

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeitos de inseticidas, acaricidas e fungicidas utilizados na cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) na abelha *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Trigonini).

Wellington Silva Gomes

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeitos de inseticidas, acaricidas e fungicidas utilizados na cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) na abelha *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Trigonini).

Wellington Silva Gomes

Dra. Ana Maria Bonetti

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeitos de inseticidas, acaricidas e fungicidas utilizados na cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) na abelha *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Trigonini).

Wellington Silva Gomes

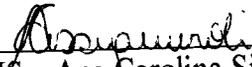
Aprovado pela Banca Examinadora em 05/02/07. Nota 100



Prof. Dr. Ana Maria Bonetti



Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira



Prof. MSc. Ana Carolina Silva Siquieroli

Uberlândia, 05 de Fevereiro de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Verificação da atividade de inseticidas, acaricidas e fungicidas
utilizados na cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne)
na abelha *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Trigonini).**

Wellington Silva Gomes

Dra. Ana Maria Bonetti
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em ___/___/___


Vera Lucia de Campos Brites

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2007

“...Aprendi que se depende sempre de tanta, muita, diferente gente, toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias de outras tantas pessoas e é tão bonito quando a gente entende que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá e é tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho por mais que pense está...”

Agradecimentos

Para que este trabalho fosse concluído, muitas pessoas fizeram parte desse crescimento pessoal e profissional. Impossível agradecê-las como merecido, porém faço àquelas que se tornaram mais envolvidas nessa pesquisa.

Inicialmente agradeço ao meu Pai Celestial pela modesta consciência que adquiri ao longo desta vida tão efêmera e tão dinâmica, que nunca me deixou só e pelo grande amor dado sem a espera de recompensa. "... Nem o sol, nem o mar, nem o brilho das estrelas... tudo isso não tem valor sem ter você...".

Agradeço a Natureza pela oportunidade de poder participar dessa grande odisséia da vida e pelo empréstimo, acredito que recompensado, de minhas abelhas jataís.

A minha gloriosa mãe: as vezes que você falou, em cada lágrima sentida que por mim já derramou; obrigado pelos beijos e conselhos que me deu e a vida que você me ofereceu. Obrigado minha mãe por tudo que eu sou. Obrigado mãe que tanto se sacrificou. Fez tudo para me ver feliz, capaz de até morrer por mim. Muito obrigado por me amar assim.

Agradeço a meu irmão, cunhada, tios e primos pela cumplicidade que sempre me trataram, pelas horas em que necessitei apenas de um olhar de aprovação. Muito obrigado a todos.

À minha família PET/BIOLOGIA pelos anos mais felizes da minha vida, por todas as oportunidades para meu crescimento, por todo o companheirismo, a amizade, a cumplicidade, o amor, a dedicação e os irmãos de coração e alma que aí conquistei; foram tantos e que com certeza levarei para o resto da vida... Amo todos vocês.

Como poderia esquecer meus grandes amigos/amores de minha vida. Isabel, de tanto amor não tenho palavras para agradecer tudo que fez para que me tornasse uma pessoa mais feliz. À Lorena, amiga companheira, em todos os momentos, sempre soube na sutileza de suas palavras, dizer o que eu mais necessitava, obrigado por tudo, adoro você. À Mariana, por tudo de bom que passamos juntos, te amo. À Carina, companheira fiel, meiga, ursinho, cúmplice... Sentirei muitas saudades desse amor. Michelle, vivemos tanta coisa boa juntos, como adoro esse bibelô, amiga eterna, dizem que os melhores perfumes estão nos menores frascos, e és uma pessoa assim. À Franciele, minha grande amiga chamada diversão, como rimos juntos nesse tempo, obrigado. Minha Paixão, Patrícia... Aprendi a ser gente e com certeza uma pessoa melhor com você, sei que nosso amor é eterno. À Renata e Liliane, obrigado por tudo.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Ana Maria Bonetti pela oportunidade de trabalho em seu laboratório e pelos ensinamentos que me auxiliaram em minha formação profissional.

A todos meus amigos do Laboratório de Genética: Carlos, Carol, Cynara, Tininha, Juliana, Luciana Oliveira, Luciana Londe, Flávia, Daniela, Rafael, Boscolli, Renato e Cícero. Obrigado pelo incentivo e ajuda sempre.

À Profa. Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro pela amizade e ajuda nos momentos em que necessitei.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr pela amizade e conselhos que sempre me acompanharam.

Agradeço a todos os professores desta Universidade que de maneira indireta contribuíram para o homem que me tornei.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade de fazer este excelente curso em que me formei.

Ao SESu/MEC pelo apoio financeiro nesses longos anos de graduação.

E aos demais amigos que conquistei durante o Curso, obrigado a todos.

RESUMO

A abelha *Tetragonisca angustula* é um polinizador indispensável na cultura do morango, pois aumenta significativamente sua produção, porém, não se sabe qual a influência dos defensivos utilizados no morangueiro sobre essa abelha. Este trabalho teve como objetivo verificar, por meio de técnicas de biologia molecular, a ocorrência de alterações na expressão de proteínas da abelha *Tetragonisca angustula*, provocados pela utilização de defensivos agrícolas utilizados na cultura de morangos. Para isso foi utilizado o método de bioensaio de contato residual e após a exposição aos defensivos agrícolas, as abelhas foram separadas de acordo com o tratamento e concentração e, em seguida, processadas para teste de verificação do efeito dos defensivos agrícolas por meio de enzimas Esterases, pela análise do Padrão Protéico e pelo Teste do Cometa. Foi possível verificar que os produtos analisados, Captan (fungicida), Propargite (acaricida), Deltametrina (inseticida) e Malation (inseticida), influenciaram o perfil de proteínas e outras enzimas importantes para esta abelha, porém não se detectou pelo método empregado, degradação de DNA.

Palavras-chave: *Tetragonisca angustula*, morango, defensivos agrícolas, Teste do Cometa, Esterases, Proteína Total.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Considerações Gerais.....	1
1.2	Esterases.....	6
1.3	Proteína Total.....	7
1.4	Teste Cometa.....	8
2	MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1	MATERIAL BIOLÓGICO	9
2.2	MÉTODOS	9
2.2.1	Teste de Sensibilidade aos Defensivos Agrícolas.....	9
2.2.2	Extração de Proteína e Teste Eletroforético.....	10
2.2.3	Esterases.....	12
2.2.3.1	Preparo das Amostras.....	12
2.2.3.2	Preparo dos Géis.....	13
2.2.3.3	Condições de Eletroforese.....	14
2.2.3.4	Identificação das Esterases.....	14
2.2.4	Teste do Cometa.....	15
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1	Teste de Sensibilidade à Defensivos Agrícolas.....	17
3.2	Esterases.....	18
3.3	Proteína Total.....	25
3.4	Teste do Cometa.....	27
4	CONCLUSÃO	29
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

LISTA DE TABELAS

em água, e concentrações crescentes de seus ingredientes ativos.

Tabela 2: Gel de Separação a 16%, desnaturante.

Tabela 3: Gel de Empilhamento a 7% desnaturante.

Tabela 4: Preparação da curva padrão BSA.

Tabela 5: Mini-Gel de Separação a 12%, não desnaturante.

Tabela 6: Mini-Gel de Empilhamento 4% não desnaturante.

submetidos aos tratamentos Captan e Propargito. * Concentrações recomendadas pelo fabricante.

submetidos aos tratamentos Decis e Malation. * Concentrações recomendadas pelo fabricante.

Tabela 9: Peso molecular a partir do método de Weber e Osborn (1969).

Tabela 10: Peso molecular a partir do método de Weber e Osborn (1969).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Trigonini). **A.** Vista frontal da operária. **B.** Vista lateral da operária. **C.** Curbículas na perna da operária (seta).

Figura 2: Morfologia da entrada do ninho da abelha *Tetragonisca angustula*. **A.** Uma entrada, nidificado em um tronco de árvore. **B.** Duas entradas, nidificados em um muro de pedras.

Figura 3: Padrão de proteínas do Marcador Molecular Kaleidoscope Prestained Standards.

Figura 4: Esquema geral de realização do teste cometa em pH alcalino.

Figura 5: Índice de dano ao DNA: cometas classe 1, sem dano, cometas classe 2, danos mínimos, cometas classe 3, danos médios, cometas classe 4, danos grandes e cometas classe 5 com o máximo de dano no DNA.

Figura 6: Perfil Esterásico de *Tetragonisca angustula* tratadas com Captan e Propargite em gel de poliacrilamida 12%, submetidos a coloração com α -naftil acetato. **A:** Controle; **B:** Captan. 2X; **C:** Captan 1X; **D:** Captan 1/2X; **E:** Captan 1/4X, **F:** Propargite; 2X, **G:** Propargite 1X; **H:** Propargite 1/2X; **I:** Propargite 1/4X.

Figura 7: Zimograma representativo das regiões esterásicas dos indivíduos de *Tetragonisca angustula*, tratados com o fungicida Captan e com o acaricida Propargite submetidos a coloração com α -naftil acetato.

Figura 8: Perfil Esterásico de *Tetragonisca angustula* tratadas com Captan e Propargite em gel de poliacrilamida 12%, submetidos a coloração com β -naftil acetato.

Figura 9 : Zimograma representativo das regiões esterásicas dos indivíduos de *Tetragonisca angustula*, tratados com o fungicida Captan e com o acaricida Propargite submetidos a coloração com β -naftil acetato.

Figura 10: Perfil Esterásico de *Tetragonisca angustula* tratadas com Deltametrina e Malation em gel de poliacrilamida 12%, submetidos a coloração com α -naftil acetato.

Figura 11: Zimograma representativo das regiões esterásicas dos indivíduos de *Tetragonisca angustula*, tratados com os inseticidas Deltametrina e Malation submetidos a coloração com α -naftil acetato.

Figura 12: Perfil Esterásico de *Tetragonisca angustula* tratadas com Deltametrina e Malation em gel de poliacrilamida 16%, submetidos a coloração com β -naftil acetato.

Figura 13: Zimograma representativo das regiões esterásicas dos indivíduos de *Tetragonisca angustula*, tratados com os inseticidas Deltametrina e Malation submetidos a coloração com β -naftil acetato.

Figura 14: Perfil eletroforético de proteína total de *T. angustula* tratadas com Captan e Propargito em gel de poliacrilamida 16% (SDS-PAGE) corado com *Comassie Blue R250*. As setas indicam bandas diferencialmente expressas, sendo as vermelhas, bandas com expressão diferente nos indivíduos e a verde, bandas dose-dependentes. **M:** Marcador de alto peso molecular SDS-7H Kaleidoscope Prestained Standards, pesos entre 10KDa e 250KDa.

Figura 15: Perfil eletroforético de proteína total de *Tetragonisca angustula* tratadas com Deltametrina e Malation em gel de poliacrilamida 16% (SDS-PAGE) corado com *Comassie Blue R250*. As setas indicam bandas diferencialmente expressas, sendo as vermelhas, bandas com expressão diferente nos e a verde, bandas expressas em concentrações diferentes. **M:** Marcador de alto peso molecular SDS-7H Kaleidoscope Prestained Standards, pesos entre 10KDa e 250KDa.

Figura 16: Efeitos da voltagem de eletroforese sobre cometas. Cometas obtidos após 30 minutos de eletroforese, pH >13, a 25V e 300mA, corados por brometo de etídeo e observados em microscópio ótico de fluorescência. **A:** Grupo Controle; **B:** Deltametrina 2X; **C:** Demais tratamentos.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
AchE	Acetilcolinesterase
BSA	Soro albumina bovina
CO₂	Dióxido de carbono
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
EGTA	Etileno glicol-bis (β- aminoetil éter) N, N, N', N' – ácido tetracético
KDa	Kilo Dalton
L	Litro
G	Gramma
M	Molar
Mg	Miligramma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Nm	Nanômetro

PAGE	Gel de poliacrilamida
pH	Potencial Hidrogeniônico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
V	Volt
μL	Microlitros
μM	Micromolar
KP	Kilo de pares de bases
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
%	Porcentagem
Rpm	Rotações por minuto
H₂O	Água

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

O morangueiro originou-se do cruzamento natural das espécies *Fragaria virginiana* e *Fragaria chiloenses* oriundas da América do Norte e do Chile, respectivamente, plantadas lado a lado em jardins europeus, com finalidades ornamental e medicinal (MEZZALIRA, 1986). Segundo a classificação botânica o morangueiro pertence à Família Rosaceae, ao gênero *Fragaria* e à espécie *Fragaria x ananassa* Duchesne (HANCOCK, 1990).

