



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**FIPRONIL: AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E CARCINOGENICIDADE
EM *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) E DO EFEITO NO
COMPORTAMENTO DE *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae)**

CÁSSIO RESENDE DE MORAIS

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Stephan Malfitano Carvalho

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

UBERLÂNDIA - MG

2015



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**FIPRONIL: AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E CARCINOGENICIDADE
EM *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) E DO EFEITO NO
COMPORTAMENTO DE *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae)**

CÁSSIO RESENDE DE MORAIS

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Stephan Malfitano Carvalho

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA - MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M827f Morais, Cássio Resende de.
2015 Fipronil: avaliação da mutagenicidade e carcinogenicidade em
Drosophila melanogaster (Diptera, Drosophilidae) e do efeito no
comportamento de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae)/ Cássio
Resende de Morais -- 2015.
113 f. : il.

Orientadora: Ana Maria Bonetti.

Coorientador: Stephan Malfitano Carvalho.

Coorientador: Mário Antônio Spanó.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Abelha - Teses. 3. Melipona - Teses. 4.
Inseticidas - Teses. 5. Antígenos - Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II.
Carvalho, Stephan Malfitano. III. Spanó, Mário Antônio. IV. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. V. Título.

CDU: 577.1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**FIPRONIL: AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E CARCINOGENICIDADE
EM *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) E DO EFEITO NO
COMPORTAMENTO DE *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae)**

CÁSSIO RESENDE DE MORAIS

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Examinadores: Prof. Dr. Osmar Malaspina – UNESP

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno - UFU

Data da Defesa: 30 /07 /2015

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

*“Nós somos o que fazemos
repetidamente. A excelência, portanto,
não é um ato, mas sim um hábito”.*

(Aristóteles)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Sirlene Resende Cardoso** e **Heiton Lobianco de Moraes**, pelo carinho, apoio, confiança e estímulo durante toda minha vida. À vocês, meu amor eterno e gratidão! Vocês são meus exemplos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti**, pelo acolhimento, sabedoria, compromisso, dedicação e ilustre orientação neste trabalho, bem como pelo seu exemplo de profissionalismo. “Vós sois as flores e nós as abelhas. Entregastes o néctar do conhecimento e da orientação. Nós, em troca, oferecemos gratidão e reconhecimento.”

Ao Co-orientador **Prof. Dr. Stephan Malfitano Carvalho**, pelos ensinamentos, orientação e auxílio na interpretação dos resultados relativos ao Teste de locomoção em abelhas. Obrigado pelo compromisso, dedicação e colaboração neste trabalho.

Ao Co-orientador **Prof. Dr. Mário Antônio Spanó** e ao **Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende**, pela orientação, amizade, paciência, auxílio na parte experimental e interpretação dos resultados do SMART. A participação de vocês vai muito além da confecção deste trabalho. Meus eternos agradecimentos pelos seus ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno**, do Instituto de Genética e Bioquímica, pelo fornecimento da linhagem *warts (wts)* de *D. melanogaster*.

Aos membros da comissão examinadora, **Prof. Dr. Osmar Malaspina**, **Prof. Dr. Júlio Cesar Nepomuceno**, **Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende** e ao **Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira**, pela disponibilidade para a leitura deste trabalho, bem como pelas relevantes sugestões.

Aos **Professores, Secretários e Técnicos do Instituto de Genética e Bioquímica** da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pelos valiosos ensinamentos e pela contribuição na minha formação científica. Em especial ao professor e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, **Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira**, pelos conselhos, sugestões e, acima de tudo, o exemplo de ética profissional com que conduz suas atividades.

Ao **Sr. Paulo Roberto Moderno**, pelo auxílio técnico laboratorial no Laboratório de Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti** pela parceria e pelo acesso ao microscópio confocal no Laboratório de Análise de Imagens/ICBIM.

Ao **Prof. Dr. Bruno Travençolo**, pela valiosa disposição e orientação nas análises de reconstrução computacional das imagens obtidas pelo sistema confocal.

À Técnica **Mariani Borges**, pela disposição e colaboração na análise e captura das imagens pelo sistema confocal.

Aos meus amigos do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica (PPGGB) pelos momentos de tensão, alegria e trabalho que compartilhamos no decorrer desta jornada. Em especial às amigas, **Aline Gomes**, **Jéssica Regina**, **Mariana Zóia** e **Fernanda Petter**, as melhores companheiras de disciplina.

Aos amigos do laboratório de Genética, **Ana Carolina Cordeiro**, **Natália Melquie**, **Emília Rezende**, **Rafaela Cabral**, **Luana Araujo**, **Carlos Cardoso**, **Célio Dias**, **Denis Prudencio**, **Washington Carvalho**, **Patricia Tieme**, **Luisa Diniz**, **Galber Araujo**, **Vinicius Pedrosa**, **Fernanda Van Petten** e **Renato Mendonça** pelo ambiente de aprendizado.

Às amigas do Laboratório de Mutagênese, **Prof^a. Dr^a. Érica de Melo Reis** e **Prof^a. Msc. Nayane Moreira Machado**, pelo socorro na montagem dos experimentos, bem como pela disponibilidade profissional ao longo deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Seria o mesmo que maquiar a realidade se dissesse que esta conquista é fruto de apenas meus esforços. Portanto, agradeço carinhosamente:

A **Deus**, por me guiar durante toda minha vida e nos momentos de turbulência me conceder o dom da paciência, perseverança, coragem e determinação para superar meus obstáculos.

Aos meus pais, **Heiton Lobianco de Moraes** e **Sirlene Resende Cardoso**, pelo incentivo e, acima de tudo, pelo amor incondicional e conselhos durante toda a minha vida. Sem vocês nada seria possível.

Aos meus irmãos **Cristiano Resende de Moraes** e **Maria Fernanda Mendonça de Moraes**, pela amizade, amor, companheirismo e momentos de descontração. Desejo à vocês, todo sucesso do mundo.

Ao Sr. **João Corrêa Rabelo** e a Sra. **Maria Eunice Mendonça**, pela amizade e conselhos nesta jornada. Agradeço intensamente pela presença de vocês na minha vida.

À minha namorada **Thays Cunha Vieira**, agradeço pelo apoio, companheirismo, compreensão nos momentos de ausência e, sobretudo, pelo amor incondicional. Sua presença contribuiu fortemente nesta e muitas outras conquistas.

À minha **família**, a qual sempre desempenhou papel fundamental na minha formação como cidadão. Em especial ao meu avô **João Resende** e avó **Maria das Dores**, pelo carinho indescritível. Vocês são meus tesouros.

Aos meus **amigos** antigos, recentes e eternos, pelos momentos de descontração e alegria. Em especial aos amigos: **Patrícia Vieira** e **Edimilson Vieira**, **Dione César Rezende** e **Emília Emico**, **Paulo Henrique** e **Bruna Rodrigues**, **Sandra Vieira** e **Arthur Rosa**, **Marcos Vieira** e **Joana Darc Rezende**. Dizem que a verdadeira riqueza de um homem é medida pela qualidade de amigos que possui, sendo, assim me considero o homem mais rico do mundo.

Aos **professores, coordenadoras e funcionários** do **Colégio Nossa Senhora do Amparo** (Monte Carmelo, MG), pelo incentivo e companheirismo nesta jornada. Em especial à **Ir. Lúcia Catarina** e às Professoras **Gislene Taveira** e **Ana Lúcia Rabelo**. Vocês são meus exemplos de profissionalismo.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Genética, Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica e no Laboratório de Análise de Imagens do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG), com o apoio das seguintes Agências de Fomento e Instituição:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).
- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Lista de Abreviações

A. mellifera: *Apis mellifera*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BASF: *Badische Anilin und Soda-Fabrik*

BH: Heterozigoto balanceado

B.O.D: *Biochemistry Oxygen Demand*

CAS: *Chemical Abstracts Services*

CDK: Proteína quinase dependente de ciclina

Cl: Cloro

CL₅₀: Concentração capaz de causar morte em 50% da população testada

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

cm: centímetro

DCC: Desordem do Colapso da Colônia (ou **CCD:** *Colony Collapse Disorder*)

DDT: diclorodifeniltricloroetano

D. melanogaster: *Drosophila melanogaster*

DL₅₀: Dose capaz de causar efeito deletério em 50% da população

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EPA: Environmental Protection Agency

flr³: *flare-3*

FP: Fipronil

g: Grama

GABA: Ácido gama aminobutírico

h: Hora

HB: Cruzamento de alta bioativação

LDH: Lactato desidrogenase

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MH: Trans-heterozigoto marcado

***M. scutellaris*:** *Melipona scutellaris*

mL: Mililitro

mg: miligrama

mm: milímetro

mM: mili molar

***mwh*:** *multiple wing hairs*

ng i.a./abelha: Nanograma de ingrediente ativo por abelha

ORR: Linhagem *Oregon R*

ERO: Espécie reativa de oxigênio

SC: Suspensão concentrada

SMART: *Somatic Mutation and Recombination Test*

ST: Cruzamento padrão

TERR: Resistência elétrica transepitelial

TM3: *Third multiple 3*

TM3, Bd^S: *Third multiple 3 Beaded Serrat*

(v/v): volume/volume

UFU: Universidade Federal de Uberlândia

WTS: Gene *Warts*

°C: Graus Celsius

μL: Microlitro

Lista de Figuras

APRESENTAÇÃO

	Pág.
Figura 1. Resumo gráfico dos experimentos realizados com o inseticida Fipronil.....	04

CAPÍTULO 1: Fundamentação Teórica

Figura 1. Fórmula química e estrutural do inseticida FP.....	08
Figura 2. Biotransformação do inseticida Fipronil.....	13
Figura 3. Distribuição natural de <i>Melipona scutellaris</i>	15
Figura 4. Ninho de <i>Melipona scutellatis</i>	17
Figura 5. Ciclo de vida da mosca <i>Drosophila melanogaster</i>	23
Figura 6. Dimorfismo sexual da espécie <i>Drosophila melanogaster</i>	24
Figura 7. Distribuição de pêlos na asa da mosca <i>Drosophila melanogaster</i>	26
Figura 8. Representação do cruzamento realizado entre a linhagem <i>multiple wing hairs</i> e <i>flare</i>	28
Figura 9. Fenótipo da asa de <i>Drosophila melanogaster</i> da progênie MH e BH.....	28
Figura 10. Manchas mutantes <i>multiple wing hairs</i>	29
Figura 11. Manchas mutantes <i>flare</i>	30
Figura 12. Manchas gêmeas.....	30
Figura 13. Representação do cruzamento realizado entre a linhagem <i>multiple wing hairs</i> e <i>warts</i>	33
Figura 14. Fenótipo dos pêlos no corpo da mosca nas diferentes progênies.....	34
Figura 15. Expressão de tumor epitelial em <i>Drosophila melanogaster</i>	35
Figura 16. Pista de teste de atividade de locomoção.....	37

CAPÍTULO II: Avaliação da capacidade mutagênica e carcinogênica do inseticida Fipronil

Figura 1.	Estrutura química dos compostos.....	44
Figura 2.	Taxa de sobrevivência das progênes de <i>Drosophila melanogaster</i> resultante dos cruzamentos ST e HB.....	51
Figura 3.	Taxa de sobrevivência da prole resultante do cruzamento HB.....	52
Figura 4.	Distribuição das manchas de acordo com as classes em indivíduos dos cruzamentos ST e HB.....	55
Figura 5.	Distribuição de tumor epitelial nos apêndices de <i>Drosophila melanogaster</i>	58
Figura 6.	Frequência de tumor epitelial em fêmeas e machos de <i>Drosophila melanogaster</i>	59

CAPÍTULO III: Efeito de doses subletais do inseticida Fipronil na atividade locomotora de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).

Figura 1.	Velocidade média de abelhas da espécie <i>Melipona scutellaris</i> expostas a diferentes doses de Fipronil.....	77
Figura 2.	Abelhas que não iniciaram ou terminaram o percurso de 50 cm no Teste de Atividade de Locomoção em diferentes doses e tempos de exposição.....	79

Anexo: Esquemas de divisão mitótica nas células dos discos imaginais de *Drosophila melanogaster* e os possíveis eventos de perda de heterozigose

Figura 1	Esquema de divisão mitótica normal em células dos discos imaginais de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	105
Figura 2	Esquema de divisão mitótica com ocorrência de mutação pontual no gene <i>flr³</i> em células dos discos imaginais de	

	asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	106
Figura 3	Esquema de divisão mitótica com ocorrência de mutação pontual no gene <i>mwh</i> em células dos discos imaginais de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	107
Figura 4	Esquema de divisão mitótica com ocorrência de mutação pontual no gene <i>flr³</i> e <i>mwh</i> em células dos discos imaginais de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	108
Figura 5	Esquema de divisão mitótica com ocorrência de evento clastogênico no gene <i>flr³</i> em células dos discos imaginais de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	109
Figura 6	Esquema de divisão mitótica com ocorrência de evento clastogênico no gene <i>mwh</i> em células dos discos imaginais de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	110
Figura 7	Esquema de divisão mitótica com ocorrência de evento clastogênico no gene <i>flr³</i> e <i>mwh</i> em células dos discos imaginais de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	111
Figura 8	Esquema de divisão mitótica com ocorrência de recombinação mitótica entre o centrômero e o locus <i>flare</i> em células dos discos imaginais de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	112
Figura 9	Esquema de divisão mitótica com ocorrência de recombinação mitótica entre o locus <i>mwh</i> e o locus <i>flare</i> em células dos discos imaginais de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	113

Lista de Tabelas

CAPÍTULO I: Fundamentação Teórica

	Pág.
Tabela 1. Pragas alvos do inseticida FP.....	10
Tabela 2. Cultivares polinizados por abelhas.....	20

CAPÍTULO II: Avaliação da capacidade mutagênica e carcinogênica do inseticida Fipronil em *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae)

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática em <i>Drosophila melanogaster</i> (SMART).....	54
Tabela 2. Frequência de tumor epitelial observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor <i>wt</i> s tratados com fipronil e mitomicina C.....	57

SUMÁRIO

	Pág.
Apresentação.....	01
Objetivos.....	06
Capítulo I.....	07
1. Fipronil: Aspectos Gerais.....	08
2. <i>Melipona scutellaris</i> (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Aspectos gerais....	14
3. A importância das abelhas na polinização.....	18
4. Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (<i>Somatic Mutation and Recombination Test</i> - SMART) em <i>Drosophila melanogaster</i> - SMART.....	21
5. Teste de detecção de clones de tumor em <i>Drosophila melanogaster</i>	31
6. Teste de Locomoção em abelhas.....	36
Capítulo II.....	38
Resumo.....	39
Abstract.....	40
1. Introdução.....	41
2. Material e Métodos.....	44
3. Resultados.....	50
4. Discussão.....	59
6. Conclusões.....	66
Capítulo III.....	67
Resumo.....	68
Abstract.....	69
1. Introdução.....	70
2. Material e Métodos.....	73
3. Resultados e Discussão.....	76
4. Conclusões.....	83
5. Referências.....	84
Anexo.....	104

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

O material biológico utilizado na presente análise foi insetos da ordem Diptera (*Drosophila melanogaster* Meigen, 1830) e Hymenoptera (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811) para avaliação dos efeitos do pesticida Fipronil (FP).

A maioria das abelhas são insetos eusociais que desempenham importante papel na manutenção da biogeocenose. A espécie *M. scutellaris* conhecida popularmente como uruçú são abelhas da Tribo Meliponini, encontradas principalmente no nordeste do Brasil. Tal espécie possui a seguinte classificação científica:

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Classe: Insecta

Ordem: Hymenoptera

Família: Apidae

Tribo: Meliponini

Gênero: *Melipona*

Espécie: *Melipona scutellaris*

A espécie *D. melanogaster*, conhecida popularmente como “mosca-da-fruta”, é um inseto díptero amplamente utilizado em pesquisas científicas. Seu amplo espectro de uso no campo da Genética tem conferido importantes contribuições sobre a cinética de mutágenos e carcinógenos. Tal espécie possui a seguinte classificação científica:

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Classe: Insecta

Ordem: Diptera

Família: Drosophilidae

Gênero: *Drosophila*

Espécie: *Drosophila melanogaster*

Pesticidas são substâncias ou misturas de substâncias utilizadas para matar, repelir ou controlar organismos considerados pragas e que, dependendo do princípio ativo, dose ou persistência no ambiente, podem apresentar impacto em espécies não alvo. FP apresenta ação não-competitiva e antagonista aos receptores do GABA, bloqueando os íons Cl^- e consequentemente, suprimindo o fluxo na via celular, bem como, anulando o efeito neuroregulador dos receptores. Em função das diferenças nos receptores, FP apresenta ação seletiva a insetos, provocando hiperexcitação, paralisia severa e consequentemente a morte. No Brasil existem várias formulações deste inseticida, destinadas ao uso médico-veterinário, domissanitário e agropecuário.

Poucos dados sobre os efeitos genotóxico, mutagênico e carcinogênico do inseticida FP estão disponíveis na literatura. Para o entendimento da cinética da molécula e o risco ocupacional do inseticida em organismos não-alvo, mais estudos devem ser realizados, priorizando o uso de sistemas teste, células, tecidos, organismos e doses diversificadas. FP e outros inseticidas da classe dos neonicotinóides são fortes candidatos, por estarem associados com outros fatores, ao DCC (desordem do colapso da colônia), caracterizado pelo desaparecimento de abelhas da espécie *Apis mellífera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). Não há provas concretas de que o DCC possa estar afetando abelhas

nativas do Brasil. Porém, alguns trabalhos comprovam o efeito tóxico de fitossanitários em abelhas sem ferrão.

Esse trabalho teve como finalidade fornecer informações sobre o perfil mutagênico e carcinogênico do inseticida FP, utilizando como ferramentas de análise o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) e o Teste de Detecção de Tumor Epitelial, ambos em *D. melanogaster*.

Adicionalmente, doses subletais foram testadas quanto à capacidade de interferir na atividade locomotora de abelhas da espécie *M. scutellaris*. Na Figura 1 é apresentado um resumo gráfico dos experimentos realizados neste trabalho.

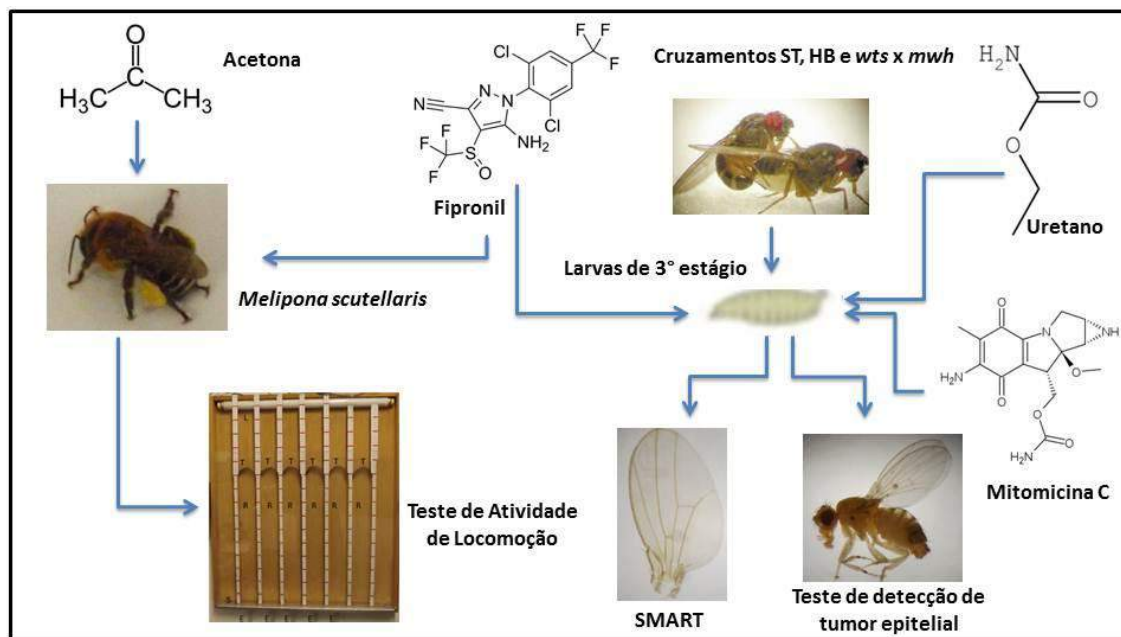


Figura 1: Resumo gráfico dos experimentos realizados com o inseticida Fipronil.

O trabalho realizado é apresentado na forma de capítulos:

CAPÍTULO 1 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Apresenta uma revisão geral da literatura com informações sobre o inseticida FP; abelhas e sua importância; aspectos gerais sobre a espécie *M. scutellaris*; assim como a fundamentação teórica sobre os testes de mutagenicidade e carcinogenicidade em *D. melanogaster*, como bioensaios para análise e identificação de mutágenos, pro-mutágenos e carcinógenos.

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO MUTAGÊNICA E CARCINOGENICA DO INSETICIDA FIPRONIL EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*.

Esse capítulo apresenta os resultados dos testes realizados com objetivo de verificar se o inseticida FP possui atividade mutagênica e/ou carcinogênica em *D. melanogaster* expostas à baixas concentrações.

CAPÍTULO 3 – EFEITO DO INSETICIDA FIPRONIL SOBRE A ATIVIDADE DE LOCOMOÇÃO DE ABELHAS DA ESPÉCIE *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).

Nesse capítulo foi abordado o efeito de doses subletais na velocidade média de deslocamento das abelhas expostas ao inseticida FP.

OBJETIVOS

Avaliar:

1. os efeitos mutagênicos do inseticida Fipronil (FP) por meio do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (*Somatic Mutation and Recombination Test* – SMART) em células das asas de *D. melanogaster* utilizando os descendentes do cruzamento padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação metabólica (HB).
2. os efeitos carcinogênicos do inseticida FP, por meio do Teste de Detecção de Tumor Epitelial em *D. melanogaster*.
3. a velocidade média de deslocamento das abelhas expostas ao FP, condicionadas a um foto estímulo, por meio do Teste de Atividade de Locomoção.

CAPÍTULO I

Fundamentação teórica

1. Inseticida Fipronil: Aspectos Gerais.

Pesticidas são substâncias ou misturas de substâncias utilizadas para matar, repelir ou controlar organismos considerados pragas e que, dependendo do princípio ativo, dose ou persistência no ambiente, podem apresentar impacto em espécies não-alvo (FAROOQUI, 2013).

O fenilpirazol 5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-[(trifluoromethyl)sulfinyl]-1*H*-pyrazole-3-carbonitrile, conhecido popularmente como Fipronil (FP) (**Figura 1**) é um inseticida comumente utilizado no combate de pragas na agricultura e na saúde animal (ANVISA, 2005).

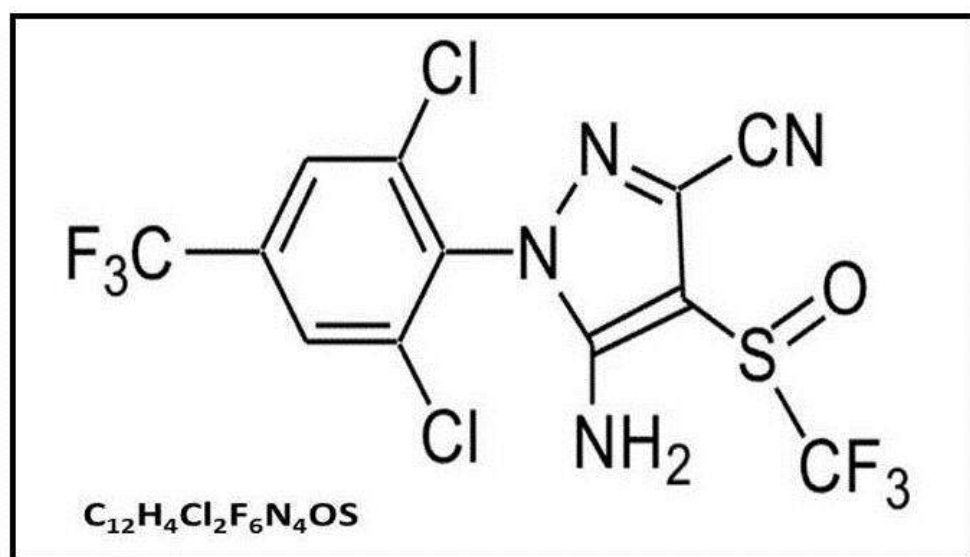


Figura 1. Fórmula química e estrutural do inseticida FP. Fonte: ANVISA, 2005

FP surgiu na década de 1990, descoberto por May e Baker, desenvolvido por Rhône - Poulenc em 1987. Foi introduzido no mercado agrícola em 1993 e registrado nos Estados Unidos em 1996 (AAJOUD *et al.*, 2003; BOBÉ *et al.*, 1998). FP foi o primeiro inseticida fenilpirazol desenvolvido em laboratório, dando impulso a uma nova era de produtos, hoje conhecidos como praguicidas de segunda geração (CONNELLY, 2001). Foi registrado sob

o número 120068-37-3 no banco de dados CAS (*Chemical Abstract Service*) e desde então, sintetizado e comercializado em grande escala por várias empresas (ANVISA, 2005).

Para compensar a resistência de larvas e insetos adultos, frente a algumas famílias de inseticidas clássicos (piretróides, organofosforados, carbamatos, ciclodienos), o inseticida FP foi elaborado e disponibilizado no mercado agrícola, visando atuar em um cenário onde o controle eficiente de pragas é indispensável para garantir uma produção rentável (Aajoud *et al.*, 2003).

De acordo com Bobé *et al.* (1998) e dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2015), o FP é empregado como princípio preventivo e corretivo de pragas em diversas monoculturas agrícolas, de acordo como o descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1. Pragas alvo do inseticida FP

Culturas	Pragas (nome científico)	Nome popular
Algodão	<i>Acromyrmex landolti landolti</i> <i>Alabama argillacea</i> <i>Anthonomus grandis</i> <i>Atta sexdens rubropilosa</i> <i>Frankliniella schultzei</i>	Formiga-rapa-rapa Curuquerê Bicudo Saúva-limão Tripes)
Arroz	<i>Acromyrmex landolti landolti</i> <i>Atta sexdens rubropilosa</i> <i>Oryzophagus oryzae</i>	Formiga-rapa-rapa Formiga Bicheira-da-raiz-do-arroz
Cana-de-açúcar	<i>Cornitermes cumulans</i> <i>Diabrotica speciosa</i> <i>Diatraea saccharalis</i> <i>Heterotermes tenuis</i> <i>Migdolus fryanus</i> <i>Neocapritermes opacus</i> <i>Procornitermes triacifer</i>	Cupim Larva-alfinete Broca-da-cana Cupim Broca-da-cana Cupim Cupim-de-monte
Milho	<i>Acromyrmex landolti landolti</i> <i>Atta sexdens rubropilosa</i> <i>Diabrotica speciosa</i> <i>Diloboderus abderus</i>	Formiga-rapa-rapa Formiga Larva-alfinete Bicho-bolo
Soja	<i>Acromyrmex landolti landolti</i> <i>Atta sexdens rubropilosa</i> <i>Sternechus subsignatus</i>	Formiga-rapa-rapa Formiga Tamanduá-da-soja
Trigo	<i>Acromyrmex landolti landolti</i> <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Formiga-rapa-rapa Formiga

Fonte: MAPA, 2015

No ramo da saúde animal, FP tem sido utilizado para o controle de pulgas, piolhos e carrapatos em ruminantes e animais domésticos (HAINZL e CASIDA, 1996). Seu amplo espectro de utilização é também voltado para o

tratamento domissanitário, no controle de formigas e cupins, e/ou jardinagem amadora (ANVISA, 2005), no tratamento de madeira para a confecção de postes, cercas rurais e vigas (MAPA, 2015) bem como no tratamento de eucalipto, via aplicação foliar, para o controle de formigas e cupins (ANVISA, 2005).

Em insetos, o ácido gama aminobutírico (GABA) atuam como neurotransmissores em sinapses inibitórias, regulando a excitabilidade das células do sistema Nervoso Central e têm sido associados a eventos fisiológicos e fisiopatológicos, que estão intrinsicamente envolvidos com a função e/ou disfunção cerebral (MARTINS, 2009).

FP apresenta ação não-competitiva e antagonista aos receptores GABA, associados ao canal de cloro (COLE *et al.*, 1993; DAS *et al.*, 2006). FP se liga aos receptores do canal de cloro, danificando e/ou bloqueando os íons de Cl^- , impedindo o influxo destes cátions monovalentes e, conseqüentemente, prejudicando o restabelecimento do potencial de repouso dos neurônios (AAJOUD *et al.*, 2003; STENERSENT, 2004; CONNELLY, 2001). Como consequência do bloqueio às vias de entrada de cloro, o impulso nervoso é comprometido, resultando em uma atividade neural excessiva (COLE *et al.*, 1993). Quando expostos ao inseticida, os insetos contaminados passam apresentar problemas de hiperexcitação nos músculos e nervos, paralisia severa e morte (BOBÉ *et al.*, 1998; GUNASEKARA e TROUNG, 2007).

Por apresentar pressão de vapor relativamente baixa, FP tende não ser volátil, sendo encontrado no ar apenas quando utilizado na forma de *spray* (U.S.EPA, 1996; GUNADEKARA e TROUNG, 2007).

No solo, FP é relativamente móvel (BOBÉ *et al.*, 1998) e apresenta meia vida entre 0,6 a 10,3 meses, podendo sofrer degradação por processos bióticos (microrganismos e sistemas enzimáticos) e abióticos (SIMON-DELSO *et al.*, 2015; BOBÉ *et al.*, 1998).

FP é estável em temperatura ambiente e pouco ou moderadamente solúvel em água, com preferência para matrizes lipofílicas (compostos orgânicos), como lipídeos, óleos, lignina e proteínas (AAJOUD *et al.*, 2003). Em

condições alcalinas é susceptível a sofrer hidrólise (GUNASEKARA e TROUNG, 2007).

Quando degradado, o FP pode produzir metabólitos mais tóxicos que o ingrediente ativo original (U.S.EPA, 1996). A molécula sofre degradação por hidrólise, fotólise, oxidação e redução, podendo formar quatro diferentes compostos: FP amida, FP desulfinil, FP sulfona e FP sulfeto (**Figura 2**) (SIMON-DELSO *et al.*, 2015; BOBÉ *et al.*, 1998).

O derivado FP amida é resultante da hidrólise do grupo nitrila da molécula original, presente no solo ou na água (U.S.EPA, 1996). Dos quatro metabólitos, o FP amida é o menos tóxico entre os compostos biotransformados (BOBÉ *et al.*, 1998).

O composto derivado desulfinil apresenta meia vida de 4,1 horas, sendo considerado o metabólito mais comum no meio ambiente. Sua metabolização é feita pela luz (fotólise) tanto no solo quanto na água (U.S.EPA, 1996; ZHAO *et al.*, 2005; HAINZL e CASIDA, 1996).

O metabólito sulfeto é formado por redução, enquanto que o derivado sulfona é formado por oxidação do substituinte sulfinil, presente na molécula do pesticida (MARTINS, 2009; ZHAO *et al.*, 2005).

Os metabólitos sulfona e desulfinil são os metabólitos biotransformados mais nocivos ao ambiente, sendo considerados altamente tóxicos para insetos, mamíferos, peixes e aves (U.S.EPA, 1996; HAINZL e CASIDA, 1996).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o FP é classificado como altamente tóxico ao ambiente, de acordo com os parâmetros toxicológicos e, portanto pertence à classe II (MAPA, 2015; ANVISA, 2005).

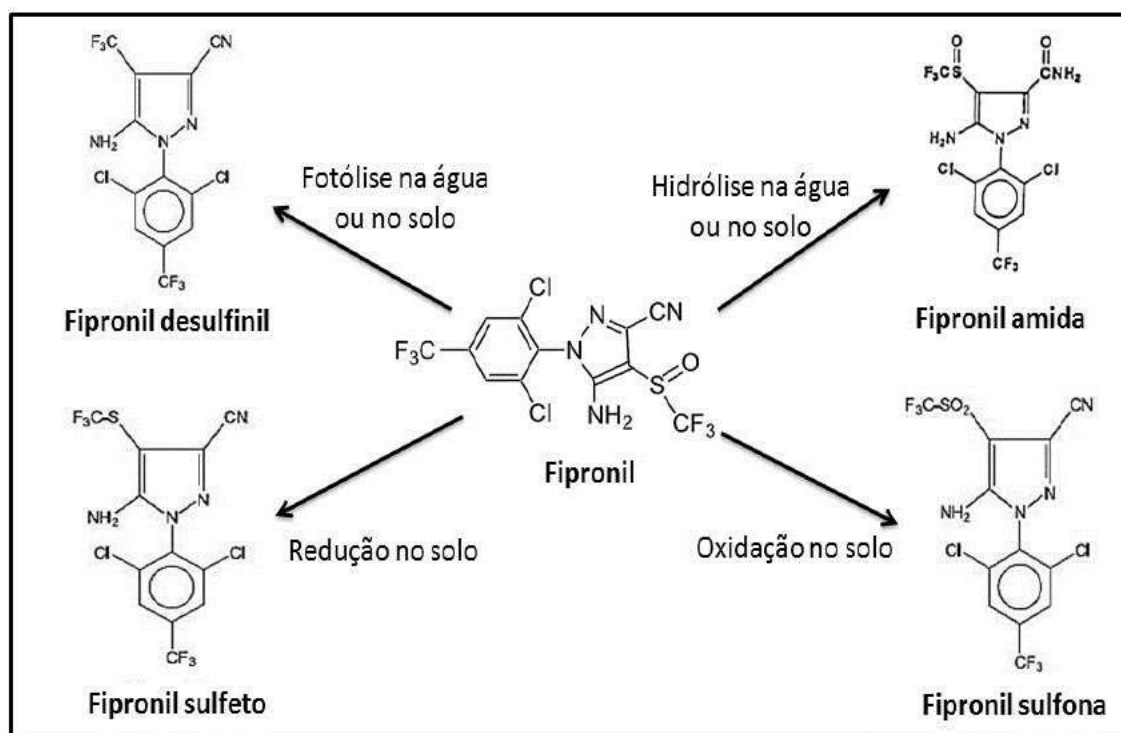


Figura 2. Biotransformação do inseticida Fipronil e seus metabólitos. Fonte: Adaptado de Bob *et al.* (1998)

Mesmo apresentando aspecto seletivo aos receptores GABA de mamíferos (HAINZL *et al.*, 1998) o inseticida apresenta ação tóxica nesses animais, via exposição oral (CONNELLY, 2001). Em ratos, o inseticida demonstrou ser prejudicial ao funcionamento da tireóide (LEGHAIT *et al.*, 2009), do sistema endócrino e reprodutivo de fêmeas (OHI *et al.*, 2004).

