – 0,34581
Thiamethoxam – ingestão	0,2133	-0,00039 – 0,5357

**Tabela II.** Inibição da atividade das esterases detectada em *Tetragonisca angustula* após contato com malathion e thiamethoxam. (-) ausência de inibição; (+) inibição parcial

<i>Concentrações</i>	<i>Esterases</i>	
	<i>EST-3</i>	<i>EST-4</i>
<i>Malathion (%)</i>		
0,0025	-	+
0,0028	-	-
0,003	+	+
0,004	-	-
0,1	-	-
<i>Thiamethoxam (%)</i>		
0,05	-	-
0,07	-	-
0,1	+	+
0,2	-	-
0,3	-	-

**Tabela III.** Inibição da atividade das esterases detectada em *Tetragonisca angustula* após ingestão de malathion e thiamethoxam. (-) ausência de inibição; (+) inibição parcial

<i>Concentrações</i>	<i>Esterases</i>	
	<i>EST-3</i>	<i>EST-4</i>
<i>Malathion (%)</i>		
0,4	-	-
0,6	-	-
1	+	+
2	-	+
3	-	-
<i>Thiamethoxam (%)</i>		
0,005	-	-
0,008	-	-
0,01	-	-
0,02	-	-
0,03	-	-

**Tabela IV.** Respostas de basofilia nuclear da cromatina do cérebro de operárias de *Tetragonisca angustula* após contaminação por contato e ingestão com o inseticida malathion, coradas com Azul de Toluidina (AT) 0,025% adicionado de MgCl<sub>2</sub> em diferentes concentrações

<i>Concentração corante</i>	<i>Controle</i>	<i>Malathion (contato)</i>	<i>Malathion (ingestão)</i>	
		<i>0,002%</i>	<i>0,6%</i>	<i>1%</i>
AT controle	Vi	Vi	Vi	Vi
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,02M	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,05M	Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,08M	Az	Vi/Az	Az	Vi/Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,10M	Az	Az	Az	Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,12M	Az/Ve	Az/Ve	Az/Ve	Az/Ve
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,15M	Az/Ve	Az/Ve	<i>Ve</i>	Az/Ve
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,20M	<i>Az/Ve</i>	<i>Ve</i>	Ve	<i>Ve</i>
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,30M	<i>Ve</i>	Ve	Az/Ve	Ve
<b>Valor de CEC (M)</b>	<b>0,20&lt;CEC&lt;0,30</b>	<b>0,20</b>	<b>0,15</b>	<b>0,20</b>

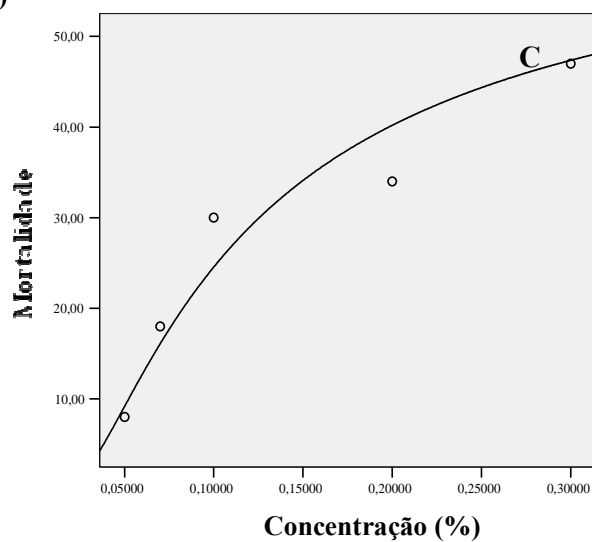
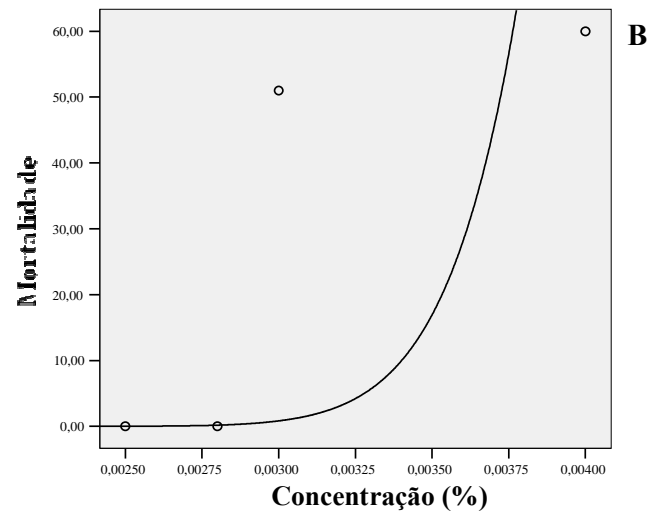
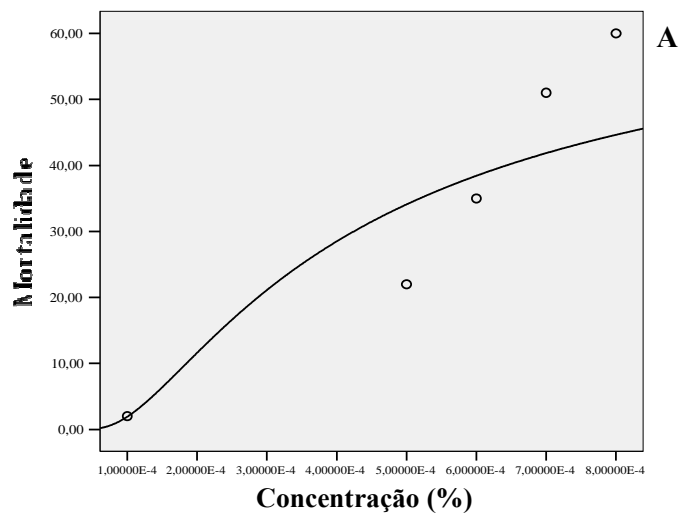
Vi: violeta. Az: azul. Ve: verde