A progênie do híbrido resultante desse cruzamento, de ampla variabilidade genética, é, até hoje, o sustentáculo dos programas de melhoramento da cultura (PASSOS, 1999). A nível mundial, o morango é o fruto cultivado de distribuição mais ampla, devido a essa diversidade genotípica e à grande capacidade de adaptação ambiental (LARSON, 1994).

No Centro Estadual de Armazéns Gerais do Estado de São Paulo (CEAGESP) a comercialização de morango foi de 3.650 toneladas, com média anual de 304,17 toneladas, no ano de 2002. O balanço mundial de morangos frescos consumidos no mesmo ano foi de 496.000 toneladas, sendo os Estados Unidos o principal país produtor (AGRIANUAL, 2002).

Em Minas Gerais, o morangueiro é tradicionalmente cultivado no sul do estado, apresentando elevada importância sócio-econômica para a região, gerando empregos nas propriedades rurais. Entretanto, a cultura apresenta um alto custo de produção, necessitando de dedicação do produtor para obter sucesso econômico (ALVARENGA et al., 1999; RESENDE et al., 1999).

É uma planta herbácea, de porte baixo e, embora perene, apresenta queda na produtividade e na qualidade dos frutos em certos períodos do ano (PIRES, 1998). As flores de todos os cultivares comerciais do morangueiro são bissexuais e autoférteis (CRANE; WALKER, 1984). Os morangos (a polpa) resultam do desenvolvimento do receptáculo floral que acumula açúcares e vitaminas, amadurecendo como um fruto verdadeiro, que são os minúsculos caroços pretos dispostos ao redor da polpa e que são denominados aquênios (NITSCH, 1950).

Em um experimento clássico, Nitsch (1950) verificou que os aquênios controlam o crescimento do receptáculo durante o seu desenvolvimento e que na natureza não há o crescimento do morango sem que o óvulo contido no aquênio tenha sido fertilizado.

A remoção total dos aquênios interrompe completamente o crescimento da polpa do morango e a não fertilização ou remoção de alguns deles resultam em morangos com

diferentes padrões de deformação. Flores completamente fertilizadas resultam em frutos bem formados, de bom tamanho e de maturação precoce, sendo o peso aproximadamente proporcional ao número de óvulos fecundados (NITSCH, 1950; CHAGNON et al., 1989). Além disso, o morangueiro tem a particularidade de produzir flores com diferentes potenciais de frutificação de acordo com o número de pistilos que possui, o que depende da sua posição na hierarquia floral (CHAGNON et al., 1989).

Vários são os agentes que levam os grãos de pólen ao estigma receptivo, promovendo a polinização: inicialmente, o pólen é pegajoso e, quando as anteras se abrem, alguns grãos, por ação da gravidade (autopolinização espontânea), caem sobre o estigma da mesma flor (JAYCOX, 1970); posteriormente, quando os grãos de pólen tornam-se secos, o vento auxilia no processo de polinização. Os insetos também são importantes agentes na polinização do morangueiro, pois além de balançarem e movimentarem as flores, promovendo a autopolinização (CONNOR; MARTIN, 1973; NYE; ANDERSON, 1974; ZEBROWSKA, 1998), promovem também a polinização cruzada (JAYCOX, 1970; ZEBROWSKA, 1998).

Connor e Martin (1973) avaliando a polinização de 11 cultivares de morango, concluíram que a autopolinização espontânea foi responsável por 53% dos aquênios fecundados; a ação do vento elevou este valor para 67% (autopolinização + ação do vento) e a polinização por insetos, para 91% (autopolinização + insetos).

Conforme CHAGNON et al., (1993), a taxa de polinização dos aquênios raramente supera 60% se não houver o transporte de pólen pelos insetos. Esses autores encontraram, na ausência da polinização por insetos, taxas de malformação de 46,5% e concluíram que a polinização entomófila tem, portanto, um papel essencial na redução destas taxa e, conseqüentemente, aumento na produtividade da cultura do morango. Outros autores (Couston, 1991; Svensson, 1991; e Zebrowska, 1998), em diversos cultivares de morango, obtiveram um acréscimo da ordem de 35% na produção de frutos em termos de peso fresco, quando os insetos não foram impedidos de polinizarem as suas flores.

Na presença de insetos polinizadores, os ganhos na produção podem ocorrer em todos ou em alguns de seus componentes (número de frutos, peso fresco, formato, tamanho), em função das características de cada cultivar (ANTONELLI et al., 1988).

Outro fator a ser considerado quando se avalia a importância da polinização por insetos na produção de morangos é a hierarquia floral. Como as flores primárias possuem o maior número de pistilos e isto se traduz em um maior número de óvulos a serem fecundados, essas flores podem apresentar uma dependência maior da polinização por insetos para serem completamente polinizadas (CHAGNON et al., ZEBROWSK, 1998). Por essa razão, o

acréscimo na produção de frutos promovido pela polinização por insetos deve ser atribuído principalmente a polinização dessas flores (ZEBROWSKA, 1998). Além disso, as flores primárias, de um modo geral, apresentam anteras com altura inferior a do receptáculo, o que contribui para uma redução na eficiência da autopolinização espontânea e da autopolinização pelo vento (CONNOR; MARTIN, 1973).

A polinização do morangueiro recebe pouca atenção porque alguns cultivares produzem uma boa colheita, mesmo sem uma provisão suplementar de abelhas (ANTONELLI et al., 1988). Entretanto, o uso de uma provisão adicional de polinizadores geralmente resulta em um aumento na produção (ANTONELLI et al., 1988; CHAGNON et al., 1989; FREE, 1993; COUSTON, 1991; SVENSSON, 1991; ZEBROWSKA, 1998).

As abelhas da espécie *Apis mellifera*, reconhecidas como o principal polinizador de diversos cultivares (NYE; ANDERSON, 1974; ANTONELLI et al., 1988; GOODMAN; OLDROYD, 1988; CHAGNON et al., 1989; SVENSSON, 1991; FREE, 1993), são manejadas em diversos países de clima temperado para a polinização do morangueiro. Contudo, segundo Jaycox (1970) e Crane e Walker (1984), essas abelhas somente podem auxiliar na polinização destas flores se suas colméias estiverem próximas à cultura, pois não se deve esperar que elas voem a longas distâncias para o morangueiro, uma vez que as flores são pouco atrativas em relação a outras floradas.

Segundo Malagodi-Braga (2002) as abelhas *Apis mellifera*, referidas como os principais polinizadores de áreas subtropicais, também contribuem significativamente para a polinização do morangueiro nas regiões tropicais como o Brasil, porém, o destaque é para a abelha *Tetragonisca angustula* (Figura 1), comumente chamada jataí, pertencente a família Apidae, subfamília Meliponinae e tribo Trigonini, um dos meliponíneos encontrados em maior número de países, distribuindo-se na região neotropical desde a Argentina até o México e ocorrendo em todo o território brasileiro (NOGUEIRA-NETO, 1970; ROUBIK, 1983; ROUBIK 1989; CAMARGO; POSEY, 1990). *T. angustula* é um dos polinizadores mais abundantes nas flores do morangueiro, o que, deve estar associado à grande plasticidade de nidificação, ocupando ocos nos mais variados locais (cercas, muros de pedra ou alvenaria, paredes, caixotes abandonados, telhados, etc. e em ambientes naturais ou pouco alterados, utilizando mais comumente ocos de árvores onde, nidificam, com frequência, na sua parte basal), em áreas com grande influência antrópica (NOGUEIRA-NETO, 1997).

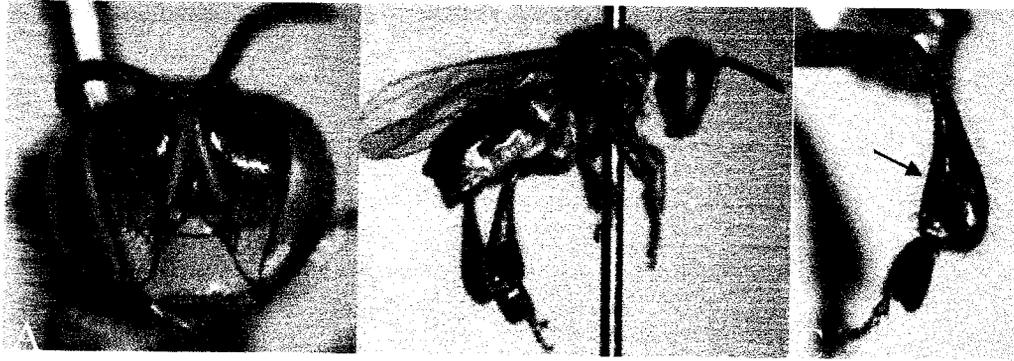


Figura 1: Abelha sem ferrão *T. angustula* (Hymenoptera, Trigonini). **A.** Vista frontal da operária. **B.** Vista lateral da operária. **C.** Curbículas na perna da operária (seta).

Fonte: http://www.apicultura.com.br/forum/phpbb2/files/tetragonisca_angustula.jpg, 2007.

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 (NOGUEIRA-NETO, 1970) (Figura 2).



Figura 2: Morfologia da entrada do ninho da abelha *T. angustula*. **A.** Uma entrada, nidificado em um tronco de árvore. **B.** Duas entradas, nidificados em um muro de pedras.

Fonte: www.apacame.org.br/mensagemdoce/80/jatai2.jpg, 2007.

O mel da jataí é conhecido popularmente pelas suas possíveis propriedades terapêuticas e novos estudos estão comprovando o efeito benéfico para a saúde humana (IWAMA; MELHEM, 1979; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 1984). Foi comprovado que o mel de *T. angustula* apresenta ação bactericida quando foram realizados testes de difusão em ágar com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BAZLEN, 1997).

As grandes plantações são mais vulneráveis à ausência de polinizadores porque os insetos podem ser menos abundantes na região central que nas bordas da cultura, resultando em uma produção menor e de baixa qualidade. Ainda, a grande quantidade de defensivos agrícolas, pode repelir ou mesmo matar os polinizadores silvestres existentes, contribuindo para uma diminuição ainda maior na produtividade (MALAGODI-BRAGA, 2002).

Devido à suscetibilidade dos principais cultivares plantados a diversas doenças e pragas (PAULUS, 1990; DIAS, 1999; FADINI; ALVARENGA, 1999), tem sido praticado o uso intensivo, muitas vezes indevido, de agrotóxicos na cultura do morangueiro. A conscientização sobre os riscos decorrentes do uso de agrotóxicos tem levado ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de sistemas de produção orgânicos (PASCHOAL, 1994). No entanto, os programas de melhoramento genético do morangueiro no Brasil (CAMARGO; PASSOS, 1993; PASSOS, 1999; SANTOS, 1999), assim como nos demais países, caracterizam-se pela avaliação e seleção de clones em sistema de cultivo convencional. Dessa forma, os cultivares recomendados tendem a apresentar menor desempenho no cultivo orgânico (GLIESSMAN et al., 1990; GLIESSMAN et al., 1995). Novos patamares de eficiência na agricultura sem agrotóxicos serão obtidos, se programas de melhoramento objetivarem o desenvolvimento de clones adaptados ao cultivo orgânico.