De acordo com Das *et al.* (2006) a exposição ao FP e a metabolização do xenobiótico foi responsável pelo aumento da expressão de mRNA CYP1A, induzindo a formação de isomorfos CYP, que causam citotoxicidade em hepatócitos humanos, podendo induzir o surgimento de câncer.

Em peixes, FP é altamente tóxico (U.S.EPA, 1996) e apresenta atividade neurotóxica, com degeneração da notocorda e defeitos locomotores em embriões e larvas (STEHR *et al.*, 2006) podendo afetar a reprodução (SUN *et al.*, 2014).

Em aves, FP é tóxico, podendo afetar a massa corporal quando expostas a baixas doses do pesticida (KITULAGODAGE *et al.*, 2011).

Somado a esses fatos, a sua aplicação tem apresentado efeitos prejudiciais em invertebrados não-alvo, principalmente em insetos polinizadores (LE FAOUDER *et al.*, 2007). Resíduos de FP podem estar presentes no pólen e no néctar de plantas tratadas, possibilitando a intoxicação das abelhas por contato ou ingestão (HASSANI *et al.*, 2005). Além do contato direto com o inseticida (durante o forrageamento ou no momento da pulverização) esses insetos são susceptíveis de receber doses em baixa concentração no campo, a qual pode prejudicar estes organismos a curto ou longo prazo.

Doses subletais de FP podem afetar a gustação, a percepção, o olfato, a capacidade de aprendizado e a atividade motora das abelhas, funções indispensáveis na atividade de forrageamento (HASSANI *et al.*, 2005).

Os efeitos tóxicos desse inseticida têm sido relacionados com o declínio de abelhas, fenômeno que ficou conhecido nos Estados Unidos como DCC (Desordem do Colapso das Colônias) em *A. mellifera* (van ENGELSDORP *et al.*, 2009) principal motivo para sua proibição na Europa em julho de 2013, pela Comunidade Européia (GONÇALVES, 2013).

FP é responsável por movimentar cerca de 150 milhões de dólares no mercado mundial (ALIOUANE *et al.*, 2009). Esse fato se deve à eficiência química conferida pela molécula ao garantir o controle de insetos pragas.

2. *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Aspectos Gerais

Representantes da ordem Hymenoptera, as abelhas sem ferrão pertencem a Subordem Apocrita, Superfamília Apoidea, Família Apidae e subfamília Meliponinae (MOURE *et al.*, 2013).

Os Meliponini são abelhas pantropicais e eusociais. Atualmente estima-se que existem 33 gêneros e mais de 400 espécies de abelhas na tribo

Meliponini (CAMARGO; PEDRO, 2013) com mais de 190 espécies no Brasil (KERR, 2001).

A espécie *Melipona scutellaris*, representante da tribo Meliponini, conhecida popularmente como Uruçu, é comumente encontrada na região Nordeste do país (**Figura 3**) principalmente entre os Estados da Bahia e do Rio Grande do Norte (ROLDÃO, 2011). Apresenta massa corporal de 60 a 80 mg e 10 a 13 mm de comprimento corporal, o que a coloca relativamente grande quando comparada com outras espécies da subfamília Meliponinae (KERR *et al.*, 1996).



Figura 3. Distribuição natural de *Melipona scutellaris* no território brasileiro. Fonte: Catalogue of Bees in the Neotropical Region. Disponível em: <http://www.more.cria.org.br/catalogue>. Acesso em 06 de junho de 2015.

Todas as abelhas da tribo Meliponini, incluindo a espécie *M. scutellaris*, (**Figura 4**) possui organização social na colônia, apresentando divisão de trabalho e castas. A abelha Uruçu, assim como outras espécies, se organiza em duas castas, operárias e rainha.

As operárias são fêmeas estéreis ou semi-estéreis responsáveis, na colônia, pelas atividades de cuidado com a prole, limpeza da colmeia, produção de cera, construção de células de cria e potes de armazenamento de alimento, proteção contra inimigos externos e alimentação da rainha (KERR *et al.*, 1996; LEONCINI *et al.*, 2004; VENTURIERE, 2008; SILVA *et al.*, 2011). A partir de certa idade, algumas operárias são incumbidas de forragear em busca de pólen e néctar (KERR *et al.*, 1996) principalmente nas primeiras horas do dia além de resina, barro e água (PIERROT e SCHLINDWEIN, 2003; SILVA *et al.*, 2011; RAAD, 2014).

As operárias podem eventualmente gerar ovócitos não fecundados (haplóides, ovos reprodutivos) que se desenvolvem em machos ou que serão utilizados pela rainha como fonte de alimento (ovos tróficos) (CRUZ-LANDIM *et al.*, 2009; VELTHUIS *et al.*, 2001).

A rainha, fêmea fértil, representa a matriarca da colônia. Seu comportamento de dominância está relacionado com movimentos ritualísticos e excreção de feromônios. Sua principal função é garantir a coesão e manutenção da colônia (KERR *et al.*, 1966). Morfologicamente, apresenta cabeça, olhos e tórax menores do que as abelhas operárias, e o abdômen torna-se maior do que o das operárias, nas rainhas fisogástricas.

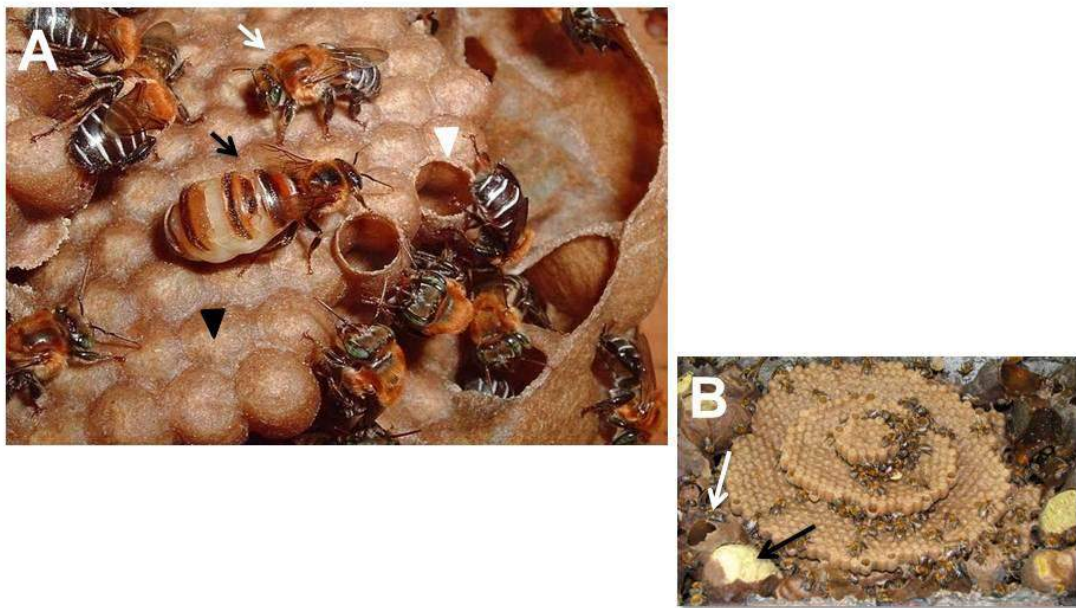


Figura 4. Ninho de *Melipona scutellaris*. **A:** Rainha (seta preta) Operária (seta branca) Célula de cria ou alvéolo em construção (ponta de seta branca) Célula de cria operculada (ponta de seta preta); **B:** Detalhe mostrando favos construídos horizontalmente e potes de alimento, com pólen (seta preta) e com mel (seta branca). Fonte: <http://meliponarionativo.com.br>.

Os machos convivem com as fêmeas na colônia e são responsáveis pela fecundação da rainha. Os machos de *M. scutellaris* podem, também, ajudar no aquecimento das crias e na produção e manipulação de cera (KERR *et al.*, 1966).

Uma característica morfológica que distingue as abelhas operárias da Superfamília Apoidea é a presença de corbícula, estrutura côncava rica em pêlos, localizada na tíbia traseira, para o transporte de pólen e outros materiais coletadas no ambiente (NOGUEIRA, NETO, 1997).

A entrada do ninho dos Meliponini é feito de geoprópolis (mistura de barro e própolis) apresentando aspectos crateriformes e o restante construído basicamente de cera, própolis e barro, os ninhos ficam em locais diversos, de acordo com cada espécie. Alguns podem ser construídos em raízes, galhos ou

tronco de árvores, em locais subterrâneos ou mesmo em paredes de residências urbanas e rurais (PIANARO, 2007).

Na entrada do ninho é comumente observada a presença de uma abelha guardiã, que desempenha papel na proteção contra abelhas não pertencentes à colônia ou insetos de espécies diferentes. A ausência de guardiã na entrada do ninho funciona como indicativo de algum desequilíbrio na colmeia (KERR *et al.*, 1996).

Devido à ausência de ferrão funcional (possuem ferrão atrofiado), seus mecanismos de defesa são limitados à força da mandíbula, entrada estreita do ninho, uso de cera e própolis, e presença de túneis com odores desagradáveis (ABRAMSON *et al.*, 1999).

O ninho (Figura 4) é estruturado em favos horizontais, separados por pilastras de cera e composto por células de cria ou alvéolos, onde a rainha realiza a postura. Potes ovalados são construídos para armazenamento de alimento (mel e pólen). Diferente do que ocorre com a abelha *A. mellifera*, em *Melipona* não há células realeiras nos favos e as operárias, machos e rainhas emergem de células do mesmo tamanho e com a mesma quantidade e qualidade de alimento (KERR *et al.*, 1996; SILVEIRA, 2002).

3. A importância das abelhas na polinização

Nas angiospermas, o processo de reprodução sexuada se deve pelo transporte efetivo do pólen presente nas anteras até o estigma, enquanto que nas gimnospermas, a fertilização se deve pelo contato direto do pólen e o óvulo. O fluxo de pólen garante a variabilidade genética das plantas da mesma espécie, o que reflete na qualidade dos frutos e sementes, bem como na garantia do equilíbrio da biogeocenose.

O processo de polinização pode ocorrer por intervenção de fatores abióticos (água e vento) e bióticos (insetos, aves e mamíferos). Os insetos se destacam entre os agentes polinizadores (COSTANZA *et al.*, 1997) e os insetos sociais através do trabalho mútuo (relação inseto-planta) se enquadram entre os principais contribuintes, principalmente as abelhas por serem os principais organismos responsáveis pela polinização entomófila (BIESMEIJER e SLAA, 2004). A necessidade das abelhas de coletar pólen (fonte proteica) e néctar (fonte energética), que serão usados como fonte alimentar, foi o apelo para que essa relação se estabelecesse. Nessa relação, as abelhas garantem a nutrição da colônia e, ao mesmo tempo, participam na manutenção e resguardo da integridade de seu habitat natural.

A produção de mel representa apenas uma pequena parcela do benefício proporcionado pelas abelhas. A polinização por abelhas está presente em 35% da produção agrícola do mundo, exercendo influência em 87% das principais culturas exploradas pelo homem (KLA *et al.*, 2007), perfazendo um valor bioeconômico de 153 bilhões de euros anualmente (GALLAI *et al.*, 2009). Frente a esse serviço natural oferecido pelos polinizadores e principalmente a dependência da polinização pelas plantas cultivadas, desenvolveu-se programas de manejo direcionados ao uso de abelhas em lavouras e pomares. Os Estados Unidos foram os pioneiros na utilização de abelhas em culturas (COSTA-MAIA *et al.*, 2010). No Brasil, Santa Catarina foi o primeiro estado a adotar e se beneficiar do serviço de polinização pelas abelhas, aplicando tal benefício para a produtividade e qualidade dos frutos produzidos pelas macieiras (PICOLLI, 1999; SALOMÉ, 2007).

Na literatura, diversos trabalhos descrevem o papel das abelhas na polinização de monoculturas (**Tabela 2**) demonstrado nitidamente a participação e contribuição destes insetos no sistema agrícola.

Tabela 2. Cultivares polinizados por abelhas

Cultivar	Espécie do polinizador	Referências
Abacate	<i>Melipona scutellaris</i>	ROCHA, 2012
Abóbora	<i>Apis mellifera</i> <i>Bombus impatiens</i> <i>Peponapis pruinosa.</i>	ARTZ e NAULT, 2011. ARTZ e NAULT, 2011. ARTZ e NAULT, 2011.
Açaí	<i>Melipona fasciculata.</i> <i>Melipona scutellaris</i>	IMPERATRIZ-FONSECA <i>et al.</i> , 2006. ROCHA, 2012.
Feijão	<i>Bombus terrestres</i> <i>Bombus locrorum</i> <i>Bombus hortolum</i> <i>Bombus lapidarius</i>	BARTOMEUS <i>et al.</i> , 2014. BARTOMEUS <i>et al.</i> , 2014. BARTOMEUS <i>et al.</i> , 2014. BARTOMEUS <i>et al.</i> , 2014.
Girassol	<i>Bombus spp.</i> <i>Apis melífera</i>	FELL, 1986. FELL, 1986.
Goiaba	<i>Melipona scutellaris</i>	IMPERATRIZ-FONSECA <i>et al.</i> , 2006.
Guaraná	<i>Melipona scutellaris</i>	ROCHA, 2012.
Jambo	<i>Melipona scutellaris</i>	IMPERATRIZ-FONSECA <i>et al.</i> , 2006
Laranja	<i>Apis mellifera.</i>	MALERBO-SOUZA <i>et al.</i> , 2003.
Maçã	<i>Melipona scutellaris</i> <i>Apis mellifera</i>	ROCHA, 2012. MOUTON, 2011.
Mamona	<i>Apis mellifera</i>	RIZZARDO <i>et al.</i> , 2012.
Melão	<i>Apis mellifera.</i>	TRINDADE <i>et al.</i> , 2004.
Morango	<i>Nannotrigona testaceicornis</i> <i>Tetragonisca angustula.</i> <i>Bombus terrestris.</i> <i>Apis mellifera</i>	IMPERATRIZ-FONSECA <i>et al.</i> , 2006. IMPERATRIZ-FONSECA <i>et al.</i> , 2006. MOMMAERTS <i>et al.</i> , 2011 BARTOLOMEUS <i>et al.</i> , 2014.
Nêspera	<i>Melipona scutellaris</i>	IMPERATRIZ-FONSECA <i>et al.</i> , 2006.
Pimenta	<i>Bombus terrestris.</i>	KNOWN e SAEED, 2003
Pimentão	<i>Melipona subnitida.</i> <i>Melipona scutellaris</i> <i>Melipona quadrfasciata</i>	CRUZ <i>et al.</i> , 2005. ROSELINO <i>et al.</i> , 2010. ROSELINO <i>et al.</i> , 2010.
Pitomba	<i>Melipona scutellaris</i>	IMPERATRIZ-FONSECA <i>et al.</i> , 2006
Tomate	<i>Bombus terrestris.</i>	VELTHUIS, DOORN, 2006.
Trigo	<i>Apis mellifera</i>	BARTOLOMEUS <i>et al.</i> , 2014

No Brasil, as espécies de abelhas da subfamília Meliponinae, também conhecidas como “abelhas indígenas, nativas ou sem ferrão” são responsáveis pela polinização de 40 a 90% da flora nativa do país, exercendo fundamental papel na manutenção da flora e da fauna (KERR *et al.*, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997).

Algumas plantas são mais frequentemente visitadas por abelhas do gênero *Melipona* devido à sua peculiar característica de polinização por vibração, uma vez que suas anteras são poricidas (NUNES-SILVA *et al.*, 2010). As plantas nativas das famílias *Myrtaceae*, *Mimosaceae*, *Caesalpinaceae*, *Anarcadinaceae*, *Sapindaceae*, *Fabaceae* e *Solanaceae* são as mais visitadas pela espécie *M. scutellaris* (CARVALHO *et al.*, 2001). Dependendo do ecossistema em que estão presentes, sua polinização pode, também, favorecer cerca de 33% das culturas agrícolas (IMPERATRIZ-FONSECA e NUNES-SILVA, 2010).

Pesquisas científicas demonstram a inquestionável importância polinizadora das abelhas no ecossistema e sugerem que na ausência e/ou presença de recurso floral de plantas nativas, as espécies podem procurar e utilizar recursos florais de plantas cultivadas.

4. Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (*Somatic Mutation And Recombination Test – SMART*) em *Drosophila melanogaster*.

Lesões no material genético são comumente causadas por erros espontâneos ou por exposição a agentes químicos, físicos e biológicos, (FRANK, 2010). Por decorrência de eventos agressivos ao material genético, o processo de replicação e transcrição gênica podem ficar comprometidos, bem como a segregação normal dos cromossomos. Essas lesões tendem a ser reparadas por enzimas da maquinaria de reparo do DNA. No entanto, se a

célula portadora de uma mutação se dividir por completo antes que o reparo seja feito, esta mutação poderá se fixar e se tornar uma alteração permanente.

De acordo com KIM *et al.* (2011) lesões no DNA em células mais senescentes são mais preocupantes, visto que a maquinaria de reparo do organismo tende a diminuir sua atividade à medida que a célula entra em processo de senescência, possibilitando a fixação de mutações. Agentes mutagênicos estão diretamente relacionados ao surgimento de mutações, que por sua vez apresentam forte relação com o surgimento de neoplasias, visto que uma população de células mutantes, quando não reconhecida e reparada, é passível de perder o seu reconhecimento celular e seu controle de divisão (RIBEIRO e MARQUES, 2003).

A Genética Toxicológica tem voltado sua atenção para a investigação de potenciais agentes mutagênicos e genotóxicos (MACHADO *et al.*, 2013), bem como para a padronização de protocolos e testes, como ferramentas para a detecção de mutações pontuais, aberrações cromossômicas e eventos de aneuploidias (ANDRADE e LEHMANN, 2003). Partindo desta premissa, o uso de organismo modelo com características específicas intrínsecas (sensibilidade e resposta) é uma peça crucial para a validação de um teste.

A designação “organismo-modelo” se aplica a espécies (plantas, animais e micro-organismos) que são utilizados para investigar um problema em particular. Um bom organismo-modelo permite extrapolar os resultados para outras espécies, como por exemplo, o homem (SEPEL e LORETO, 2010).

A espécie *Drosophila melanogaster*, conhecida popularmente como “mosca da fruta”, é um versátil organismo-modelo usado em pesquisas científicas no campo da Genética, Biomedicina, Medicina, Ecotoxicologia e Biologia de comportamento, e foi responsável por fornecer importantes informações em estudos genéticos e de desenvolvimento (KIM *et al.*, 2011).

O desenvolvimento embrionário, após a fertilização e formação do zigoto, ocorre dentro da membrana do ovo. O ovo produz uma larva. O período larval consiste de três estágios (*instars*). No estágio final, ou 3º *instar* a larva pode alcançar o comprimento de cerca de 4,5 milímetros, tornando-se pupa. A pupa, por sua vez, se desenvolve em um imago ou adulto (**Figura 5**). A

duração destas fases varia com a temperatura. A 20 °C a duração média do período ovo - larval é de 8 dias; a 25 °C é reduzida para 5 dias. Assim, a 25 °C o ciclo de vida pode ser completado em cerca de 10 dias (DEEPA PARVATHI *et al.*, 2009).

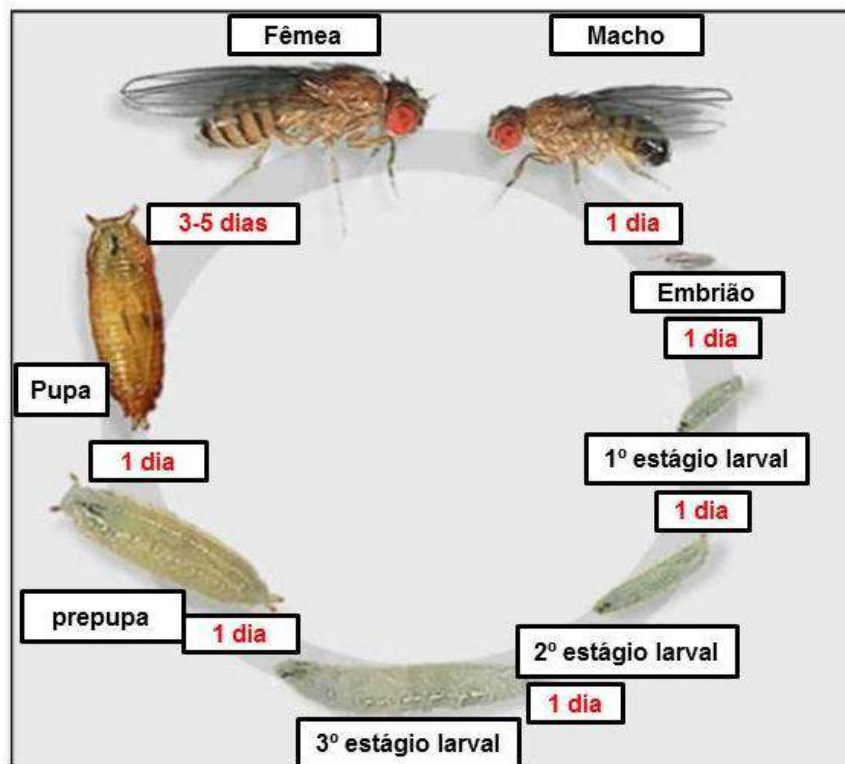


Figura 5. Ciclo de vida da mosca *Drosophila melanogaster*. Fonte: <http://www.sc.didaxis.pt/hereditariedade/drosophila.html>.

A *D. melanogaster* possui quatro pares de cromossomos ($2n = 8$), sendo três pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais. Apresenta dimorfismo sexual (Figura 6). As fêmeas, geralmente, são maiores que os machos e apresentam uma alternância típica de listas claras e escuras no decorrer do abdômen. Nos machos é observada a presença de uma mancha escura na extremidade posterior do abdômen (exceto em indivíduos recém-

eclodidos), bem como a presença de “pente sexual” localizados no primeiro par de patas superiores.

A *D. melanogaster* é muito bem caracterizada morfológica e geneticamente. Possui prole numerosa, ciclo de vida curto, baixo custo e é de fácil manutenção em laboratório. Muitas propriedades biológicas, fisiológicas e neurológicas básicas são conservadas entre mamíferos e *D. melanogaster*. Aproximadamente 75% dos genes relacionados às doenças humanas possuem homólogos funcionais em *D. melanogaster*, o que tem conferido formidáveis vantagens quanto ao uso deste organismo como modelo experimental (GRAF *et al.*, 1996; JENNINGS, 2011; PANDEY E NICHOL, 2011; REITER *et al.*, 2001).

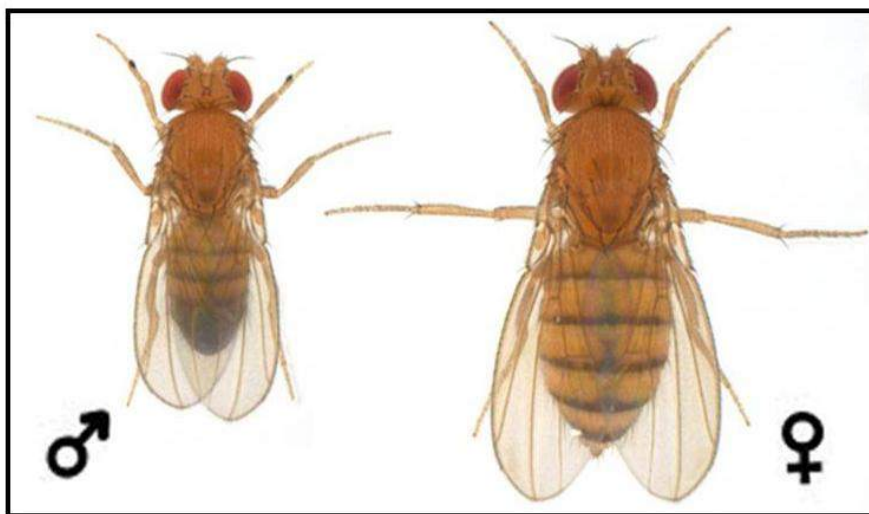


Figura 6: Dimorfismo sexual da espécie *Drosophila melanogaster*. Fonte: <http://seresmodelicos.csic.es/galeria/mosca.html>.

Algumas indagações quanto ao uso de modelos biológicos para estudo da correlação entre os organismos modelo e o homem são frequentemente postos em questão em pesquisas científicas. Os testes rotineiramente utilizados *in vivo* com mamíferos parecem estar atualmente mal adaptados

frente à grande demanda de material envolvido, elevado custo e questões éticas. Devido ao rápido ciclo reprodutivo, maior aceitação ética, e menor necessidade de infraestrutura, pequenos animais não-mamíferos, tais como nematódeos (*Caenorhabditis elegans*), peixes (*Daniorerio*), e moscas (*D. melanogaster*) são bons candidatos para o desenvolvimento de testes de genotoxicidade de alto rendimento. Assim, o Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (*Somatic mutation and recombination test – SMART*) representa uma alternativa mais escalável, uma vez que utiliza *Drosophila*, que se desenvolve mais rapidamente e requer menos infra-estrutura (LOMBARDOT *et al.*, 2015).

O SMART de asa é um teste baseado na análise fenotípica dos pêlos (tricomas) das células das asas da mosca *D. melanogaster*. O teste foi desenvolvido por Graf *et al.* (1984) e aprimorado por Graf e van Shaick (1992). Desde então tem sido usado para avaliar o potencial mutagênico/recombinogênico ou antimutagênico/antirecombinogênico de substâncias simples e misturas complexas (AMARAL *et al.*, 2005; FRAGIORGE *et al.*, 2008; de REZENDE *et al.*, 2011; ORSOLIN *et al.*, 2012.; DANESI *et al.*, 2012; DEMIR *et al.*, 2013; 2013; REZENDE *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2015) e compostos isolados (SANTOS-CRUZ *et al.*, 2012).

O teste baseia-se na Genética Clássica visto que os experimentos fundamentam-se nos conhecimentos referentes à distribuição igual e independente dos cromossomos durante a mitose. Os cruzamentos experimentais fazem uso de três linhagens portadoras de marcadores recessivos que se expressam nas células das asas da mosca, a saber:

1. Linhagem “*multiple wing hairs*” (*mwh*) com constituição genética *y; mwh jv*. O marcador recessivo *mwh* é um gene recessivo mantido em homozigose na linhagem *mwh*, localizado no braço esquerdo do cromossomo 3, em uma região mais distal em relação ao centrômero (3-0,3). Na condição de homozigose, o fenótipo do pêlo nas células da asa passa a ser expresso, originando pêlos múltiplos (tricomas múltiplos) (GRAF e VAN SHAICK, 1992) (Figura 7 A). O fenótipo de pêlos múltiplos (*mwh*) é caracterizado pela

presença de três ou mais pêlos em uma única célula da asa, o que difere do fenótipo selvagem que apresenta um único pêlo em cada célula (Figura 7 B).

2. Linhagem “*flare-3*” (*flr³*), com constituição genética *flr³/In(3LR)TM3, ri p^D sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*. O marcador *flr³* é um gene recessivo que está localizado no braço esquerdo do cromossomo 3, em uma região mais próxima em relação ao centrômero (3-38,8). Quando expresso (homozigose) o fenótipo do pêlo selvagem é modificado, originando pêlos que se assemelham a uma chama de vela ou espinho de roseira (GRAF e VAN SHAIK, 1992) (Figura 7 C).

De acordo com Andrade e Lehmann (2003), existem 3 alelos *flr*, sendo que todos os três são letais em homozigose recessiva. No entanto, nas células do disco imaginal das asas portadoras do gene recessivo, o fenótipo mutante passa a ser expresso em ausência de letalidade, sendo, portanto viáveis para o teste. O alelo *flr³* é mantido pela presença de um balanceador cromossômico *TM3, BD^S*.

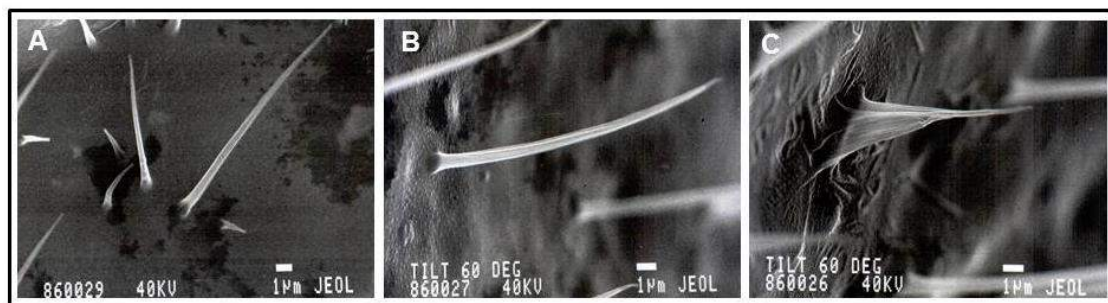


Figura 7. Distribuição de pêlos na asa de *Drosophila melanogaster*. Pêlo mutante *multiple wing hairs* (A); Pêlo mutante *flare* (C); Pêlo selvagem (B) Fonte: Fotomicrografia em microscopia de varredura (Cortesia Prof. Dr. Ulrich Graf – Institute of Toxicology ETH - Zurich – Suíça).

3. Linhagem “*ORR; flare-3*”, com constituição genética *ORR/ORR; flr³ In(3LR)TM3, ri p^D sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*. Os indivíduos pertencentes a essa linhagem possuem os mesmos marcadores da linhagem *flr³* no braço esquerdo

do cromossomo 3, somando a esta linhagem (*ORR;flare-3*) a presença de genes que expressam enzimas do citocromo P450, localizados nos cromossomos 1 e 2 (provenientes da linhagem “Oregon R”) (GRAF e VAN SCHAIK, 1992).

Com essas três linhagens são realizados dois diferentes tipos de cruzamentos:

- 1) Cruzamento padrão (*standard cross* - ST): cruzamento de machos “*mwh*” com fêmeas virgens “*flr³*”.
- 2) Cruzamento de alta bioativação (HB- *high bioactivation cross*): cruzamento de machos “*mwh*” com fêmeas virgens “*ORR;flr³*”

O cruzamento ST é usado para verificar se uma determinada substância ou composto isolado, por si, apresenta potencial para inferir dano ao material genético (detecção de mutágenos diretos).

Alguns compostos não são capazes de induzir mutações e/ou recombinação, mas seus metabólitos podem atuar agressivamente em nível do DNA. Neste sentido, o cruzamento HB permite verificar se os metabólitos do composto testado, originados por ação de enzimas do complexo citocromo P450, são ou não nocivos ao material genético (detecção de pró-mutágenos).

Ambos os cruzamentos produzem dois tipos de progênes (**Figura 8**):

- 1) Progênie MH: Trans-heterozigoto marcado (*mwh +/+ flr³*), com fenótipo de borda da asa lisa (**Figura 9 A**).
- 2) Progênie BH: Heterozigoto balanceado (*mwh +/ + TM3, Bd^s*), com fenótipo de borda da asa serrilhada (**Figura 9 B**).