**Tabela V.** Respostas de basofilia nuclear da cromatina do cérebro de operárias de *Tetragonisca angustula* após contaminação por contato e ingestão com o inseticida thiamethoxam, coradas com Azul de Toluidina (AT) 0,025% adicionado de MgCl<sub>2</sub> em diferentes concentrações

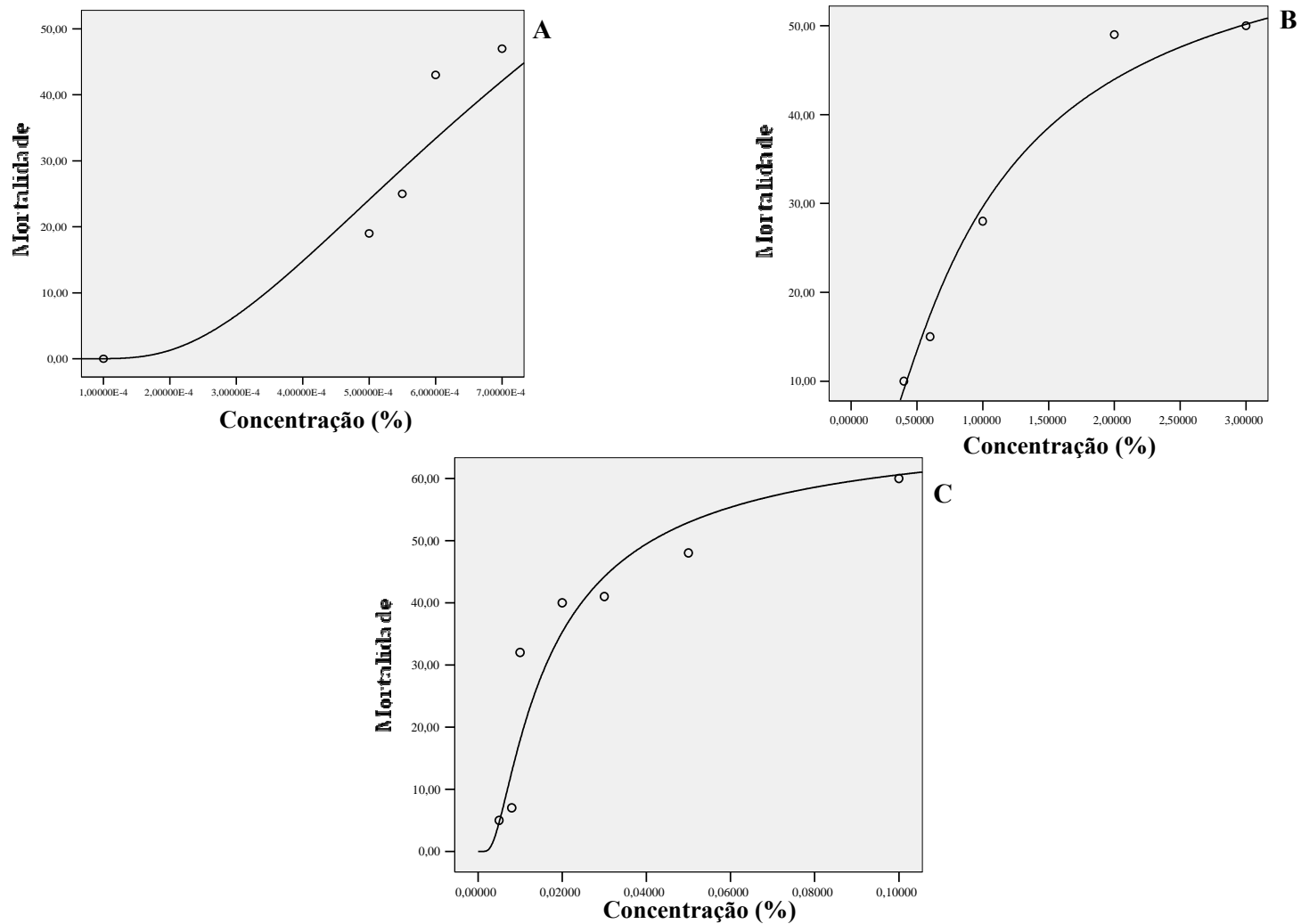
<i>Concentração corante</i>	<i>Controle</i>	<i>Thiamethoxam (contato)</i>		<i>Thiamethoxam (ingestão)</i>	
		<i>0,07%</i>	<i>0,1%</i>	<i>0,008%</i>	<i>0,01%</i>
AT controle	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,02M	Vi/Az	Vi	Vi	Vi	Vi
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,05M	Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,08M	Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az	Vi/Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,10M	Az	Az	Az	Az	Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,12M	Az/Ve	Az/Ve	Az	Az	Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,15M	Az/Ve	Az/Ve	Az/Ve	Az/Ve	Az
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,20M	<i>Az/Ve</i>	<i>Ve</i>	<i>Ve</i>	<i>Ve</i>	<i>Az/Ve</i>
AT + MgCl <sub>2</sub> 0,30M	<i>Ve</i>	Ve	Ve	Ve	<i>Ve</i>
<b>Valor de CEC (M)</b>	<b>0,20&lt;CEC&lt;0,30</b>	<b>0,20</b>	<b>0,20</b>	<b>0,20</b>	<b>0,20&lt;CEC&lt;0,30</b>