O Instituto Biológico (CEAGESP), vinculado à Secretaria de Agricultura e Abastecimento, concluiu que o morango é uma das frutas que mais apresentam resíduos de agrotóxicos. No período de 1990 a 1995, 5,3% das amostras analisadas continham resíduos de praguicidas autorizados acima dos níveis permitidos e 22,4% das amostras continham resíduos de produtos cuja comercialização e uso agrícola já foram proibidos no país em função de sua toxicidade (PNUD, 1999).

Nos agroecossistemas, os polinizadores estão sob stress severo devido, em grande parte, à ação dos agrotóxicos usados indiscriminadamente nas culturas. Apesar de serem utilizados em larga escala, a maioria dos estudos relacionados à toxicidade em abelhas enfocaram *Apis mellifera*, principalmente, devido a sua importância econômica, mas sabe-se pouco sobre os efeitos dos agrotóxicos em populações de abelhas nativas (NOGUEIRA-NETO, 1953; MALASPINA, 1979; MACIEIRA, 1983; BALESTIERI, 1989).

O morangueiro é suscetível a várias doenças e pragas que podem provocar grandes perdas quando não controladas adequadamente. Devido a este fato, são utilizados vários produtos para aumentar a produtividade dessa cultura. O Orthocide 500 EC, também chamado de Captan, é um fungicida não sistêmico, do grupo químico Dicarboximida, com ação preventiva no Controle de doenças fúngicas. O mecanismo de ação refere-se à reação do princípio ativo com certos tipos de proteínas, afetando atividades bioquímicas dos fungos em diversos locais (Ficha Técnica do Produto). Nesta cultura, o fungicida Captan é utilizado como Controle químico protetor contra o “mofo cinzento”, causado pelo fungo *Botrytis cinerea* (EMBRAPA, 2005). A concentração recomendada para a cultura do morango é de 240g de Captan para cada 100L de H₂O (Ficha Técnica do Produto).

O Omite 720 EC, com o sinônimo Propargito, pertence ao grupo químico sulfito de alquila (fenoxiciclohexil, organosulfurado). É um acaricida específico que atua por contato inibindo a respiração celular (KADIR; KNOWLES, 1991). A respiração celular é realizada por meio de inúmeras etapas no interior das mitocôndrias e sua inibição compromete a formação de ATP e outros substratos intermediários necessários para as reações bioquímicas. Os inibidores da respiração celular atuam no transporte de elétrons e fosforilação oxidativa (CORBETT et al., 1984). O Propargito combate o “ácaro rajado”, *Tetranychus urticae*. A concentração recomendada para a cultura do morango é de 30ml do produto para cada 100L de H₂O (Ficha Técnica do Produto).

O Malatol 500 CE, conhecido também como Malation é um inseticida e acaricida fitossanitário organofosforado que atua inibindo permanentemente a enzima acetilcolinesterase, através de sua fosforilação, causando acúmulo de acetilcolina e conseqüentemente superestimulação das terminações nervosas, tornando inadequada a transmissão de estímulos às células musculares, glandulares, ganglionares e ao sistema nervoso central (ESKENAZI et al,1999). Na cultura do morango ele combate a inúmeras pragas. A concentração recomendada para a cultura do morango é de 200ml do inseticida para cada 100L de H₂O (Ficha Técnica do Produto).

O Decis 25 CE, de sinonímia Deltametrina, é um inseticida do grupo químico dos piretróides que age por contato e ingestão, atuando nos canais de sódio da membrana de axônios, diminuindo e retardando a condutância de sódio para o interior da célula e suprimindo o efluxo de potássio. Também pode inibir a adenosina trifosfatase (ATPase), o que afeta a condução de cátions na membrana axonal. O resultado final é uma diminuição do potencial de ação e a geração de impulsos nervosos repetitivos. Além disso, a deltametrina, assim como outros piretróides do tipo 2, interfere na ligação do GABA e do ácido glutâmico nos sítios receptores (Ficha Técnica do Produto). A concentração recomendada para o morangueiro é de 50ml para cada 100L de H₂O (Ficha Técnica do Produto).

1.2 Esterases

As esterases pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam preferencialmente ésteres de ácidos carboxílicos, podendo atuar também sobre outros substratos que contenham ligações amidas (OAKESHOTT et al., 1993).

Os estudos feitos com estas proteínas têm a finalidade de esclarecer melhor seu papel biológico durante o desenvolvimento dos insetos. Dentre eles, destacam-se os que visam a

classificação dessas enzimas por meio de dois sistemas: especificidade por substratos e inibidores de esterases (ANDRADE, 2000).

Estas enzimas podem, também, estar relacionadas com outras atividades fisiológicas, como a regulação dos níveis de Hormônio Juvenil (HIDAYAT; GOODMAN, 1994); processos digestivos (ARGENTINE; JAMES, 1995) e no comportamento reprodutivo (LABATE et al. 1990).

Estas enzimas podem ser classificadas em quatro classes (HOLMES; MASTERS, 1967; OAKESHOTT et al., 1993):

1. Arilesterases: inibidas somente por agentes sulfidrílicos e cátions metálicos bivalentes como Hg^{-2} e Cu^{-2} ; geralmente preferem substratos aromáticos;
2. Carboxilesterases: inibidas somente por organofosforados, com preferência por ésteres alifáticos de cadeia longa;
3. Colinesterases: inibidas por organofosforados e sulfato de eserina, com preferência por substratos carregados (como ésteres de colina);
4. Acetilesterases: não são afetadas por nenhum dos inibidores e, geralmente, preferem substratos alifáticos derivados do ácido acético.

As esterases possuem ampla especificidade de substratos e são as enzimas mais polimórficas em insetos e outros organismos. Nos insetos, as esterases são sintetizadas pelo corpo gorduroso e são encontradas na hemolinfa e em outros tecidos (ANDRADE, 2000).

1.3 Proteína Total

As proteínas exercem papéis cruciais em todos os processos biológicos, entre eles: catálise enzimática, transporte e armazenamento, movimento coordenado, sustentação mecânica, produção imunitária, geração de impulsos nervosos, controle do crescimento e diferenciação, entre outros (HOY, 1994 apud CARVALHO 2000).

A separação eletroforética está entre os principais métodos utilizados para o fracionamento e caracterização de todos os tipos de proteínas; é baseada na mobilidade dos polipeptídios de acordo com seu tamanho e/ou carga elétrica líquida ou, ainda, em métodos que separam os polipeptídios de acordo com suas cargas independente dos seus pesos moleculares, por meio de um campo elétrico. Análise de proteínas por eletroforese tem sido utilizada para detectar variações traducionais em insetos (HOY, 1994 apud CARVALHO, 2000).

1.4 Teste Cometa

O Teste do Cometa é utilizado para detectar lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Esse teste pode ser utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir sobre a fidedignidade do processo de reparo. Uma vez que danos no DNA são freqüentemente em células e tecidos-específicos, uma metodologia como o Teste do Cometa, que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula e, conseqüentemente, em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos (RIBEIRO et al., 2003).

O comportamento do DNA em células individualizadas leva em conta sua organização dentro do núcleo. Para ser compactado, após seu enovelamento com proteínas histonas, o DNA forma alças de 5-200 Kb, as quais são aderidas a uma rede protéica ou “matriz nuclear” (COOK; BRAZELL, 1976, RAZIN et al., 1995, ERIKSSON et al., 2002). Se células embebidas em agarose tiveram suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares (incluindo as histonas) extraídas com altas concentrações de sais (2,5 M NaCl), o DNA, maior e mais pesado que o restante dos componentes, ocupará o espaço no gel anteriormente preenchido por toda a célula, permanecendo retido numa estrutura residual semelhante a um núcleo, designada como “nucleóide” (COOK; BRAZELL, 1976). Dentre as poucas proteínas que resistem a esta extração, estão as proteínas da matriz nuclear (OLIVE; BASNÁTH, 1995). Portanto, por definição, o nucleóide é uma série de alças superenoveladas de DNA, desprovido de histonas, aderida à matriz nuclear residual, do tamanho do núcleo da célula. Caso existam quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofre alterações, visto que as alças de DNA se desenovelam formando um halo (COOK; BRAZELL, 1976, VOGELSTEIN et al., 1980).

Sabe-se que as abelhas da espécie *T. angustula* aumentam significativamente a quantidade de morangos adequados à comercialização, devido a sua eficiência em relação a polinização desta cultura, na qual as flores visitadas por essa abelha originam morangos bem formados. Na presença da jataí, o número de frutos deformados cai de 85 para 5% (MALAGODI-BRAGA, 2002). Apesar das abelhas comprovadamente serem importantes para a polinização, elas estão sendo mortas ou repelidas devido a intensa utilização de agrotóxicos para o controle de pragas, visto que o morango é um dos frutos que mais apresenta resíduos de agrotóxicos, não havendo, portanto, polinização natural e eficiente. Este trabalho teve como objetivo demonstrar, por meio de técnicas de biologia molecular, a

ocorrência de alterações na expressão de genes sobre a abelha sem ferrão *T. angustula*, provocados pela utilização de defensivos agrícolas utilizados na cultura de morangos, por meio de enzimas Esterases, pela análise do Padrão protéico e pelo Teste do Cometa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizadas abelhas operárias adultas (peso médio de 5 mg) de *T. angustula*, capturadas na entrada de uma colméia localizada no Meliponário Uberlândia (Uberlândia - MG - S 18° 55'; W-GR 48° 17') da Universidade Federal de Uberlândia. As coletas foram feitas com o auxílio de um frasco pequeno, de boca estreita, posicionado em frente à entrada da colméia de modo que as operárias que saíam da colônia passavam diretamente para o referido frasco.

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica desta mesma Universidade.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Teste de Sensibilidade aos Defensivos Agrícolas

O método de bioensaio adotado foi o de contato residual. Os bioensaios de caracterização toxicológica para todos os testes foram repetidas 2 vezes durante o tempo total do experimento. Cada repetição foi constituída por uma placa como testemunha (pulverizadas com água destilada) e quatro placas por concentração. Grupos de 6 abelhas foram preparados para cada concentração dos defensivos e para o grupo Controle.

Para o preparo das soluções foram utilizadas formulações dos defensivos agrícolas abaixo relacionados, diluídas em água destilada e em concentrações crescentes de seus ingredientes ativos (Tabela 1).

Tabela 1: Produtos utilizados para o bioensaio em sua concentração recomendada, diluídas em água, e concentrações crescentes de seus ingredientes ativos.

Produto	Concentração		Concentrações Utilizadas		
	Recomendada				
Orthocide 500	240g/100L	4,8g/L	2,4g/L	1,2g/L	0,6g/L
EC (Captan)	H ₂ O	(2X ou 200%)	(1X ou 100%)	(1/2X ou 50%)	(1/4X ou 25%)
Omite 720 EC	30ml/100L	0,6ml/L	0,3ml/L	0,15ml/L	0,075ml/L
(Propargito)	H ₂ O	(2X ou 200%)	(1X ou 100%)	(1/2X ou 50%)	(1/4X ou 25%)
Malatol 500	200ml/100L	4ml/L	2ml/L	1ml/L	0,5ml/L
CE (Malation)	H ₂ O	(2X ou 200%)	(1X ou 100%)	(1/2 X ou 50%)	(1/4X ou 25%)
Deltametrina	50ml/100L	50ml/L	25ml/L	12,5ml/L	6,25ml/L
25 CE	H ₂ O	(2X ou 200%)	(1X ou 100%)	(1/2 X ou 50%)	(1/2 X ou 50%)
(Deltametrina)					

As abelhas foram anestesiadas com gás carbônico (CO₂), suficiente apenas para que fossem manipuladas e, posteriormente, colocadas em placas de *Petri* de 100x20 mm, forradas com um círculo de papel de filtro de 8,2 cm de diâmetro, a uma temperatura e umidade relativa médias de 27,1°C e 78,3%, respectivamente. Dentro de cada placa foi colocado um alimentador, o qual consistiu em um pequeno recipiente contendo solução de sacarose 30%.

Ao final, registrou-se a taxa de mortalidade em cada concentração dos defensivos agrícolas e no Controle. Foram consideradas mortas as abelhas sem movimento durante a leitura do teste.