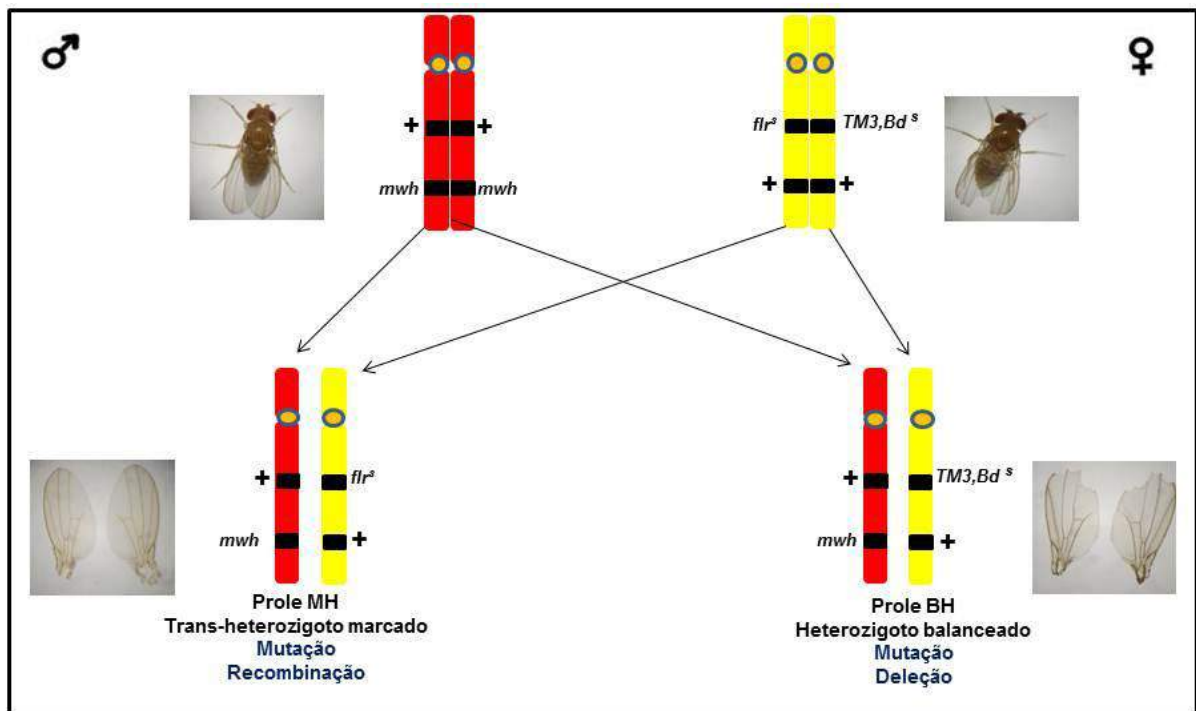


Figura 8. Representação do cruzamento realizado entre a linhagem *multiple wing hairs* e a linhagem *flare*, seus respectivos descendentes (distintos fenotipicamente), e os eventos mutacionais que podem ser identificados em cada progênie. Fonte: Adaptado de Rezende (2012).

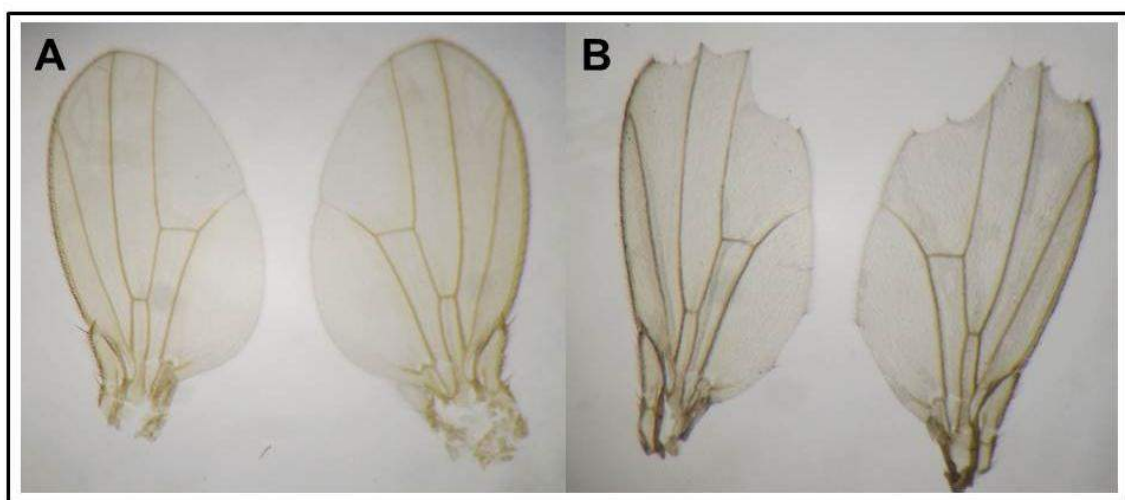


Figura 9. Fenótipo da asa de *D. melanogaster* da progênie MH (A) e BH (B). Fonte: Acervo pessoal.

Nos adultos da progênie MH, as manchas mutantes podem se expressar fenotipicamente como simples (*mwh* ou *flare*) e manchas gêmeas (*mwh* e *flare*). As manchas simples da progênie MH, são resultantes da perda da heterozigose em qualquer um dos marcadores, devido a mutação, aberração cromossômica e não-disjunção mitótica, enquanto que as manchas gêmeas são resultantes, exclusivamente, de recombinação mitótica. Imagens das manchas estão ilustradas abaixo: *mwh* (**Figura 10**), *flr³* (**Figura 11**) e gêmeas (**Figura 12**).

Na progênie BH a presença do balanceador permite apenas o surgimento de manchas simples *mwh*, provenientes de mutação, aberração cromossômica e não-disjunção mitótica.

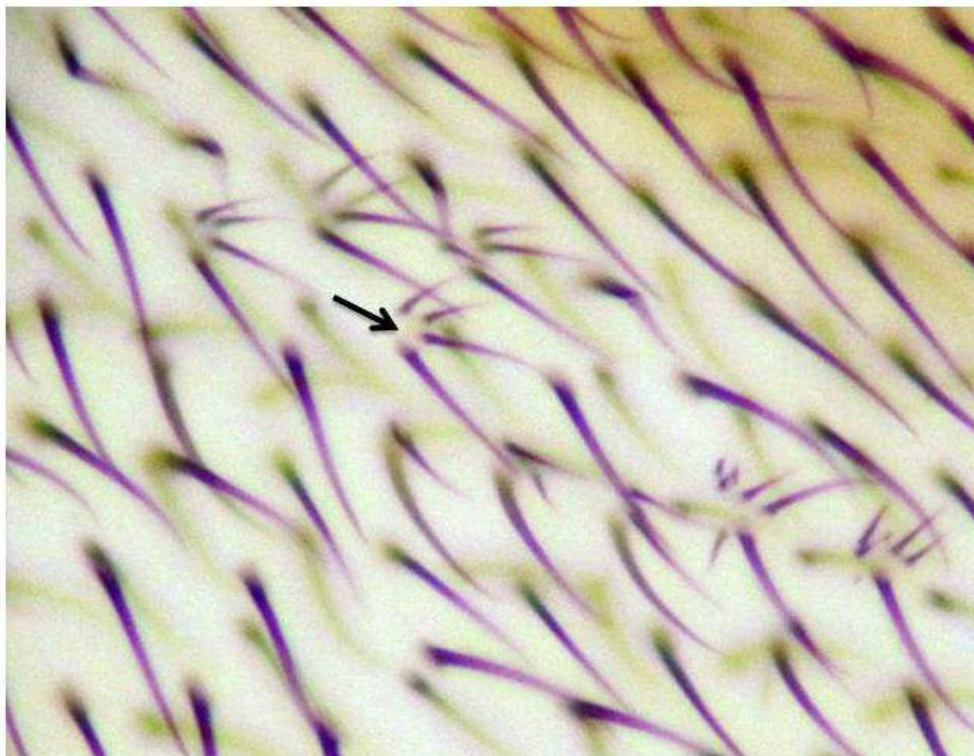


Figura 10. Manchas mutantes *multiple wing hairs* (seta). Fonte: Fotomicrografia obtida em microscópio óptico de luz (400X).

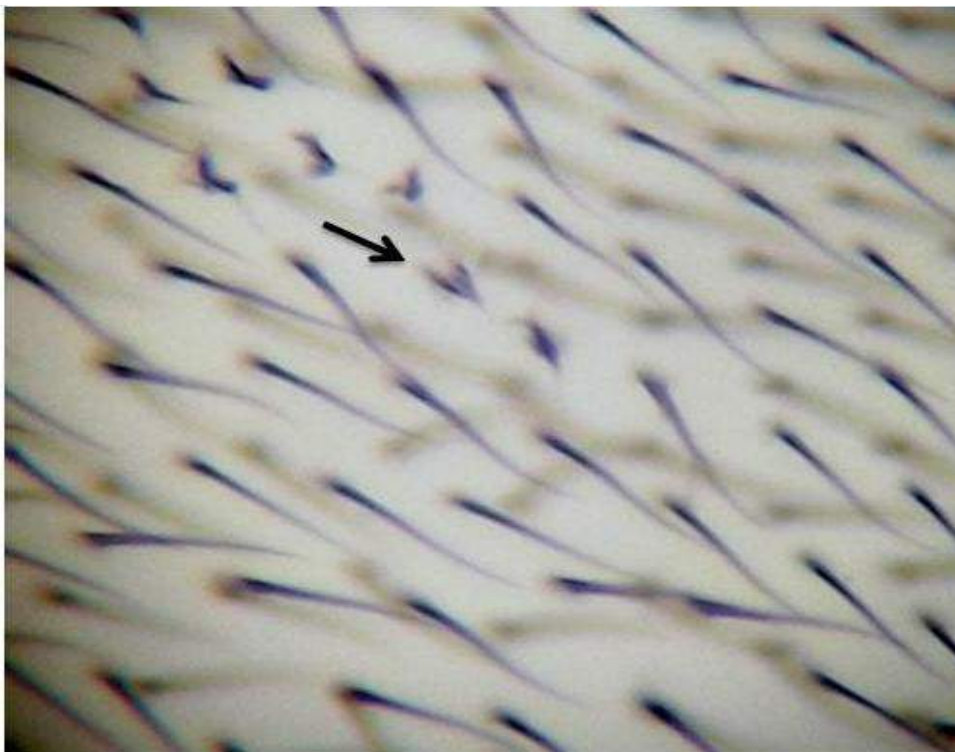


Figura 11. Manchas mutantes *flare* (seta). Fonte: Fotomicrografia obtida em microscópio óptico de luz (400X).

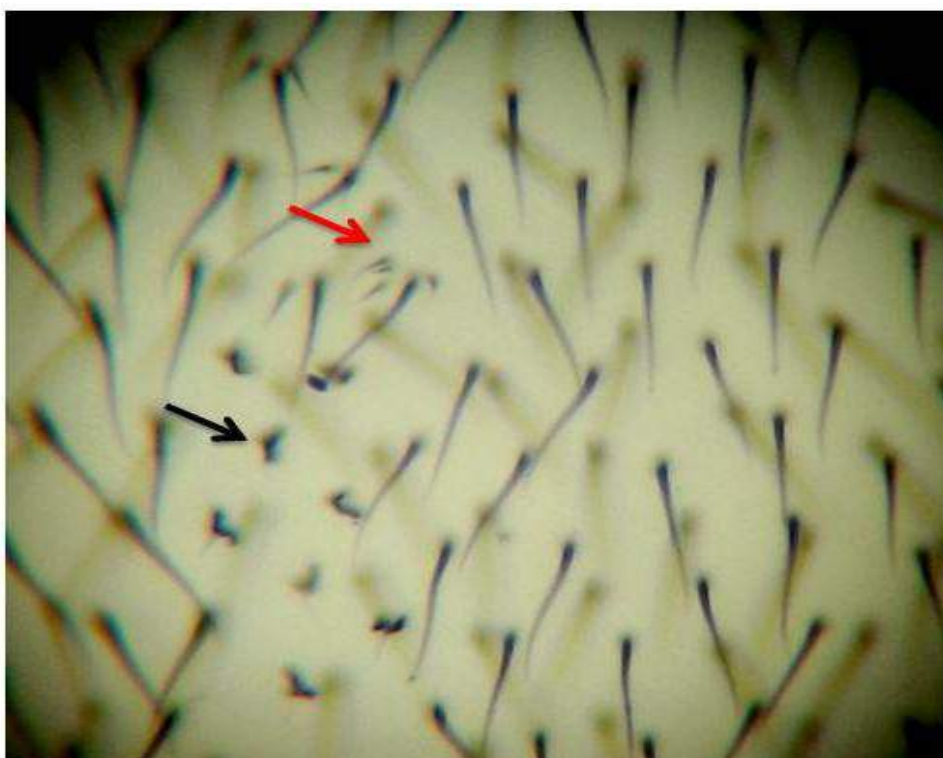


Figura 12. Mancha gêmea mostrando pêlo *flare* (seta preta) e pêlos múltiplos (seta vermelha). Fonte: Fotomicrografia obtida em microscópio óptico de luz (400X)

O SMART fundamenta-se na premissa de que, durante o desenvolvimento, células do disco imaginal da mosca dividem-se mitoticamente para se diferenciar, dando origem aos diversos tecidos secundários da mosca (ANDRADE e LEHMANN, 2003). A presença de um composto com atividade genotóxica nesta fase de desenvolvimento da mosca reflete-se na perda da heterozigose dos marcadores (um ou ambos) nas larvas tratadas, possibilitando a identificação de mutantes através da análise fenotípica dos pêlos nas asas das moscas adultas. Os possíveis eventos provenientes de mutação ou recombinação estão esquematizados no Anexo 1.

A detecção de mutações em *D. melanogaster* não afirma que a substância testada terá o mesmo efeito em outros organismos, porém aponta a possibilidade deste agente causar mutações em outras espécies de eucariotos.

5. Teste de Detecção de Tumor Epitelial (warts) em *Drosophila melanogaster*

O câncer pode ser definido como uma célula ou população de células que acumularam mutações e perderam a sua capacidade de reconhecimento celular. Pode ser classificado basicamente como benigno ou maligno. Este último, quando adquire capacidade de metástase e passa a invadir outros tecidos, gerando uma nova massa tumoral. A origem e progressão da massa tumoral envolve uma série de mudanças genéticas na célula, incluindo ativação de oncogenes e perda ou inativação de genes supressores de tumor (SHMANDT e MILLS, 1993; FELZENSWAB, 2003).

A conservação de alguns fatores genéticos e as vias bioquímicas, bem como, a conservação funcional dos genes associados à supressão de tumor em *D. melanogaster* e mamíferos, têm sugerido que estudos que envolvem a exposição de *Drosophila sp* a xenobióticos, associados à indução e manifestação de tumor nos discos imaginais, podem contribuir para o entendimento do câncer em humanos (POTTER *et al.*, 2000).

Em *Drosophila*, mais de 50 genes foram mapeados e caracterizados como genes supressores de tumor. Oito deles têm função no desenvolvimento embrionário da mosca, 12 no desenvolvimento do cérebro, 19 são expressos nas células dos discos imaginais, 25 no desenvolvimento hematopoiético e 10 nas gônadas adultas (JUSTICE *et al.*, 1995).

O gene *warts* (*wts*) foi identificado e caracterizado como um gene supressor de tumor (XU *et al.*, 1995). A deleção desse gene e expressão do alelo recessivo leva à formação de clones de células que são consideradas altamente invasivas acarretando na manifestação de tumor epitelial no corpo e apêndices da mosca. Tais tumores apresentam fenótipo semelhante a uma verruga com coloração escura (NISHIYAMA *et al.*, 1999).

O ciclo celular é governado por uma família de proteínas quinases que atuam nas vias metabólicas da célula, com intuito de garantir e regular o controle da divisão celular. As proteínas quinases são constituídas por duas subunidades, sendo uma subunidade regulatória (ciclina) e outra catalítica (proteína quinase dependente de ciclina – CDK) as quais em conjunto, formam um heterodímero.

De acordo com Nelson e Cox (2012) nas células somáticas existem pelo menos quatro tipos de ciclinas (A, B, C, D) e no mínimo oito tipos de proteína quinases dependente de ciclina (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK8) que atuam especificamente em um determinado momento no ciclo celular. O gene *warts* codifica uma proteína serina/treonina quinase que exerce papel na progressão do ciclo celular, na mitose (NISHIYAMA *et al.*, 1999; JUSTICE *et al.*, 1995; IIDA *et al.*, 2004).

Em *D. melanogaster* o gene supressor de tumor *warts* apresenta homologia com o gene humano LATS1, associado ao surgimento de tumores ovarianos e sarcomas em tecidos moles, quando expresso na condição alterada (NISHIYAMA *et al.*, 1999).

O marcador *wts* está localizado no cromossomo 3 da mosca e é letal para o zigoto quando expresso em homozigose recessiva. Em função desse evento, a linhagem *Warts* é mantida pela presença de um balanceador

cromossômico *TM3, Sb¹*, o qual fornece um estado hemizigoto e garante a não letalidade para o indivíduo.

Para avaliação do potencial carcinogênico o Teste de Detecção de Tumor Epitelial faz uso de duas linhagens:

1- Linhagem *Warts* (*wts/TM3, Sb¹*) com constituição genética: *ST [1] in [1] kni [ri-1] p [p] wts [3-17]/TM3, S B [1]*.

2- Linhagem *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*) com constituição genética *y; mwh jv (3-0,3)*.

O cruzamento é feito com machos *mwh* e fêmeas virgens *wts* (**Figura13**). Por meio desse cruzamento, duas progênie são geradas:

- 1- Progênie trans-heterozigoto marcado (*wts +/+ mwh*);
- 2- Progênie heterozigoto balanceado (*TM3, sb¹ +/+ mwh*).

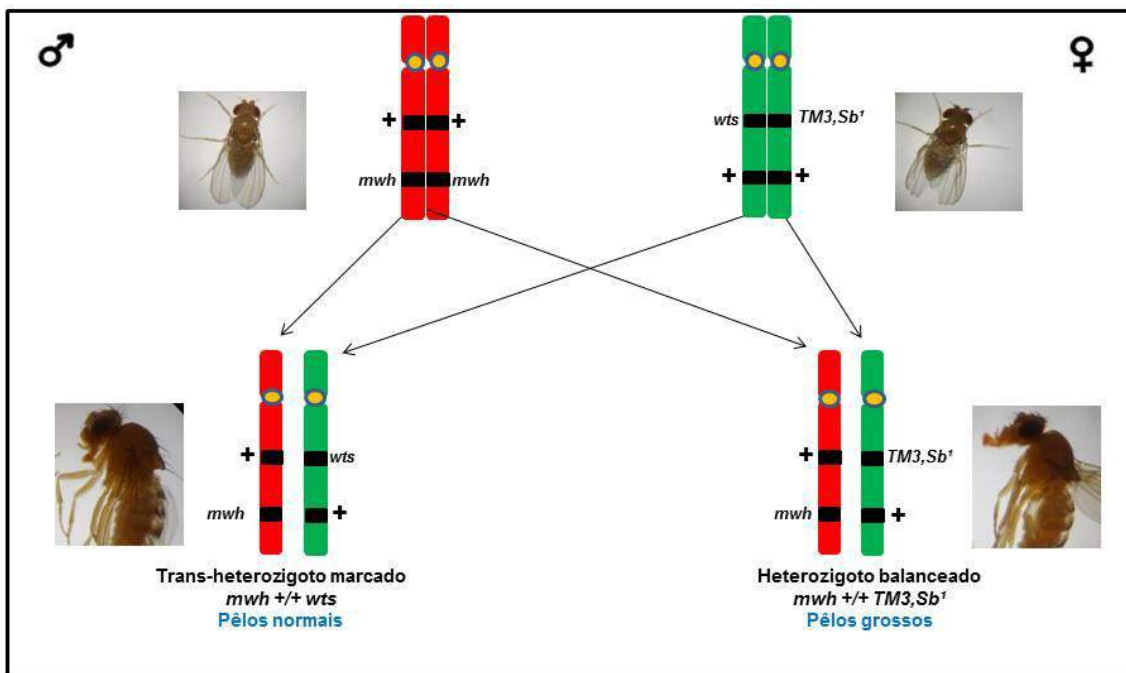


Figura 13. Representação do cruzamento realizado entre a linhagem *multiple wing hairs* e a linhagem *warts*, seus respectivos descendentes (distintos fenotipicamente).

As moscas (progênie) são identificadas pelo fenótipo dos pêlos expressos no corpo da mosca (**Figura 14**). Indivíduos pertencentes à progênie “Trans-Heterozigoto marcado” apresentam pêlos normais no corpo (longos e finos), enquanto que indivíduos pertencentes a progênie “heterozigoto balanceado” apresentam pêlo curto e espesso.

No Teste de Detecção de Tumor Epitelial, apenas a progênie trans-heterozigoto marcado (*wts +/+mwh*) é analisada.

A perda da heterozigose nas células do disco imaginal das larvas resulta na expressão do gene *Warts* na condição recessiva, levando ao surgimento de tumor epitelial na mosca, na fase adulta. Tal evento ocorre em função de efeito clastogênico, aneugênico ou por meio de recombinação mitótica. Os tumores são detectados nos diversos tecidos epiteliais do inseto (cabeça, olhos, corpo, pernas, asas e halteres (**Figura 15**) (EEKEN *et al.*, 2002).



Figura 14. Fenótipo dos pêlos no corpo da mosca *D. melanogaster* nas diferentes progênies.

Desde que o Teste para Detecção de Tumor Epitelial em *D. melanogaster* foi padronizado, tem sido aplicado no estudo de substâncias com caráter carcinogênico e anticarcinogênico (ALVES e NEPOMUCENO, 2012; COSTA *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2014; FURTADO e NEPOMUCENO, 2012; ORSOLIN e NEPOMUCENO, 2009; SILVA e NEPOMUCENO, 2011) , oferecendo informações relevantes para uma gama de substâncias simples e compostas.

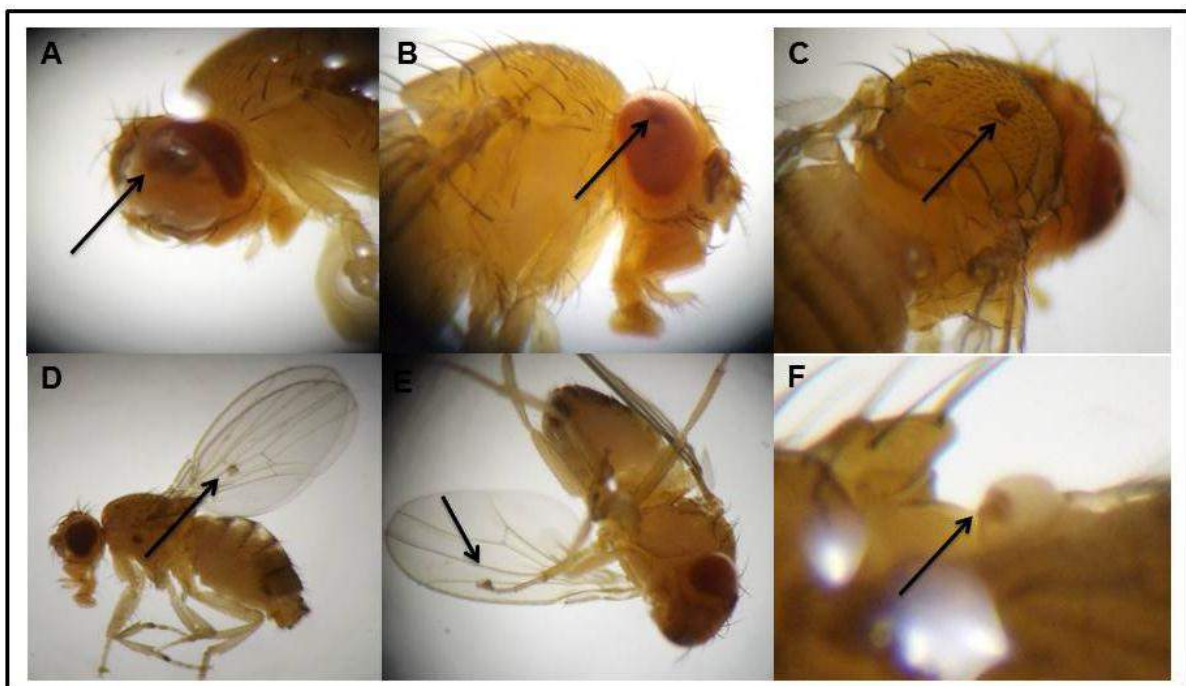


Figura 15. Expressão de tumor epitelial em *D. melanogaster*. Tumor na cabeça (A), tumor no olho (B), tumor no corpo (C), tumor na asa (D) e tumor no halter.

6. Teste de Locomoção em abelhas

O teste da atividade de locomoção fundamenta-se na observação do deslocamento das abelhas ao longo de em uma arena graduada construída de madeira (80 cm x 30 cm x 4 cm) com seis divisões (Figura 16). Cada divisão representa uma raia de 50 cm de comprimento, que permite monitorar o deslocamento de cada indivíduo. A caixa é tampada com um vidro na parte frontal para a visualização do deslocamento das abelhas durante o teste. A parte inferior da caixa têm seis entradas individuais, uma para cada raia, onde são colocadas as abelhas. Um suporte de alumínio na parte inferior da caixa garante que o acesso das abelhas às raias ocorra ao mesmo tempo para os indivíduos testados.

O estímulo das abelhas ocorre por meio do fototropismo positivo, as quais deslocam em direção à lâmpada fluorescente que fica na parte superior da pista de teste.

Este teste é usado para avaliar o efeito de doses subletais de pesticidas na velocidade das abelhas, podendo fornecer informações sobre mudanças de comportamento dos insetos expostos.

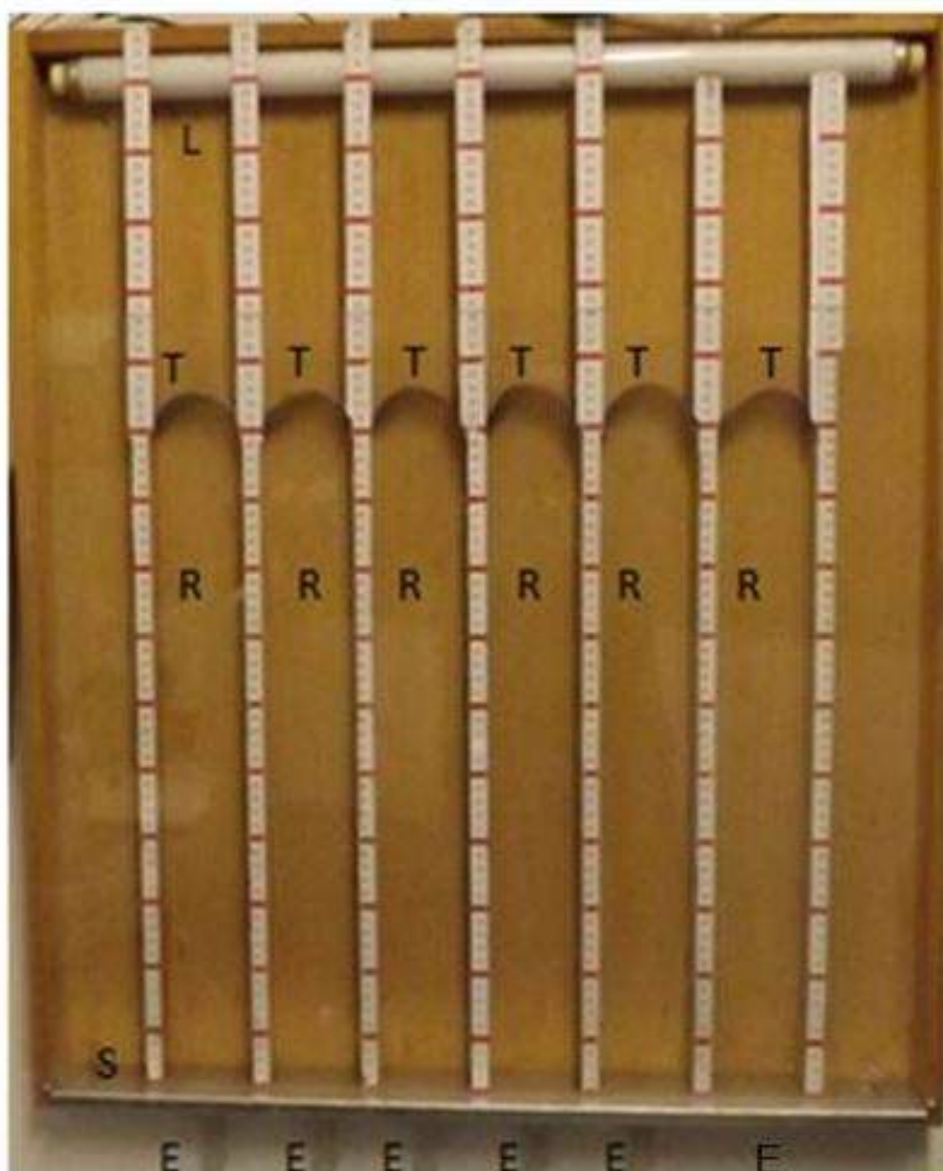


Figura 16. Pista de Teste de Atividade de Locomoção. Luz (L) Tela de Nylon (T) Raias (R) Suporte de alumínio (S) Entrada da caixa (E)

CAPÍTULO II

Avaliação da capacidade Mutagênica e Carcinogênica do Inseticida Fipronil em células somáticas de *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae)

Resumo

Fipronil é um pesticida do grupo fenilpirazol, usado no controle de pragas, com ação não competitiva e antagonista aos receptores GABA de insetos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos mutagênicos e carcinogênicos do inseticida Fipronil. Os efeitos mutagênicos foram avaliados por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART). em células de asas de *Drosophila melanogaster*. Larvas de 3º estágio dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação metabólica (HB), foram tratadas com diferentes concentrações de Fipronil (0,3; 0,7; 1,5 ou $3,0 \cdot 10^{-5}$ mM). Os resultados revelaram efeito mutagênico em todas as concentrações testadas no cruzamento HB e em todas as concentrações testadas no cruzamento ST, exceto para a concentração de $0,7 \cdot 10^{-5}$ mM. Os efeitos carcinogênicos do Fipronil foram avaliados por meio do teste para detecção de tumor epitelial (warts). Larvas de 3º estágio do cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3*, *sb¹* e machos *mwh/mwh* foram tratadas com diferentes concentrações de Fipronil (0,3; 0,7; 1,5 ou $3,0 \cdot 10^{-5}$ mM). Todas as concentrações utilizadas induziram aumento estatisticamente significativo na frequência de tumores. Em conclusão, o fipronil mostrou ser um agente mutagênico e carcinogênico em células somáticas de *D. melanogaster*.

Palavras chave: mutação somática; fipronil; tumor epitelial; SMART; warts; *wts*.

Abstract

Fipronil is an insecticide of phenylpyrazol group used to control pests with non-competitive action and antagonistic GABA receptors. The aim of this study was to evaluate the mutagenic and carcinogenic effects of Fipronil insecticide. The mutagenic effects were evaluated using the somatic mutation and recombination test (SMART) on wings cells of *Drosophila melanogaster*. Third instar larvae from standard (ST) cross and High bioactivation (HB) cross were treated with different concentrations of Fipronil (0.3; 0.7; 1.5 or $3.0 \cdot 10^{-5}$ mM). The results showed mutagenic effect at all concentrations tested in the HB cross; and all concentrations tested in the ST cross, except at concentration of $0.7 \cdot 10^{-5}$ mM. The carcinogenic effect of fipronil was assayed through the test for detection of tumor epithelial (*warts*) in *D. melanogaster*. Third instar larvae from *wt*s/*TM3* virgin females mated to *mwh/mwh* males were treated with different concentrations of fipronil (0.3; 0.7; 1.5 or $3.0 \cdot 10^{-5}$ mM). All these concentrations induced a statistically significant increase in tumor frequency. In conclusion, Fipronil proved to be mutagenic and carcinogenic in somatic cells of *D. melanogaster*.

Key words: somatic mutation; fipronil; tumor epithelial; SMART; warts; *wt*s.

1. Introdução

Pesticidas são substâncias ou misturas de substâncias utilizadas para matar, repelir ou controlar organismos (microrganismos, plantas ou animais) considerados pragas e que, dependendo das características físico-químicas, mecanismo de ação, dose ou persistência no ambiente, podem apresentar impacto em espécies não-alvo (TSUTSUI; MAIZUMI; BARRET, 1984; FAROOQUI; FAROOQUI, 2012).

Pesticidas foram desenvolvidos visando atuar em um cenário onde o controle eficiente de pragas é fundamental para garantir a demanda de alimento global, tornando a agricultura dependente do controle químico de pragas (ECOBICHON, 2000).

Os efeitos nocivos apresentados por inseticidas clássicos, tais como, organofosforados, organoclorados, piretróides e carbamatos têm levantado a preocupação quanto à utilização da tecnologia frente aos danos gerados no ambiente. Em função do dano ambiental e ocupacional que os pesticidas podem causar, um bom agroquímico deve atender às expectativas do controle de pragas e apresentar toxicidade seletiva, bem como, baixa persistência no meio ambiente e não apresentar característica de bioacumulação nos níveis tróficos (ÇELIK *et al.*, 2014).

Pesticidas podem prejudicar a saúde humana a longo prazo, devido a exposição crônica aos resíduos do princípio ativo e seus metabólicos no ambiente e nos alimentos (HOUK, 1992), podendo gerar diversos efeitos negativos, tais como disfunção nas vias bioquímicas ou instabilidade genética (ÇELIK *et al.*, 2014).

Fipronil (5 - amino - 1 - [2,6 - dichloro - 4 - (trifluoromethyl) phenyl] - 4 - [(trifluoromethyl) sulfinyl] - 1H - pyrazole) (FP) é um inseticida, formicida e cupinicida do grupo fenilpirazol. Classificado como pesticida de segunda geração, FP foi descoberto por Rhone-Poulenc Agro em 1987, introduzido comercialmente em 1993 e registrado nos Estados Unidos em 1996 (AAJOURD; RAVANEL; TISSUT, 2003).