Vi: violeta. Az: azul. Ve: verde

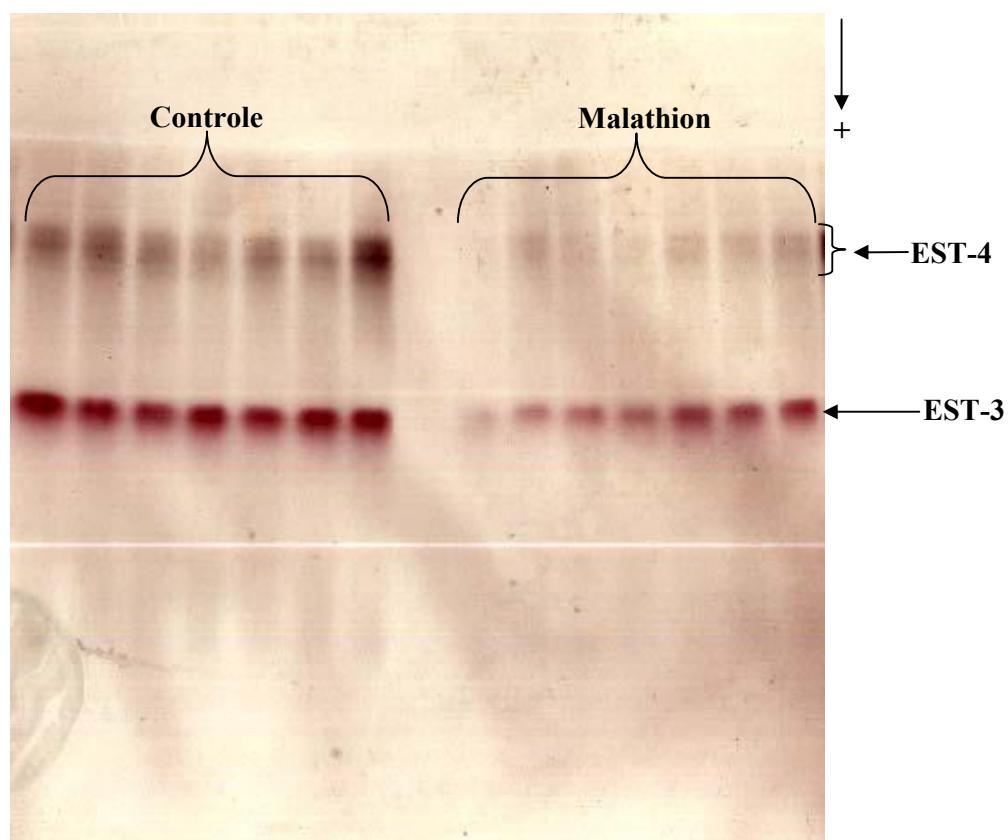




**Figura 1.** Curva de regressão (sigmoide) para os valores de mortalidade em diferentes concentrações dos inseticidas fipronil, malathion e thiamethoxam na contaminação por contato. A = fipronil com  $R^2 = 0,957$ ; B = malathion com  $R^2 = 0,644$ ; C = thiamethoxam com  $R^2 = 0,948$ .



**Figura 2.** Curva de regressão (sigmoide) para os valores de mortalidade em diferentes concentrações dos inseticidas fipronil, malathion e thiamethoxam na contaminação por ingestão. A = fipronil com  $R^2 = 0,997$ ; B = malathion com  $R^2 = 0,976$ ; C = thiamethoxam com  $R^2 = 0,876$ .



**Figura 3.** Perfil eletroforético das esterases de extratos de cabeça/tórax de *Tetragonisca angustula*, mostrando a inibição parcial da EST-3 e EST-4, após contaminação por contato com o inseticida malathion na concentração de 0,003%.

## VI – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados da caracterização bioquímica das esterases de jataí mostraram que esse gênero é composto por duas espécies: *T. angustula* e *T. fiebrigi*. A EST-1, EST-2 e EST-3 são marcadores moleculares que as identificam de forma simples e eficiente. Contudo, a EST-4 de *T. angustula* e *T. fiebrigi* é, bioquimicamente, semelhante. Portanto, as duas espécies ainda possuem características genéticas em comum.

Os bioensaios com fipronil, malathion e thiamethoxam mostraram que a mortalidade tem correlação com a contaminação por diferentes concentrações desses inseticidas, com excessão da contaminação do inseticida malathion por contato. Dessa maneira, a mortalidade de abelhas jataí pode ser utilizada como bioindicador da presença de resíduos desses inseticidas.

As análises eletroforéticas de extratos de cabeça/tórax de operárias de *T. angustula* e *T. fiebrigi* contaminadas com os inseticidas testados mostraram alteração da atividade das EST-1, EST-3 e EST-4, e esta alteração é um indicativo de que a expressão dessas isoenzimas pode ser alterada após a contaminação das abelhas com neonicotinoides, fenilpirazóis e organofosforados. Dessa maneira, as esterases têm potencial para se tornarem marcadores moleculares da presença desses inseticidas na natureza. Porém, ainda será necessário o desenvolvimento de experimentos de campo para que tal fato seja confirmado.