Após o tempo pré-estabelecido de exposição aos defensivos agrícolas, as abelhas foram separadas de acordo com o tratamento e concentração e, em seguida, processadas para teste de verificação do efeito dos defensivos agrícolas por meio de enzimas esterases, pela análise do padrão protéico e pelo Teste Cometa.

2.2.2 Extração de Proteína e Teste Eletroforético

Para a extração de proteína total, utilizaram-se seis operárias para quatro tratamentos diferentes e, dentro desses, quatro concentrações e duas réplicas por tratamento, totalizando 240 indivíduos. Os indivíduos foram macerados em nitrogênio líquido, sendo, em seguida, solubilizados em tampão de extração (Tris-HCl 0,02M pH 7,2; sacarose 0,25M; EGTA 0,002M e EDTA 0,01M) e submetidos à centrifugação a 15.000G por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a dosagem protéica realizada pelo método de Bradford (1976).

O perfil protéico foi analisado por SDS-PAGE em gel de separação 16% (Tabela 2) com o gel de empilhamento a 7% (Tabela 3). Foram aplicados 15µg de proteína total para cada amostra.

A separação eletroforética dos polipeptídeos foi conduzida em tampão Tris-HCl 25mM pH 8,5, EDTA 2mM, glicina 0,2M, SDS 2,5mM, sob voltagem constante de 110V por 3h30min. Os géis foram corados com solução de *Coomassie Brilliant Blue* R250 0,125%, metanol 50% e ácido acético 10%, sendo descorados em solução de metanol 10% e ácido acético 12,5%.

Tabela 2: Gel de Separação a 16%, desnaturante.

Componentes	Volume
Glicerol	935 µL
Acrilamida - Bis-Acrilamida (49,5: 0,5)	1656 µL
Tampão TRis-HCl 3,0M pH 8,3	1656 µL
Água deionizada	737 µL
Persulfato de Amônia 10%	18 µL
TEMED	3 µL
Volume Final	5005 µL

Tabela 3: Gel de Empilhamento a 7% desnaturante.

Componentes	Volume
Acrilamida - Bis-Acrilamida (49,5: 0,5)	280 µL
Tampão TRis-HCl 3,0M pH 8,3	478 µL
Água deionizada	1240 µL
Persulfato de Amônia 10%	18 µL
TEMED	3 µL
Volume Final	2019 µL

O cálculo do peso molecular aparente dos polipeptídeos em gel foi determinado tomando como parâmetro o marcador de alto peso molecular *Kaleidoscope Prestained Standards* (BIO-RAD), o qual consiste de sete padrões de bandas coloridas com alto peso molecular, de variação de aproximadamente 6.500 a 200.000 Daltons. Essas bandas referem-

se a sete proteínas com peso molecular conhecido. As proteínas e seus respectivos pesos estão representados na figura 3.

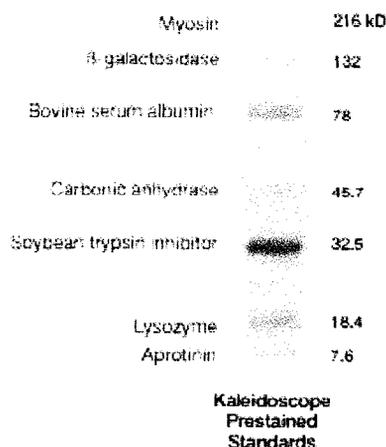


Figura 3: Padrão de proteínas do Marcador Molecular Kaleidoscope Prestained Standards.

2.2.3 Esterases

2.2.3.1 Preparo das Amostras

Após os tratamentos, as placas de *Petri* foram mantidas em estufa (Fanem 002 CB), à temperatura de 25°C e umidade relativa de 60%. Durante os experimentos, as abelhas foram alimentadas com solução de sacarose: água (30%), colocado um alimentador, o qual consistiu em um pequeno recipiente

Passado o tempo de exposição as abelhas foram separadas de acordo com o tratamento e maceradas em cadinho de porcelana com auxílio de bastão de vidro, em nitrogênio líquido solubilizado em 400 μ l de tampão de amostra (fosfato de sódio 0,01M, pH 6,5, contendo glicerol a 10%, azul de bromofenol a 0,001%, sacarose a 20%, EDTA 0,001M e Triton X-100 a 0,5%) e submetidas à centrifugação a 10.000rpm por 10 minutos a 4° C e, posteriormente, coletados os sobrenadantes.

A dosagem de proteínas, para a normalização da reação com Esterases, foi realizada com base no princípio proteína-corada, de acordo com Bradford (1976). Nesse método, utilizou-se soroalbumina bovina (BSA) como proteína padrão. A curva padrão BSA foi definida inicialmente como mostra a Tabela 4.

Tabela 4: Preparação da curva padrão BSA.

Tubos	Volume BSA	Volume H₂O	Volume Final
1	-	10 µl	100µl
2	5µl	95 µl	100µl
3	10 µl	90 µl	100µl
4	15 µl	85 µl	100µl
5	20 µl	80 µl	100µl
6	25 µl	75 µl	100µl
7	30 µl	70 µl	100µl

A cada um dos tubos foi adicionado 3ml de reagente de Bradford. A leitura em espectrofotômetro (HITACHIU-2000 Spectrophotometer) a 595nm foi feita depois de, no mínimo, 2 minutos, tempo suficiente para o reagente de Bradford sensibilizar as amostras.

Todas as amostras, incluindo a curva padrão, foram feitas em duplicata e os valores das médias aritméticas das amostras foram utilizados.

A equação da reta foi obtida utilizando-se o programa EXCEL (MICROSOFT OFFICE 2000), as médias das leituras das amostras foram substituídas nessa equação para se obter a concentração de proteína de cada amostra. A partir da quantificação, padronizou-se a concentração das amostras utilizadas. Foram aplicados 100µg de cada amostra em gel de poliacrilamida nativo para análise.

2.2.3.2 Preparo dos Géis

Foram preparados Mini-Géis de Separação 12% não desnaturante, em placa de vidro de 12cm x 16,5cm, conforme descrição da Tabela 5.

Tabela 5: Mini-Gel de Separação a 12%, não desnaturante.

COMPONENTES	VOLUMES
Água deionizada	5,0ml
Acrilamida - Bis-acrilamida (30:0,8)	5,2ml
Tampão TRIS-HCL 1,5M pH 8,8	2,6ml
Persulfato de amônia 10%	0,200ml
Temed	0,020ml

Na Tabela 6 estão sumariados os volumes de água e soluções estoque necessários para o preparo do Mini-Gel de Empilhamento 4%, não desnaturante.

Tabela 6: Mini-Gel de Empilhamento 4% não desnaturante.

COMPONENTES	VOLUMES
Água deionizada	3,0ml
Acrilamida-Bis-acrilamida (30:1,6)	0,675ml
Tris-HCL 0,5M (Ph 6,8)	1,25ml
Persulfato de amônio 10%.	0,075ml
Temed	0,020ml

2.2.3.3 Condições de Eletroforese

Os géis foram submetidos a uma pré corrida de 1h a 150V e, posteriormente, a 200V por 3h. Os compartimentos superior e inferior da cuba foram preenchidos com Tampão Tris-Glicina (Tris 0,0125M, Glicina 0,096M) pH 8,3.

2.2.3.4 Identificação das Esterases

A identificação das bandas com atividade esterásica presentes nos géis foi baseada nos métodos de coloração, de acordo com Steiner e Johnson (1973) citado em Ceron (1988), com pequenas modificações. Os géis foram pré-incubados à temperatura ambiente em 100ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,2 por 20 minutos. Após esse período, foram submetidos à

coloração por 45 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. A solução de coloração foi preparada com 50mg de β -naftil acetato e/ou 50mg de α -naftil acetato, dissolvidos em 1ml de acetona e misturados com uma solução recém-preparada e filtrada, contendo 100ml de tampão fosfato e 100mg de *Fast Blue RR Salt* (SIGMA). As atividades das α e β esterases foram visualizadas nos géis como bandas de coloração preta e vermelha, indicando a hidrólise preferencial do α ou do β naftil-acetato, respectivamente, ou ambos, dependendo do substrato utilizado. Após a coloração, os géis foram tratados com 100ml de solução de descoloração contendo álcool etílico comercial: ácido acético: glicerol (250:100:15) diluídos em 1L de água, por 24 horas. Após a descoloração, os géis foram prensados entre folhas de papel celofane, fixados por garras e deixados secar a temperatura ambiente.

2.2.4 Teste do Cometa

O Teste Cometa em pH alcalino foi realizado como descrito por Singh e colaboradores (1988) com pequenas modificações (HARTMANN; SPEIT, 1997) e está representado no esquema da Figura 4. Após os tratamentos com os defensivos, as células foram colhidas, por separação mecânica através da maceração da abelha em solução de Hanks (contendo 20mM EDTA, 10%DMSO) coletando o sobrenadante e dissolvidas em agarose *low-melting point* 0,75% (LMPA) e então espalhadas sobre uma lâmina de microscopia com pré-cobertura de agarose (1,5%). As lâminas foram feitas em duplicata para cada tratamento. As células foram lisadas com uma solução de contendo 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM de Tris, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, apresentando pH 10, por no mínimo uma hora. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal. Para permitir o desenrolamento do DNA, as lâminas ficaram incubadas por 20 minutos em tampão alcalino feito na hora de uso contendo 300mM NaOH e 1mM EDTA, pH~13.0 a 4°C. Uma corrente elétrica de 300mA e 25V (0,90V/cm) foi aplicada por 20 minutos a 4°C. As lâminas foram então neutralizadas com 0,4M Tris, pH 7,5. Após estarem secas, as mesmas foram coradas com a solução de brometo de etídio 0,5mM e cobertas com uma lamínula grande (24x60mm).

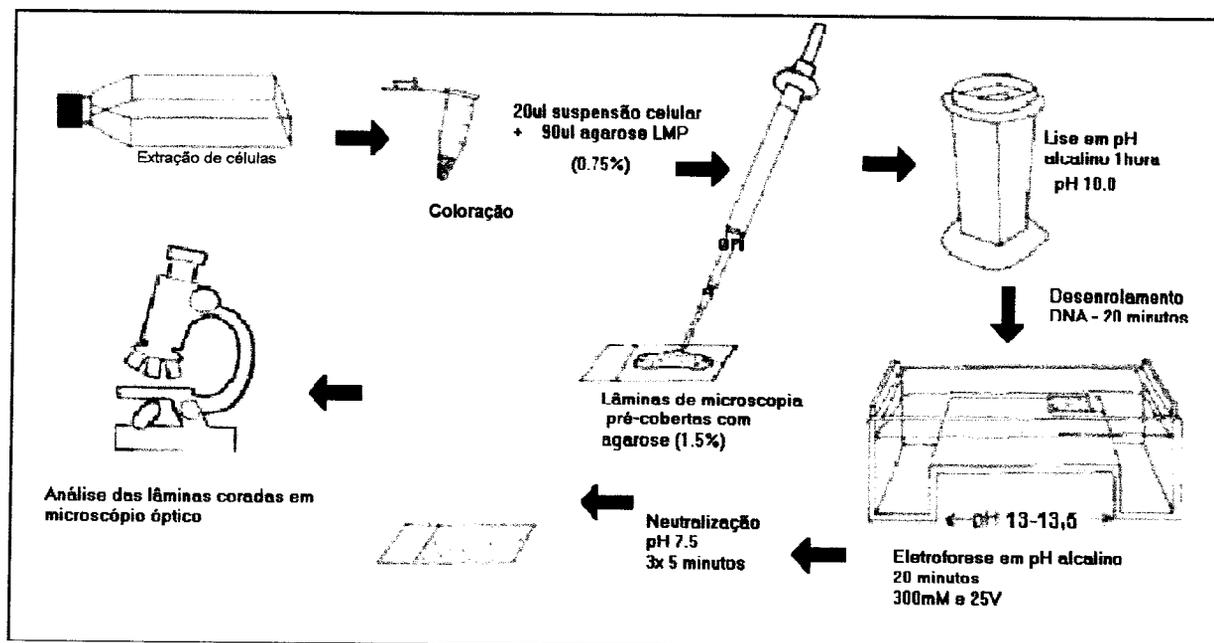


Figura 4: Esquema geral de realização do teste cometa em pH alcalino.