FP age no sistema nervoso do inseto. O ingrediente ativo liga-se aos receptores do canal de cloro, agindo ao danificar e/ou bloqueando os íons de Cl^- , impedindo o influxo na via celular, anulando o efeito neuroregulador dos

receptores (CONNELLY, 2001; AAJOUD; RAVANEL; TISSUT, 2003; STENERSENT, 2004). Como consequência do bloqueio das vias de entrada de cloro, o impulso nervoso é comprometido, resultando em uma atividade neural excessiva (COLE *et al.*, 1993). Quando expostos ao inseticida, os insetos passam apresentar problemas de hiperexcitação nos músculos e nervos, paralisia severa e morte (BOBÉ *et al.*, 1998; GUNASEKARA e TROUNG, 2007).

No Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), FP é considerado altamente tóxico ao meio ambiente, sendo classificado, de acordo com os parâmetros toxicológicos, como pertencente à classe II. Em função da sua toxicidade, vários trabalhos têm demonstrado efeitos danosos em organismos não-alvo, como abelhas (EL HASSANI *et al.*, 2005; LE FAUDER *et al.*, 2007; LOURENÇO *et al.*, 2012), peixes, aves e mamíferos (OHI *et al.*, 2004; STEHR *et al.*, 2006; DAS *et al.*, 2006; LEGHAIT *et al.*, 2009). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency* - EPA) FP é classificado como um possível carcinógeno (EPA, 2011).

Os efeitos da exposição prolongada aos pesticidas, em baixas doses, na saúde humana é difícil de avaliar, uma vez que os sintomas muitas vezes não são manifestados clinicamente (HERNANDEZ *et al.*, 2005). Informações sobre a toxicidade dos pesticidas não são suficientes para prever o risco ocupacional, uma vez que algumas formulações podem apresentar compostos nocivos em nível molecular e serem genotóxicos e mutagênicos (BOLOGNESI, 2003).

Muitos desses compostos são considerados potenciais carcinógenos, podendo estar associados ao surgimento do câncer e outras doenças crônicas, tais como malformações congênitas e doenças degenerativas (BOLOGNESI, 2003; VIDAU *et al.*, 2006; BHALLI *et al.*, 2009; BOLOGNESI; MORETTO, 2014). Poucos dados sobre os efeitos genotóxicos e mutagênicos do inseticida FP estão disponíveis na literatura (GUISI NDE *et al.*, 2011; ÇELIK *et al.*, 2014), o que aponta para a necessidade de mais estudos direcionados à avaliação da molécula.

O Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART), usando como organismo-modelo a espécie *Drosophila melanogaster*, fundamenta-se

na detecção da perda da heterozigose em genes marcadores, que são analisados fenotipicamente nas asas da mosca. Este teste é um eficiente método para avaliar e quantificar o potencial mutagênico e recombinogênico causados por agentes físicos e químicos (GRAF, WÜRLER, 1996). No SMART dois cruzamentos são usados: Cruzamento padrão (ST) (GRAF *et al.*, 1984) e cruzamento de alta bioativação (HB) (GRAF e VAN SHAIK, 1992). A progênie do cruzamento ST expressa níveis basais de enzimas do complexo citocromo P450 (CYP6A2), enzimas que estão associadas à metabolização de compostos químicos. A progênie do cruzamento HB apresenta alto nível de enzimas do CYP6A2.

O Teste de Detecção de Tumor Epitelial em *D. melanogaster* faz uso de uma linhagem que possui o marcador *wt*s (*warts*), que quando expresso na condição selvagem atua como um gene supressor de tumor (XU *et al.*, 1995). A deleção do gene e a consequente expressão do alelo recessivo, leva à formação de clones de células que são consideradas altamente invasivas, acarretando na manifestação de tumor epitelial no corpo e apêndices da mosca (NISHIYAMA *et al.*, 1999).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade mutagênica e carcinogênica do inseticida FP por meio do SMART e do Teste de Detecção de Tumor Epitelial (Teste *wt*s) em *D. melanogaster*, respectivamente.

2. Material e Métodos

2.1 Agentes químicos

Fipronil Regent® 800 WG (CAS 120068-37-3) foi obtido da empresa BASF S.A, São Paulo, Brasil. A **Figura 1 (A)** mostra a estrutura química do Fipronil Regent® 800 WG, que contém na sua formulação 80% de princípio ativo e 20% de ingredientes inertes.

Carbamato de etila – Uretano (CAS51-79-6) (**Figura 1 - B**) foi obtido da empresa Fluka AG (Buchs, Switzerland).

Mitomicina C (CAS 50-07-7) (**Figura 1 - C**) na formulação em pó liofilizado foi fabricado por Kyowa Hakko Kirin Co. Ltda. Shizuoka (Japão), embalado por Bristol-Myers Squibb S.r.l.Sermoneta-Latina-Itália e importado por Bristol-Myers Squibb Farmacêutica S.A.

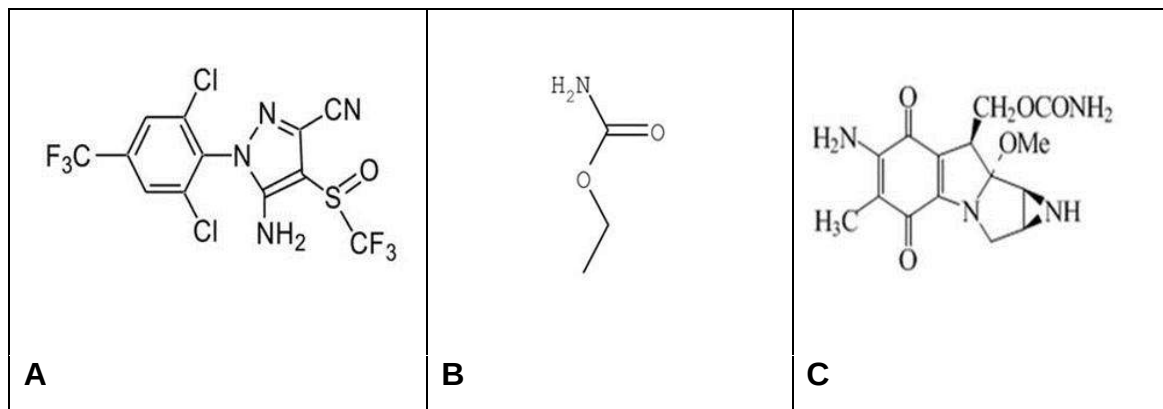


Figura 1. Estrutura química dos compostos. A. Fipronil; B. Carbamato de etila - Uretano (URE); C. Mitomicina-C (MMC).

2.2 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster* (SMART)

2.2.1 Linhagens de *Drosophila*, cruzamentos e tratamento.

Três linhagens de *D. melanogaster* mutantes foram usadas no experimento: Linhagem *multiple wing hairs*, *flare* e ORR. A linhagem *multiple wing hairs* é mantida em homozigose recessiva para o marcador *mwh*, localizado no cromossomo 3, em posição distal em relação ao centrômero (*mwh*, 3-0,3). O gene *mwh* expresso em homozigose recessiva, produz fenótipo de pêlos nas asas da mosca em formato múltiplo, diferente do fenótipo selvagem (um único pêlo por célula).

A linhagem *flare* possui o marcador *flr³* que é mantido em hemizigose na presença do balanceador cromossômico *TM3, Bd^s*, situados no cromossomo 3 em posição proximal ao centrômero (*flr³*, 3-38,9), quando comparado ao marcador *mwh*. Quando expresso, o marcador *flr³* leva à formação de pêlos semelhantes a uma chama de vela, ou espinho de roseira, os quais são identificados fenotipicamente na asa da mosca.

A linhagem ORR, proveniente da linhagem Oregon (resistente ao inseticida DDT), possui o mesmo marcador da linhagem *flr³*, e a presença de genes que codificam enzimas do complexo citocromo P450, nos cromossomos 1 e 2.

Estas linhagens foram mantidas em estoque, em frascos contendo ¼ de meio de cultura à base de banana (1230 mL de água; 16,5 g de ágar; 234 g de banana; 37,5 g de fermento biológico e 1,5 g de nipagin em pó) em estufa incubadora para B.O.D. (demanda bioquímica de Oxigênio) (SOLAB), em ciclos luz/escuro (12h:12h) na temperatura de 25 °C e 65% de umidade relativa.

Dois cruzamentos foram conduzidos: (1) Cruzamento padrão (ST), entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx34^e Bd^s* (GRAF *et al.*, 1984; 1989); (2) Cruzamento de alta bioativação (HB), com machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens ORR/ORR; *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx34^e Bd^s* (GRAF e VAN SCHAİK, 1992).

Os cruzamentos produzem dois tipos diferentes de progênie: trans-heterozigoto marcado (*mwh+/+flr³*) (MH) e heterozigoto balanceado (*mwh+/+TM3, Bd^s*) (BH). A progênie MH possibilita a detecção de mutação e recombinação mitótica; enquanto que na progênie BH somente eventos mutacionais levam à formação de manchas, uma vez que todos eventos recombinacionais são eliminados (Spanó *et al.*, 2001). As progênies são identificadas em função da expressão do balanceador cromossômico TM3, Bd^s, fenótipo da borda da asa serrilhada, e fenótipo de borda lisa da asa em moscas com genótipo *mwh+/+flr³*.

A coleta de ovos dos descendentes dos cruzamentos ST e HB ocorreu dentro do período de 8 horas, em frascos contendo meio de cultura à base de ágar (4%) e fermento biológico suplementado com sacarose. Após 72 ± 4 horas, larvas de 3º estágio foram lavadas com água ultrapura MiliQ (Millipore) e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. Posteriormente, as larvas foram submetidas a tratamento crônico (aproximadamente 48 horas) até completar o processo de metamorfose. As larvas foram colocadas em *vials* (2,5 cm de diâmetro por 8 cm de comprimento) contendo 1,5 g de purê de batatas (Yoki® Alimentos S.A) e 5 mL de Fipronil nas concentrações de 0,3; 0,7; 1,5 ou $3,0 \cdot 10^{-5}$ mM. As concentrações utilizadas foram baseadas em ensaio de sobrevivência em *D. melanogaster* (Figura 2).

Uretano (Carbamato de etila) (URE) - foi usado como controle positivo, na concentração de 10 mM, conforme descrito na literatura (SILVA *et al.*, 2006; FRAGIORGE *et al.*, 2008; DE REZENDE *et al.*, 2013a). Água ultrapura foi usada como controle negativo.

2.2.2. Preparação das lâminas e análise microscópica.

Após a eclosão, moscas adultas descendentes dos cruzamentos ST e HB foram fixadas em etanol 70% (v/v). As asas foram removidas e montadas em lâminas de microscopia com solução de *Faure* (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato de cloral e 50 mL de água destilada) e analisadas em microscópio óptico de luz, com ampliação de 400X. As

frequências de manchas *mwh*, *flr³* e gêmeas foram registradas em um diagrama padrão, expressando o tamanho das manchas, em classes.

2.2.3 Análise estatística

Para cada série tratada, 40 moscas de ambos os sexos foram analisadas. O procedimento de decisão múltipla (FREI e WÜRGLER, 1988) foi utilizado para analisar os dados, resultando em três diferentes diagnósticos: negativo, positivo ou inconclusivo. As frequências de cada tipo de mancha (simples pequenas, simples grandes e gêmeas) e o total de manchas por mosca, de cada tratamento, foram comparadas aos pares (exemplo, controle negativo contra tratamento fipronil) de acordo com Kastenbaum e Bowman (1970), com $p = 0,05$ (FREI e WÜRGLER, 1988).

Comparações estatísticas referentes às taxas de sobrevivência foram feitas por meio do teste do Chi-quadrado para razões de amostras independentes.

2.3 Teste de Detecção de Tumor Epitelial em células somáticas de *D. melanogaster* (Teste *wt*s)

2.3.1 Linhagens de *Drosophila*, cruzamento e tratamento

Duas linhagens mutantes foram usadas nesse teste: Linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e linhagem *warts* (*wt*s, 3-100). A linhagem *warts* possui um marcador *wt*s no cromossomo 3, que é mantido em hemizigose na presença do balanceador cromossômico TM3, Sb¹. O marcador *wt*s, quando expresso na condição selvagem, atua como um gene supressor de tumor. A deleção desse gene, e a expressão do alelo recessivo, leva à formação de clones de células que são consideradas altamente invasivas, acarretando na manifestação de tumor epitelial no corpo e apêndices da mosca.

Foi realizado o cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens da linhagem *wts, [1] in [1] kni [ri-1] p [p] wts [3-17]/TM3, S B [1]*. Duas progênie são geradas nesse cruzamento: trans-heterozigoto marcado (*mwh+/+wts*) (MH), e heterozigoto balanceado (*mwh+/+TM3, Sb¹*) (BH). No ensaio de detecção de clones de tumor, apenas a progênie MH é analisada. A identificação da progênie é feita mediante a expressão do balanceador cromossômico TM3, Sb¹, que apresenta, como fenótipo, pêlos curtos e espessos no corpo da mosca, o que difere da progênie MH, que apresenta pêlos longos e finos no corpo da mosca.

As moscas da linhagem *wts* foram mantidas em estoque, nas mesmas condições laboratoriais que as linhagens usadas no Teste SMART. A coleta de ovos e o tratamento de larvas ocorreram da mesma forma e nas mesmas concentrações usadas no teste SMART.

Mitomicina C (MMC) foi usado como controle positivo na concentração de 0,1 mM. Esta concentração foi baseada em estudos de recombinação mitótica em *D. melanogaster* (TSUDA; TAKEDA, 1987) e ensaios de carcinogênese (ORSOLIN, NEPOMUCENO, 2009; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012). No controle positivo Larvas de 3º estágio foram expostas a 0,1 mM de MMC durante 6 horas.

2.3.2 Fixação de moscas e análise de tumor epitelial

Para análise de tumor epitelial, adultos eclodidos do cruzamento *mwh+/+mwh* x *wts+/TM3, Sb¹* foram fixados em etanol 70% (v/v) e analisados sob estereomicroscópio (Bel® Photonics) e placa de Petri embebida com glicerina. A análise baseou-se na contagem de tumores, de acordo com Justice (1995). Os resultados foram registrados em um diagrama padrão, expressando os números observados em cada seguimento das moscas: olhos, cabeça, corpo, asas, pernas e halteres.

2.3.4 Análise estatística

As frequências de tumores epiteliais observados nos indivíduos tratados com as diferentes concentrações de FP e MMC foram comparadas estatisticamente com as frequências de tumores epiteliais observadas nos controles negativo, usando o teste U , não paramétrico, de Mann-Whitney, com nível de significância $p \leq 0,005$.

Comparações estatísticas referentes às taxas de sobrevivência foram realizadas por meio do teste do Chi-quadrado, para razões de amostras independentes.

3. Resultados

FP foi analisado quanto à capacidade de induzir mutações e neoplasias, em células somáticas de *D. melanogaster*, por meio do SMART e do Teste de Detecção de Tumor Epitelial (Teste *wts*), respectivamente.

A escolha das concentrações foi feita mediante ensaio de sobrevivência em larvas expostas a diferentes concentrações do inseticida. No cruzamento ST do SMART, nenhuma das concentrações testadas afetou o processo de formação de pupas. Concentrações de $0,3 \cdot 10^{-5}$ a $3,0 \cdot 10^{-5}$ mM de FP não foram tóxicas em *D. melanogaster*. No entanto, concentrações igual ou superior a $6,0 \cdot 10^{-5}$ mM foram tóxicas, interferindo no processo de metamorfose e afetaram significativamente a sobrevivência das moscas (**Figura 2 A**). No cruzamento HB do SMART, nenhuma das concentrações testadas afetou o processo de pupação. Apenas a menor concentração ($0,3 \cdot 10^{-5}$ mM) não foi tóxica para *D. melanogaster*. Todas as demais concentrações afetaram o processo de metamorfose, interferindo significativamente na sobrevivência das moscas. Água ultrapura (controle negativo) e URE 10 mM (controle positivo) não afetaram a taxa de sobrevivência em ambos os cruzamentos (**Figura 2**).

No cruzamento entre machos *mwh* e fêmeas virgens *wts*, do teste *wts*, nenhuma das concentrações testadas afetou o processo de pupação. A frequência (%) de sobrevivência foi similar à verificada no cruzamento ST. Concentrações de $0,3 \cdot 10^{-5}$ a $3,0 \cdot 10^{-5}$ mM de FP não induziram toxicidade para *D. melanogaster*. No entanto, concentrações igual ou superior a $6,0 \cdot 10^{-5}$ mM foram tóxicas, interferindo no processo de metamorfose e afetaram significativamente a sobrevivência das moscas. Água ultrapura (controle negativo - NC) e MMC 0,1 mM (controle positivo - PC) não afetaram a taxa de sobrevivência (**Figura 3**).

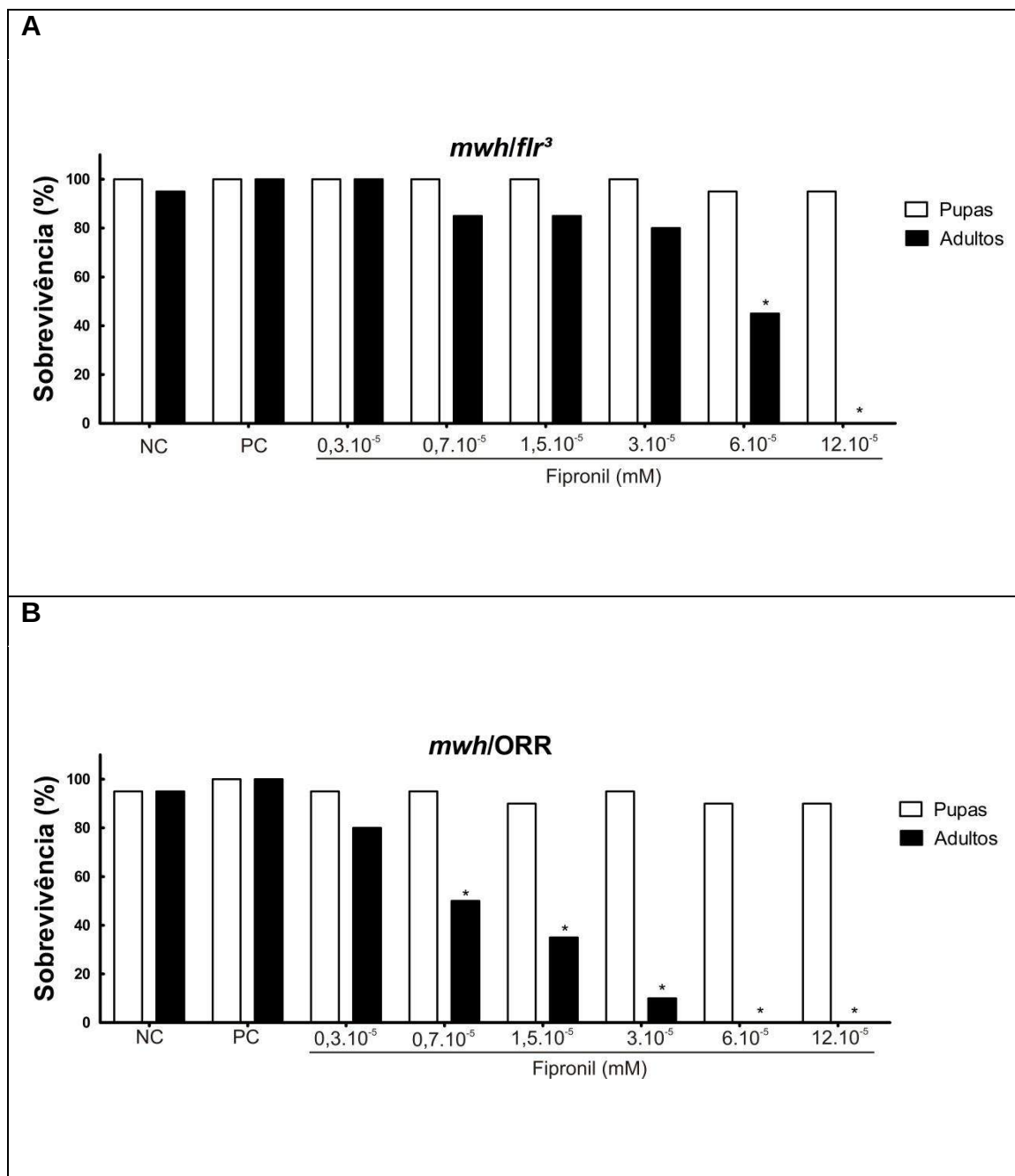


Figura 2. Taxas de sobrevivência das progênes de *Drosophila melanogaster* resultantes dos cruzamentos ST (A) e HB (B). NC = Controle negativo (Água); PC = Controle positivo (Uretano 10 mM); Fipronil (concentrações em mM). *Diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste do Chi- quadrado para razões de amostras independentes.

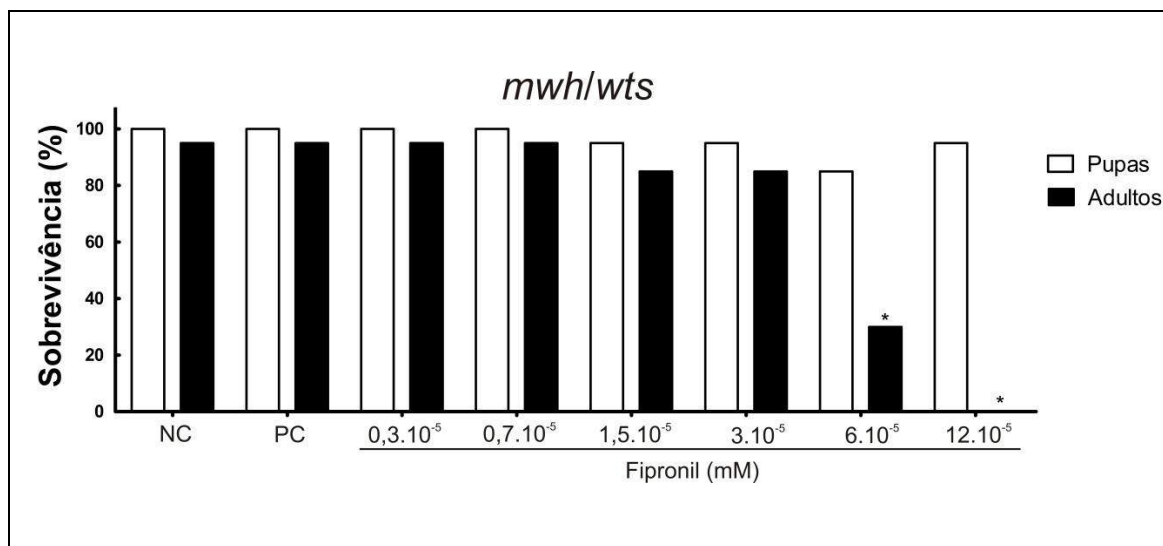


Figura 3. Taxas de sobrevivência das progênes de *Drosophila melanogaster* resultantes do cruzamento *mwh/mwh* x *wts/TM3, Sb¹*. NC = Controle negativo (Água); PC = Controle positivo (Uretano 10 mM); Fipronil (concentrações em mM). *Diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste do Chi- quadrado para razões de amostras independentes.

No SMART, três tipos de manchas foram analisadas separadamente para os marcadores *mwh* e *flr³*: (1) Manchas simples pequenas, caracterizadas pela presença de 1 ou 2 células afetadas; (2) Manchas simples grandes, caracterizadas pela presença de 3 ou mais células afetadas; e (3) Manchas gêmeas, caracterizadas por uma área com pêlos múltiplos e uma área com pêlos flare. Após verificar que resultados obtidos em dois experimentos independentes estavam de acordo, com boa reprodutibilidade, os dados foram agrupados, totalizando 40 moscas (80 asas) analisadas por tratamento.

Os resultados observados nos indivíduos MH dos cruzamentos ST e HB tratados com água (controle negativo), Uretano (controle positivo) e com diferentes concentrações do FP estão apresentados na **Tabela 1**. Para a análise estatística, os resultados obtidos nos grupos tratados com FP e URE foram comparados com o controle negativo.

No cruzamento ST, o FP induziu efeito mutagênico ($P < 0,05$) em todas as concentrações testadas, exceto para a concentração de $0,7.10^{-5}$ mM. As frequências totais de manchas observadas nos grupos tratados não

demonstraram relação dose dependência. Moscas expostas a $0,3 \cdot 10^{-5}$ mM de FP (menor concentração testada) foi a que apresentou as maiores frequências de manchas (simples pequenas, simples grandes e total de manchas). Não foram observadas diferenças entre as frequências de manchas gêmeas entre os grupos tratados com FP, quando comparado com o controle negativo.

No cruzamento HB, todas as concentrações de FP induziram frequências estatisticamente significativas de manchas mutantes ($P < 0,05$) quando comparado ao controle negativo. No entanto, não foi observado relação dose dependência. A maior concentração ($3,0 \cdot 10^{-5}$ mM de FP) induziu a menor frequência de manchas mutantes, em relação aos demais grupos expostos ao FP. No cruzamento HB, também não foram observados aumentos significativos nas frequências de manchas gêmeas.

URE (10 mM) induziu aumento significativo de manchas mutantes em ambos cruzamentos, confirmando a eficácia do teste.

As frequências de manchas *mwh* e *flr*³ foram registradas em um diagrama padrão, expressando o tamanho das manchas em classes. Como apresentada na **Figura 4**, as manchas simples pequenas (de 1 a 3 pêlos mutantes) prevaleceram em relação às manchas simples grandes (de 4 a 256 pêlos), tanto no cruzamento ST quanto no cruzamento HB.

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos com o teste de mutação e recombinação somática (SMART) na progênie trans-heterozigoto marcado (MH) do cruzamento padrão (ST) e cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento crônico de larvas com Fipronil (FP) e Uretano (URE).

Cruzamentos (ST ou HB) e tratamentos (mM)	Manchas por moscas (número de manchas); diagnóstico estatístico [†]					Manchas com clones <i>mwh</i> [§]
	Nº de moscas	Manchas simples pequena	Manchas simples grande	Gêmeas	Total de Manchas	
		(1-2 células) [‡]	(> 2 células) [‡]			
ST						
Controle negativo	40	0.33(13)	0.03(01)	0.00(00)	0.35(14)	13
URE 10	40	2.08(83) +	0.33(13) +	0.00(00) i	2.40(96) +	89
FP						
0,3.10 ⁻⁵	40	0.90(36) +	0.23(09) +	0.08(03) i	1.20(48) +	45
0,7.10 ⁻⁵	40	0.53(21) i	0.08(03) i	0.00(00) i	0.60(24) i	24
1,5.10 ⁻⁵	40	0.40(16) i	0.23(09) +	0.05(02) i	0.68(27) +	24
3,0.10 ⁻⁵	40	0.65(26) +	0.08(03) i	0.00(00) i	0.73(29) +	29
HB						
Controle negativo	40	0.38(15)	0.03(01)	0.03(01)	0.43(17)	17
Uretano 10	40	6.48(259) +	1.30(52) +	1.05(42) +	8.83(353) +	337
FP						
0,3.10 ⁻⁵	40	1.18(47) +	0.08(03) i	0.00(00) i	1.25(50) +	48
0,7.10 ⁻⁵	40	1.13(45) +	0.18(07) +	0.05(02) i	1.35(54) +	52
1,5.10 ⁻⁵	40	1.13(45) +	0.15(06) i	0.00(00) i	1.28(51) +	51
3,0.10 ⁻⁵	40	0.78(31) +	0.10(04) i	0.00(00) i	0.88(35) +	34

[†] Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): *U*-test; níveis de probabilidade: -, negativo; +, positivo; i, inconclusivo; $P \leq 0.05$ vs. controle negativo;[‡] incluindo raras manchas simples *flr*³. [§] Considerando clones *mwh* clones de manchas simples *mwh* e gêmeas.

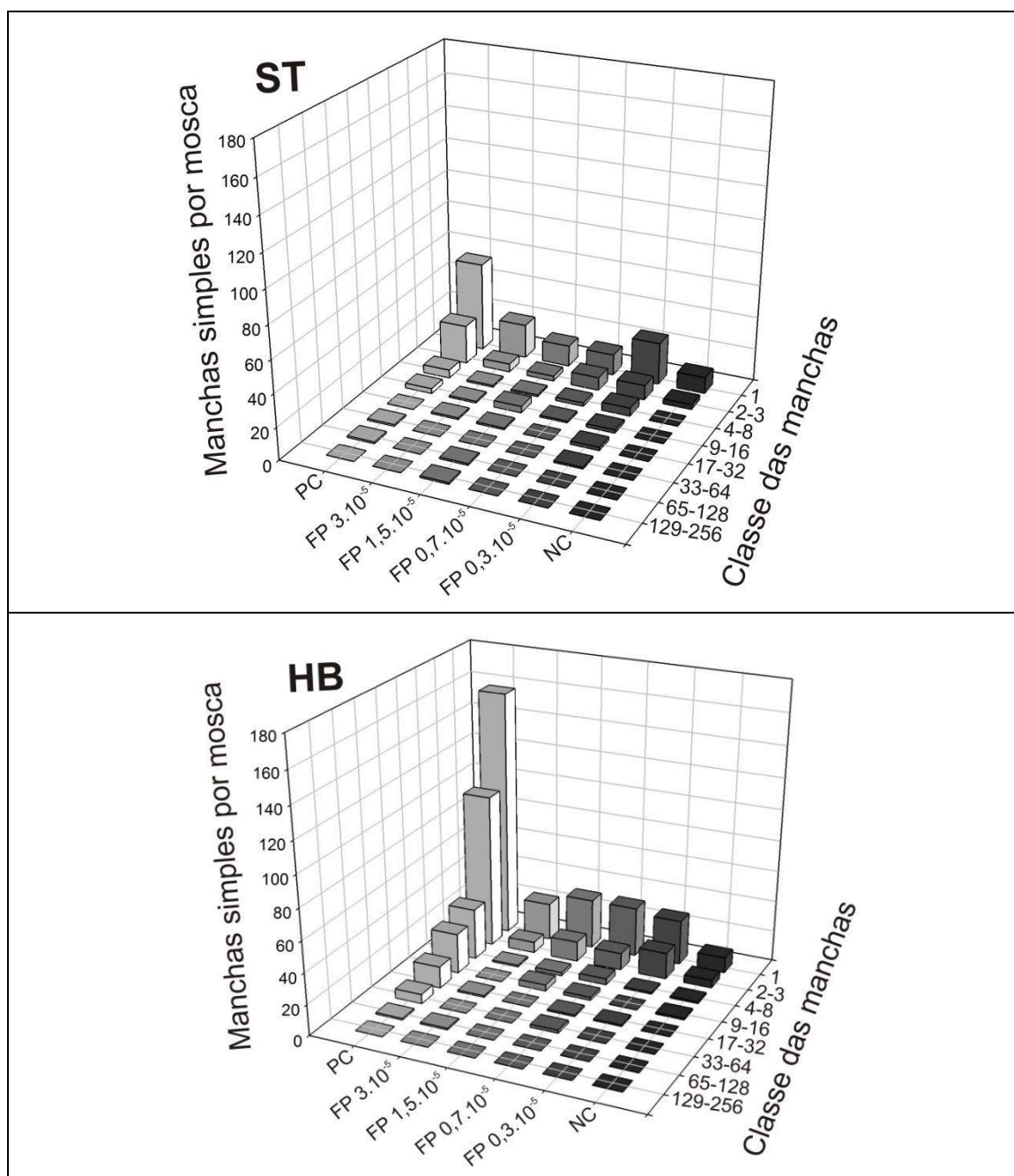


Figura 4. Distribuição das manchas de acordo com as classes em indivíduos dos cruzamentos ST e HB de *Drosophila melanogaster*. PC = Controle positivo (Uretano 10 mM); FP = Fipronil (em mM); NC = Controle negativo (Água). As classes representam a quantidade de pêlos mutantes (*mwh* ou *flr³*) encontrados em cada mancha em asas de *D. melanogaster*.

Para avaliar os possíveis efeitos carcinogênicos do FP, para cada série testada, 200 moscas, de ambos os sexos, foram analisadas quanto à presença de tumor epitelial nos diferentes apêndices (cabeça, olhos, corpo, pernas, asas e halteres). A frequência de tumor epitelial total, bem como a frequência de tumor nos apêndices das moscas foi comparada aos pares (ex: cabeça - controle negativo x cabeça - FP $0,7 \cdot 10^{-5}$ mM). Os resultados das frequências de tumores estão apresentados na **Tabela 2**.

Em todas as concentrações testadas, FP demonstrou ser carcinogênico, induzindo aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) na frequência de tumor total em todas as séries testadas, quando comparado com o controle negativo. Dos 52 tumores encontrados nas moscas expostas a $0,3 \cdot 10^{-5}$ mM de FP, 5,7% estavam presente nos olhos; 7,7% na cabeça; 13,4% nas asas e 73,1% no corpo. Dos 49 tumores encontrados nas moscas expostas a $0,7 \cdot 10^{-5}$ mM de FP, 2 % estavam presentes nos olhos; 10,2% na cabeça; 18,4% nas asas; 55,1% no corpo e 14,3% nas pernas. Na concentração $1,5 \cdot 10^{-5}$ mM, dos 55 tumores expressos na mosca, 5,45% foram encontrados nos olhos e na cabeça; 9,1% nas asas; 61,8% no corpo e 18,2 % nas pernas. Na maior concentração foram identificados 29 tumores nos apêndices das moscas, sendo 3,4% nos olhos e na cabeça; 20,7% nas asas; 62,1% no corpo e 10,3% nas pernas.