A EST-4, apesar de ter as mesmas características bioquímicas e de migração, nas duas espécies, respondeu de forma diferente quando as abelhas foram contaminadas com o mesmo inseticida; portanto, indicando que seriam genes diferentes nas duas espécies. Esses resultados sugerem, ainda, que a separação das duas espécies é recente pela semelhança identificada na caracterização bioquímica, ou seja, evolutivamente, essas isoenzimas ainda não se diferenciaram, provavelmente pela falta de pressão de

seleção sobre elas; somente agora com a utilização de inseticidas é que estão sendo observadas essas diferenças e que a seleção sobre esses *locos* permitirá identificar as diferenças e semelhanças entre eles.

A análise da alteração da estrutura da cromatina das células de cérebro após a contaminação com malathion e thiamethoxam mostrou que a técnica de CEC também pode ser empregada para detectar presença de resíduos de agroquímicos no ambiente. Essa metodologia mostrou também que as células de cérebro de *T. fiebrigi* apresentaram mais alterações na estrutura de cromatina que *T. angustula*. Além disso, foram observados indicativos de que esses inseticidas podem levar à apoptose das células de cérebro dessas abelhas.

Os resultados obtidos nas análises em laboratório com as abelhas jataí permitem concluir que essas abelhas poderão se tornar bons bioindicadores da contaminação ambiental, com especial ênfase nos agroecossistemas e áreas de preservação, pois foi detectada inibição parcial de esterases e suscetibilidade à contaminação por vários tipos de inseticidas neonicotinoides, organofosforados e fenilpirazol. Vale salientar que o inseticida neem até o momento não levou a alterações nessas abelhas nas análises *in vitro*.