As células foram analisadas em microscópio óptico de fluorescência Polyvar (REICHERT-JUNG). Imagens de 100 células foram analisadas por lâmina e classificadas visualmente dentro de cinco classes de acordo com o tamanho da cauda, variando de células sem dano a células com o máximo de dano (Figura 5).

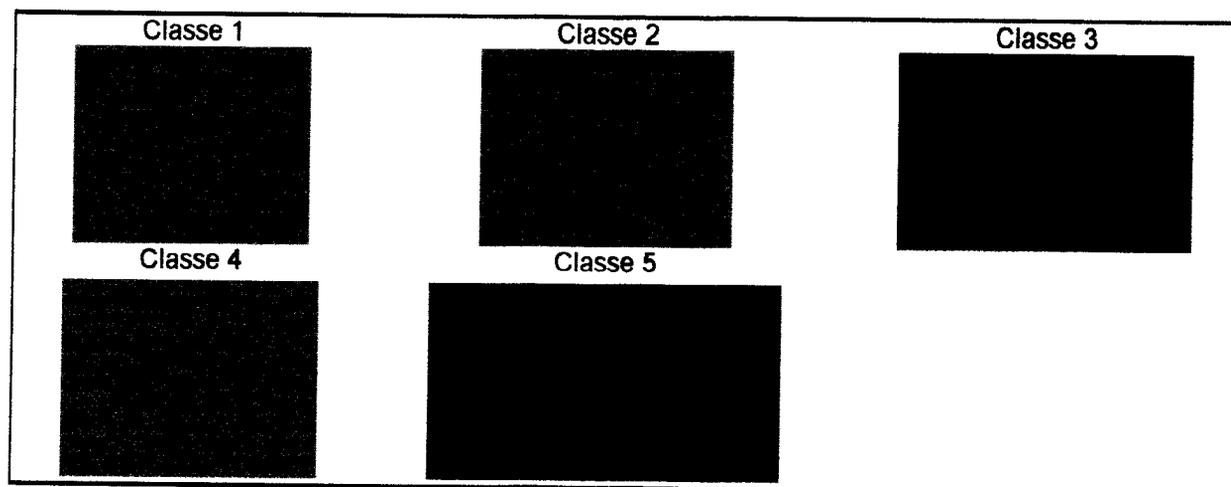


Figura 5: Índice de dano ao DNA: cometas classe 1, sem dano; cometas classe 2, danos mínimos; cometas classe 3; danos médios, cometas classe 4, danos grandes e cometas classe 5 com o máximo de dano no DNA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de Sensibilidade à Defensivos Agrícolas

Todos os indivíduos, com exceção do Grupo Controle morreram num intervalo máximo de 5:20 horas, nos tratamentos com Captan e Propargite e 1:56 horas com ao Deltametrina e o Malation. Os indivíduos do Grupo Controle foram congelados logo após a morte do último indivíduo dos Grupos Tratados. O quadro do tempo de vida dos indivíduos após a aplicação do Captan e do Propargito está mostrado na Tabela 7 e dos tratamentos com Deltametrina e Malation na Tabela 8.

Os resultados para o teste de sensibilidade demonstram que as abelhas *T. angustula* foram mortas em tempos relativamente curtos e que os tempos de vida são proporcionais às doses utilizadas.

Tabela 7: Tempo de vida, em horas, dos indivíduos adultos de *T. angustula* submetidos aos tratamentos Captan e Propargito. * Concentrações recomendadas pelo fabricante.

Tratamentos	Tempo de vida	
	Mínimo	Máximo
Captan 2X	0:30	1:45
Captan 1X *	1:20	3:00
Captan 1/2X	1:55	4:10
Captan 1/4X	2:05	5:20
Propargito 2X	0:40	2:00
Propargito 1X *	0:50	2:30
Propargito 1/2X	1:15	3:50
Propargito 1/4X	2:15	4:35

Tabela 8: Tempo de vida, em horas, dos indivíduos adultos de *T. angustula* submetidos aos tratamentos Decis e Malation. * Concentrações recomendadas pelo fabricante.

Tratamentos	Tempo de vida	
	Mínimo	Máximo
Decis 2X	0:05	0:14
Decis 1X *	0:12	0:29
Decis 1/2X	0:19	0:41
Decis 1/4X	0:36	1:02
Malation 2X	0:10	0:22
Malation 1X *	0:20	0:36
Malation 1/2X	0:32	0:47
Malation 1/4X	1:00	1:56

Os testes realizados em laboratório são padronizados de acordo com a ocorrência na natureza, e como demonstrado, as abelhas estão sendo mortas por produtos que não teriam nenhum tipo de reação (fungicida e acaricida) e, com isso, provocará a diminuição da taxa de polinização dos morangueiros e conseqüentemente a produção de morangos será diminuída significativamente. Nesse sentido, a abelha *T. angustula* pode ser utilizada como bioindicador de poluição provocado por defensivos agrícolas.

3.2 Esterases

Para identificação das esterases foram utilizados os substratos α -naftil acetato e β -naftil acetato.

As Figuras 6 e 8 mostram o padrão de regiões esterásicas obtido quando os géis de poliacrilamida foram submetidos a coloração com o substrato α -naftil acetato. E nas Figuras 10 e 12 têm-se o perfil esterásico resultante da utilização do substrato β -naftil acetato.

Seis regiões com atividade esterásica foram detectadas em indivíduos da população de *T. angustula*, tratadas com o fungicida Captan e o acaricida Propargito, utilizando-se o α naftil-acetato como substrato. Essas regiões foram numeradas como EST-1 a EST-6, a partir da extremidade anódica do gel, sendo a banda correspondente a EST-1 a de migração mais rápida (Figura 6). Géis corados utilizando-se o β naftil-acetato como substrato, mostram um padrão com cinco regiões esterásicas (Figura 10).

Nos indivíduos Controle foram observadas cinco das seis bandas sendo a EST-3 presente apenas nos indivíduos tratados com Captan nas concentrações 25% (1/4X) e ou 50%

(1/2X) da recomendada pelo fabricante, porém não ocorrendo no Grupo Controle (Figura 6), podendo referir-se como biomarcador de baixas concentrações para o Captan.

A EST-5 ocorre apenas no Grupo Controle (Figura 6). A aplicação de Captan e Propargito, em todas as concentrações estudadas, provoca o desaparecimento total dessa Esterase. É possível levantar duas hipóteses: os produtos podem ter agido diretamente sobre essa enzima, ou essa Esterase teria sido consumida na tentativa de metabolizar os defensivos. Como o processo fisiológico e de desenvolvimento são dinâmicos, e o material foi processado logo em seguida à morte da abelha, não é possível afirmar a partir de qual momento essa esterase começa a desaparecer na abelha e se é um produto diretamente resultante da aplicação dos defensivos ou a expressão de um subproduto gênico relacionado a esse inseticida. De qualquer forma, a metabolização dos produtos não foi eficiente para impedir a morte do indivíduo. Pode-se ressaltar também, que esta EST pode ser utilizada como biomarcador de contaminação para o Captan e o Propargito.

Em todas as amostras do Grupo Tratado, houve uma diminuição na intensidade das bandas quando comparadas ao Grupo Controle (sem qualquer tratamento), reforçando a hipótese de que Esterases, de alguma forma, sofrem influência dos defensivos (Figura 6).

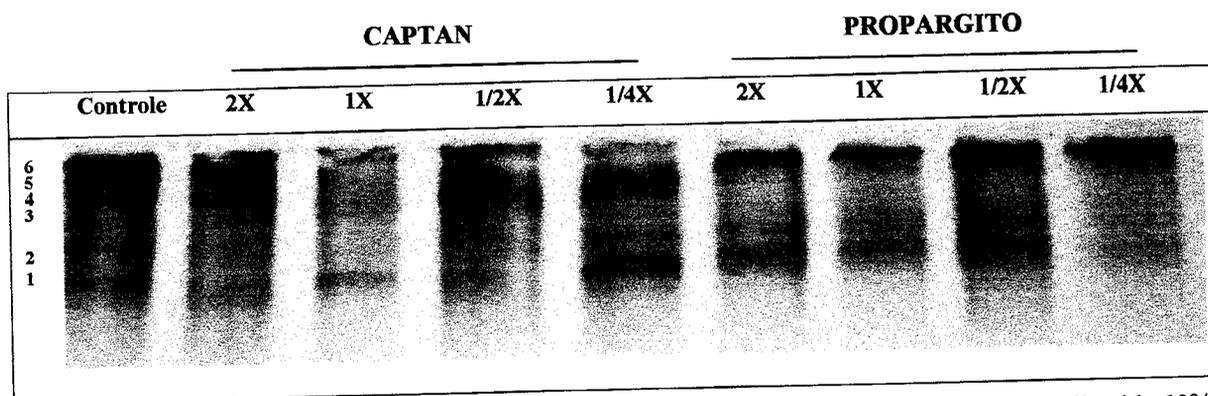


Figura 6: Perfil Esterásico de *T. angustula* tratadas com Captan e Propargito em gel de poliacrilamida 12%, submetidos a coloração com α -naftil acetato.

A Figura 7 apresenta o zimograma das Esterases que ocorrem em operárias de *T. angustula* submetidas ao tratamento com o fungicida Captan e o acaricida Propargito. Observa-se que:

EST-1 ocorre em todos os indivíduos (Controle e Tratados);

- EST-2 ocorre em todos os indivíduos (Controle e Tratados);
- EST-3 ocorre apenas no tratamento com o fungicida Captan nas concentrações de 25 (1/4X) e 50%.

- EST-4 ocorre em todos os indivíduos (Controle e Tratados);
- EST-5 apenas em indivíduos do Grupo Controle;
- EST-6 ocorre em todos os indivíduos (Controle e Tratados);

	CAPTAN					PROPARGITO			
	Controle	2X	1X	1/2X	1/4X	2X	1X	1/2X	1/4X
EST-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EST-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EST-3				-	-				
EST-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EST-5	-								
EST-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 7: Zimograma representativo das regiões esterásicas dos indivíduos de *Tetragonisca angustula*, tratados com o fungicida Captan e com o acaricida Propargito submetidos a coloração com α -naftil acetato.

Em relação aos géis submetidos à coloração β -naftil acetato (Figura 8), com os tratamentos com Captan e Propargito, os padrões esterásicos foram diferentes dos encontrados na coloração com o substrato α -naftil acetato.

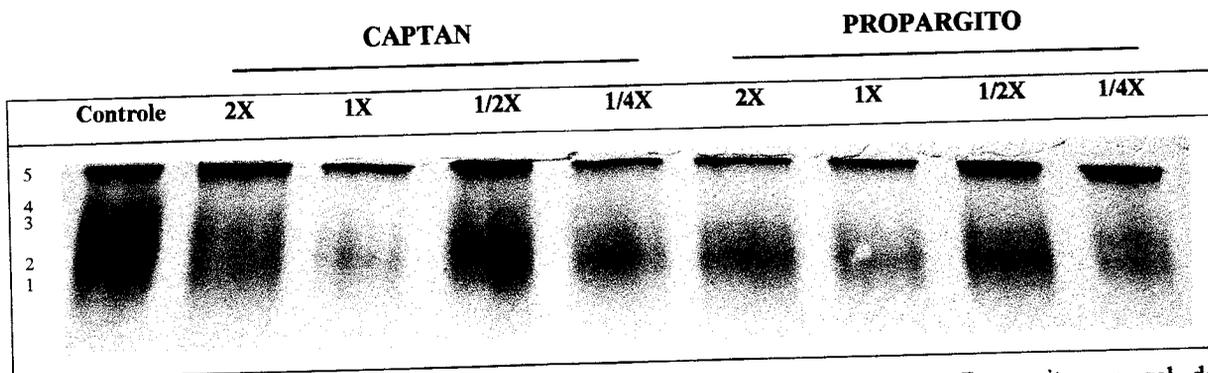


Figura 8: Perfil Esterásico de *Tetragonisca angustula* tratadas com Captan e Propargito em gel de poliacrilamida 12%, submetidos a coloração com β -naftil acetato.