Em todas as séries tratadas com FP, o corpo da mosca foi a região onde mais foi encontrado tumor. A maior concentração ($3 \cdot 10^{-5}$ mM) foi a que menos induziu o surgimento de tumor total na mosca.

Tanto o controle negativo (água), quanto o controle positivo (MMC) responderam fielmente ao teste. Moscas expostas à MMC 0,1 mM apresentaram alta frequência de tumor epitelial, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) em todos os apêndices das moscas analisadas.

Distribuições relativas da frequência de tumor epitelial nos apêndices das moscas em função das diferentes séries testadas são apresentadas na **Figura 5**. Nesse trabalho não houve diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) na frequência de tumor epitelial entre fêmeas e machos da linhagem *mwh/wts* expostas ao FP (**Figura 6**).

Tabela 2. Frequência de tumor epitelial observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor *wts* de *D. melanogaster* tratados com diferentes concentrações de Fipronil (FP) e Mitomicina-C (MMC)

Tratamento (mM)	Número de indivíduos	Número de tumores analisados (total de tumores)						
		olhos	cabeça	asas	corpo	pernas	halteres	Total
Controle negativo	200	0,005 (01)	0,000 (00)	0,030 (06)	0,040 (08)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,075 (15)
MMC 0,1	130	0,138 (18)*	0,115 (15)*	2,138 (278)*	0,823 (107)*	0,300 (39)*	0,046 (06)*	3,561(463)*
FP 0,3.10 ⁻⁵	200	0,015 (03)	0,020 (04)*	0,035 (07)	0,190 (38)*	0,000 (00)	0,000 (00)	0,260 (52)*
FP 0,7x10 ⁻⁵	200	0,005 (01)	0,025 (05)*	0,045 (09)	0,135 (27)*	0,035 (07)*	0,000 (00)	0,245 (49)*
FP 1,5x10 ⁻⁵	200	0,015 (03)	0,015 (03)	0,025 (05)	0,170 (34)*	0,050 (10)*	0,000 (00)	0,275 (55)*
FP 3,0x10 ⁻⁵	200	0,005 (01)	0,005 (01)	0,030 (06)	0,090 (18)*	0,015 (03)	0,000 (00)	0,145 (29)*

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância ($P \leq 0,05$).

* Valores considerados diferentes do controle negativo ($P \leq 0,05$). MMC, Mitomicina C.

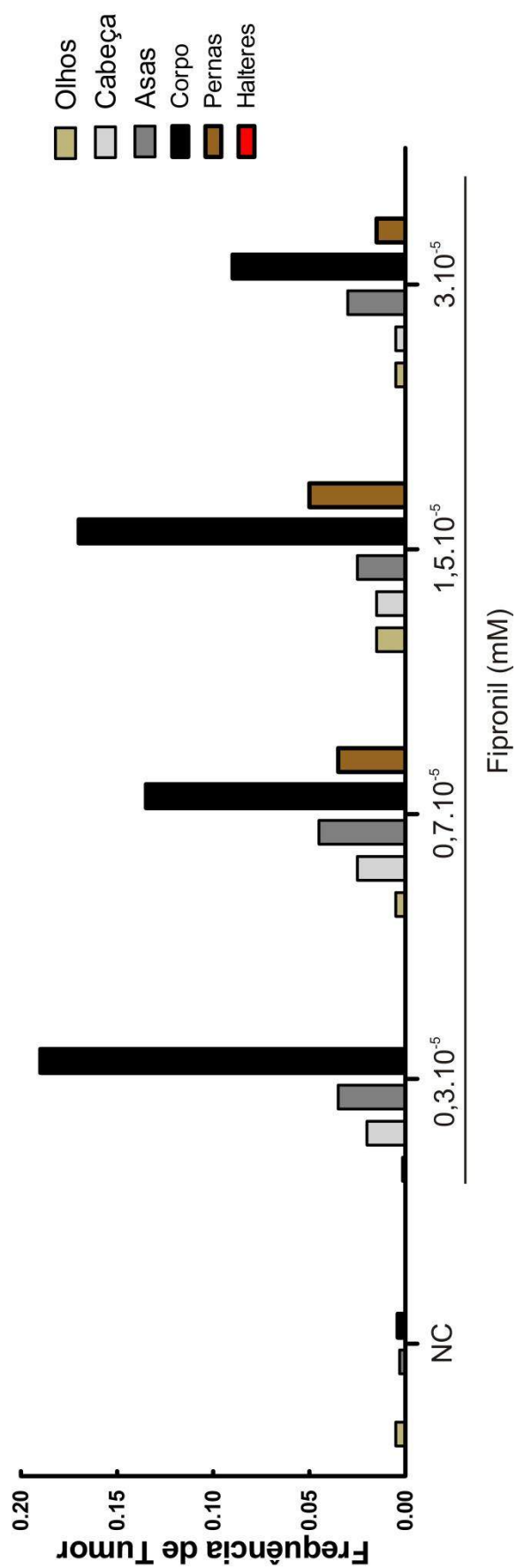


Figura 5. Distribuição de tumores nos apêndices de *Drosophila melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de Fipronil. NC (Controle negativo – água); FP (Fipronil em mM)

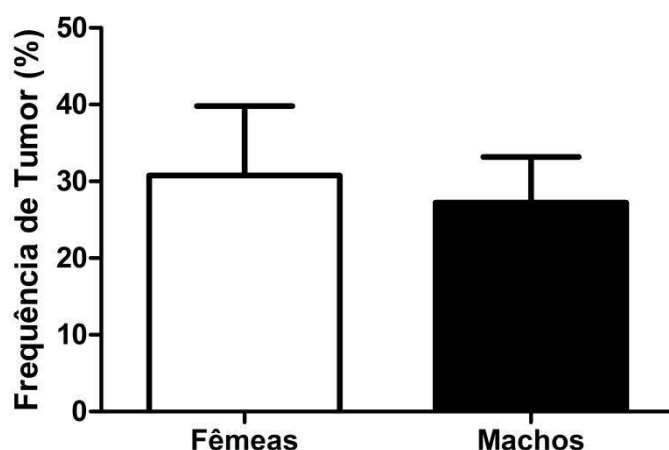


Figura 6. Frequências de tumores observados em fêmeas e machos de *Drosophila melanogaster* expostos ao inseticida Fipronil.

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância ($P \leq 0,05$).

4. Discussão

Na Genética Toxicológica, o SMART e o Teste *wt*s têm sido considerados importantes ferramentas para a avaliação de agentes xenobióticos (PANTALEAO *et al.*, 2007; DANESI *et al.*, 2010; DE REZENDE *et al.*, 2011b; CUNHA e NEPOMUCENO, 2011; ORSOLIN *et al.*, 2012; ALVES e NEPOMUCENO, 2012; REZENDE *et al.*, 2013).

Nas progênie geradas por meio dos cruzamentos ST e *mwh* x *wt*s, FP demonstrou ser altamente tóxico para as larvas expostas cronicamente nas concentrações acima de $6,0 \cdot 10^{-5}$ mM. No cruzamento HB, FP demonstrou maior toxicidade para as larvas, quando comparado aos demais cruzamentos. Este fato se deve à constituição genética das linhagens utilizadas. As linhagens *mwh*, *flr*³, e *wt*s codificam níveis basais de enzimas do complexo citocromo P450 (GRAF *et al.*, 1984), motivo pelo qual foi observado o mesmo padrão de

toxicidade no cruzamento ST e no cruzamento *mwh* X *wts* (**Figuras 2 e 3**). Em contraste, fêmeas da linhagem ORR, usadas no cruzamento HB, possuem nos cromossomos 1 e 2 genes com elevada expressão de enzimas do citocromo P450 (GRAF e VAN SHAIK, 1992). Como os caracteres genéticos são herdados durante a segregação e distribuição alélica na divisão celular, a progênie originada do cruzamento HB também possui as características genéticas da linhagem ORR. A alta toxicidade do inseticida FP neste cruzamento (**Figura 2**) não se deve exclusivamente ao princípio ativo, mas principalmente aos metabólitos gerados após a ativação do FP (metabolização).

Durham, Siegfried e Scharf (2002) estudaram *in vivo* e *in vitro* a toxicocinética da metabolização do FP na larva *Ostrinia nubilalis*. Neste estudo foi constatada a penetração de 71,5% de [¹⁴C] FP no tegumento da larva, após 24 horas de exposição tópica. Os resultados sugerem que a oxidação de FP em FP sulfona é a maior rota de conversão metabólica, e que esta conversão é completamente dependente da atividade de monoxigenases do citocromo P450.

No ambiente FP, pode ser metabolizado e dar origem, basicamente, a quatro diferentes tipos de metabólicos: 1) FP desulfinil (MB46573) por reações de fotólise (HAINZL e CASIDA, 1996; EPA, 1996); 2) FP amida (RPA200766) por meio da hidrólise do grupo nitrila (EPA, 1996; BOBE *et al.*, 1998); 3) FP sulfeto (MB45950) pela redução do substituinte desulfinil (RAMESH e BALSUBRA MANIAN, 1999; ZHAO *et al.*, 2005) e 4) FP sulfona (MB46573) via oxidação do substituinte desulfinil (EPA, 1996; HAINZL e CASIDA, 1996; BOBE *et al.*, 1998; ZHAO *et al.*, 2005).

FP sulfona e FP desulfinil são os metabólitos mais nocivos ao ambiente, sendo considerados altamente tóxicos para insetos, mamíferos, peixes e aves (Hainzl e Casida, 1996). O fato de o inseticida FP ser metabolizado via citocromo P450 em FP sulfona e este apresentar maior toxicidade (EPA, 1996), quando comparado ao ingrediente ativo, corrobora com os resultados obtidos na taxa sobrevivência das moscas do cruzamento HB.

Tanto no SMART, quanto no Teste *wts*, concentrações subletais do FP foram avaliadas quanto à capacidade de induzir a perda de heterozigose dos marcadores *mwh*, *flr³* (SMART) e *wts* (Teste *wts*). Os resultados obtidos, nas

condições testadas, revelaram elevada natureza mutagênica do FP em ambos os cruzamentos (ST e HB) e carcinogênica (*mwh* x *wts*).

No cruzamento ST, o FP demonstrou ser mutagênico em todas as concentrações testadas, exceto na concentração $0,7 \cdot 10^{-5}$ mM (**Tabela 1**). Os resultados observados demonstram não haver relação dose-dependência. FP, na menor concentração testada ($0,3 \cdot 10^{-5}$ mM), induziu a maior frequência de danos no DNA, apresentando resultados positivos nas duas categorias de manchas simples (pequenas e grandes), provavelmente por ser menos citotóxico. Mesmo não reduzindo de maneira significativa a taxa de sobrevivência de *D. melanogaster* (cruzamento ST), o processo de citotoxicidade pode ter ocorrido nas maiores concentrações como apresentado na **Figura 2 A**, reduzindo a quantidade de células (motivo pelo qual as manchas não foram identificadas fenotipicamente)

Existem evidências de que alguns xenobióticos ambientais, incluindo pesticidas, contribuem com a morte celular. FP apresenta toxicidade seletiva a insetos devido às diferenças entre os receptores GABA de insetos e mamíferos (VIDAU *et al.*, 2009). No entanto, dados da literatura demonstram que o inseticida pode apresentar ação tóxica e citotóxica, mesmo na ausência de sítios de ligação no sistema nervoso (DAS *et al.*, 2006; VIDAU *et al.*, 2009; SLOTKIN e SEIDLER, 2009; LASSISTER *et al.*, 2009; VIDAU *et al.*, 2011).

Das *et al.* (2006) avaliaram os efeitos citotóxicos de FP e FP sulfona em células HepG2 e hepatócitos humanos. Nesse trabalho foi constatado a relação dose dependência para a taxa de citotoxicidade em células HepG2, nas doses variando de 0,5 a 50,0 μ M, por meio do ensaio de exclusão de azul de tripano, demonstrando claramente o efeito citotóxico em doses mais concentradas bem como a contribuição do tempo de exposição na taxa de viabilidade celular. Nesse estudo FP Sulfona demonstrou maior porcentagem de citotoxicidade do que o FP.

VidaU *et al.* (2009) estudou o perfil citotóxico do inseticida FP e seus metabólitos em cultura de células Caco-2 do epitélio intestinal humano e demonstraram que, em baixas doses, FP e seus metabólitos interferiram na resistência elétrica transepitelial (TERR) com grande perda na integridade da membrana das células expostas a 150 μ M de FP e seus metabólitos, em diferentes intervalos de tempo. A citotoxicidade foi avaliada mensurando a

atividade de lactato desidrogenase (LDH) após a ruptura da membrana paralelamente à morte celular, o que revelou evento citotóxico decorrido 48 horas de exposição a FP e FP sulfona (100 a 200 μ M). Nesse trabalho, foi avaliada a porcentagem de ATP intracelular em células expostas a diferentes doses de FP e seus metabólitos, demonstrando o decréscimo de ATP de maneira dose e tempo dependente no compartimento intracelular de Caco-2. O FP pode estar interferindo no metabolismo energético (VIDAU *et al.*, 2009) levando a um potencial colapso nas mitocôndrias, liberação de citocromo C no citosol, com concomitante ativação de caspase-3, condensação nuclear, externalização de fosfatidilserina, levando ao processo de morte celular por apoptose (VIDAU *et al.*, 2011).

No cruzamento HB, apesar da elevada natureza tóxica, os metabólitos originados da metabolização do FP, por enzimas do citocromo P-450, foram altamente mutagênicos, induzindo elevada frequência de danos no DNA, evidenciados pelas manchas do tipo *mwh* e *flr*³. Assim como no cruzamento ST, no cruzamento HB as frequências de danos não foram dose dependentes. No HB, as concentrações $1,5 \cdot 10^{-5}$ e $0,7 \cdot 10^{-5}$ mM dobraram as frequências totais de manchas, quando comparado com as mesmas concentrações usadas no cruzamento ST (**Tabela 1**), demonstrando a maior natureza mutagênica após a metabolização do inseticida. Estes resultados demonstraram a importância do cruzamento HB, devido ao aumento do nível de citocromo P450, para a detecção da atividade genotóxica de compostos dependentes de ativação metabólica.

A maior concentração de FP ($3,0 \cdot 10^{-5}$ mM) induziu a menor frequência total de manchas, provavelmente devido à citotoxicidade e toxicidade das concentrações mais elevadas. Na **Figura 2 B** verifica-se que a concentração $3,0 \cdot 10^{-5}$ mM demonstrou maior toxicidade em relação as demais concentrações analisadas no SMART, justificando a menor frequência total de manchas observadas neste trabalho. Baseados nos resultados obtidos na taxa de sobrevivência (**Figura 2**) e na frequência de manchas do cruzamento HB (**Tabela 1**) foi possível verificar que, nestas condições experimentais, FP após a metabolização passa a exercer uma natureza mais tóxica, citotóxica e mutagênica em *D. melanogaster*.

Teoricamente, diferentes tipos de distribuição de manchas são esperadas após a exposição crônica e aguda de larvas de *D. melanogaster* a xenobióticos (GRAF, 1995). Em concordância com Graf *et al.* (1984), tratamento crônico (48 h) resulta na predominância de manchas simples pequenas em relação as manchas simples grandes. Tanto no cruzamento ST, quanto no cruzamento HB, as manchas simples pequenas (classes 1 e 2-3) prevaleceram em relação às manchas simples grandes (classes > 4) (**Figura 4**). Estes dados sugerem que o FP e seus metabólicos causam danos no DNA de maneira tardia, uma vez que os eventos de mutação não são propagados em um grande número de células filhas por meio da divisão celular, resultando na presença de manchas pequenas (1-3 pêlos mutantes).

As capacidades genotóxica e mutagênica do FP têm sido avaliadas em sistemas *in vitro* e *in vivo* (GHISI NDE *et al.*, 2011; ÇELIK *et al.*, 2014).

Çelik *et al.* (2014) avaliaram as capacidades genotóxica e mutagênica da molécula *in vitro* por meio do Ensaio Cometa, Teste do MN (MN) e o Teste de Troca de Cromátides Irmãs (TCI) em cultura de linfócitos. FP demonstrou ser genotóxico e mutagênico em todas as doses testadas (0,1; 0,3 e 0,7 µg/mL) e em todos os sistemas testes, exceto no Teste do MN na dose de 0,1 µg/mL.

Ghisi NDE *et al.* (2011) avaliaram a capacidade do FP induzir danos no DNA por meio do Ensaio Cometa e o Teste do MN, bem como a capacidade da molécula induzir danos hiperplásticos em peixes da espécie *Rhamdia quelen* expostos cronicamente durante 60 dias a 0,05; 0,10 ou 0,23 µg/L de FP. Foi constatado alteração no material genético nos eritrócitos de peixes expostos às concentrações de 0,10 e 0,23 µg/mL apenas no Teste do MN. Tanto o trabalho de Çelik *et al.* (2014), quanto o trabalho de Ghisi *et al.* (2011) demonstraram a relação dose dependência na frequência de danos ao DNA, o que não é corroborado pelos resultados do nosso estudo.

Possivelmente, doses menores de FP estejam associadas a danos mais discretos no material genético, tais como mutação de ponto (deleção, inserção e substituição de bases no DNA), enquanto que doses maiores poderiam estar associadas com danos mais agressivos no material genético, tais como quebra uni e bifilamentar e/ou eventos de não-disjunção mitótica. Mesmo tratando-se de ferramentas robustas no campo da Genética Toxicológica, o Teste do MN, bem como o Ensaio Cometa, não conseguem

identificar mutações pontuais. Por outro lado, o SMART consegue identificar eventos aneugênicos, clastogênicos e mutações pontuais. Os resultados obtidos em nossa análise, bem como os resultados obtidos por outros pesquisadores, sugerem que em doses menores, o mecanismo de ação do inseticida FP pode estar associado a eventos de mutações de ponto.

O Teste *wts* fundamenta-se na premissa que, durante o desenvolvimento dos discos imaginais, a perda da heterozigose desse gene leva à manifestação de células altamente invasivas, as quais são expressas como tumor epitelial nos diversos apêndices da mosca. Os resultados revelaram a elevada frequência de tumor nas moscas exposta ao FP, mostrando resultados positivos na frequência de tumor em todas as concentrações testadas (**Tabela 2**).

A frequência de tumor epitelial foi mais pronunciada no corpo (corpo e abdômen) e nas asas da mosca (**Figura 5**), provavelmente devido à presença de maior número de células que nos demais apêndices. Quanto maior número de células, maior as chances de ocorrerem mutações e, conseqüentemente, maior probabilidade de surgimento de células neoplásicas. Os resultados obtidos aqui, para a frequência de tumores nos apêndices de *D. melanogaster* são concordantes com dados da literatura (SIDOROV *et al.*, 2001; ORSOLIN e NEPOMUCENO, 2009; SILVA e NEPOMUCENO, 2011; COSTA; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2011; FURTADO e NEPOMUCENO, 2012).

Assim como demonstrado pelo SMART, o Teste *wts* mostrou menor frequência de neoplasias epidérmicas na maior concentração ($3,0 \cdot 10^{-5}$ mM), sugerindo evento citotóxico.

Não foram identificadas, nessa análise, diferenças nas frequências de tumores em relação ao gênero (**Figura 6**). Os resultados obtidos nas frequências de tumores em relação ao gênero corresponderam ao esperado, uma vez que o marcador *wts* está situado no cromossomo 3 da mosca (ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012) e a chance de ocorrer uma mutação neste cromossomo autossômico é praticamente a mesma para ambos os gêneros.

Com base nos relatos sobre a toxicocinética do inseticida FP, a chave para a alteração do material genético induzida pela molécula não está associada à sua interação direta com o DNA, mas sim pela sua interferência no

processo normal do estresse oxidativo, com geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (LASSITER *et al.*, 2009; SLOTKIN e SEIDLER, 2010; LEE *et al.*, 2011; KI *et al.*, 2012; GILL e DUMKA, 2013; BADGUJAR *et al.*, 2015a; BADGUJAR *et al.*, 2015b; PARK *et al.*, 2015).

Ki *et al.* (2012) demonstraram que células de neuroplasma humano SH-SY5Y expostas a diferentes concentrações de FP exibiram elevados níveis de ERO, levando à peroxidação de lipídeos da membrana celular, aumentando o estresse oxidativo. A liberação de ERO foi dose-dependente, sendo gerada em maior intensidade na dose mais concentrada (100 μ M). Resultados deste trabalho demonstram a liberação de ERO e morte celular via apoptose, mediante a diminuição da atividade do complexo mitocondrial 1 e comitente ativação de caspase-9 e caspase-3, com liberação de citocromo C mitocondrial para o citosol, decréscimo da expressão de Bcl-2 (uma proteína anti-apoptótica) e fosforilação de *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Adicionalmente, células expostas ao FP demonstraram acumulação de p53 na porção citosólica de maneira dose dependente (PARK *et al.*, 2015). FP também promove a condensação do núcleo e danos no DNA (KI *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2015), bem como reduz a síntese de DNA e de proteínas de maneira dose e tempo dependente (LASSITER *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo é natural e fundamental nos organismos, estando envolvidos na produção de energia, fagocitose, sinalização intracelular, síntese de substâncias biológicas e regulação do crescimento celular (BARRETOS e DAVID, 2006). No entanto, o aumento acima dos níveis normais pode gerar radicais livres altamente reativos, promovendo oxidação de biomoléculas, tais como lipídeos, proteínas e o DNA, podendo afetar a função biológica das moléculas oxidadas (BARRETOS e DAVID, 2006; MAES *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012; ABDULLAH, 2015).

ERO geradas por pesticidas são fortes candidatas ao surgimento de distúrbios neurodegenerativos, tais como a doença de Parkinson e de Alzheimer (GORELL *et al.*, 1998; BOGDANOV *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2004). Em adição, alguns estudos têm demonstrado o aumento do risco do parkinsonismo em indivíduos expostos cronicamente a pesticidas (BROWN *et al.*, 2006). Somado a estes eventos, o aumento da produção de ERO em organismos expostos a diferentes xenobióticos está diretamente associado a

danos genotóxicos, o que aumenta as chances de instalação do câncer (ALBET e MAGEE, 2000; PELUSO *et al.*, 2015).

5. Conclusões

Os resultados obtidos no SMART de asas e no Teste *wts* nos permitem concluir que, nas condições experimentais utilizadas, o inseticida FP é altamente tóxico, mutagênico e carcinogênico para *D. melanogaster*, indicando a necessidade de se ampliar os estudos em outros sistemas teste, células, tecidos ou organismos, visando a obtenção de maiores informações quanto ao risco químico dessa molécula.

CAPÍTULO III

**Efeito do inseticida Fipronil na atividade de
locomoção de *Melipona scutellaris*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**

Resumo

Melipona scutellaris Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) são abelhas sociais, conhecidas popularmente como “Uruçu” e destaca-se por ser polinizadora de diversas plantas nativas e cultivadas. Entretanto, devido a expansão da agricultura brasileira e do uso de medidas de controle de artrópodes-praga, verifica-se o aumento no uso de inseticidas. O inseticida Fipronil atua no sistema nervoso central como um antagonista não competitivo aos receptores GABA, em canais de cloro. Em função da sua ação tóxica, têm sido associado com o declínio de insetos polinizadores. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de doses subletais do inseticida Fipronil na atividade locomotora de abelhas da espécie *M. scutellaris*. Abelhas campeiras foram coletadas ao retornarem à colmeia e expostas a três diferentes concentrações de Fipronil (0,41; 0,041 e 0,0041 ng i.a/abelha) via aplicação tópica. A velocidade média das abelhas foi avaliada 6, 12 e 24 horas após a exposição, por meio do Teste de Locomoção. Os resultados revelaram redução na velocidade das abelhas em todas as doses testadas e em todos os intervalos de tempo quando comparado ao controle (acetona).

Palavras chave: abelhas; *Melipona scutellaris*, Atividade de locomoção; fipronil.

Abstract

Melipona scutellaris Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) are social bees, popularly known as "Uruçu". They are notable as pollinator of several native and cultivated plants. However, due to the expansion of Brazilian agriculture and the use of arthropod pest control, the uses of insecticides are increasing. The Fipronil insecticide acts on the central nervous system as a noncompetitive antagonist to GABA receptors in chloride channels. According their toxic effects the Fipronil has been associated with pollinator insects decline. The objective of this study was to evaluate the effect of sublethal doses of the Fipronil insecticide in locomotor activity of *M. scutellaris* bees. Forager bees were collected upon return to the hive and exposed to three different concentrations of fipronil (0.41, 0.041 and 0.0041 ng ai / bee) by topical application. The average speed of the bees was assessed 6, 12 and 24 hours after exposure by the locomotor activity test. The results revealed reduction in bees speed in all doses tested and in all interval time when compared to the control (acetone).

Keywords: bees; *M. scutellaris*, locomotor activity; fipronil.

1. Introdução

No Brasil, as abelhas sem ferrão são responsáveis pela polinização de 30 a 90% da flora nativa do país (KERR *et al.*, 1996; IMPERATRIZ-FONSECA e NUNES-SILVA, 2010) e dependendo do ecossistema que estão presentes, podem frequentar e realizar a polinização em diversas espécies cultivadas pelo homem (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2006; ROSELINO *et al.*, 2010; MOMMAERTS *et al.*, 2011; MOUTON, 2011; ROCHA, 2012;; BARTOMEUS *et al.*, 2014).

A espécie *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) representante da tribo Meliponini, conhecida popularmente como Urucu, é comumente encontrada na região do Nordeste do Brasil, vivendo em florestas quentes e úmidas entre os Estados da Bahia e Rio Grande do Norte (ROLDÃO, 2011; ALVES *et al.*, 2012). Assim como em *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, Apidae, Apini), a espécie *M. scutellaris* apresenta divisão de castas (rainhas e operárias) e são mantidas em meliponários semelhantes aos apiários. Os favos são organizados de maneira horizontal onde ficam as células que a rainha oviposita, e na zona periférica, potes de alimento (KERR *et al.*, 1996).

Além de sua importância ecológica para a biogeocenose brasileira, a espécie *M. scutellaris* oferece um amplo espectro de benefícios a agricultura, contribuindo com o aumento da variabilidade genética através da polinização de diversas espécies cultivadas pelo homem (CARVALHO *et al.*, 2001; IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2006; ROSELINO *et al.*, 2010; ROCHA, 2012), principalmente em plantas da família das Solenaceas, devido a sua habilidade de polinização por vibração ("*buzz pollination*") (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2006).

Em 2006/2008 uma grande perda de abelhas *A. mellifera* foi registrada nos Estados Unidos, caracterizada pelo desaparecimento de abelhas operárias adultas, em um fenômeno que ficou mundialmente conhecido como *Colony Collapse Disorder* (CCD) ou desordem do colapso da colônia (VANENGELSDORP *et al.*, 2009). Várias hipóteses foram levantadas para explicar este fenômeno, dentre elas (1) patógenos, (2) baixa nutrição e

subsequente desenvolvimento de doenças, (3) fragmentação florestal (4) aquecimento global e (5) contaminantes ambientais. Neste último caso, destaque-se os produtos fitossanitários como, por exemplo, os inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, etc (CORNMAN *et al.*, 2012).

Apesar desse fenômeno estar relacionado com a espécie *A. mellifera*, as abelhas sem ferrão também são susceptíveis a efeitos deletérios por ação antrópica, principalmente por meio da intoxicação com produtos fitossanitários (JOHNSON, 2010).

No Brasil, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) vem investigando o impacto proporcionado por produtos fitossanitários na apicultura, registrando entre 2010 e 2012 mais de cem casos de mortes de abelhas (EVANGELISTA-RODRIGUES e MONDEGO, 2014). Em abelhas nativas do Brasil, vários trabalhos demonstram aspectos negativos oriundos da exposição à inseticidas em doses letais e subletais (LOURENÇO *et al.*, 2012a; TOMÉ *et al.*, 2012; JACOB *et al.*, 2013; JACOB *et al.*, 2014).

O fenilpirazol 5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-[(trifluoromethyl)sulfinyl]-1*H*-pyrazole-3-carbonitrile), conhecido como Fipronil (FP) é um inseticida comumente utilizado no combate de pragas em sistemas agrícola e também na saúde animal (ANVISA, 2005). FP surgiu na década de 1990, descoberto por May e Baker e desenvolvido por Rhône – Poulenc, sendo introduzido no mercado agrícola nos Estados Unidos em 1996 (BOBÉ *et al.*, 1998).

FP apresenta ação não-competitiva e antagonista aos receptores do GABA (COLE *et al.*, 1993; DAS *et al.*, 2006) em canais de cloro, bloqueando o influxo de íons de Cl⁻ em sinapses inibitórias de neurônios (CONNELLY, 2001; AAJOUD *et al.*, 2003; STENERSEN, 2004).

Como consequência do bloqueio das vias de entrada de cloro, o impulso nervoso é comprometido, resultando em uma atividade neural excessiva (COLE *et al.*, 1993). Quando expostos ao inseticida, os insetos contaminados passam apresentar problemas de hiperexcitação dos músculos e

nervos, paralisia severa e morte (BOBÉ *et al.*, 1998; GUNASEKARA; TROUNG, 2007).

Mesmo sendo considerado um inseticida eficaz, FP é altamente tóxico para abelhas (LOURENÇO *et al.*, 2012a), sendo apontado, em conjunto com inseticidas da classe dos neonicotinóides, os principais contribuintes químicos para o desaparecimento desses insetos.

Efeitos de doses subletais de FP podem resultar em mudanças comportamentais e moleculares, podendo afetar o desenvolvimento de colônias, atividade motora (ZALUSKI *et al.*, 2015), aprendizagem e memória olfatória (BERNADOU *et al.*, 2009; EL HASSANI *et al.*, 2009), redução da atividade mitocondrial (NICODEMO *et al.*, 2014), citotoxicidade de células dos corpos de cogumelo (JACOB *et al.*, 2014) e redução da imunidade por meio de eventos sinérgicos entre o inseticida e patógenos de abelhas (AUFAUVRE *et al.*, 2012).

Abelhas estão constantemente expostas a diferentes classes de pesticidas nas matrizes forais. A exposição crônica de abelhas no campo a doses subletais são mais preocupantes do ponto de vista ecotoxicológico, uma vez que a coleta de matrizes com pesticidas pode resultar na contaminação interna da colônia, e posteriormente, resultar em problemas na coesão do ninho.

A presente investigação teve como objetivo avaliar o efeito de doses subletais do inseticida FP na atividade de locomoção de abelhas sem ferrão da espécie *M. scutellaris*. As doses empregadas neste estudo são compatíveis com as encontradas no ambiente (realísticas).

2. Material e Métodos

2.1 Declaração de Ética

Não há necessidade de licença científica quanto ao uso de invertebrados em pesquisas, não sendo necessário aprovação do Comitê de Ética para realização do estudo. O material biológico foi coletado no Meliponário UFU, mantido para fins de pesquisas científicas.

2.2 Material Biológico

Foi utilizado como material biológico, abelhas operárias forrageiras da espécie *M. scutellaris*, mantidas no Meliponário UFU da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais (S 18° 55' / W 45° 17'). Os experimentos foram conduzidos e analisados no Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica da mesma Universidade.

As colônias foram inspecionadas quanto à presença ou ausência de sinais que denotassem uma qualidade saudável do ninho. Não houve indícios visuais de fatores abióticos ou bióticos que prejudicassem a integridade do Meliponário, portanto, as colônias foram aprovadas e caracterizadas como em perfeitas condições de saúde para as análises.

2.3 Compostos químicos e tratamentos

O inseticida FP (99%) foi fornecido pela empresa Dalian Raiser Pesticides (China). Para o preparo das doses, o FP foi diluído em acetona P.A (Merck) (99%) na proporção 1:1 obtendo-se uma solução estoque de 1000 ng i.a/μL acetona, mantida em frasco de vidro protegido da luz e preservado a -10°C. A partir da solução estoque foram preparadas as demais soluções de trabalho.

As doses empregadas nos diferentes tratamentos deste trabalho, foram estimadas com referência na DL₅₀ de 0,41 ng i.a/abelha (exposição tópica - 48 horas) para *M. scutellaris*, estabelecida por LOURENÇO *et al.* (2012b). Assim,

as abelhas campeiras foram expostas às doses de 0,41 ng i.a/abelha (DL_{50}); 0,041 ng i.a/abelha ($DL_{50/10}$) e 0,0041 ng i.a/abelha ($DL_{50/100}$). Acetona foi utilizada como controle negativo segundo metodologias internacionais (OECD, 1998, ROAT *et al.*, 2012.; LOURENÇO *et al.*, 2012a., OLIVEIRA *et al.*, 2013; JACOB *et al.*, 2013; MEDRZYCKI *et al.*, 2013). Ensaios prévios conduzidos com água e acetona não demonstraram diferenças no comportamento das abelhas, sendo assim apenas o controle acetona foi incluído nos experimentos.

As abelhas foram coletadas na entrada de três colmeias durante o período da manhã, priorizando a coleta de abelhas que estavam retornando à colmeia com pólen na corbícula.

Em laboratório as abelhas foram anestesiadas por 10 segundos com uso de gás carbônico (CO_2) (MORAES *et al.*, 2000; IWASA *et al.*, 2004; LOURENÇO *et al.*, 2012) e pesadas em balança analítica de precisão.