## VII – ARTIGO DE VULGARIZAÇÃO

### **Abelhas jataí podem ser usadas como indicadores da presença de agroquímicos?**

As abelhas jataí não possuem ferrão, são abelhas dóceis, produzem mel muito saboroso e de alto valor comercial. Normalmente, o mel de jataí é produzido em pequena quantidade por pequenos produtores que, geralmente, têm lavouras de várias plantas em suas propriedades.

Normalmente, nas lavouras são utilizados vários tipos de agrotóxicos, dentre eles vários tipos de inseticidas para controle de pragas. Esses inseticidas muitas vezes são muito tóxicos para os animais, inclusive para as abelhas.

As abelhas são polinizadores de muitas plantas até mesmo nas lavouras, e elas podem aumentar e muito a quantidade de frutos e sementes, contribuindo com o aumento da produção. Durante a polinização, elas coletam néctar e pólen das flores, quando isso acontece as plantas foram pulverizadas com inseticidas as abelhas se contaminam e levam para suas colmeias néctar e pólen contaminados.

Dependendo da dose que foi utilizada para pulverização da lavoura haverá maior ou menor quantidade de resíduos do inseticida utilizado. Esses resíduos poderão causar uma série de problemas para as abelhas e para o mel e para o pólen que são produzidos. E claro, pode ocorrer aumento de mortalidade das abelhas pela contaminação com esses inseticidas.

A contaminação do mel irá diminuir o seu valor de venda acarretando prejuízo para o produtor. E dependendo da quantidade de resíduo de inseticida presente no mel poderá causar problemas de saúde em quem o consumir.

A jataí também tem sensibilidade a esse tipo de contaminação. Testes realizados em laboratório mostraram que pequenas concentrações (entre 0,21% e 0,79%) de

inseticida como o thiamethoxam (neonicotinoide, com alta toxicidade para abelhas *Apis mellifera*) mataram 50% das abelhas jataí contaminadas.

Essa contaminação da jataí com o inseticida thiamethoxam pode acontecer quando as abelhas estão coletando (por contato) néctar, pólen ou resina das plantas ou depois, quando utilizam os produtos dessas coletas no seu ninho (ingestão).

Esse inseticida é utilizado para controle do bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) que ataca os cafezais, bicho da goiaba (*Triozioida* sp.), lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) no milho, e várias pragas da batata como a vaquinha (*Diabrotica speciosa*, *Cerotoma* spp.), o verme-aramé (*Heteroderes* spp.), a lagarta rosca (*Agrotis* spp.) e o coró (*Dyscinetus* spp., *Diloboderus abederus*).

A sugestão aos produtores é que devem manter em suas propriedades alguns ninhos ou caixas de abelhas jataí e, até três dias após a aplicação de thiamethoxam em sua lavoura, verificar se há aumento na mortandade das abelhas próximo às caixas.

Essa é uma forma simples de proporcionar mais segurança para os animais da propriedade, para as pessoas que estão trabalhando na lavoura e garantir a qualidade do mel que será produzido.

Além da mortandade, os experimentos de laboratório mostraram que as abelhas que ficaram vivas após se contaminarem com o thiamethoxam, tiveram mudanças no seu organismo em nível de substâncias (enzimas) que fazem a desintoxicação do seu corpo. Essas enzimas estudadas eliminam substâncias tóxicas como o inseticida, contudo foi verificado que elas tornaram-se não-funcionais depois da contaminação com o thiamethoxam. No futuro, a análise dessas enzimas também poderá ser utilizada para detectar a presença do inseticida no ambiente.

As abelhas indígenas sem ferrão, grupo ao qual a jataí faz parte, são nativas das regiões tropicais, principalmente o Brasil. Já foram encontradas mais de 200 espécies dessas abelhas. Elas fazem seus ninhos principalmente em locais com matas que ainda não foram derrubadas. Muitas delas estão se adaptando a construir seus ninhos próximos a construções como casas, barracões, ocos de cercas e postes, dentre outros locais.

Como foi apresentado no início, as abelhas jataí são importantes para polinizar plantas de lavouras, mas também polinizam plantas nativas das matas, este é mais um motivo pelo qual é essencial a preservação dessas abelhas.

Assim, a utilização da jataí para monitorar a presença de inseticida como o thiamethoxam pode trazer vários benefícios ao produtor: o mel é saboroso e rentável,

ajuda na polinização da lavoura e a mata das proximidades, contribui para a preservação da espécie e finalmente é muito agradável observar a beleza, a capacidade de trabalho e o comportamento em sociedade desses insetos tão pequenos e tão importantes para a natureza.