As EST-2, EST3 e EST5, ocorreram em todos os indivíduos, demonstrando, portanto, a não influência desses defensivos nessas Esterases. Sugere-se que essas Esterases sejam codificadas por genes estruturais e que, provavelmente, estão relacionadas à papéis fisiológicos importantes para o organismo. Porém, a EST-1 foi encontrada somente no grupo Controle, fato decorrente da possível inibição dessas regiões esterásicas pelos produtos

utilizados. Além disso, essa Esterase pode ser um biomarcador para estes tratamentos (Figura 8).

A EST-4 ocorreu apenas nos tratamentos Captan 25% (1/4X) e 50% (1/2X) e no Propargito 25% (1/4X) (Figura 8). Supõe-se que essas Esterases estão sendo produzidas na tentativa de inibir tais defensivos, visto que o tempo de exposição foi maior.

A Figura 9 apresenta o zimograma das Esterases, com coloração com β -naftil acetato que ocorrem em operárias de *Tetragonisca angustula* submetidas ou não ao tratamento com o fungicida Captan e o acaricida Propargito. Observa-se que:

- EST-1 ocorre no grupo Controle;
- EST-2 ocorre em todos os indivíduos (Controle e Tratados);
- EST-3 ocorre em todos os indivíduos (Controle e Tratados);
- EST-4 apenas nos tratamentos Captan 25% (1/4X) e 50% (1/2X) e Propargito 25% (1/4X).
- EST-5 ocorre em todos os indivíduos (Controle e Tratados);

	Controle	CAPTAN				PROPARGITO			
		2X	1X	1/2X	1/4X	2X	1X	1/2X	1/4X
EST-1	-								
EST-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EST-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EST-4				-	-				-
EST-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 9 : Zimograma representativo das regiões esterásicas dos indivíduos de *Tetragonisca angustula*, tratados com o fungicida Captan e com o acaricida Propargito submetidos a coloração com β -naftil acetato.

Na análise do padrão de bandas esterásicas obtido após os tratamentos com os inseticidas Deltametrina e Malation, foram detectadas seis regiões com atividade esterásica com o substrato α -naftil acetato (figura 10) e cinco regiões esterásicas para o substrato β -naftil acetato (Figura 12).

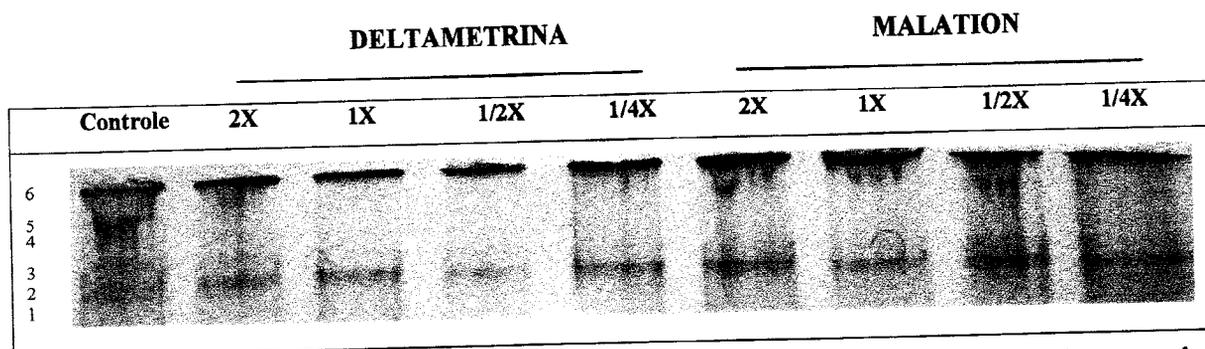


Figura 10: Perfil Esterásico de *Tetragonisca angustula* tratadas com Deltametrina e Malation em gel de poliacrilamida 12%, submetidos a coloração com α -naftil acetato.

Para o substrato α -naftil acetato, a EST-1 ocorreu apenas nos indivíduos tratados com Malation (Figura 10), podendo estas ser utilizadas como biomarcador para o Malation. Além disso, apesar de o Malation ser um forte inibidor de Esterases, nesse exemplo, essas apareceram somente neste tratamento.

A EST-3 ocorre em todos os tratamentos, porém com maior intensidade no Grupo Controle (Figura 10). A EST-4 aparece apenas no grupo Controle. A aplicação dos dois inseticidas, em todas as concentrações estudadas, provoca o desaparecimento total dessa Esterase. Os produtos podem ter afetado diretamente a atividade desta enzima, ou essa Esterase teria sido consumida na tentativa de metabolizar os defensivos. Esta Esterase pode ser utilizada com biomarcador para a Deltametrina e o Malation. Em todas as amostras houve diminuição na intensidade das bandas quando comparadas ao Grupo Controle (sem qualquer tratamento) (Figura 10), reforçando a hipótese de que Esterases, de alguma forma, estão relacionadas aos inseticidas, assim como mostra os resultados com os tratamentos com o fungicida Captan e o acaricida Propargite.

A EST-5 ocorre em todos os indivíduos com exceção do tratamento com Malation nas concentrações de 100% (1X) e 200% (2X) das indicadas, provavelmente devido a alta dose do defensivo utilizada.

A Figura 11 apresenta o zimograma das Esterases de indivíduos adultos *T. angustula* submetidas ao tratamento com os inseticidas Deltametrina e Malation submetidas a coloração com α -naftil acetato.

Observa-se que:

- EST-1 ocorre apenas nos indivíduos tratados com o inseticida Malation.
- EST-2 ocorre em todos os indivíduos (Controle e Tratados);
- EST-3 ocorre no grupo Controle e no tratamento com o Malation nas concentrações de 25% (1/4X), 50% (1/2X) e 100% (1X).

- EST-4 apenas em indivíduos do Grupo Controle;
- EST-5 ocorre em todos os indivíduos com exceção do tratamento com Malation nas concentrações de 100% (1X) e 200% (2X).
- EST-6 ocorre em todos os indivíduos (Controle e Tratados);

	DELTAMETRINA					MALATION			
	Controle	2X	1X	1/2X	1/4X	2X	1X	1/2X	1/4X
EST-1						-	-	-	-
EST-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EST-3	-						-	-	-
EST-4	-								
EST-5	-	-	-	-	-			-	-
EST-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 11: Zimograma representativo das regiões esterásicas dos indivíduos de *Tetragonisca angustula*, tratados com os inseticidas Deltametrina e Malation submetidos a coloração com α -naftil acetato.

O padrão de esterases apresentado com o substrato β -naftil acetato (Figura 12), apresentou um perfil diferente do obtido com o substrato α -naftil acetato.

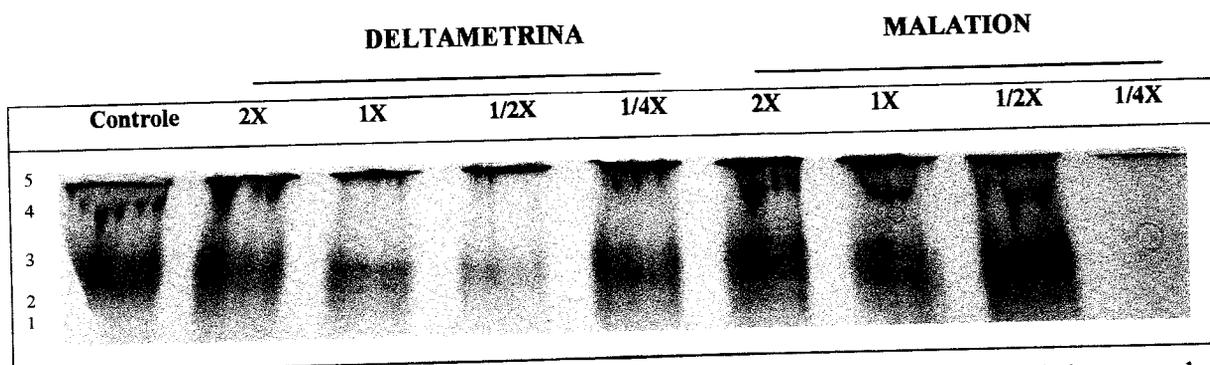


Figura 12: Perfil Esterásico de *Tetragonisca angustula* tratadas com Deltametrina e Malation em gel de poliacrilamida 16%, submetidos a coloração com β -naftil acetato.

Nos indivíduos Controle foram observadas quatro das cinco bandas: EST-1, EST-2, EST-3 e EST-5 (Figura 12). A EST-1 não ocorreu nos indivíduos tratados com Malation. Sugere-se que o tratamento tenha inibido essas enzimas e se tratar de um biomarcador para o Malation. A EST-2 ocorreu em todos os indivíduos sendo a EST-3 ocorreu no grupo Controle

e nos tratamentos Malation 25% (1/4X), 50% (1/2X) e 100% (1X). Sendo sensível portanto ao inseticida Deltametrina.

A EST-4 esteve presente nos tratamentos Deltametrina 25% (1/4X) e 50% (1/2X) e Malation 25% (1/4X), demonstrando que as demais ESTs foram inibidas devido as altas concentrações dos aditivos. Por fim, a EST-5 foi inibida nos tratamentos Deltametrina 50% (1/2X) e 100% (1X) e Malation 25% (1/4X) e 50% (1/2X) (Figura 12), possivelmente devido as altas doses utilizadas. Em todas as amostras do Grupo Tratado, houve uma diminuição na intensidade das bandas quando comparadas ao Grupo Controle (sem qualquer tratamento), reforçando a hipótese de que Esterases, de alguma forma, estão sendo influenciadas pelo inseticida (Figura 12).

A Figura 13 apresenta o zimograma das Esterases de adultos de *T. angustula* submetidas ou não ao tratamento com os inseticidas Deltametrina e Malation submetidas à coloração com β -naftil acetato.

Observa-se que:

- EST-1 ocorre no Grupo Controle e nos indivíduos tratados com o inseticida Deltametrina.
- EST-2 ocorre em todos os indivíduos (Controle e Tratados);
- EST-3 ocorre apenas no grupo Controle e no tratamento com o Malation nas concentrações de 25% (1/4X), 50% (1/2X) e 100% (1X).
- EST-4 ocorre nos tratamentos com Deltametrina 25% (1/4X) e 50% (1/2X) e Malation 25% (1/4X);
- EST-5 ocorre nos tratamentos com Deltametrina 50% (1/2X) e 100% (1X) e Malation 25% (1/4X) e 50% (1/2X).

	DELTAMETRINA					MALATION			
	Controle	2X	1X	1/2X	1/4X	2X	1X	1/2X	1/4X
EST-1	-	-	-	-	-				
EST-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EST-3	-					-	-	-	-
EST-4				-	-				-
EST-5	-		-	-				-	-

Figura 13: Zimograma representativo das regiões esterásicas dos indivíduos de *Tetragonisca angustula*, tratados com os inseticidas Deltametrina e Malation submetidos a coloração com β -naftil acetato.

3.3 Proteína Total

Os resultados obtidos do perfil eletroforético de proteína total de indivíduos *T. angustula* tratados com o fungicida Captan e o acaricida Propargito, em gel desnaturante 16% (SDS-PAGE) (Figura 14), mostram pequena variação entre os tratamentos e controle.