Para cada grupo experimental foram utilizadas 15 abelhas (5 forrageiras de cada colônia), as quais foram expostas topicamente a um volume de 1 μ L (região dorsal do tórax das abelhas) nas diferentes concentrações de FP e ao controle acetona. Após aplicação, as abelhas foram acondicionadas em gaiolas plásticas (500 mL) na ausência de tampa por 5 minutos, respeitando o tempo para melhor volatilização do solvente. Posteriormente, as gaiolas foram tampadas e mantidas em estufa a $31\pm 2^\circ C$ e $65\pm 5\%$ de umidade relativa. Foram fornecidos água e alimento (solução de mel de *A. mellifera* + água) embebido em algodão durante todo o experimento.

Abelhas que apresentaram comportamentos anormais tais como tremores, letargia, bater de asas e paralisia, foram previamente descartadas na fase inicial do experimento. Decorrido o tempo de exposição, 6, 12, e 24 horas, as abelhas foram submetidas ao Teste de Atividade de Locomoção. Estes intervalos de tempo foram selecionados para melhor compreensão das diferenças de comportamento (velocidade) em função do tempo de exposição ao FP.

2. 4 Teste de Atividade de Locomoção

O Teste de Atividade de Locomoção foi conduzido em uma caixa (80 cm x 30 cm x 4 cm) dividido em 6 raia. Após 6, 12 e 24 h de exposição ao inseticida, as abelhas de cada grupo amostral foram colocadas na entrada de cada raia e liberadas. A caixa de teste foi posicionada verticalmente e na parte superior da caixa foi colocada uma lâmpada fluorescente para funcionar como atração para as abelhas, por fototropismo positivo. Trinta segundos antes de iniciar o teste, a lâmpada foi ligada. Foram liberadas cinco abelhas em cada rodada do experimento, realizado em triplicata. A atividade de locomoção foi mensurada por meio do tempo que as abelhas levaram para atingir a marca de 50 cm na caixa. O experimento foi filmado com filmadora FUJIFILM FinePix SL260. A filmagem foi interrompida quando as cinco abelhas atingiram a marca de 50 cm.

2.5 Análise estatística

Os dados de velocidade foram analisados utilizando o software R (2015) pela rotina GLM, distribuição gaussiana e função de ligação identidade. A comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Scott e Knott (1974) ($P \leq 0,05$).

3. Resultados e Discussão

A capacidade cognitiva das abelhas, a qual envolve gustação, aprendizagem olfatória e atividade motora, são funções essenciais para o sucesso de coleta de recursos (HASSANI *et al.*, 2005). Nesse contexto, o Teste de Atividade de Locomoção foi usado nesse estudo para avaliar a influência de doses subletais de FP na velocidade de abelhas.

Abelhas sem ferrão da espécie *M. scutellaris* foram expostas a três diferentes doses de Fipronil (0,41; 0,041 e 0,0041 ng i.a/abelha) e ao controle (acetona). Para cada grupo, 15 abelhas foram utilizadas (cinco em cada repetição), totalizando 60 indivíduos. Após a exposição tópica ao inseticida, a velocidade média (cm/s) foi avaliada em três diferentes intervalos de tempo, 6, 12 e 24 horas.

Houve diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) na velocidade média das abelhas expostas, em todas as doses de FP testadas quando comparadas com o controle acetona (**Figura 1**). Os resultados obtidos neste experimento não demonstraram relação dose-dependência, uma vez que doses menores foram capazes de reduzir a velocidade média das abelhas de maneira mais pronunciada do que doses maiores.

Após 6 horas de exposição tópica ao inseticida FP, abelhas do grupo controle apresentaram maior velocidade ($3,62 \pm 0,33$ cm/s) quando comparadas com os tratamentos DL_{50} ($2,81 \pm 0,35$ cm/s), $DL_{50/10}$ ($2,55 \pm 0,40$ cm/s) e $DL_{50/100}$ ($2,22 \pm 0,42$ cm/s). Após 12 horas da aplicação tópica do FP a velocidade média das abelhas expostas à dose DL_{50} foi de $1,00 \pm 0,20$ cm/s, para $DL_{50/10}$ de $1,09 \pm 0,32$ cm/s e $DL_{50/100}$ de $0,86 \pm 0,24$ cm/s. Para o tratamento controle na avaliação de 12 horas a velocidade média das abelhas exposta apenas à acetona foi de $2,16 \pm 0,43$ cm/s. No tempo de 24 horas pós-tratamento, as abelhas do controle negativo apresentaram maior velocidade ($3,30 \pm 0,38$ cm/s) diferindo estatisticamente ($P \leq 0,05$) da DL_{50} ($1,89 \pm 0,31$ cm/s), $DL_{50/10}$ ($1,54 \pm 0,31$ cm/s) e $DL_{50/100}$ ($1,33 \pm 0,31$ cm/s).

O experimento foi conduzido em três períodos dentro de 24 horas e, assim um deles ocorreu no período noturno, às 21:00 h. Abelhas forrageiras

são ativas durante o dia, mas durante a noite permanecem nas colônias, diminuindo sua atividade (ROSELINO *et al.*, 2010). O intervalo de 12 horas pós-exposição ocorreu durante a noite, o que favoreceu a redução da velocidade média das abelhas, inclusive as do grupo controle (**Figura 2**). No tempo de 24 horas foi observada maior redução da velocidade de abelhas expostas ao FP quando comparada ao grupo exposto durante 6 horas. Isto pode ser explicado pela cinética da molécula FP, como descrito por Pereira *et al.* (2010) e Durham *et al.* (2002) que sugerem que a molécula possui mecanismo de penetração lenta no tegumento do inseto e ação tóxica tardia.

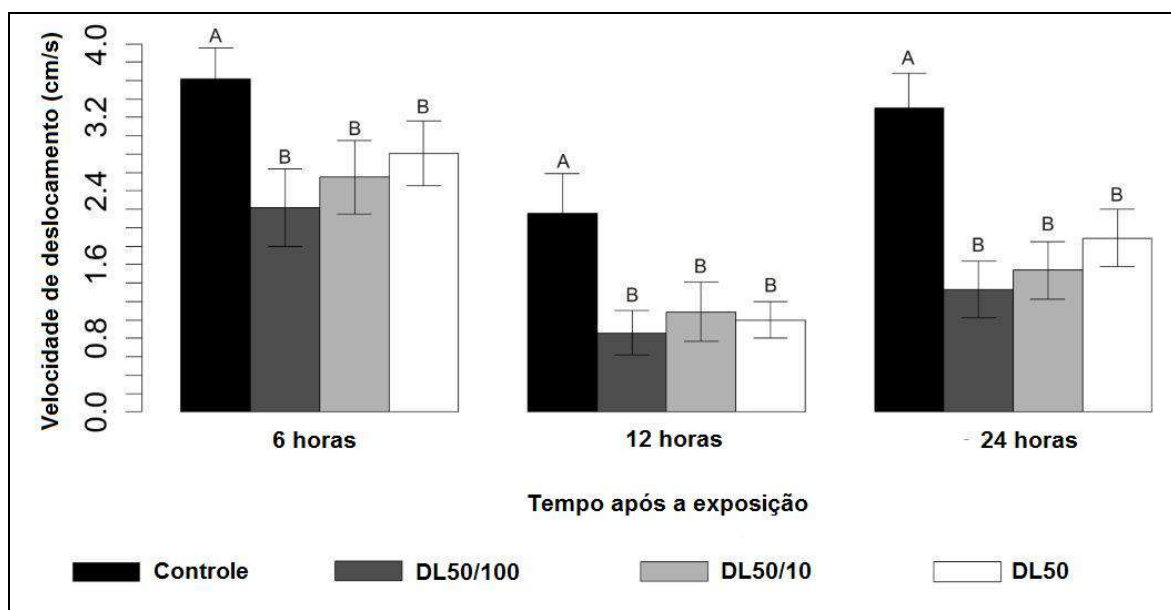


Figura 1. Velocidade média de abelhas *Melipona scutellaris* expostas a diferentes doses de FP. Controle (acetona P.A) DL₅₀ (0,41 ng i.a/abelha) DL_{50/10} (0,041 ng i.a/abelha) DL_{50/100} (0,0041 ng i.a/abelha).

* Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott & Knott (1974) ($P \leq 0,05$).

Mesmo não tendo sido determinada a DL_{50} para a população de *M. scutellaris* avaliada, foi observado efeito deletério em 40% das abelhas expostas a dose de 0,41 ng i.a/abelha 24 horas após aplicação tópica, conforme previamente discutido por Lourenço *et al.* (2012a).

Os inseticidas em sua grande maioria atuam principalmente no sistema nervoso central, podendo prejudicar a capacidade de aprendizagem e memória, levar a paralisia das asas, pernas e sistema digestório (CARILLO *et al.*, 2013). FP é altamente tóxico para abelhas (GUNASEKARAN *et al.*, 2007). Nas doses subletais, avaliadas não foi observado a morte de indivíduos, porém foram observadas mudanças comportamentais como paralisia e bater excessivo de asas em abelhas expostas a 0,0041 ng i.a/abelha nos tempos de 6, 12 e 24 horas e para 0,041 ng i.a/abelha nos tempos de 12 e 24 horas. Eventos de hiperexcitabilidade motora, seguidos por paralisia foram observados nas abelhas expostas a 0,41 ng i.a/abelha nos tempos de 12 e 24 horas de exposição.

Algumas abelhas não conseguiram iniciar ou completar o percurso na pista de teste (50 cm). Como mostra na **Figura 2**, no grupo controle (acetona) 20% das abelhas não alcançaram a meta após 12 horas de exposição. Foram observadas abelhas que não conseguiram iniciar ou completar o percurso em todas as doses de FP e tempos avaliados, exceto na dose 0,41 ng i.a/abelha após 6 horas de exposição, quando 33,3% e 13,3% das abelhas expostas a 0,0041 e 0,041 ng i.a/abelha, respectivamente não completaram o percurso. Decorridos 12 horas de exposição 53,3%; 66,6% e 60% dos insetos expostos a 0,0041; 0,041 e 0,41 ng i.a/abelha, respectivamente não completaram o percurso. Decorridos 24 horas de exposição, 46,6%; 33,3% e 33,3% das abelhas expostas a 0,0041; 0,041 e 0,41 ng i.a/abelha respectivamente, não percorreram a distância de 50 cm.

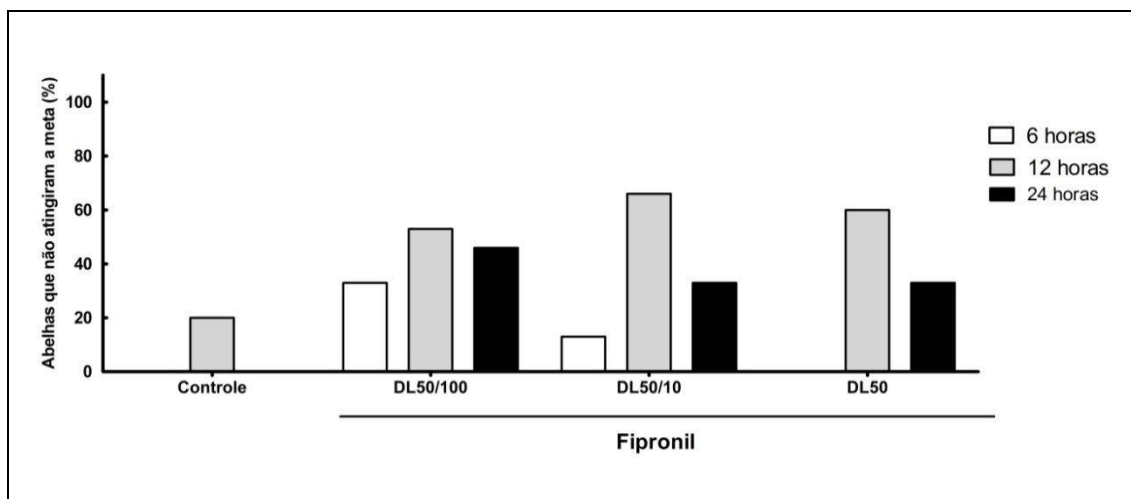


Figura 2. Abelhas que não iniciaram ou terminaram o percurso de 50 cm no Teste de Atividade de Locomoção em diferentes doses e tempos de exposição. Controle (Acetona P.A); DL₅₀ (0,41 ng i.a/abelha) DL_{50/10} (0,041 ng i.a/abelha) DL_{50/100} (0,0041 ng i.a/abelha).

Um dos métodos usados para avaliar a periculosidade de inseticidas advém de testes com a espécie *A. mellifera* por meio da determinação da dose ou concentração capaz de causar a morte em 50% da população testada (OECD/OCDE, 1998). Dados da literatura mostram que algumas espécies de abelhas, incluindo as abelhas nativas do Brasil, podem apresentar maior sensibilidade a algumas classes de pesticidas quando comparadas à sensibilidade de *A. mellifera* (ARENA e SGOLASTRA, 2014).

Geralmente os testes de toxicidade são conduzidos por meio da exposição aguda de abelhas aos inseticidas durante 24 e 48 horas e os resultados são gerados de acordo com a forma de exposição, por contato ou por ingestão (DEVILLERS, 2000). Os dados de intoxicação aguda (DL₅₀ e CL₅₀) são importantes, mas não são suficientes para estimar o risco proporcionado por envenenamento crônico das abelhas. Durante a coleta de recursos, abelhas são expostas a diferentes poluentes tais como inseticidas, fungicidas, acaricidas e herbicidas, quer seja por contato, inalação e ingestão (CARRILHO *et al.*, 2013).

Dois eventos são passíveis de acontecer com abelhas contaminadas com pesticidas no campo: (1) Efeitos letais: que são observados pelo aumento da taxa de mortalidade de abelhas ao entrar em contato com doses elevadas (CRESSWELL, 2011); (2) Efeitos subletais: que se manifestam individualmente ou em populações de abelhas, por aspectos anormais de crescimento, fecundidade, longevidade, ou mudanças de comportamento (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007).

No presente estudo, em todos os intervalos de tempo analisados, a menor dose subletal testada de 0,0041 ng i.a/abelha ($DL_{50/100}$) foi a que mais reduziu a velocidade de *M. scutellaris*. Tal evento é preocupante do ponto de vista ecotoxicológico uma vez que, doses menos concentradas são mais passíveis de serem encontradas no campo.

Neste sentido, Chauzat *et al.* (2006) avaliaram a presença de resíduos de pesticidas em abelhas, em cinco apiários na França. Foram identificados resíduos de várias classes de pesticidas em 81 amostras de abelhas e dentre elas 10 continham resíduos de FP (1,2 µg/Kg) e 9 com resíduos de FP sulfona (0,3 µg/Kg), um metabolito mais tóxico do que a molécula original FP (HAINZL e CASIDA, 1996). Nesse mesmo país, durante três anos de monitoramento, FP foi identificado em amostras de abelhas e pólen, com média de 0,5 e 1,2 µg/Kg respectivamente. Resíduos de FP sulfona e FP desulfinil foram também encontrados nessas matrizes (CHAUZAT *et al.*, 2011). Em um estudo semelhante realizado por Colin (2004) foram detectados 0,002 a 2 g de FP/Kg em 65% do pólen de girassol e do milho analisados.

Em um ano, cada colônia de *A. mellifera* pode coletar até 55 Kg de pólen e precisam produzir de 60 a 80 Kg de mel para suprir as necessidades energéticas do ninho (RORTAIS *et al.*, 2005). Durante o ciclo de vida e em determinadas estações do ano, as abelhas podem consumir de 59,4 a 792 mg de açúcar e de 5,4 a 65 mg de pólen (RORTAIS *et al.*, 2005). Em função desse consumo de produtos obtidos das matrizes florais, as abelhas estão cotidianamente expostas a diferentes doses e classes de pesticidas, por contato e ingestão.

Dependendo da monocultura ou do método de aplicação, os produtos formulados a base de FP, podem apresentar concentração de aplicação de 150 a 400 µg/mL (PEREIRA *et al.*, 2010). Estas concentrações correspondem a valores que excedem em 365 e 975 vezes o valor da dose mais concentrada usada em nosso estudo, de 0,41 ng/abelha, a qual já foi capaz de alterar o comportamento de *M. scutellaris*.

Dependendo da abundância de recurso floral no ambiente, as abelhas (*A. mellifera*) podem percorrer um raio de 10 a 12 km de distância (PORRINI *et al.*, 1998; O'NEAL e WALLER, 1984), porém para garantir uma eficiente coleta de material floral no campo, as abelhas precisam estar em perfeitas condições de saúde. Os resultados obtidos em nossa análise apresentam aspectos preocupantes em relação as atividades externas da colmeia, uma vez que a partir do momento em que a atividade de locomoção é comprometida, as abelhas ficam mais susceptíveis às condições ambientais, podendo se perder durante o percurso ou serem facilmente predadas.

Pereira *et al.* (2010) avaliaram a toxicidade e os efeitos da exposição de FP e outros inseticidas da classe dos neonicotinóides (Acetamiprido e Tiametoxam) sobre o comportamento de *A. mellifera*. Neste trabalho, FP administrado topicamente, mostrou maior toxicidade para as abelhas em comparação aos demais inseticidas neonicotinóides. A DL₅₀ (1,9 ng/abelha) calculada nesse estudo foi capaz de reduzir a velocidade das abelhas após 4 horas de exposição. Em nossa análise, a exposição de *M. scutellaris* ao FP reduziu a velocidade das forrageiras, após 6 horas de exposição.

El Hassani *et al.* (2005) estudaram o efeito de FP sobre a capacidade gustativa, sobre a atividade de locomoção e memória olfativa de abelhas *A. mellifera* expostas tópicamente e oralmente a 0,1, 0,5 e 1,0 ng/abelha. A dose mais concentrada, 1,0 ng/abelha afetou a percepção gustativa, uma hora após a exposição. Não foi observado alteração na atividade motora em nenhuma das doses testadas.

Os resultados obtidos no nosso estudo divergiram dos resultados de Pereira *et al.* (2010) e El Hassani *et al.* (2005) uma vez que as alterações comportamentais em *M. scutellaris* foram mais pronunciadas na dose menos

concentrada. Mudanças comportamentais em doses menos concentradas também foram observadas no trabalho de Alioune *et al.* (2009), onde foi constatada alteração da capacidade gustativa em abelhas exposta oralmente a 0,01 ng/abelha.

Além do efeito na atividade de locomoção em organismos polinizadores, FP pode causar diversos outros danos comportamentais e moleculares. Carillo *et al.* (2013) avaliaram a toxicidade do inseticida FP sobre a capacidade de aprendizado de *A. mellifera*. Abelhas exposta oralmente a CL₅₀ (0,28 ± 0,11) apresentaram problemas de aprendizado no ensaio REP condicionado. Quando expostas a 0,75 e 0,15 ng/abelha, Decourtye (2005) observou o decréscimo da capacidade olfativa de *A. mellifera*, que pode ser devido ao efeito bloqueador de cloro no lobo antenal do sistema nervoso desses insetos (BARBARA, 2005).

Abelhas nativas do Brasil, *Scaptotrigona postica* tratadas tópica e oralmente com 0,27, 0,54 e 1,08 ng i.a μL^{-1} de FP apresentaram mudanças no núcleo e nas organelas celulares com morte celular e impacto nos corpos de cogumelo (JACOB *et al.*, 2014).

Vidau *et al.* (2011) avaliaram o efeito sinérgico de *Nosema ceranae* e inseticidas (FP e Tiacloprid) sobre a mortalidade de *A. mellifera*. Neste estudo, abelhas contaminadas com o fungo e expostas tanto a FP quanto ao Tiacloprid apresentaram maior taxa de mortalidade quando comparado com grupos tratados isoladamente com os inseticidas ou quando apenas infectados com *N. ceranae*. O efeito sinérgico neste estudo não foi relacionado ao decréscimo do sistema de desintoxicação, mas sim ao favorecimento de propagação do fungo nas abelhas.

Reportada pela primeira vez nos Estados Unidos (2006-2007) a síndrome da desordem do colapso da colônia (CCD) é caracterizada pelo desaparecimento de abelhas adultas operárias (COX-FOSTER *et al.*, 2007). Em abelhas nativas do Brasil não há dados concretos relatando esse fenômeno, porém vários trabalhos destacam aspectos negativos em abelhas expostas a pesticidas (PEREIRA *et al.*, 2010; LOURENÇO *et al.*, 2012; TOMÉ *et al.*, 2012; JACOB *et al.*, 2013; JACOB *et al.*, 2014).

Segundo a Diretiva 91/414/EEC da União Européia, FP pode ser comercializado e utilizado apenas para fins de tratamento de sementes, resguardando o contato de abelhas ao princípio ativo (EUROPEAN COMMISSION, 2010). Mesmo com a autorização do comércio de FP, poucos países autorizaram seu uso, entre eles a Bélgica, Espanha e a França. No Brasil, além do tratamento de sementes, foi autorizado o uso de FP para o controle de pragas, em ciclo tardio, por pulverização, o que oferece grande risco aos insetos polinizadores (MAPA, 2015).

Apesar de nossos resultados apontarem para o comprometimento de *M. scutellaris* após intoxicação com FP, estes compostos não são os únicos responsáveis pelo declínio de polinizadores no ecossistema brasileiro. Outros fatores já foram reportados como contribuintes para o processo tais como patógenos, baixa nutrição, fragmentação florestal e intensificação da agricultura (WINFREE *et al.*, 2009; CORNMAN *et al.*, 2012; VANBERGEN, 2013; DEGUINES *et al.*, 2014), mudanças climáticas (GIANNINI *et al.*, 2012), baixa variabilidade genética (CHAUZAT *et al.*, 2013) e manejo inadequado (KERR *et al.*, 1996).

4. Conclusões

O Teste de Atividade de Locomoção permitiu concluir que:

1-Todas as doses de Fipronil (FP) testadas promoveram redução da velocidade das abelhas quando comparado ao controle (acetona).

2- A dose menos concentrada de FP (0,0041 ng i.a/abelha) foi a que mais reduziu a velocidade de abelhas em todos os intervalos de tempo de exposição.

3- FP em doses letais e subletais são prejudiciais para abelhas sem ferrão da espécie *M. scutellaris*, alterando a atividade locomotora e podendo comprometer a atividade de coleta de recursos, além do retorno à colmeia.

5. Referências

- AAJOUD, A.; RAVANEL, P., TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51:1347-1352, 2003.
- ABDULLAH, A.H.; MOHAMMED, A.S.; RASEDEE, A.; MIRGHANI, M.E.S.; AL-QUBAISI, M.S. Induction of apoptosis and oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer, MDA-MB231 cells, by ethanolic mango seed extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 1: 3-17, 2015.
- ABRAMSON, C.I.; AQUINO, I.S.; STONE, S.M. Failure to find proboscis conditioning in one-day old africanized honey bees (*Apis mellifera*) and in adult urucu honey bees (*Melipona scutellaris*). **International Journal of Comparative Psychology**. 12: 242-262, 1999.
- AILOUANE, Y., LAMBIN, M., ARMENGAUD, C., EL HASSANI, A., GARY, V. Subchronic exposure of honey bees to sublethal doses of pesticides: Effects on behavior, **Environmental Toxicology and Chemistry**. 28: 113-122, 2009.
- ALBERT, R.E.; MAGEE, P.S. The tumorigenicity of mutagenic contact-sensitizing chemicals. **Risk Anal**. 20: 317-325, 2000.
- ALVES, R.M.O.; CARVALHO, C.A.L.; SOUZA, B.A.; SANTOS, W.S. Areas of natural occurrence of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) in the state of Bahia, Brazil. **Annals of Brazilian Academy of Sciences**. 84: 679-688, 2012.
- ALVES, E.M.; NEPOMUCENO, J.C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do avelós (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**. 2: 125-140, 2012.
- AMARAL, V.S.; SINIGAGLIA, M., REGULY, M.L., ANDRADE, H.H.R. Genetic toxicity in surface water from guáíaba hydrographic region under the influence of industrial, urban and agricultural sewage in the *Drosophila* wing-spot test. **Environmental Pollution**. 139: 469-476, 2006.
- ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M. Teste para a detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In: RIBEIRO, R.L.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. ULBRA, 1: 281-307, 2003.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública nº 11, de 11 de março de 2005. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B9774-1-0%5D.PDF>. Acesso em 30 de outubro de 2014.

- ARENA, M.; SGOLASTRA, F. A meta-analysis comparing the sensitivity to pesticides. **Ecotoxicology**. 23: 324-334, 2014.
- ARTZ, D.R.; NAULT, B.A. Performance of *Apis mellífera*, *Bombus impatiens*, and *Peponapis pruinosa* (Hymenoptera: Apidae) as pollinators of pumpkin. **Journal of Economic Entomology**. 104: 1153-1161, 2011.
- AUFAUVRE, J.; BIRON, D.G.; VIDAU, C.; FONTBONNE, R.; ROUDEL, M.; DIOGON, M.; VIGUÉS, B.; BELZUNCES, L.P.; DELBAC, F.; BLOT, N. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema cerenae* and fipronil synergy on honeybee. **Scientific Reports**. 2: 1-7, 2012.
- BADGUJAR, P.C.; CHANDRATRE, G.A.; PAWAR, N.N.; TELANG, A.G.; KURADE, N.P. Fipronil induced oxidative stress involves alterations in SOD1 and catalase gene expression in male mice liver: Protection by Vitamins E and C. **Environmental Toxicology**. 1-12: 2015b.
- BADGUJAR, P.C.; PAWAR, N.N.; CHANDRATRE, G.A.; SHARMA, .T.A.K. Fipronil induced oxidative stress in kidney and brain of mice: Protective effect of vitamin E and vitamin C. **Pesticides Biochemistry and Physiology**. 118: 10-18, 2015a.
- BARBARA, G.S. et al. Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellífera*. **Journal of Comparative Physiology**. 191: 823-836, 2005.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G; DE PAULA, S. O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceitos, implicações e fatores modulatórios. **Revista Nutrição**. 23: 629-646, 2012.
- BARRETOS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. 1: 113-123, 2006.
- BARTOMEUS, I.; POTTS, S.G.; STEFFAN-DEWENTER, I.; VAISSIERE, B.E.; WOYCIECHOWSKI, M.; KREWENKA, K.M.; TSCHULIN, T.; ROBERTS, S.P.M.; SZENTGYORGYI, H.; WESTPHAL, C.; BOMMARCO, R. Contribution of insect pollinators to crop yield and quality varies with agricultural intensification. **PeerJ**. 1-20, 2014.
- BERNADOU, A.; DÉMARES, F.; COURET-FAUVEL, T.; SANDOZ, J.C.; GAUTHIER, M. Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. **Journal of Insect Physiology**. 55: 1099-1106, 2009.
- BHALLI, J. A.; ALI, T.; ASI, M. R.; KHALID, Z. M.; CEPPI, M.; KHAN, Q. M. DNA damage in Pakistani agricultural workers exposed to mixture of pesticides. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 50: 37-45, 2009.
- BIESMEIJER.; SLAA, E.J. Information flow organization of stingless bee foraging. **Apidologie**. 35: 143-157, 2004.

- BOBÉ, A.; COOPER, J.; COSTE, C.M.; MULLER, M. Behavior of fipronil in soil under sahelian plain field conditions. **Pest Management Science**. 52: 275-281, 1998.
- BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**. 543: 251-272, 2003.
- BOLOGNESI, C.; MORETTO, A. Genotoxic risk in rubber manufacturing industry: a systematic review. **Toxicology Letters**. 230: 345-355, 2014.
- BOGDANOV, M.B., ANDREASSEN, O.A., DEDEOGLU, A., FERRANTE, R.J., BEAL, M.F. Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **Journal of Neurochemistry**. 6: 1246–1249, 2001.
- BROWN, T.P., RUMSBY, P.C., CAPLETON, A.C., RUSHTON, L., LEVY, L.S. Pesticides and Parkinson's disease—is there a link? **Environmental Health Perspectives**. 114: 156-164, 2006
- ÇAKIR, S.; SARIKAYA, R. Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test. **Food and Chemical Toxicology**. 43: 443-450, 2005.
- CARRILHO, M.P.; BOVI, T.S.; NEGRÃO, A.F.; ORSI, R.O. influence of agrochemicals fipronil and imidacloprid on the learning behavior of *Apis mellifera* L. Honeybees. **Acta Scientiarum**. 35: 431-434, 2013.
- CARVALHO, C. A.; MORETI, A. C.; MARCHINI, L. C.; ALVES, R. M.; OLIVEIRA, P. C. Pollen spectrum of honey of “uruçu” bee (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811). **Brazilian Journal Biology**: 61, 63-67, 2001.
- CARVALHO, F.P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental Science e Policy**. 9: 685-692, 2006.
- CATAE, A.F.; RAT, T.C.; OLIVEIRA, R.A.; NOCELLI, R.C.F.; MALASPINA, O. Cytotoxic effects of thiametoxam in the midgut and malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**. 2014.
- ÇAVAS, T.; KONEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius aratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**. 22: 263-268, 2007.
- CCE - Comunidade Econômica Européia. Directiva 80/778/CEE relativa à qualidade de águas destinadas ao consumo humano. **Jornal Oficial da Comunidade Européia**. 299: 20, 1980. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0083&from=PT>. Acesso em 21 de abril de 2015.

- ÇELİK, A.; EKINCI, S. Y.; GÜLER, G.; YILDIRIM, S. *In vitro* genotoxicity of Fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test, and comet assay. **DNA and Cell Biology**. 33: 148-154, 2014.
- CHAUZAT, M.P.; CAUQUIL, L.; ROY, L.; FRANCO, S.; HENDRIKX, P.; CHABERT, M.R. Demographics of the European apicultural industry. **Plos one**. 8: 1-13, 2013.
- CHAUZAT, M.P.; FAUCON, J.P.; MARTEL, A.N.; LACHAIZE, J.; COUGOULE, N.; AUBERT, M. A survey of pesticides residues in pollen loads collected by honeybees in France. **Apiculture and Social Insects**. 99: 253-262, 2006.
- CHAUZAT, M.P.; MARTEL, A.C.; COUGOULE, N.; PORTA, P.; LACHAIZE, J.; ZEGGANE, S.; AUBERT, M.; CARPENTIER, P.; FAUCONY, J.P. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 30: 103-111, 2011.
- COLE, L. M.; NICHOLSON, R. A.; CASIDA, J. E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry Physiology**. 46, 47-54, 1993.
- COLIN, M.E. Un medio ambiente que mata las abejas. Estudios de imidacloprid y fipronil en Europa. **Vida Apícola**. 128, 2004.
- CONELLY, P. Environmental fate of fipronil. California environmental protection agency. **Department of Pesticide Regulation**. 01-17, 2001.
- CORNMAN, R.S.; TARP, D.R.; CHEN, Y.; JEFFREYS, L.; LOPEZ, D.; PETTIS, J.S.; VANENGELSDORP, D.; EVANS, J.D. Pathogen web in collapsing honey bee colonies. **Plos One**. 7: 1-15, 2012.
- COSTA-MAIA, F. M.; LINO-LOURENÇO, D.A.; TOLEDO, V.A.A. Aspectos econômicos e sustentáveis da polinização por abelhas. **Sistemas de Produção Agropecuária (Ciências Agrárias, Animais e Florestais)**. 45-67, 2010.
- COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; GROOT, R.; FARBER, S.; GRASSO, M.; HANNON, B.; LIMBURG, K.; NAEEM, S.; O'NEILL, R.V.; PARUELO, J.; RASKIN, R.G.; SUTTON, P.; BELT, M.V.D. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**. 387: 253-260, 1997.
- COSTA, W.F.; OLIVEIRA, A.B.; NEPOMUCENO, J.C. Lapachol as an epithelial tumor inhibitor agent in *Drosophila melanogaster* heterozygote for tumor suppressor gene wts. **Genetics and Molecular Research**. 10: 3236-3245, 2011.
- COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D.; MORAN, N. A.; QUAN, P. L.; BRIESE, T.; HORNIG, M.; GEISER, D.

- M.; MARTINSON, V.; ENGELSDORP, D; KALKSTEIN, A. L.; DRYSDALE, A.; HUI, J.; ZHAI, J.; CUI, L.; HUTCHISON, S. K.; SIMONS, J. F.; EGHOLM, M.; PETTIS, J. S.; LIPKIN, W. I. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**. 318: 283-287, 2007.
- CRESSWELL, J.E. "A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees." **Ecotoxicology**. 20: 149-157, 2011.
- CRUZ, D.D.; FREITAS, B.M.; SILVA, L.A.; SILVA, E.M.S.; BOMFIN, I.G.A. Pollination efficiency of the stingless bee *Melipona subnitida* on greenhouse sweet pepper. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 40: 1197-1201, 2005.
- CRUZ-LANDIM, C. da. Abelhas: Morfologia e função de sistemas. São Paulo, SP, **Unesp**. 1: 1-408, 2009.
- CUNHA, D.L.; NEPOMUCENO, J.C. Genotoxicidade do anastrozol avaliado por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**. 1: 79-99, 2011.
- DANESI, C.C.; DIHI, R.R.; BELLAGAMBA, B.C.; ANDRADE, H.H.R.; CUNHA, K.S.; GUIMARÃES, N.N.; LEHMANN, M. Genotoxicity testing of combined treatment with cisplatin, bleomycin, and 5-fluorouracil in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 747: 228-233, 2012.
- DAS, P. C., CAO, Y., CHERRINGTON, N., HODGSON, E., & ROSE, L. R. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemical Biological Interactions**. 164, 200-214, 2006.
- DECOURTYE, A. et al. Comparative Sublethal Toxicity of Nine Pesticides on Olfactory Learning Performances of the Honeybee *Apis mellifera*. **Environmental Contamination Toxicology**. 48: 242-250, 2005.
- DEEPA PARVATHI V., AKSHAYA AMRITHA, S., SOLOMON, F.D.P. Wonder animal model for genetic studies - *Drosophila melanogaster* – its life cycle and breeding methods – a review Sri Ramachandra. **Journal of Medicine**. 2: 33-38, 2009.
- DEGUINES, N.; JONO, C.; BAUDE, M.; HENRY, M.; JULLIARD, R.; FONTAINE, C. Large-scale trade-off between agricultural intensification and crop services. **The Ecological Society of America**. 12: 212-217, 2014.
- DEMIR, E.; TURNA, F.; KAYA, B.; CREUS, A.; MARCOS, R. Mutagenic/recombinogenic effects of four lipid peroxidation products in *Drosophila*. **Food and chemical toxicology**. 53: 221-227, 2013.