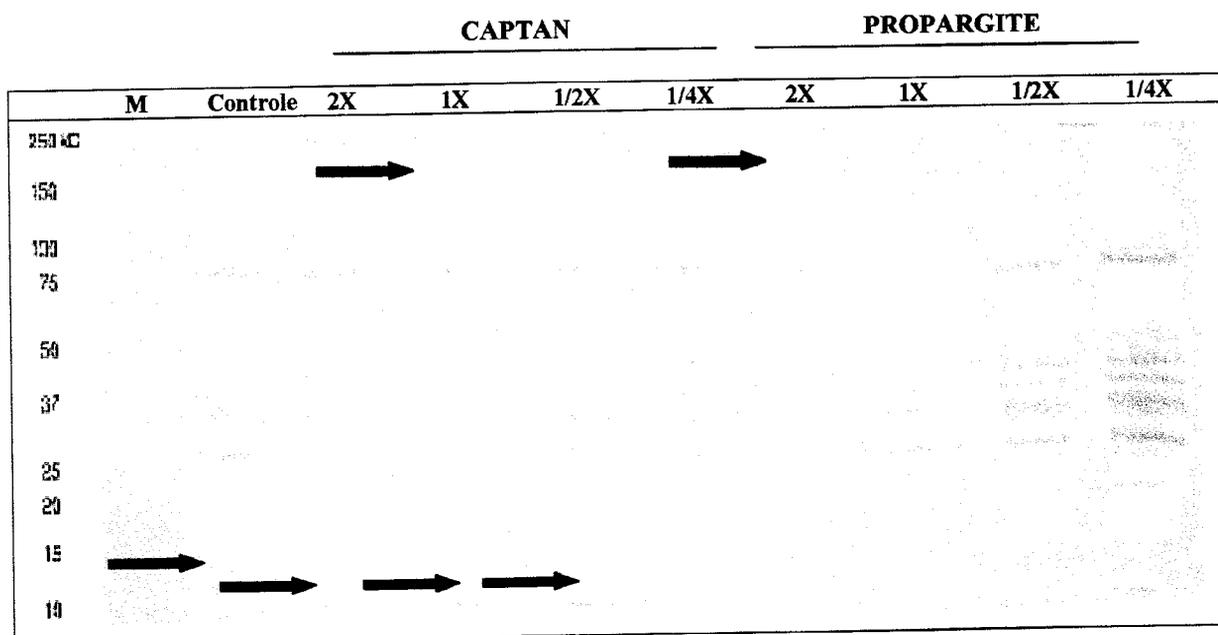


Figura 14: Perfil eletroforético de proteína total de *T. angustula* tratadas com Captan e Propargite em gel de poliacrilamida 16% (SDS-PAGE) corado com *Comassie Blue R250*. As setas indicam bandas diferencialmente expressas, sendo as vermelhas, bandas com expressão diferente nos indivíduos e a verde, bandas dose-dependentes. **M:** Marcador de alto peso molecular SDS-7H Kaleidoscope Prestained Standards, pesos entre 10KDa e 250KDa.

O peso molecular das proteínas diferencialmente expressas (Tabela 9) foi determinado usando o Marcador de Alto Peso Molecular como referência e de acordo com Weber e Osborn (1969). Há uma variação de 5% a 10% do peso calculado para o peso real das proteínas.

Tabela 9: Peso molecular a partir do método de Weber e Osborn (1969).

Banda no gel/Proteína	I	II	III
Peso Molecular Calculado	200 KDa	14 KDa	12 KDa
Aproximado			

O padrão protéico referido como banda I no gel, com o peso aproximado de 200 KDa, ocorreu apenas nos tratamentos 1X Deltametrina e 2X Malation, provavelmente tendo sido

produzidas devido ao estresse químico que a abelha sofreu na tentativa de metabolizar os inseticidas.

No padrão referido como II, com peso aproximado de 14 KDa, foi encontrado no grupo Controle e no tratamento Captan, porém não ocorreu no tratamento Propargito, entretanto foi observada uma diminuição da intensidade, mostrando se tratar de um padrão protéico dose-dependente.

As bandas referidas como III, peso aproximado 12KDa, foram encontradas apenas no grupo tratado com o fungicida Captan, com exceção da concentração de 25%, como recomenda o fabricante. Supõe-se que as proteínas encontradas nesse padrão protéico tenham sido produzidas como resposta a toxicidade que o fungicida exerce sobre a abelha.

Os resultados obtidos do perfil eletroforético de proteína total dos tratamentos com os inseticidas Deltametrina e Malation em *T. angustula*, em gel desnaturante, apresentaram pequena variação entre os tratamentos em algumas proteínas, porém demonstra significativa diferença entre os tratamentos e o Controle (Figura 15).

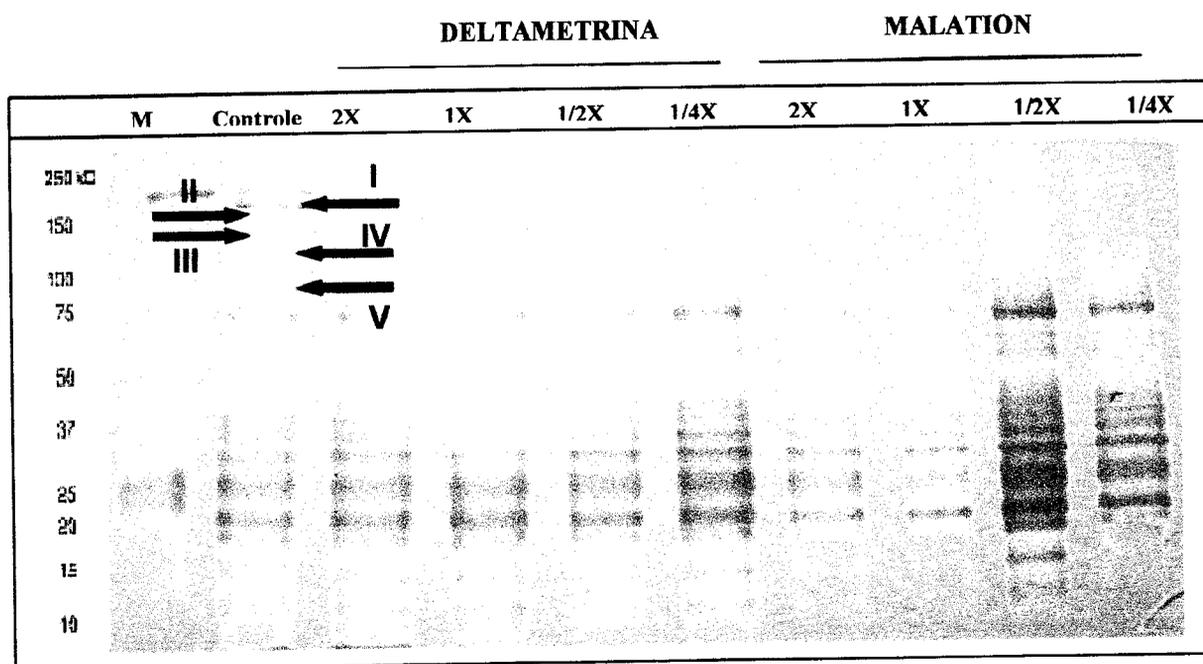


Figura 15: Perfil eletroforético de proteína total de *Tetragnisca angustula* tratadas com Deltametrina e Malation em gel de poliácridamida 16% (SDS-PAGE) corado com *Comassie Blue R250*. As setas indicam bandas diferencialmente expressas, sendo as vermelhas, bandas com expressão diferente nos e a verde, bandas expressas em concentrações diferentes. **M:** Marcador de alto peso molecular SDS-7H Kaleidoscope Prestained Standards, pesos entre 10KDa e 250KDa.

O peso molecular das proteínas diferencialmente expressas (Tabela 10) foi determinado usando o Marcador de Alto Peso Molecular como referência e de acordo com

Weber e Osborn (1969). Há uma variação de 5% a 10% do peso calculado para o peso real das proteínas.

Tabela 10: Peso molecular a partir do método de Weber e Osborn (1969).

Banda no gel/Proteína	I	II	III	IV	V
Peso Molecular Calculado	200 KDa	185 KDa	140 KDa	125 KDa	90 KDa
Aproximado					

A partir da figura 15, podemos perceber que a diferença significativa reside no padrão de algumas bandas presentes no Grupo Controle, representados pelos algarismos, I, II, III, IV e V. O desaparecimento deste padrão de bandas nos grupos tratados pode ter ocorrido pelo fato de que estes inseticidas degradam ou influenciam a produção destas proteínas.

Todas as concentrações dos produtos Captan, Propargite, Decis, Malation, acima do recomendado ou abaixo deste, interferiu na produção de proteínas na abelha *Tetragonisca angustula*, demonstrando que os inseticidas analisados são bastante agressivos para este organismo.

3.4 Teste do Cometa

Através da Figura 15, podemos perceber os seguintes resultados: **A:** Cometa de cabeça intacta, sem halo de difusão periférica e sem cauda (sem dano em DNA). **B:** Tratado. Inseticida Deltametrina no dobro da concentração recomendada. Cometa de cabeça intacta, ténue halo de difusão discreta e sem cauda (sem dano em DNA). **C:** Demais tratamentos (Captan, Propargito, Deltametrina e Malation). Cometas de cabeça intacta sem halo de difusão periférica e sem cauda (sem dano em DNA).

Neste estudo não foram encontrados índices significativos de danos do DNA em células dos indivíduos dos grupos Tratado e Controle com os defensivos (Figura 15). A partir dos resultados, pode-se inferir que os produtos utilizados neste estudo e nas condições da aplicação, não são agentes genotóxicos, nas concentrações utilizadas, para a abelha *T. angustula*.

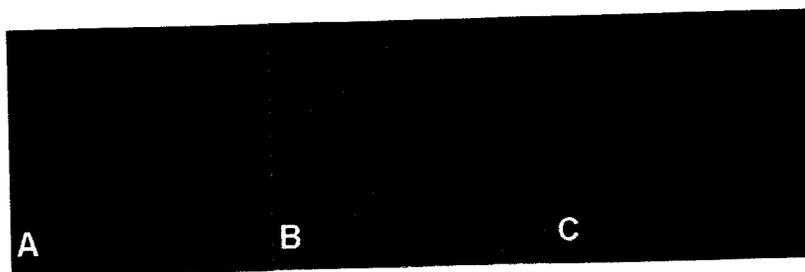


Figura 16: Efeitos da voltagem de eletroforese sobre cometas. Cometas obtidos após 30 minutos de eletroforese, pH >13, a 25V e 300mA, corados por brometo de etídeo e observados em microscópio ótico de fluorescência. **A:** Grupo Controle; **B:** Deltametrina 2X; **C:** Demais tratamentos.

Sobre isso, podemos supor também que não ocorreu nenhum dano no DNA devido ao pouco tempo de exposição dos tratamentos, já que a morte mais tardia foi de 5:20 horas ou que tenha ocorrido reparação do DNA antes de sua análise.