- DE REZENDE, A.A.A.; MUNARI, C.C.; DE OLIVEIRA, P.F.; FERREIRA, N.H.; TAVARES, D.C.; ANDRADE E SILVA, M.L.; REZENDE, K.C.S.; SPANÓ, M.A. A comparative study of the modulatory effects of (-)-cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. **Food and Chemical Toxicology**. 55: 645-652, 2013.
- DE REZENDE, A.A.A.; E SILVA, M.L.A.; TAVARES, D.C.; CUNHA, W.R.; REZENDE, K.C.S.; BASTOS, J.K.; LEHMANN, M.; DE ANDRADE, H.H.R.; GUTERRES, Z.R.; SILVA, L.P.; SPANÓ, M.A. The effect of the dibenzylbutyrolactolic lignan (-)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**. 49: 1235-1241, 2011.
- DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.M. The Sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, 52, 81-106, 2007.
- DEVILLERS, J. Acute toxicity of pesticides to honey bees. In: DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M.H. (Ed.). Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. London: **Taylor and Francis**. 55-66, 2002.
- DURHAM, E. W.; SIEGFRIED, B. D.; SCHARF, M. E. In vivo and in vitro metabolism of fipronil by larvae of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. **Pest Management Science**. 58: 799-804, 2002.
- ECOBICHON, D.J. Our changing perspectives on the benefits and risks of pesticides: a historical overview. **Neurotoxicology**, 21, 211-218, 2000.
- EEKEN, J.C.J.; KLINK, I.; VAN VEEN, B.L.; PASTINK, A.; FERRO, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the suppressor gene *wt*s. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 40: 277-282, 2002.
- EL HASSANI, A.K.; DACHER, M.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C. Effect of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 82: 30-39, 2005.
- EUROPEAN COMMISSION. EU Pesticides database. 2010. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm>. Acesso em: 18 setembro. 2014.
- EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; MONDEGO, J.M. O desaparecimento de abelhas nos ecossistemas brasileiros. **Associação brasileira de zootecistas**. 1-11, 2014.
- FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A.A. Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. **Frontiers in Bioscience**. 4: 779-793, 2013.

- FELL, R.D. Foraging behaviors of *Apis mellifera* and *Bombus* spp. on oilseed sunflowers. **Journal of the Kansas Entomological Society**. 59: 72-81, 1986.
- FELZENSZWALB, I.; PINTO, L. F. R. Genética do câncer humano. In: RIBEIRO, R.L.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. ULBRA, 2003.
- FRAGIORGE, E.J.; REZENDE, A.A.A.; GRAF, U.; SPANÓ, M.A. Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**. 46: 393-401, 2008.
- FRANK, S.A. Evolution in health and medicine sackler colloquium: somatic evolutionary genomics: mutations during development cause highly variable genetic mosaicism with risk of cancer and neurodegeneration. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**. 107: 1725-30, 2010.
- FREI, H.; WURGLERWÜRLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**. 203: 297-308, 1988.
- FREITAS, C.R.; FREITAS, N.R.; NEPOMUCENO, J.C. Avaliação do efeito anticarcinogênico da rutina, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**. 11: 247-257, 2014.
- FURTADO, S.G.; NEPOMUCENO, J.C. Redução de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*, pela enzima metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, por meio do teste wts (Warts). **Perquirere**. 9: 224-240, 2012.
- GALLAI, N.; SALLES, J.M.; SETTELE, J.; VAISSIERE, B.E. Economic evaluation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**. 68: 810-821, 2009.
- GIANNINI, T.C.; ACOSTA, A.L.; GARÓFALO, C.A.; SARAIVA, A.M.; SANTOS, I.A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Pollination services at risk: Bee habitats will decrease owing to climate change in Brazil. **Ecological Modelling**. 244: 127-131, 2012.
- GILL, K.K.; DUMKA, V.K. Antioxidant status in oral subchronic toxicity of fipronil and fluoride co-exposure in buffalo calves. **Toxicology and Industrial Health**. 1-19: 2013.
- GHISI NDE, C.; RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V.; DE ALMEIDA, M. I.; RIBEIRO, C. A.; CESTARI, M. M. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental Monitoring Assessment**. 180: 589-599, 2011.

- GONÇALVES, L. S. Um alerta sobre os prejuízos causados pelos pesticidas na apicultura e meliponicultura no Brasil. **Mensagem Doce**. 123, 2013.
- GORELL, J. M.; JOHNSON, C.C.; RYBICKI, B.A.; PETERSON, E.L, RICHARDSON, R.J. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. **Neurology**. 50:1346-1350, 1998.
- GRAF, U. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster* . **Experientia**. 51: 168-173, 1995.
- GRAF, U.; FREI, H.; KAGI, A.; KATZ, A. J.; WURGLERWÜRLER, F. E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**. 222: 359-373, 1989.
- GRAF, U., SCHAIK, N.V. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**. 271: 59-67, 1992.
- GRAF, U.; SPANÓ, M.A.; GUZMÁN, J. R.; ABRAHAM, S. K.; ANDRADE, H. H. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixture as well as for studies of antigenotoxicity. **African Newsletter on Occupational Health and Safety**. 6: 9-13, 1996.
- GRAF, U., WURGLER, F. E; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G . Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**. 6: 153-188, 1984.
- GUNASEKARA, A.; TROUNG, T. Environmental fate of fipronil. **California Environmental Protection Agency**. 1-28, 2007.
- GUNASEKARAN, A. S.; TRUONG, T.; GOH, S. K; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticides Science**. 32: 189-199, 2007.
- HAINZL, D.; CASIDA, J.E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings National Academy of Sciences**. 93: 12764-12767, 1996.
- HAINZL, D., COLE, L.M., CAZIDA, J.E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. **Chemical Resources Toxicology**. 11: 1529-1535, 1998.
- HASSANI, A.K.; DACHER, M.; GAUTHEIR, M.; ARMENGAUD, C. Effects of sub-lethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 82: 30-39, 2005.

- HERNANDEZ, A. F.; LOPEZ, O.; RODRIGO, L.; GIL, F.; PENA, G.; SERRANO, J. L.; PARRON, T.; ALVAREZ, J. C.; LORENTE, J. A.; PLA, A. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: influence of several markers of individual susceptibility. **Toxicology Letters**. 159: 13-21, 2005.
- HOSIE, A.M., BAYLIS, H.A., BUCKINHAM, S.D., SATTELLE, D.B. Actions of the insecticide fipronil, on dieldrin-sensitive and -resistant GABA receptors of *Drosophila melanogaster*. **British Journal of Pharmacology**. 115: 909-912, 1995.
- HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**. 277: 91-138, 1992.
- HUANG, X., MOIR, R.D., TANZI, R.E., BUSH, A.I., ROGERS, J.T. Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology. **Annals of New York Academy of Sciences**. 1012: 153-163, 2004.
- IIDA, S.I.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; MARUMOTO, T.; HARA, T.; KUNINAKA, S.; HONDA, S.; KOZAI, K.I.; KAWASUJ, M.; PALLAS, D.C.;SAYA, H. Tumor supressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both mitotic progression and G1 tetraploid checkpoint function. **Oncogene**. 23: 5266-5274, 2004.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; NUNES-SILVA. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o código florestal brasileiro. **Biota Neotropical**.10: 59-62, 2010.
- IMPERATRIZ-FONSECA,V.L.; SARAIVA, A.M.; DE JONG, D. Bee as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices, Ribeirão Preto. **Holos**. 112: 1-96, 2006.
- IWASA, T., MOTOYAMA, N., AMBROSE, J.T.R., ROE, M.E.T. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid inseticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**. 23: 371-378, 2004.
- JACOB, C.R.O.; SOARES, H.M.; CARVALHO, S.M.; NOCELLI, R.C.F.; MALASPINA, O. Acute toxicity to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille. **Bulletin Environmental Contamination Toxicology**. 90: 69-72, 2013.
- JACOB, C.R.O.; SOARES, H.M.; NOCELLI, R.C.F.; MALASPINA, O. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Society of Chemical Industry**, 1-9, 2014.
- JARDIM, A.N.O.; CALDAS, E.D. Brazilian monitoring programs for pesticides residues in food – Results from 2001 to 2010. **Food Control**. 25: 607-616, 2012.
- JENNINGS, B. H. *Drosophila* - a versatile model in biology e medicine. **Materials Today**. 14: 190-195, 2011.

- JOHNSON. Honey bee colony collapse disorder. **CRS reporter for congress**. 1-17, 2010.
- JUSTICE, R.W.; ZILIAN, O.; WOODS, D.F.; NOLL, M.; BRYANT, P.J. The *Drosophila* tumor suppressor gene Warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes and Development**. 534-546, 1995.
- KASTENBAUM, M.A.; BOWMAN, K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**. 9: 527-549, 1970.
- KERR, W.E. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégicas**. 12: 20-41, 2001.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V. A. Abelha Uruçu: Biologia Manejo e Conservação. Belo Horizonte – MG. **Acangau**. 1-143, 1996.
- KI, Y.; LEE, J.E.; PARK, J.H.; SHIN, I.C.; KOH, H.C. Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to Fipronil. **Toxicology Letters**. 211: 18-28, 2012.
- KIM, S. I., J.W. JUNG, J.W.; AHN, Y.J.; RESTIFO, L.L.; KWON, H.W. *Drosophila* as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. **Journal of Asia-Pacific Entomology**. 14: 509-517, 2011.
- KITULAGODAGE, M.; ISANHART, J.; BUTTNER, W.A.; HOOPER, M.J.; ASTHEIMER, L.B. Fipronil toxicity in northern bobwhite quail *Colinus virginianus*: Reduced feeding behaviour and sulfone metabolite formation. **Chemosphere**. 83: 524-530, 2011.
- KLA.M.; VAISSIERE, B.; CANE, J.H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S.A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society London**. 274: 303-313, 2009.
- KNOWN, Y.J.; SAEED, S. Effect of temperature on the foraging activity of *Bombus terrestris* L (Hymenoptera: Apidae) on greenhouse hot pepper (*Capsicum annuum* L.). **Applied Entomology and Zoology**. 38: 275-280, 2003.
- LASSITER, T.L.; MACKILLOP, E.A.; RYDE, I.T.; SEIDLER, F.J.; SLOTKIN, T.A. Is Fipronil safer than chlorpyrifos? Comparative developmental neurotoxicity modeled in PC12 cells. **Brain Research Bulletin**. 78: 313-322, 2009.
- LEE, J.E.; KANG, J.S.; KI, Y.W.; LEE, S.H.; LEE, S.J.; LEE, K.S. Akt/GSK3 β signaling is involved in fipronil-induced apoptotic cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Toxicology letters**. 202: 133-141, 2011.

- LE FAOUDER, J.; BICHON, E.; BRUNSCHWIG, P.; LANDELLE, R.; ANDRE, F.; LE BIZEC, B. Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. **Talanta**. 1: 710-717, 2007.
- LEGHAIT, J.; VÉRONIQUE, G.; NICOLE, P.H.; MARION, C.; ELISABETH, P.; PIERRE-LOUIS, T.; CATHERINE, V. Fipronil induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**. 255: 38-44, 2009.
- LEONCINI, I.; LE CONTE, Y.; COSTAGLIOLA, G.; PLETTNER, E.; TOTH, A. L.; WANG, M.; HUANG, Z.; BECARD, J. M.; CRAUSER, D.; SLESSOR, K. N.; ROBINSON, G. E. Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. **Proceedings of the Royal Society London**. 101: 17559-17564, 2004.
- LI, W.; TAI, L.; LIU, J.; GAI, Z.; DING, G. Monitoring of pesticide residues levels in fresh vegetable from Heibei Province, North China. **Environmental Monitoring Assessment**. 186: 6341-6349, 2014.
- LOMBARDOT, B.; OH, C.-T.; KWAK, J.; GENOVESIO, A.; KANG, M.; HANSEN, M.A.E.; HAN, S.-J. High-throughput in vivo genotoxicity testing: an automated readout system for the somatic mutation and recombination test (SMART). **Plos One**. 1-18, 2015.
- LOURENÇO, C. T.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. Oral toxicity of Fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bulletin Environmental Contamination Toxicology**. 89: 921-924, 2012.
- LOURENÇO, C.T.; CARVALHO, S.M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R.C.F. Determination of fipronil LD₅₀ for the Brazilian bee *Melipona scutellaris*. **Hazards of pesticides to bees**. 1: 174-178, 2012b.
- LOZOWICKA, B.; KACZYNSKI, P.; PARITOVA, A.E.; KUZEMBEKOVA, G.B.; ABZHALIEVA, N.B.; SARSEMBAYEVA, N.B.; ALIHAN, K. Pesticide residues in grain from Kazakhstan and potential health risks associated with exposure to detected pesticides. **Food and Chemical Toxicology**. 64: 238-248, 2014.
- MACHADO N.M.; LOPES, J.C.; SATURNINO, R.S.; FAGAN, E.B.; NEPOMUCENO, J.C. Lack of Mutagenic effect by multi-walled functionalized carbono nanotubes in the somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**. 62: 355-360, 2013.
- MAES, M.; RUCKOAICH, P.; CHANG, Y.S.; MAHANONDA, N.; BERK, M. Multiple aberrations in shared inflammatory and oxidative & nitrosative stress (IO&NS) pathways explain the co-association of depression and cardiovascular disorder (CVD), and the increased risk for CVD and due mortality in depressed patients. **Progress in Neuro-Psychopharmacology Biological & Psychiatry**. 35: 769-783, 2011.

- MALERBO-SOUZA, D.T.; NOGUEIRA-COUTO, R.H.; COUTO, L.A. Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, Var. Pera-rio) **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 40: 237-242, 2003.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO . Agrofit: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em :<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 25 fev.2015.
- MARTINS C. G. M.; LORENZON M. C. A. e BAPTISTA J. L. Eficiência de tipos de polinização em acerola. **Dissertação de Mestrado** em Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 1-86, 2009.
- MASUTTI, C.S.M.; MERMUT, A.R. Degradation of fipronil under laboratory conditions in a tropical soil from Sirinhaém Pernambuco, Brazil. **Journal of Environmental Science and Health**. 42: 33-43, 2007.
- MEDRZYCK, P.; GIFFARD, H.; AUPINEL, P.; BELZUNCES, L.P.; CHAUZAT, M.P.; CLABEN, C.; COLIN, M.E.; DUPONT, T.; GIROLAMI, V.; JOHNSON, V.; LECONTE, Y.; LUCKMANN, J.; MARZARO, M.; PISTORIUS, J.; PORRINI, C.; SCHUR, A.; SGOLASTRA, F.; SIMON DELSON, N.; BOGO, G.; BRUNET, J.L.; DELBAC, F.; DIOGON, M.; EL ALAOUI, H.; PROVOST, B.; TOSI, S.; VIDAÜ, C. Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. **The COLLOSS BEEBOOK**. 52: 1-60, 2013
- MEKONEN, S.; AMBELU, A.; SPANOGUE, P. Pesticide residue evaluation in major staple food items of Ethiopia using the quechers method: A case study from the Jimma Zone. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 33: 1294-1302, 2014.
- MISHRA, M.; SHARMA, A.; SHUKLA, A.K.; KUMAR, R.; DWIVEDI, U.N.; CHOWDHURI, D.K. Genotoxicity of dichlorvos in strains of *Drosophila melanogaster* defective in DNA repair. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 766: 35-41, 2014.
- MOMMAERTS, V.; PUT, K.; SMAGGHE, G. *Bombus terrestris* as pollinator-and-vector to suppress *Botrytis cinerea* in greenhouse strawberry. **Pest Management Science**. 67: 1069-1075, 2011.
- MORAES, S.S., BAUTISTA, A.L., VIANA, B.F. Avaliação da toxicidade aguda (DL50 e CL50) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): via de contato. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 29: 31-37, 2000.
- MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region – online version, 2013. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Apr/10/2015.

- MOUTON, M. Significance of direct and indirect pollination ecosystem services to the apple industry in the western cape of south Africa. **PhD thesis**, University of Stellenbosch. 1-108, 2011.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. LEHNINGER. Principles of Biochemistry. **Worth Publishers**. 6: 1-1340, 2012.
- NICODEMO, D.; MAIOLI, M.A.; MEDEIROS, H.C.D.; GUELF, M.; BALIEIRA, V.B.; DE JONG, D.; MINGATTO, F.E. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 33: 2070-2075, 2014.
- NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IADA, S.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H. A human homolog *Drosophila* warts supressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. **Febs Letters**. 459: 159-165, 1999.
- NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. **Nogueirapis**. 1-446, 1997.
- NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A polinização por vibração. **Oecologia Australis**. 14: 140-151, 2010.
- OECD/OCDE. Guidelines for the testing of chemicals number 213, honeybees, acute oral toxicity test, OECD. **Environmental Health and Safety Division, Paris**. 1-8, 1998.
- OHI, M.; DALSENER, P. R.; ANDRADE, A. J. M.; NASCIMENTO, A. J. Reproductive adverse effects of fipronil in winstar rats. **Toxicology Letters**. 146: 121-127, 2004.
- OLIVEIRA, R. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O. Side-effects of thiametoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**. 1-12, 2013.
- O'NEAL, R.J.; WALLER, G.D. On the pollen harvest by the honey bee (*Apis mellifera* L.) near Tucson, Arizona (1976–1981). **Desert Plants**. 6: 81-109, 1984.
- ORSOLIN, P.C.; SILVA-OLIVEIRA, R.G.; NEPUMOCENO, J.C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**. 50: 2598-2604, 2012.
- ORSOLIN, P.C.; NEPOMUCENO, J.C. Potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma Longa L*) identificado por meio do teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster*. **Perquiere**. 6: 55-69, 2009.

- PANDEY, U.B.; NICHOLS, C.D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews**. 63: 411-436, 2011.
- PANTALEAO, S.M.; ALCANTARA, A.V.; ALVES, J.P.H.; PAVANIN, L.A.; GRAF, U.; REZENDE, A.A.A.; VALADARES, B.L.B.; FRAGIORGE, E.J.; SOUSA, N.C.; GUTERRES, Z.R.; SPANÓ, M.A. Assessing the impact of pollution on the Japaratuba River in Brazil using the *Drosophila* wing spot test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 48: 96-105, 2007.
- PARK, J.H.; PARK, Y.S.; LEE, J.B.; PARK, K.H.; PAIK, M.K.; JEONG, M.; KOH, H.C. Meloxicam inhibits Fipronil-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells. **Journal of Applied Toxicology**. 1-15: 2015.
- PELUSO, M.E.M.; GIESE, R.W.; CHELLINI, E.; CEPPI, M.; CAPACCI, F. Oxidatively damaged DNA in the nasal epithelium of workers occupationally exposed to silica dust in Tuscany region, Italy. **Mutagenesis**. 1-7: 2015.
- PEREIRA, A. M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e comportamento de abelhas**. 2010. 124f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2010.
- PEREIRA, R.A.; MORAIS, M. M.; NASCIMENTOS, F. S.; BEGO, L. R. Intrinsic colony conditions affect the provisioning and oviposition process in the stingless bee *Melipona scutellaris*. **Genetics and Molecular Research**. 8: 725-729, 2009.
- PIANARO, A. Ecologia química de abelhas brasileiras: *Melipona rufiventris*, *Melipona scutellaris*, *Plebeia droryana*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Tetragonisca angustula* e *Centris trigonoides*. **Dissertação de Mestrado**- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 1-138, 2007.
- PICOLLI, P. O. Polinização de macieiras em Santa Catarina. **Mensagem Doce**, 52, 1999. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/52/polinizacao.htm> Acesso: 07 de setembro de 2014.
- PIERROT, L.; SCHLINDWEIN, C. Variation in daily flight activity and foraging patterns in colonies of urucu- *Melipona scutellaris* Latreille (Apidae, Meliponini). **Revista Brasileira de Zoologia**. 20: 565-571, 2003.
- PORRINI, C.; CELLI, G.; RADEGHIERI, P. Monitoring of pesticides through the use of honeybees as bioindicators of the Emilia-Romagna coastline (1995–1996). **Annali di Chimica**. 88: 243-252, 1988.
- POTTER, C.J.; TURENSCHALK, G.S.; XU, T. *Drosophila sp* in cancer research: an expanding role. **Trends Genetic**. 16: 33-39, 2000.

- RAAD, R.S. Alta Produtividade na Agricultura. **Mensagem Doce**: Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíficas Européias.125: 8-12, 2014.
- RAMESH, A.; BALSUBRAMANIAN, M. Kinetics and hydrolysis of fenamiphos, Fipronil and Trifluthrin in aqueous buffer solutions. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. 47: 3367-3371, 1999.
- REIS, E.M.; DE REZENDE, A.A.A; SANTOS, D.V.; OLIVEIRA, P.F.; NICOLELLA, H.D.; TAVARES, D.C.; SILVA, A.C.; DANTAS, N.O.; SPANÓ, M.A. Assessment of the genotoxic potential of two zinc oxide sources (amorphous and nanoparticles) using the in vitro micronucleus test and the in vivo wing somatic test. **Food and Chemical Toxicology**. 2015, *in press*.
- REITER, L. T.; POTOCKI, L.; SAM, C.; GRIBSKOV, M.; BIER, E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. **Genome Research**. 11: 1114-1125, 2001.
- REZENDE, V.B.; LINS, A.B.; REZENDE, A.A.A.; SPANÓ, M.A.; SOUSA, N.C. Avaliação do efeito modulador da levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae* M.) sobre a genotoxicidade induzida pela doxorubicina em *Drosophila melanogaster*. **Revista de Biologia Neotropical**. 10: 9-17, 2013.
- REZENDE, A.A.A; SPANÓ, M.A. Estudo comparativo dos efeitos modeladores da (-)-cubebina sobre a mutagenicidade/recombinogenicidade induzida por diferentes agentes químicos. **Tese de Doutorado**. Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 2012.
- RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A Importância da Mutagênese Ambiental na Carcinogênese Humana. In: RIBEIRO, R.L.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. **ULBRA**. 1: 21-27, 2003.
- RIZZARDO, R.A.G.; MILFONT, M.O.; SILVA, E.M.S.; S.; FREITAS, B.M. *Apis mellifera* pollination improves agronomic productivity of anemophilous castor bean. **Anais da academia Brasileira de Ciências**. 84: 1137-1145, 2012.
- ROCHA, M.C.L.S.A. Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres do Brasil. **IBAMA**. 1: 1-88, 2012.
- ROLDÃO, Y. S. Termorregulação colonial e a influência da temperatura no desenvolvimento da cria em abelhas sem ferrão, *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, Ribeirão Preto, 2011.
- RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; HALM, M.P.; TOUFEET-BRIENS, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees¹. **Apidologie**. 36: 71-83, 2005.

- ROSELINO, A.C.; SANTOS, S.A.B.; BEGO, L.R. Qualidade dos frutos de pimentão (*Capsicum annuum* L.) a partir de flores polinizadas por abelhas sem ferrão (*Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier 1836 e *Melipona scutellaris* Latreille 1811) sob cultivo protegido. **Revista brasileira de Biociência**. 8: 154-158, 2010.
- SALOMÉ, J.A. Polinização de Macieiras em Santa Catarina. 2007. Disponível em: <http://tecnoapiscatarinense.blogspot.com/2007/03/polinizao-de-macieiras-em-santa.html>. Acesso em: 07 de setembro de 2013.
- SANTOS-CRUZ, L.F.; ÁVILA-ACEVEDO, J.G.; ORTEGA-CAPITAINE, D.; OJEDA-DUPLANCHER, C.; PERDIGÓN-MOYA, J.L.; HERNÁNDEZ-PORTILHA, L.B.; LÓPEZ-DIONICIO, H.; DURÁN-DIAS, A.; DUEÑAS-GARCIA, I.E.; CASTAÑEDA-PARTIDA, L.; GARCIA-BORGES, A.M.; HERES-PULIDO, M.E. Verbascoside is not genotoxic in the ST and HB crosses of the *Drosophila melanogaster* wing spot test, and its constituent, caffeic acid, decreases the spontaneous mutation rate in the ST cross. **Food and Chemical Toxicology**. 50: 1082-1090, 2012.
- SAPBAMRER, R.; HONGSIBSONG, S. Organophosphorus pesticide residues in vegetables from farms, markets, and a supermarket around Kwan Phayao lake of northern Thailand. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**. 67: 60-67, 2014.
- SCOTT R.J., KNOTT M. A cluster analysis method for grouping mans in the analysis of variance. **Biometrics**. 30: 507-512, 1974.
- SEPEL, L.M.N.; LORETO, E.L.D. 2010: Um século de *Drosophila* na Genética. **Genética na Praça-SBG**. 42-47, 2010.
- SIDOROV, R. A.; UGNIVENKO, E. G.; KHOVANOVAE, E. M.; BELISTSKY, G. A. Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogeneses. **Mutation Research**. 498: 181-191, 2001.
- SILVA, L.M.; NEPOMUCENO, J.C. Efeito modulador da polpa da graviola (*Annona muricata*) sobre a carcinogenicidade da mitomicina C, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**. 8: 80-94, 2011.
- SILVA, L. P.; COSTA-CRUZ, J. M.; SPANO, M. A.; GRAF, U. Genotoxicity of vesicular fluid and saline extract of *Taenia solium* metacestodes in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 47: 247-253, 2006.
- SILVA, M.D.; RAMALHO, M.; ROSA, J.F. Por que *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae) forrageia sob alta umidade relativa do ar? **Iheringia, Série Zoologia**. 131-137, 2011.

- SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. Abelhas brasileiras: Sistemática e identificação. Belo Horizonte - MG, 1-253, 2002.
- SIMON-DELISO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C. H.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; VAN DER SLUIJS, J. P.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science Pollution Research**. 22: 5-34, 2015.
- SLOTKIN, T.A.; SEIDLER, F. J. Oxidative stress from diverse developmental neurotoxicants: Antioxidants protect against lipid peroxidation without preventing cell loss. **Neurotoxicology and Teratology**, 32: 124-131, 2010.
- SNUSTAD, D. P; SIMMONS, M. J. Fundamentos de genética. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**. 2: 1-756, 2001.
- SPANÓ, M. A.; FREI, H.; WÜRGLERS, F. E.; GRAF, U. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. **Mutagenesis**. 16: 385-394, 2001.
- STEHR, C.M.; LINBO, T.L.; INCARDONA, J.P.; SCHOLZ, N.L. The Developmental Neurotoxicity of fipronil: notochord degeneration and locomotors defects in Zebrafish Embryos and Larvae. **Toxicological Sciences**. 90: 270-278, 2006.
- STENERSEN, J. Chemical pesticides: Modes of action and toxicology. **CRC PRESS**. 1: 1-271, 2004.
- SUN, L.; JIN, R.; PENG, Z.; ZHOU, Q.; QIAN, H.; FU, Z. Effects of trilostane and fipronil on the reproductive axis in an early life stage of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Ecotoxicology**. 23: 1044-1054, 2014.
- SURRALLÉS, J.; XAMENA, N.; CREUS, A.; CATALÁN, J.; NORPPA, H.; MARCOS, R. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**. 341: 169-184, 1995.
- TAVARES, D.A.; ROAT, T.C.; CARVALHO, S.M.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; MALASPINA, O. . In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**.135: 370-378, 2015.

- TICKOO, S e RUSSEL, S. *Drosophila melanogaster* as a model system for drug Discovery and pathway screening. **Current Opinion Pharmacology**: 2, 555-60, 2002.
- TOMÉ, H.V.V.; MARTINS, G.F.; LIMAS, M.A.P.; CAMPOS, L.A.O.; GUEDES, R.N.C. Imidachloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Plos one**. 7: 1-9, 2012.
- TRINDADE, M.S.A.; SOUZA.; VASCONCELOS, W.E.; FREITAS, R.S.; SILVA, A.M.; PEREIRA, D.S.; MARACAJÁ, P.B. Avaliação da polinização e estudo comportamental de *Apis mellifera* L. na cultura do meloeiro em Mossoró, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. 4: 1-10, 2004.
- TRIPATHY, N.K.; MAJHI, B.; DEY, L.; PATNAIK, K.; DAS, CC. Mutagenicity of Dimecron studied in 3 mosaic assays and the sex-linked recessive lethal test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology**. 189: 277-283, 1987.
- TSUDA, H.; TAKEDA, N. Effect of tumor promoter TPA on spontaneous and Mitomycin C induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**. 189: 375-379, 1987.
- TSUTSUI, T.; MAIZUMI, H.; BARRETI, J.C. Colcemid-induced neoplastic transformation and aneuploidy in Syrian hamster embryo cells. **Carcinogenesis**. 5: 89-93, 1984.
- U.S.EPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of prevention, pesticides and toxic substances. New pesticide fact sheet. EPA-737-F-96-005 Washington, D.C, 1996. Disponível em: <http://fluoridealert.org/wp-content/pesticides/fipronil.epa.facts.may.1996.htm>. Acessed April/15 2015.
- UN. The Millennium Development Goals Report. **United Nations Department of Public Information**. 1-48, 2005.
- VANBERGEN, A. J.; BAUDE, M.; BIESMEIJER, J. C.; BRITTON, N. F.; BROWN, M. J. F.; BRYDEN, J.; BUDGE, G. E.; BULL, J. C.; CARVELL, C.; CHALLINOR, A. J.; CONNOLLY, C. N.; EVANS, D. J.; FEIL, E. J.; GARRATT, M. P.; GRECO, M. K.; HEARD, M. S.; JANSEN, V. A. A.; KEELING, M. J.; KUNIN, W. E.; MARRIS, G. C.; MEMMOTT, J.; MURRAY, J. T.; NICOLSON, S. W.; OSBORNE, J. L.; PAXTON, R. J.; PIRK, C. W. W.; POLCE, C.; POTTS, S. G.; PRIEST, N. K.; RAINE, N. E.; ROBERTS, S.; RYABOV, E. V.; SHAFIR, S.; SHIRLEY, M. D. F.; SIMPSON, S. J.; STEVENSON, P. C.; STONE, G. N.; TERMANSEN, M.; WRIGHT, G. A. Threats to an ecosystem service: Pressures on pollinators. **Frontiers in Ecology and the Environment**. 11: 251-259, 2013
- Van ENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-

- FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Colony collapse disorder: A descriptive study. **Plos one**. 4: 1-17, 2009.
- VELTHUIS, H.H.W.; DOORN, A. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. **Apidologie**. 37: 421-451, 2006
- VELTHUIS, H.H.W.; ROELING, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Repartition of reproduction among queens in the polygynous stingless bee *Melipona bicolor*. **Proceedings of the Experimental and Applied Entomology**. 12: 45-49, 2001.
- VENTRURIERE, G. C. Criação de abelhas indígenas sem ferrão. **Embrapa Amazônia Oriental**. 1: 1-36, 2004.
- VIDAU, C.; BRUNET, J.; BADIOU, A.; BELZUNCES, L.P. Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell mode Caco-2. **Toxicology in Vitro**. 23: 589-597, 2009.
- VIDAU, C.; DIOGON, M.; AUFAUVRE, J.; FONTBONNE, R.; VIGUES, B.; BRUNET, J.L.; TEXIER, C.; BIRON, D.G.; BLOT, N.; ALAOUI, H.E.; BELZUNCES, L.P.; DELBAC, F. Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*. **Plos One**. 6: 1-8, 2011.
- VIDAU, C.; GONZÁLEZ-POLO, R. A.; NISO-SANTANO, M.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, R.; PEDRO, J.M.B.; PIZARRO-ESTRELA, E.; BLASCO, R.; BRUNET, J. L.; BELZUNCES, L. P.; FUENTES, J. M. Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. **Neuro Toxicology**. 32: 935-943, 2011.
- WINFREE, R.; AGUILAR, R.; VÁZQUEZ, D.P.; LEBBUHN, G.; AIZEN, M.A. A meta-analysis of bees response to anthropogenic disturbance. **Ecology**. 90: 2068-2076, 2009.
- XU, T.; WANG, W.; ZHANG, S.; STEWART, R.A.; YU, W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. **Development**. 12: 1053-1063, 1995.
- ZACARIN, E.C.M.S.; GREGORC, A.; FERREIRA, R.A.C.; MALASPINA, O. Cytotoxicity induced by fipronil in the midgut of Africanized *Apis mellifera* workers. **Apidologie**. 2012.
- ZALUSKI, R.; KADRI, S.M.; ALONSO, D.P.; RIBOLLA, P.E.; ORSI, R.O. Fipronil promotes motor and behavioral changes in Honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 4: 1062-1069, 2015.
- ZHAO, X., YE, J.Z.; SALGADO, V.L., NARAHASHI, T. Sulfone metabolite of fipronil Blocks aminobutyric acid and glutamate activated chloride

channels in mammalian and insect neurons. **The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 314: 363-373, 2005.

ANEXO

**Esquemas de divisão mitótica nas células dos discos imaginal de
Drosophila melanogaster e os possíveis eventos de perda de
heterozigose**

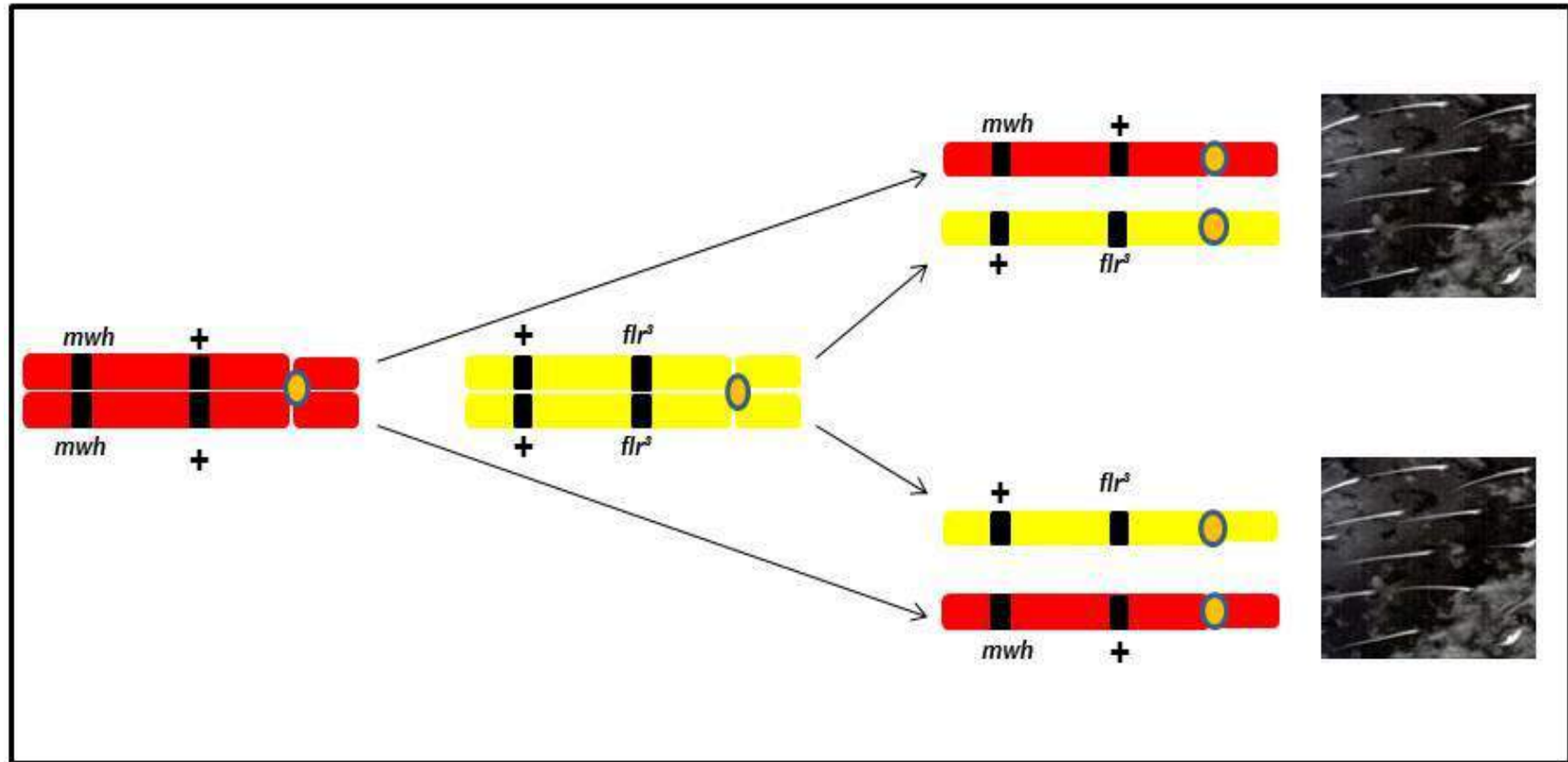


Figura 1. Esquema de divisão mitótica normal em células dos discos imaginais de asas de *Drosophila melanogaster*. Adaptado de Graf e Würzler *et al.*, 1984.

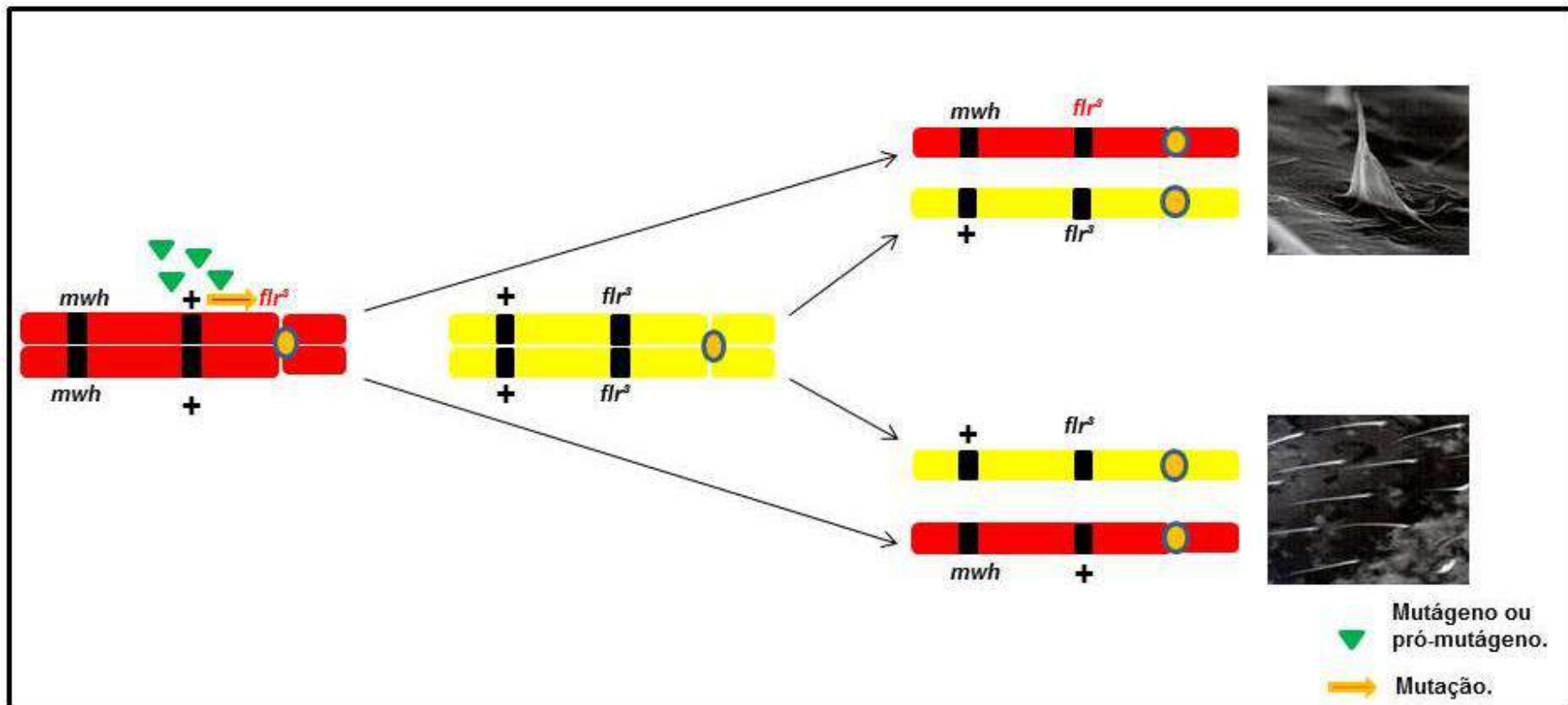


Figura 2. Esquema de divisão mitótica com ocorrência de mutação pontual no gene *flr³* em células dos discos imaginais de asas de *Drosophila melanogaster*. Adaptado de Graf e Würigler *et al.*, 1984.

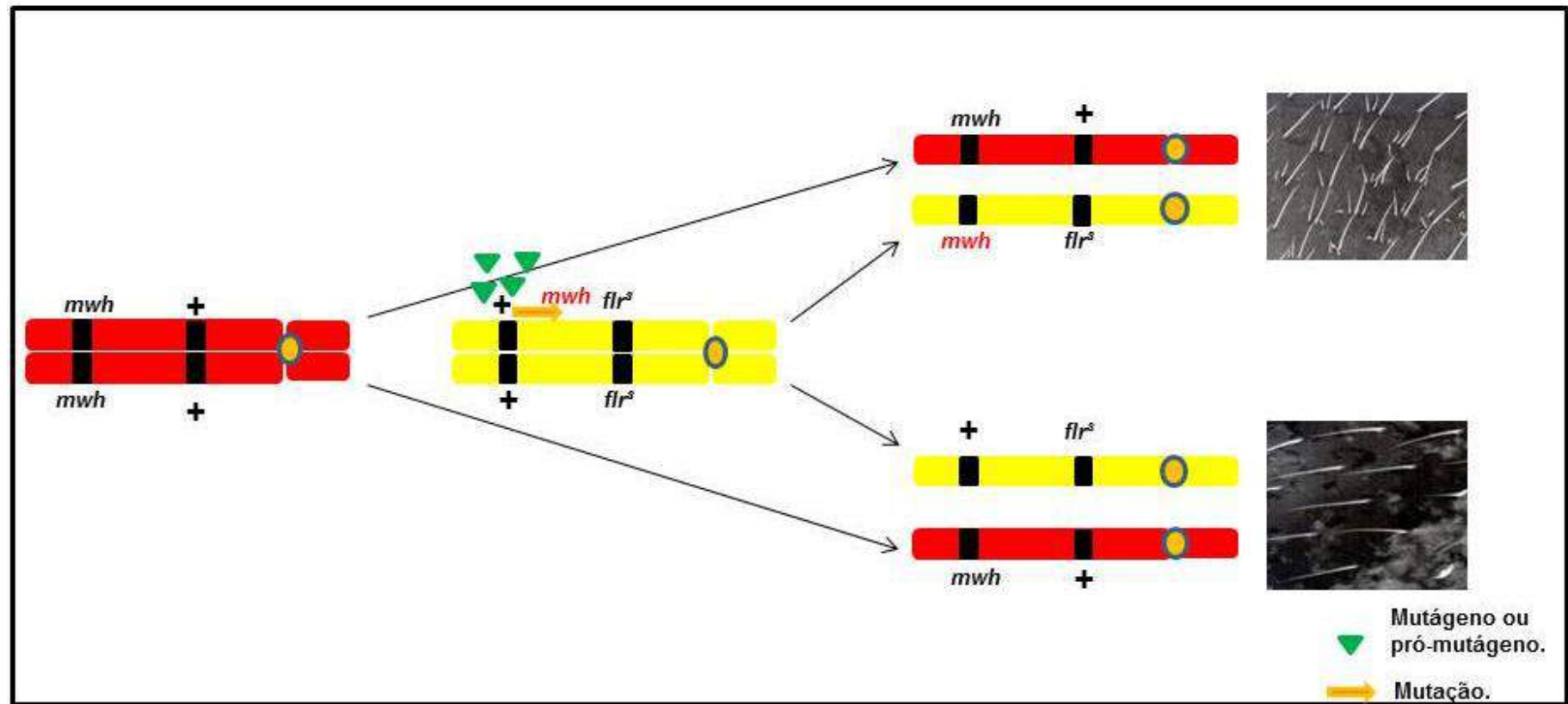


Figura 3. Esquema de divisão mitótica com ocorrência de mutação pontual no gene *mwh* em células dos discos imaginais de asas de *Drosophila melanogaster*. Adaptado de Graf e Würdler et al., 1984.

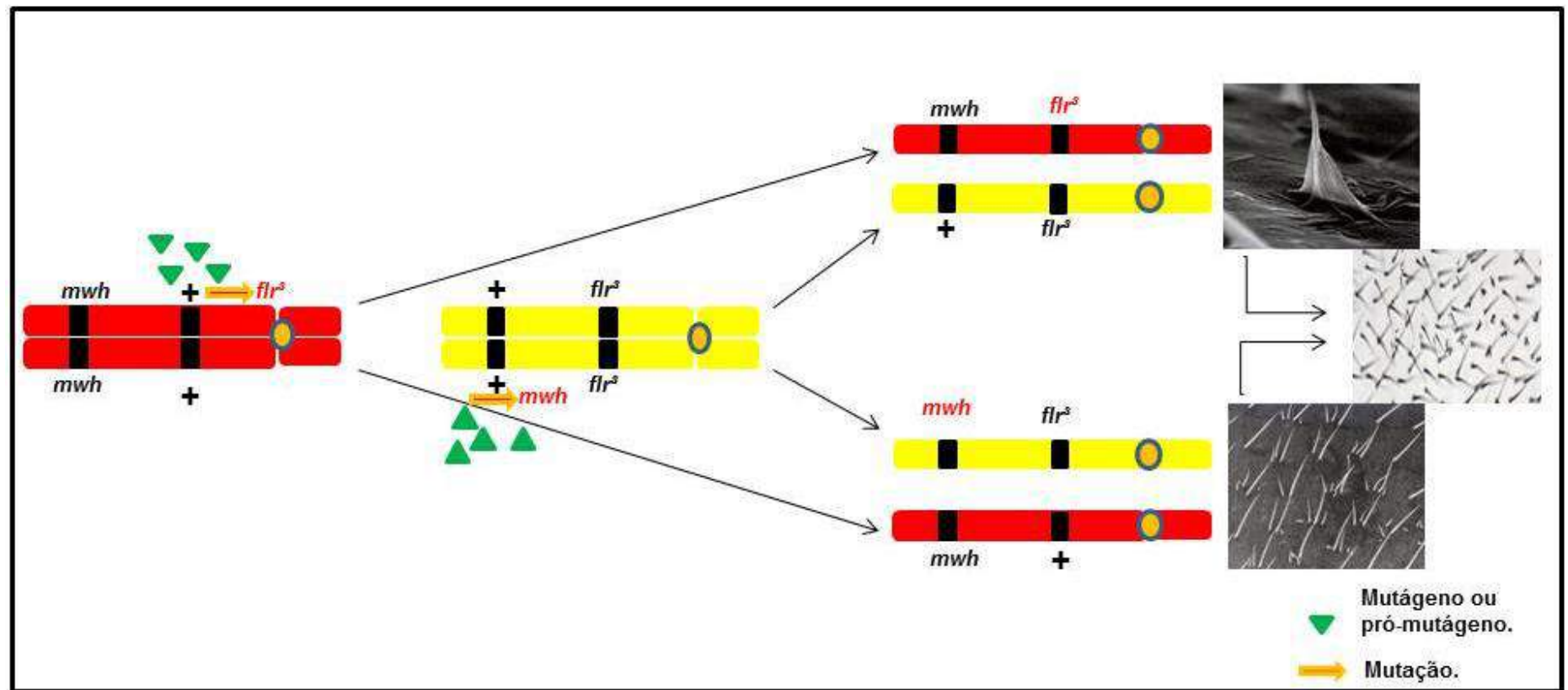


Figura 4. Esquema de divisão mitótica com ocorrência de mutação pontual no gene *flr^s* e *mwh* em células dos discos imaginais de asas de *Drosophila melanogaster*. Adaptado de Graf e W  rgler et al., 1984.

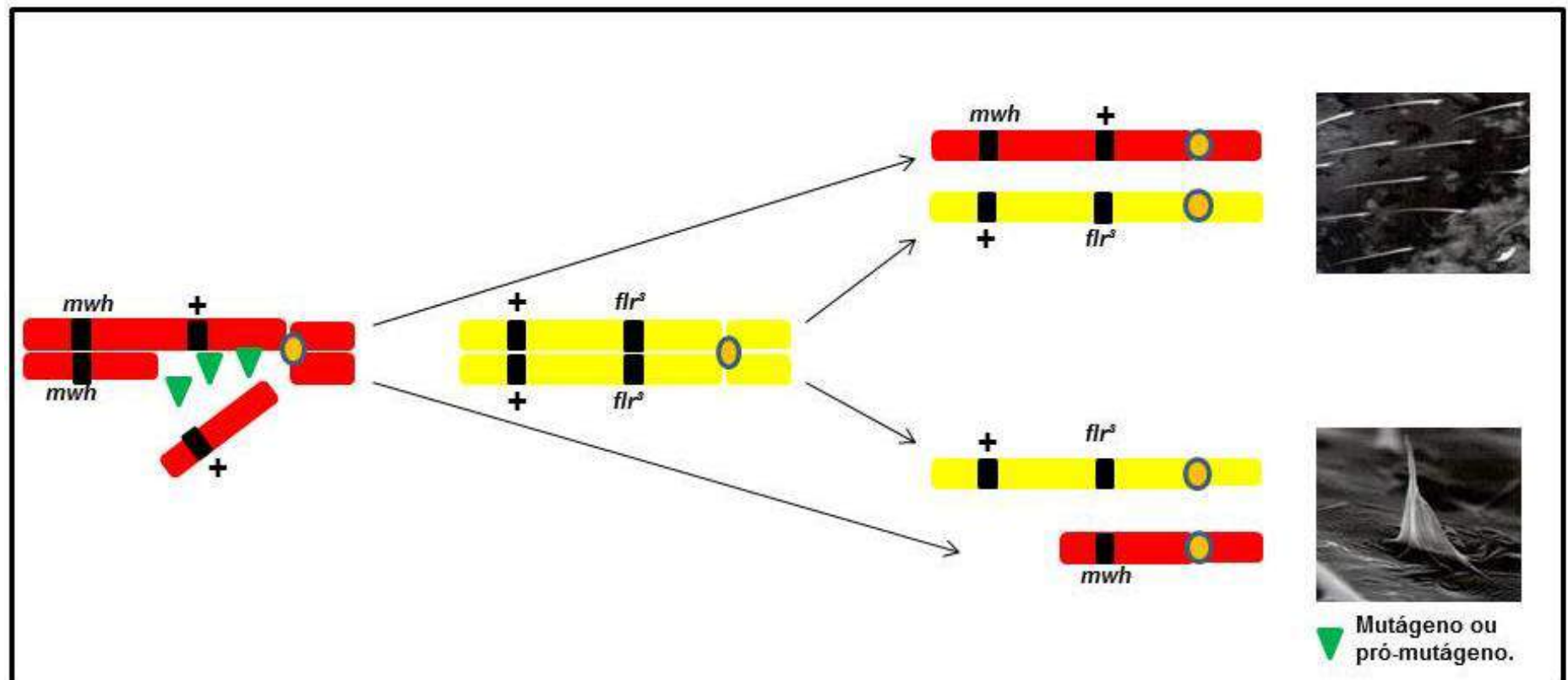


Figura 5. Esquema de divisão mitótica com ocorrência de evento clastogênico no gene *flr³* em células dos discos imaginais de asas de *Drosophila melanogaster*. Adaptado de Graf e Würigler *et al.*, 1984.

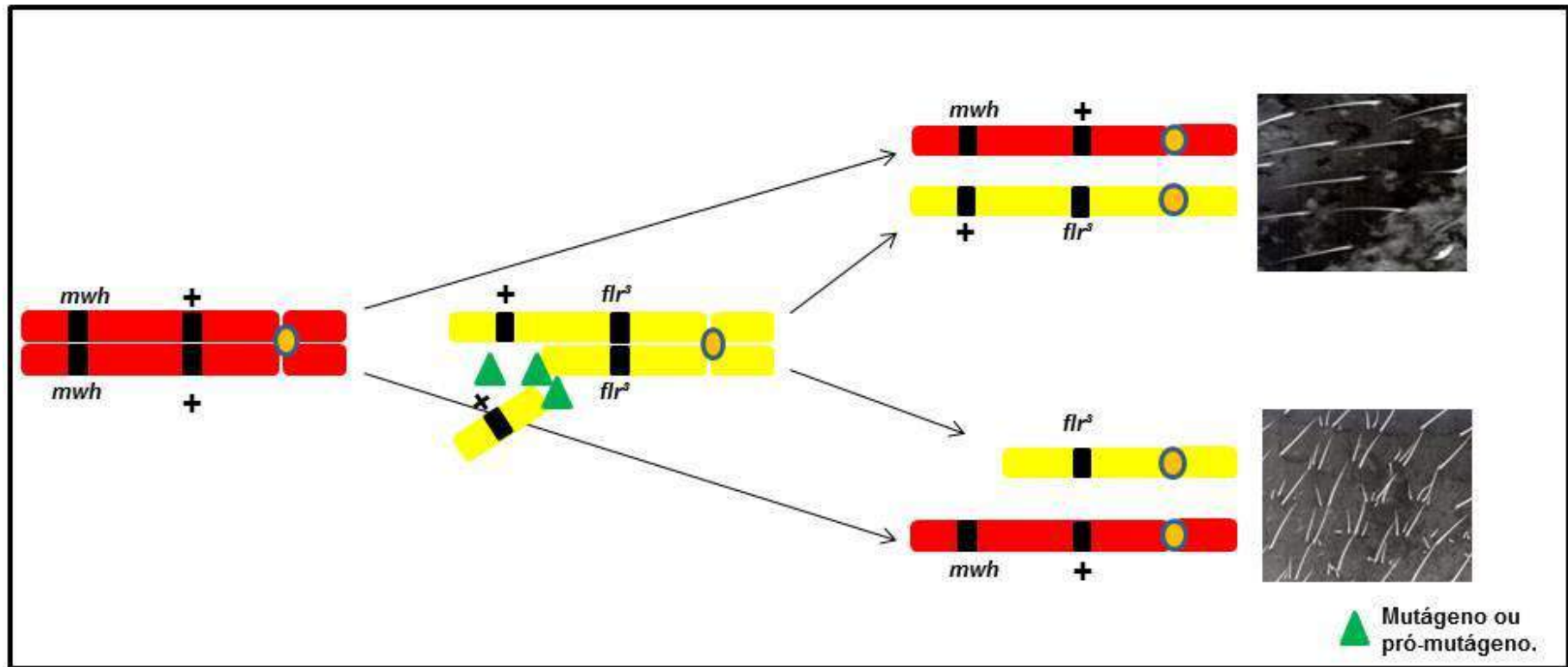


Figura 6. Esquema de divisão mitótica com ocorrência de evento clastogênico no gene *mwh* em células dos discos imaginais de asas de *Drosophila melanogaster*. Adaptado de Graf e Würigler *et al.*, 1984.

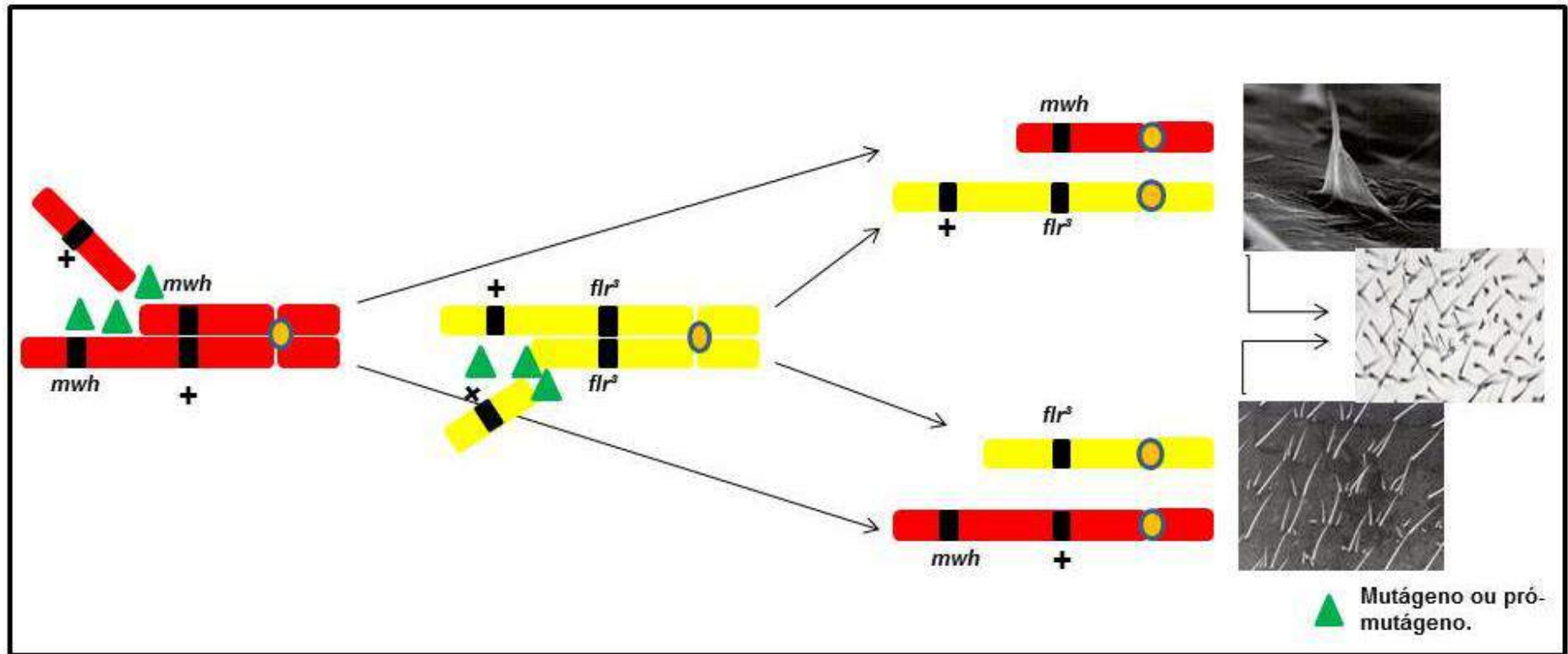


Figura 7. Esquema de divisão mitótica com ocorrência de evento clastogênico no gene *flr³* e *mwh* em células dos discos imaginais de asas de *Drosophila melanogaster*. Adaptado de Graf e Würigler *et al.*, 1984.

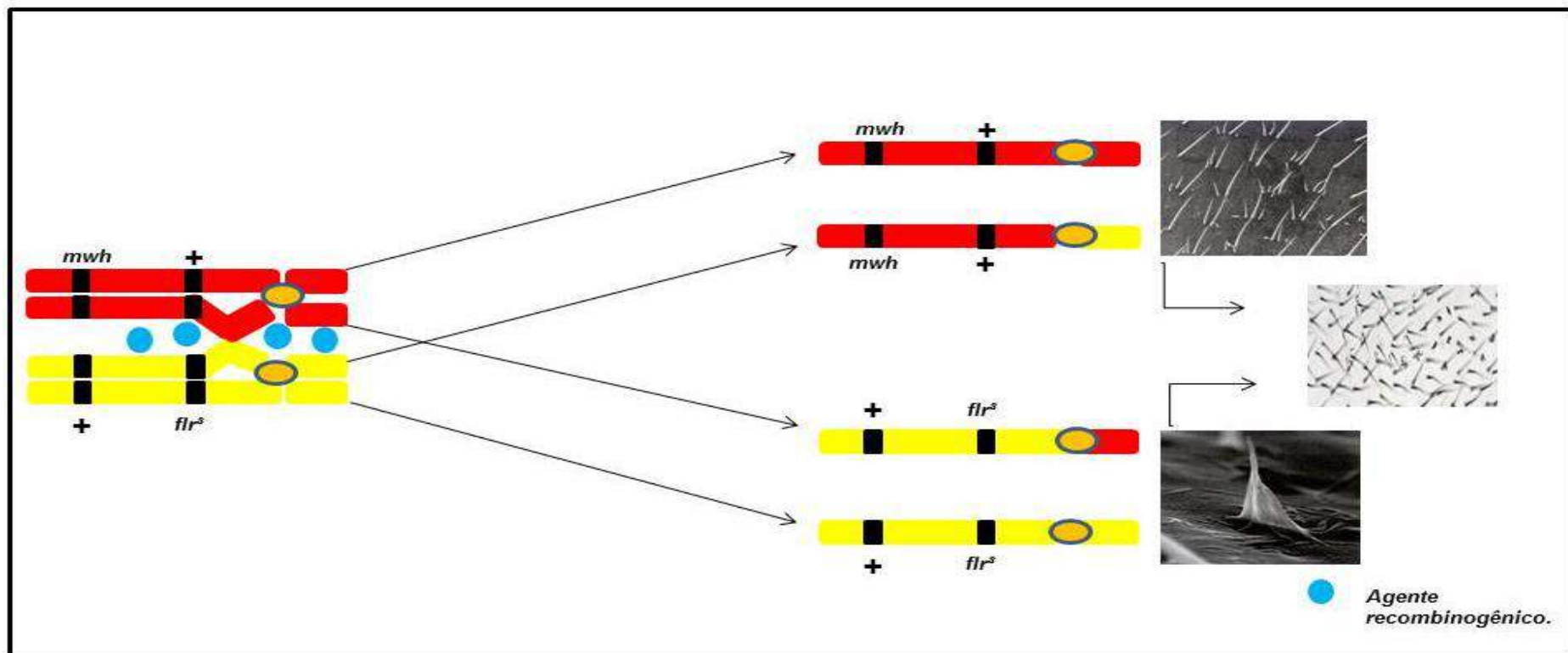


Figura 8. Esquema de divisão mitótica com ocorrência de recombinação mitótica entre o centrômero e o locus *flare* em células dos discos imaginais de asas de *Drosophila melanogaster*. Adaptado de Graf e Würigler *et al.*, 1984.

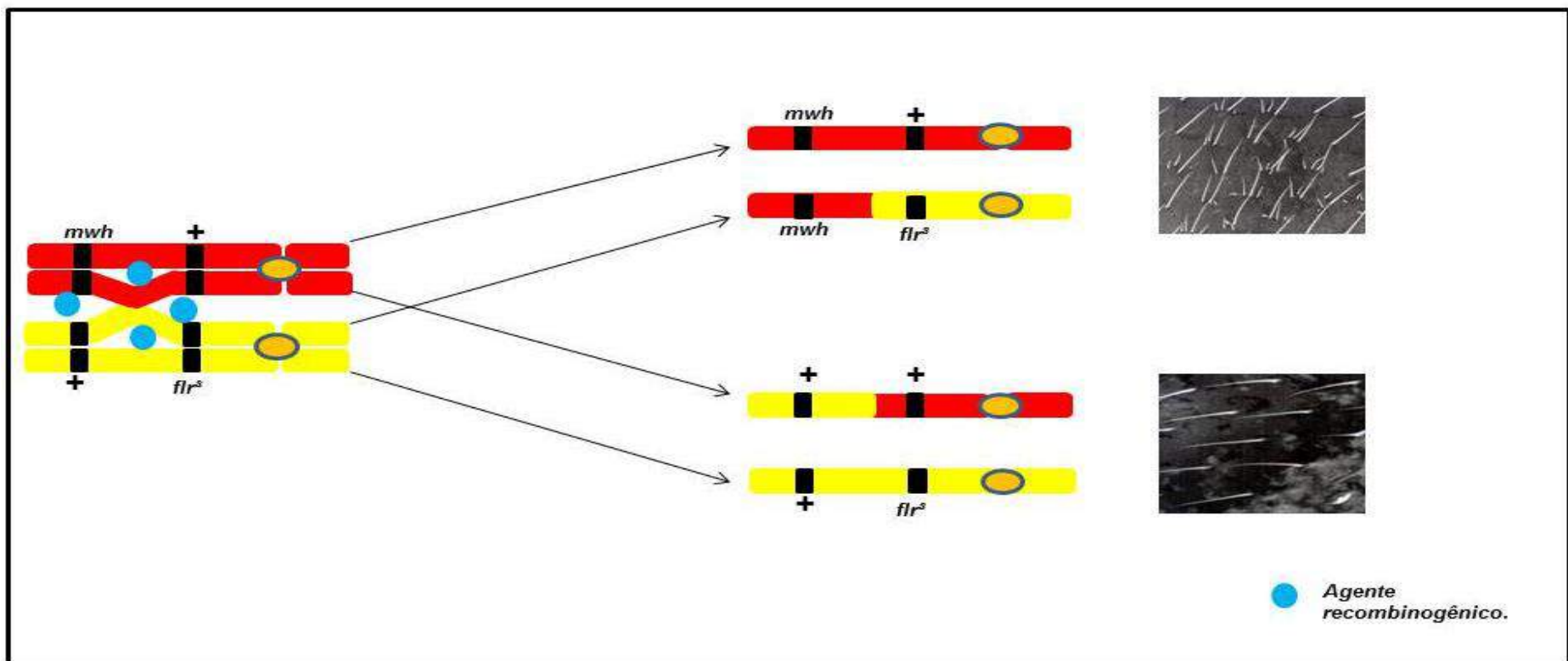


Figura 9. Esquema de divisão mitótica com ocorrência de recombinação mitótica entre o locus *mwh* e o locus *flare* em células dos discos imaginais de asas de *Drosophila melanogaster*. Adaptado de Graf e Würigler *et al.*, 1984.