4 CONCLUSÃO

Os testes realizados para a verificação da atividade de inseticidas, fungicidas e acaricidas utilizados na cultura do morangueiro sobre a abelha *Tetragonisca angustula* demonstraram *que*:

- 1- Os defensivos agrícolas analisados têm grande influência fisiológica na abelha *Tetragonisca angustula* na produção e destruição de enzimas e outras proteínas. Além disso, os produtos utilizados matam as abelhas em diferentes variações de tempo, e esses relativamente baixos.
- 2- O fungicida e o acaricida, que teoricamente não teriam influência nos insetos, eliminaram as abelhas em um tempo considerado baixo (30 minutos) e ainda modificou o perfil protéico.
- 3- Pode-se ressaltar também que as baixas concentrações utilizadas dos inseticidas, 25% e 50% do recomendado pelo fabricante, tiveram grande influência em produção de proteínas e no intervalo de morte dos indivíduos
- 4- Não foram encontrados índices significativos de danos do DNA em células nos tratamentos.
- 5- Faz-se necessário o estudo de métodos alternativos, como agricultura orgânica e utilização de controles biológicos, que visam a diminuição da utilização desses produtos nas lavouras para manter o equilíbrio entre o controle de pragas e a produtividade.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. **Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP consultoria & Comércio, 2002. 438p.
- ALVARENGA, D. A.; DUARTE-FILHO, J.; CARVALHO, A. A. A.; FADINI, M. A. M. Coeficientes Técnicos da Produção de Morango. **Informe Agropecuário**, v. 20, n. 19, p. 20-21, 1999.
- ANDRADE, F. M. **Análise da ocorrência de hibridação em uma população de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) por meio de Isoenzimas**. Monografia, 26f. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (MG), 2000.
- ANTONELLI, D. F.; MAYER, D. F.; BURGETT, D. M.; SJULIN T. Pollinating insects and the strawberry yields in the Pacific Northwest. **American Bee Journal**, v. 128, n. 9, p. 618-620, 1988.
- ARGENTINE, J. A.; JAMES, A. A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochemic Molecular Biologic**, v. 25, p. 621-630, 1995.
- BALESTIERI, J. B. P. **Toxicidade de Inseticidas e Efeitos Respiratórios em Duas Espécies de Meliponínios *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1807) e *Nannotrigona testaceicornis* (Lapeletier, 1836) (Hymenoptera – Apidae)**. Dissertação Mestrado Zoologia, 116p. Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro (SP), 1989.
- BAZLEN, K. Erst Analysen zu Inhaltsstoffen von Honigen Brasilianischer Stachelloser Bienen. **Abstr. Soziale Insekten**, IUSSI-Tagung Graz, Eigenverlag, Graz Wüzburg, p.17, 1997.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochemic.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

- CAMARGO, J. M. F.; POSEY, D. A. O conhecimento dos Kayapó sobre as abelhas sociais sem ferrão (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera): Notas adicionais. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi Ser. Zool.**, v. 6, n. 17, 1990.
- CARVALHO G. A. **Contribuição à reprodução da *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e suas conseqüências.** Tese de Doutorado, 109p. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto (SP), 2000.
- CERON, C. R. **Padrão de Esterases no Desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensi* e seus híbridos.** Tese de Doutorado, 142f. Universidade de São Paulo-USP, São Paulo (SP), 1988.
- CHAGNON, M. GINGRAS, J.; OLIVEIRA, D. Pollination rate of strawberries. **Journal of Economic Entomology**, v. 82, p. 1350-1353, 1989.
- CONNOR, L. J.; MARTIN, E. C. Components of pollination of commercial strawberries in Michigan. **HortScience**.v. 8, n. 4, p. 304-306. 1973.
- COOK, P. R.; BRAZELL, I. A. Conformations constraints in nuclear DNA. **J. Cell Science**, v. 22, p. 287-302, 1976.
- CORDEIRO, A.; PETERSEN, P.; ALMEIDA, S. G. **Crise socioambiental e conversão ecológica da agricultura brasileira**, Rio de Janeiro: AS-PTA. 1996. 122p.
- COUSTON, R. Insect pollination of soft fruits and associated problems. **Acta Horticulturae**, v. 288, p. 249-254, 1991.
- CRANE, E.; WALKER, P. Pollination directory for world crops. **International Bee Research Association**, London, p. 183, 1984.
- CORBETT, J. R.; WRIGHT, K.; BAILLIE, A. C. The biochemical mode of action of pesticides. (2 ed.). **Academic Press**, London. 1984

DIAS, M. S. C. Doenças do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 198, p. 75-79, 1999.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. **Sistemas de Produção**. Versão Eletrônica. 2005.

ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTROM, G. Matrix association of early and late replicating chromatin studied by single-cell electrophoresis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1590, p. 103-108, 2002.

ESKENAZI, B. Exposições das crianças aos pesticidas organofosforados e seus efeitos de saúde adversos potenciais. **Perspectives ambientais da saúde**, v.107, n. 3, 1999.

FADINI, M. A. M. (eds.) Morango: tecnologia de produção e processamento. Caldas Novas: EPAMIG, p. 259-264, 1999.

FADINI, M. A. M.; ALVARENGA, D. A. Pragas do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 198, p. 69-74, 1999.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília – DF: EMBRAPA, 2 ed., 1996. 220p.

FREE, J. B. **Insect pollination of crops**, Academic Press, London, 2ª ed., 1993. 684p.

GOODMAN, R. D.; OLDROYD, B. P. Honeybee pollination of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duchesne). **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 28, p. 435- 438, 1988.

GUERRERO, F. D.; PRUETT, J. H.; KUNZ, S. E.; KAMMLAH, D. M. Esterase profiles of diazinon-susceptible and resistant horn flies (Diptera, Muscidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 92, n. 2, p. 286-292, 1999.

HANCOCK, J. F. Ecological genetics of natural strawberry species. **HortScience**, v.25, p.869-871, 1990.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicol Lett.** 7, v. 90, n. 2-3, p. 183-8, 1997.

HEMINGWAY, J.; FIELD, L.; VONTAS, J. An overview of insecticide resistance. **Science**, n. 298, p. 96-97, 2002.

HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. H. P. P. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Med. Vet. Entomol.**, n. 12, p. 1-12, 1998.

HIDAYAT, P.; GOODMAN, W. G. Juvenile hormone and hemolymph juvenile hormone binding protein titers and their interaction in the hemolymph of fourth stadium *Manduca sexta*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 24, n. 7, p. 709-715, 1994.

HOLMES, R. S., MASTERS, C. J. The developmental multiplicity and isoenzyme status of cavian esterases. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 132, p.379-399, 1967.

HOY, M. A. Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications. **Academic Press**, San Diego, 1994.546p.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KLEINERT-GIOVANNINI, A; CORTOPASSI-LAURINO, M.; RAMALHO, M. Hábitos de coleta de *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Bolm. Zool. Univ. S.Paulo**, 8ª ed., 1984. 115p.

IWAMA, S.; MELHEM, T. S. The pollen spectrum of the honey of *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Apidae, Meliponinae). **Apidol.** 10ª ed. 1979. 275p.

JAYCOX, E. R. Pollination of strawberries. **American Bee Journal**, v. 110, n.1, p. 176-177, 1970.

KADIR, H. A.; KNOWLES, C. O. Inhibition of ATP dephosphorylation by acaricides with emphasis on the anti-ATPase activity of the carbodiimide metabolite of diafenthiuron. **Journal of Economic Entomology**, v. 83, n. 3, p. 801-805, 1991.

- LABATE, B., GAME, Y., COOKE, H., OAKSHOTT, J. G. The number and distribution of esterase 6 alleles in populations of *Drosophila melanogaster*. **Heredity.**, n. 63, p. 203-208, 1990.
- LARSON, K. D. Strawberry. In: B. SCHAFFER, P.; ANDERSEN, C. (eds.) **Handbook of environmental physiology of fruit crops**, v.1, p. 271-297, 1994.
- MACIEIRA, O. J. D. Toxicidade de Inseticidas e Efeitos sobre a Metabolismo Respiratório de *Trigona spinipes* (FABR., 1793) (HYMENOPTERA: APIDAE). Dissertação, Mestrado em Zoologia, Rio Claro, São Paulo, 1983.
- MALAGODI-BRAGA, K. S. **Estudo de agentes polinizadores em cultura de morango (*Fragaria x ananassa* Duchesne - Rosaceae)**. Tese (PhD), 102p. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo/USP, São Paulo, 2002.
- MALASPINA, O. **Estudo genético da resistência ao DDT e relação com outros caracteres em *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae)**. Dissertação, 81p. il. Mestrado em Zoologia de Invertebrados, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro (SP), 1979.
- MEZZALIRA, H. Morango: com dedicação, boas perspectivas. São Paulo: **Balde Branco**, v.21, n.256, p.19-21, 1986.
- NEWCOMB, R. D.; CAMPBELL, P. M.; OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; RUSSEL, R. J.; OAKSHOTT, J. G. A single amino acid substitution converts a carboxilesterase to an organophosphorous hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. **P. N. A. S.**, n. 94, p. 7464-7468, 1997.
- NOGUEIRA-NETO, P. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Chácaras e Quintais, 1953.369p.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997. 445 p.

NOGUEIRA-NETO, P. **A criação racional das abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Tecnapis, 2ª ed., 1970. 365p.

NYE, W. P.; ANERSON, J. L. Insect pollinators frequenting strawberry blossoms and the effect of honey bees on yield and fruit quality. **Journal American Soc. Hort. Science**, v. 99, n. 1, p. 40-44, 1974.

OAKESHOTT, J. G.; VAN PAPERRECHT, E. A.; BOYCE, T. M.; HEALY, M. J.; RUSSEL, R. J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetics**, v. 90, p. 239-268, 1993.

OLIVE, P. L.; BANATH, J. P. Radiation- induced DNA double-strand breaks produced in histone-depleted tumor cell nucleimeasured using the neutral comet assay. **Radiat. Res.**, v. 142, p.144-152, 1995.

PASCHOAL, A. D. **Produção orgânica de alimentos: agricultura sustentável para os séculos XX e XXI**. Piracicaba: Adilson D. Paschoal, 1994. 191 p.

PASSOS, F. A. Melhoramento do morangueiro no Instituto Agronômico de Campinas. In: DUARTE FILHO, J; CANÇADO, G. M. A.; REGINA, M. A.; ANTUNES, L. E. C.; FADINI, M. A. M. (eds.) **Morango: Tecnologia de produção e processamento**. Campinas. Editora Agropecuária, p. 259-264, 1999.

PASSOS, F. A. Melhoramento do morangueiro no Instituto Agronômico de Campinas. 1993. In: DUARTE FILHO, J.; CANÇADO, G. M. A.; REGINA, M. A.; ANTUNES, L. E. C.; PAULUS, A. O. Fungal diseases of strawberry. **HortScience**, v. 25, n. 8, p. 885-889, 1990.

PIRES, R. C. M. **Desenvolvimento e produtividade do morangueiro sob diferentes níveis de água e coberturas de solo**. Tese, 116f. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo/USP, Piracicaba (SP), 1998.

PNUD. **Formulação e Implementação de Políticas Públicas Compatíveis com os Princípios do Desenvolvimento Sustentável, definidos na Agenda 21**, Brasília, 1999.

RAZIN, S. V.; GRAMOVOA, I. I.; IAROVAIA, O. V. Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions. In: **Nuclear matrix: structural and functional organization**. California. Academic Press, p. 405-448, 1995.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Editora da ULBRA, Canoas (RS), 2003. 306p.

ROUBIK, D. W. Nest and colony characteristics of stingless bees from Panamá (Hymenoptera: Apidae). **J. Kans. Entomol. Soc.**, v. 56, n. 327, 1983.

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

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, n. 175, p. 184-191, 1988.

STEINER, W. W. M.; JOHNSON, W. E. Techniques for electrophoreses of Hawaiian *Drosophila*. Us International Biological Program. **Island Ecosystems IRP. Tech. Report**, v. 30, p. 1-21, 1973.

STUMPF, N., ZEBITZ, C. P. W., KRAUS, W., MOORES, G. D., NAUEN, R. Resistance to organophosphates and biochemical genotyping of acetylcholinesterases in *Tetranychus urticae* (Acari, Tetranychidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n. 69, p. 131-142, 2001.

SVENSSON, B. The importance so honeybee-pollination for the quality and the quantity of strawberries (*Fragaria x ananassa*) in central Sweden. **Acta Horticulturae**, n. 288, p. 260-264, 1991.

VITSCH, J. P. Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. **American Journal of Botany**, n. 37, p. 211-215, 1950.

VOGELSTEIN, B.; PARDOLL, D. M.; COFFEY, D. S. Supercoiled loops and eukaryotic DNA replication. **Cell**, n. 48, p. 14-19, 1980.

WEBER, K.; OSBORN, M. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **The Journal of Biological Chemistry**. v.244, n.16, p.4406-4412, 1969.

WILLE, A.; OROZCO, E.; RAABE, C. Polinizacion del chayote *Sechium edule* (Jacq.) Swartz en Costa Rica. **Rev. Biol. Trop.**, n. 31, p. 145-154, 1983.

ZEBROWSKA, J. Influence of pollination medes on yield components in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchesne). **Plant Breeding**, n. 17, p. 255- 260, 1998.